

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Ali El-Armouche

**“Charakterisierung des Einflusses bariatrischer Chirurgie auf die β -adrenerge
Signalkaskade und damit verbundene Adaptationsprozesse im Glukose- und
Fettsäuremetabolismus“**

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Pia Schlinkert

aus Darmstadt

Dresden 2019

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Anmerkung:

gez.: -----

Vorsitzender der Promotionskommission

Für meine Großeltern, meine Eltern und Max.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Pathomechanismus	1
1.1.3	Therapie	2
1.1.4	Kardiale β -Adrenorezeptoren	2
1.2	Bariatrische Chirurgie	4
1.2.1	Indikationen	4
1.2.2	Adipositas als globales Gesundheitsproblem	4
1.2.3	Operationstechniken	5
1.2.4	Aktuelle Entwicklungen	5
1.2.5	Diabetes: Remission und -prävention	6
1.3	Das Herz und bariatrische Chirurgie	7
1.3.1	Das Herz - Übergewicht und Diabetes	7
1.3.2	Das Herz - Bariatrische Chirurgie	8
1.3.3	Das Herz - Energiehaushalt	9
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Tiermodelle	12
2.1.1.1	Mäuse	12
2.1.1.2	Ratten	12
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.3	Geräte	13
2.1.4	Antikörper	15
2.1.5	Primer	16
2.1.5.1	Primer Ratte	16

2.1.5.2	Primer Maus.....	17
2.1.6	Software.....	17
2.1.7	Kits.....	17
2.1.8	Verbrauchsmittel	18
2.1.9	Statistische Auswertung	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Tierexperimente	20
2.2.1.1	Duodenojejunaler Bypass bei adipösen Sprague-Dawley-Ratten.....	20
2.2.1.2	Hochfettdiät bei C57BL/6NRj-Mäusen.....	22
2.2.2	Molekularbiologie	23
2.2.2.1	Real-Time PCR.....	23
2.2.2.2	Western Blot	24
2.2.3	Differentielle Genexpressionsanalyse	26
2.2.3.1	RNA-Isolation und Sequenzierung	26
2.2.3.2	Ingenuity Pathway Analysis.....	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Charakterisierung des Einflusses von Übergewicht auf das Herz im Mausmodell ..	28
3.1.1	Gewichtsverlauf.....	28
3.1.2	Glukosestoffwechsel	29
3.1.3	Herzfunktion	31
3.1.4	Expression von Glukosetransportern.....	32
3.2	Differentielle Genexpressionsanalyse – RNA-Sequencing nach bariatrischer Operation im Rattenmodell	33
3.2.1	Hauptkomponentenanalyse (Gruppenzugehörigkeit).....	33
3.2.2	Orientierende Genexpressionsanalyse.....	34
3.2.3	Überblick über die Signalwege	36
3.2.3.1	Die oxidative Phosphorylierung	37
3.2.3.2	Der Renin-Angiotensin-Signalweg.....	38
3.2.3.3	Adrenerge Signalwege	39

3.3	Genexpression ausgewählter Gene innerhalb der adrenergen Signalkaskade	41
3.3.1	Expression von β -Adrenorezeptoren	41
3.3.1.1	Auswahl eines Referenzgenes	41
3.3.1.2	Expression der β -Adrenorezeptoren	42
3.3.2	Expression von Calcium-handling Proteinen	44
3.4	Der Fibrosemarker α -SMA	48
3.5	Ausgewählte Gene im Glukose- und Fettsäurestoffwechsel	48
3.6	Die Gene Hif-1 α und Nhe1	50
4	Diskussion	52
4.1	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	53
4.2	Das Herz - Adipositas und Diabetes	53
4.2.1	Funktionelle Analyse mittels Echokardiographie	53
4.2.2	Veränderungen im Glukosemetabolismus	54
4.2.3	Limitationen des HFD-Mausmodells	55
4.3	Das Herz - Bariatrische Chirurgie	57
4.3.1	Differentielle Genexpressionsanalyse – RNA-Sequenzierung	57
4.3.1.1	Oxidative Phosphorylierung und mitochondriale Funktion	57
4.3.1.2	Adrenerge Signalwege	59
4.3.1.3	Limitationen der RNA-Sequenzierung	59
4.3.2	Die adrenerge Signalkaskade	60
4.3.3	Expression von Glukosetransportern	62
4.3.4	Expression von Genen der Fettsäureoxidation	64
4.3.5	Limitationen des DJB-Rattenmodells	64
4.4	Synopsis – Der duodenojejunale Bypass und das Herz	65
4.5	Experimenteller Ausblick	66
5	Zusammenfassung	67
6	Summary	68

7	Anhang	69
7.1	Abkürzungsverzeichnis	69
7.2	Tabellenverzeichnis.....	73
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	74
7.4	Literaturverzeichnis	75
7.5	Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens	84
	7.5.1 Erklärung über die Eigenständigkeit	84
	7.5.2 Erklärung über die Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen der Dissertation.....	85
7.6	Danksagung	86

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen steigen stetig in ihrer Prävalenz und stellen in der westlichen Welt die führende Todesursache dar (Lympopoulos, et al., 2013). Eine spezielle Entität kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Herzinsuffizienz, deren Inzidenz mit weltweit jährlich 2 Millionen neuen Fällen sehr hoch ist (Kemp und Conte, 2012).

Zwei wichtige Typen der Herzinsuffizienz sind zu unterscheiden: Die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) und die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Die Ejektionsfraktion (EF) wird ab einem Wert von unter 50 % als reduziert angesehen (Berliner und Bauersachs, 2017). Eine Herzinsuffizienz entwickelt sich häufig nach einem Herzinfarkt: Durch die Zerstörung von Herzmuskelgewebe wird die Pumpleistung und der Auswurf des Herzens eingeschränkt. Seine Fähigkeit, die Gewebedurchblutung aufrechtzuerhalten, sinkt (Lympopoulos, et al., 2013). Für die Ätiologie scheinen vor allem Diabetes, Hypertonie und ischämische Herzerkrankungen wichtig zu sein (Kemp und Conte, 2012).

1.1.2 Pathomechanismus

Durch den verringerten Auswurf aus dem insuffizienten Herzen sinken der mittlere arterielle Druck (MAP) und die Gewebedurchblutung. Charakteristisch für die Herzinsuffizienz ist die Aktivierung von neurohumeralen Systemen, die kurzfristig eine adäquate Gewebedurchblutung ermöglichen, langfristig allerdings zur Verschlechterung der Herzinsuffizienz-Symptomatik beitragen. Zu diesen Systemen zählen das sympathische Nervensystem, das System der natriuretischen Peptide und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Kemp und Conte, 2012).

Das sympathische Nervensystem reagiert auf den Abfall des MAP mit einer Sekretion von Katecholaminen, die die Herzfrequenz und die Kontraktilität des Herzens steigern können. Durch sympathische Aktivierung und verminderten renalen Blutfluss steigt die Renin-Sekretion, die für vermehrte Natrium-Rückresorption, Aldosteron-Freisetzung und Vasokonstriktion sorgt (Kemp und Conte, 2012). Die natriuretischen Peptide sind als Gegenspieler des adrenergen und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu verstehen: *Atrial natriuretic peptide* (ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP) und *c-type natriuretic peptide* (CNP) werden bei vermehrter Dehnung des Ventrikels bzw. der Atrien freigesetzt und bewirken

direkt an den Gefäßen eine Vasodilatation. Außerdem sorgen sie für eine Wasser- und Salzexkretion, hemmen die Sekretion von Renin, Aldosteron und Antidiuretischem Hormon (ADH). Erhöhte BNP-Werte dienen in der Diagnostik als erster Hinweis für eine sich entwickelnde Herzinsuffizienz und werden als Marker für die Progression der Erkrankung genutzt (Kemp und Conte, 2012).

Durch die dauerhafte verstärkte Aktivierung des sympathischen Nervensystems und den daraus resultierenden hohen Katecholamin-Spiegel ist das adrenerge System im insuffizienten Herzen verändert: Es kommt zu einer Desensitivierung der adrenergen Rezeptoren (Lymeropoulos, et al., 2013). Auch haben Studien gezeigt, dass es bei Herzinsuffizienz des Stadiums NYHA IV zu einer Reduktion der β_1 -mRNA um bis zu 50 % kommen kann, während die Expression des β_2 -Rezeptors unbeeinflusst bleibt (Engelhardt, et al., 1996). Die Interpretation dieser Anpassungsmechanismen ist umstritten. Eine Erklärung könnte sein, dass sich das Herz durch die Desensitivierung und die Herabregulation der Rezeptoren vor den negativen Effekten der chronischen β -Rezeptor-Stimulation schützt (Lohse, et al., 2003).

1.1.3 Therapie

Ziele der Therapie der Herzinsuffizienz sind eine Verbesserung der Symptome (z. B. Ödeme, Dyspnoe) und der Lebensqualität, die Reduktion der Hospitalisierungsraten und eine Verringerung der Mortalität (Ponikowski, et al., 2016).

Die Therapieoptionen für HFrEF-Patienten sind zahlreich. Die Basistherapie beinhaltet ACE-Inhibitoren, Mineralokortikoid-Rezeptorantagonisten und Beta-Adrenorezeptor-Blocker. Darüber hinaus können Diuretika, I_r-Kanalblocker, Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitoren und Digitalispräparate eingesetzt werden, um die Symptome der Patienten zu verbessern, die Progression der Herzinsuffizienz zu verlangsamen und die Kontraktilität aufrechtzuerhalten (Berliner und Bauersachs, 2017). Für HFpEF-Patienten gibt es bis heute keine ausreichenden Therapiemöglichkeiten. Studien konnten bisher bei keiner Kombination aus Standardmedikamenten eine Senkung der Mortalität bei HFpEF-Patienten zeigen. Bei der Therapie der HFpEF-Patienten steht deshalb vor allem die Symptomlinderung mit z.B. Diuretika im Fokus (Berliner und Bauersachs, 2017).

1.1.4 Kardiale β -Adrenorezeptoren

Zwei Gegenspieler regulieren die Aktivität des Herzens: der Parasympathikus und der Sympathikus. Der Parasympathikus wirkt herzfrequenzsenkend (negativ chronotrop), seine Nervenendigungen innervieren jedoch nur die Atrien (Vorhöfe), sodass er kaum Einfluss auf die Funktion der Herzkammern (Ventrikel) und somit auf die Kontraktilität des Herzens hat.

Der Sympathikus hingegen beeinflusst neben der Herzfrequenz auch die Kontraktilität (Inotropie), die Erschlaffungsgeschwindigkeit (Lusitropie) und die Überleitungsgeschwindigkeit elektrischer Signale von den Vorhöfen auf die Ventrikel (Dromotropie) (Lymeropoulos, et al., 2013)

Die vom sympathischen Nervensystem sezernierten Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin wirken im Herzen vor allem über die β -adrenerge Rezeptoren (siehe Abbildung 1). Das Herz exprimiert drei verschiedene Arten von β -Rezeptoren: β_1 -, β_2 - und β_3 -Rezeptoren (El-Armouche und Eschenhagen, 2009). Die Rolle der β_1 - und β_2 -Rezeptoren ist gut erforscht: Ihre Aktivierung sorgt für eine Zunahme der Kontraktilität, der Herzfrequenz und der Überleitungsgeschwindigkeit im AV-Knoten (El-Armouche und Eschenhagen, 2009). Der β_3 -Rezeptor ist der am geringsten exprimierte β -Rezeptor im Herzen, bei Aktivierung kann er über den NO-Synthase-Weg negativ inotrop und so als Gegenspieler kardialer β_1 -, β_2 -Überstimulation wirken (Lymeropoulos, et al., 2013).

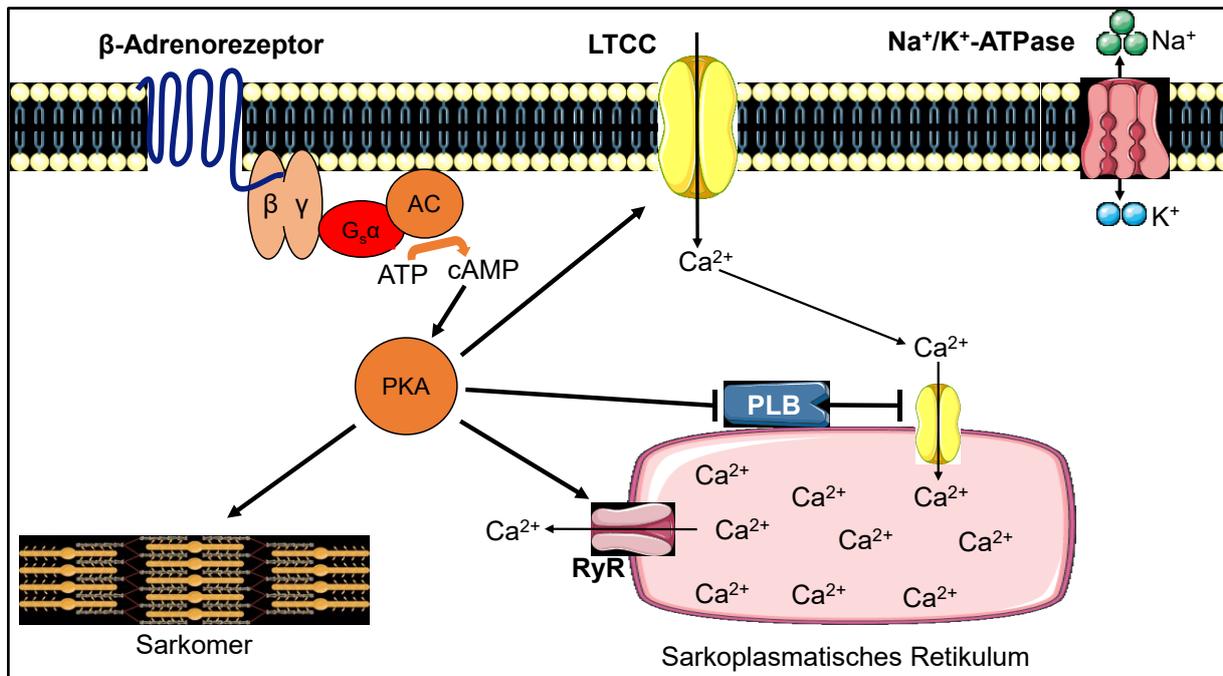


Abbildung 1: Signaltransduktion der kardialen β -Adrenorezeptoren

AC, Adenylatzyklase; ATP, Adenosintriphosphat; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; LTCC, L-Typ-Calcium-Kanal; PKA, Proteinkinase A; PLB, Phospholamban; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SERCA, Sarkoplasmatische Calcium-ATPase. Schematische Darstellung der Signaltransduktion der β -Adrenorezeptoren im Herzen: Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Aktivierung des G-Proteins (Austausch GDP durch GTP). Das G-Protein dissoziiert in die Untereinheiten α und β/γ . Die α -Untereinheit eines G_s -Proteins interagiert mit der Adenylatzyklase und bewirkt so eine vermehrte Synthese des Second messengers cAMP. Zwei Moleküle cAMP aktivieren die Proteinkinase A (PKA), die unter anderem den L-Typ-Calcium-Kanal, Ryanodin-Rezeptoren und Phospholamban phosphoryliert und so deren Aktivität reguliert. Diese Abbildung wurde mithilfe von Servier Medical Art Vorlagen erstellt, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License lizenziert sind; <https://smart.servier.com>.

1.2 Bariatrische Chirurgie

In den vergangenen Jahren gewinnt die bariatrische Chirurgie immer mehr an Bedeutung. Die Effekte dieser Eingriffe sind weitreichend und begrenzen sich keinesfalls nur auf den Glukosestoffwechsel und das Gewicht. Das Herz wird von bariatrischen Eingriffen positiv beeinflusst. Ein besseres Verständnis der Verbindung zwischen bariatrischer Chirurgie und dem Herzen birgt großes Potential, um neue Angriffspunkte in der Therapie der Herzinsuffizienz zu finden.

1.2.1 Indikationen

Aufgrund des Fehlens effizienter, nicht invasiver Therapiemöglichkeiten der Adipositas sind bariatrische Eingriffe momentan die einzige erfolgsversprechende Option, um einen langfristigen Gewichtsverlust zu erzielen (Bruinsma, et al., 2015). Bariatrische Chirurgie greift auf verschiedenste Techniken wie Magenverkleinerung, Magenteilung und die Schaffung neuer Verbindungen innerhalb des Gastrointestinaltraktes zurück (Rubino, 2016). Die bariatrische Chirurgie induziert einen dauerhaften Gewichtsverlust und eine Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM)-Verbesserung über einen Eingriff in die gastrointestinale Anatomie (Bruinsma, et al., 2015).

Seit den 1950er Jahren werden bariatrische Eingriffe bei Menschen mit starkem Übergewicht durchgeführt (Rubino, 2016). Die aktuelle Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie empfiehlt nach Erschöpfung der konservativen Therapie (Ernährungsumstellung, Pharmaka, Bewegungstherapie) für folgende Patientengruppen einen bariatrischen Eingriff: für Patienten mit einem *body mass index* (BMI) $> 40 \text{ kg/m}^2$ ohne Kontraindikationen (bspw. Schwangerschaft, maligne Erkrankung und instabile psychopathologische Zustände) und für Patienten mit einem BMI zwischen 35 und 40 mit einer/mehreren Adipositas-assoziierten Begleiterkrankungen. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie kann ebenfalls für Patienten mit einem BMI zwischen 30 und 35 und einem T2DM ein bariatrischer Eingriff in Erwägung gezogen werden (DGAV-CAADIP, 2018).

1.2.2 Adipositas als globales Gesundheitsproblem

Definiert ist Übergewicht bei Erwachsenen durch einen BMI von $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$. Adipositas beginnt ab einem BMI von 30 kg/m^2 (Lavie, et al., 2009). Adipositas und Übergewicht werden zunehmend zum globalen Gesundheitsproblem. Schon 2015 gab es mehr als eine halbe Milliarde übergewichtige Erwachsene und 40 Millionen übergewichtige Kinder auf der Welt (Hamzeh, et al., 2017). Statistiker rechnen damit, dass sowohl Inzidenz als auch Prävalenz von Adipositas stark zunehmen werden: Für die nächsten 50 Jahre prognostizieren sie eine

Verdopplung der übergewichtigen und eine Verdreifachung der adipösen Menschen (Hamzeh, et al., 2017). Neben Übergewicht hat sich auch T2DM zum ernsthaften Gesundheitsproblem in den Industrieländern entwickelt. Vorhersagen rechnen mit einer stetigen Zunahme der Patientenzahlen in den kommenden 20 Jahren (Wu, et al., 2014). Übergewicht wurde als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung von T2DM identifiziert. Es begünstigt die Entwicklung einer Insulinresistenz und trägt zur Progression von Diabetes bei. Weitere Risikofaktoren sind körperliche Inaktivität, Rauchen und Alkoholkonsum (Wu, et al., 2014).

1.2.3 Operationstechniken

Bei einem Roux-en-Y-Magenbypass (RYGB) wird das Magenvolumen auf 20 ml verkleinert, das Jejunum wird 50 cm distal des Treitz-Bandes durchtrennt und eine End-zu-Seit-Anastomose zwischen Magen und distalem Jejunum wird gebildet (alimentärer Ast). Der proximale Teil des Jejunums wird über eine Seit-zu-Seit-Anastomose 100 cm distal der Gastrojejunostomie mit dem distalen Jejunum verbunden (biliärer Ast). So werden Teile des Magens, das komplette Duodenum und das proximale Jejunum vom Nahrungsfluss exkludiert (Rubino, et al., 2006; Rubino, et al., 2004). Durch die Anastomosierung des duodenojejunalen (biliären) Astes mit dem alimentären Ast gelangen die biliopankreatisch sezernierten Verdauungssäfte weiterhin in den Dünndarm (Rubino, et al., 2006).

Die immer populärer werdende Technik des Schlauchmagens (*sleeve gastrectomy*, SG) wird sowohl bei jugendlichen als auch erwachsenen Patienten zunehmend verwendet (McGuire, et al., 2014). Die SG-Technik beinhaltet die Entfernung von 80 % des Fundus und Korpus des Magens. Dabei wird das Volumen von ca. 2,5 l auf 250 ml verringert (Dixon, et al., 2015). Die Schlauchmagen-Operation kann mit einem sogenannten duodenojejunalen Bypass (DJB) verbunden werden. Bei diesem kombinierten Verfahren wird der Magen wie beim Schlauchmagen verkleinert und ähnlich wie beim RYGB ein biliopankreatischer Ast (100 cm lang) und ein alimentärer Ast (150 cm) gebildet, sodass Duodenum und Teile des Jejunums vom Nahrungsfluss exkludiert sind (Seki, et al., 2018).

1.2.4 Aktuelle Entwicklungen

Die Zahl der durchgeführten bariatrischen Eingriffe hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen: 1997 wurde von ca. 40.000 Operationen weltweit berichtet, 2013 hingegen von bereits über 450.000 (Angrisani, et al., 2015). Die Technik des RYGB war 2013 das am häufigsten durchgeführte Verfahren (45 % der durchgeführten Eingriffe). Nach und nach gewinnen allerdings auch andere Techniken wie die Schlauchmagen-Operation (37 %) und das Magenband (10 %, engl. adjustable gastric banding) an Beliebtheit (Angrisani, et al., 2015).

Auch in Europa spielt die bariatrische Chirurgie eine immer wichtigere Rolle. Die Zahl der Eingriffe ist auch hier in nur zehn Jahren um ein Vielfaches angestiegen: 2003 gab es nur 33.771 bariatrische Eingriffe in Europa, 2013 zählte man 125.185 (Angrisani, et al., 2015). Der RYGB ist auch in Europa das am häufigsten durchgeführte Verfahren. Es wird nach und nach aber von der Schlauchmagen-Operation abgelöst. 2013 machte die Schlauchmagen-Operation 37 % der Eingriffe aus, ein RYGB wurde in 38 % der Operationen durchgeführt. Ein Magenband wurde nur noch in 15 % der Fälle eingesetzt (Angrisani, et al., 2015).

1.2.5 Diabetes: Remission und -prävention

Bariatrische Eingriffe wie der RYGB sorgen bei den Patienten nicht nur für Gewichtsverlust. Sie haben weitreichende Effekte auf den ganzen Körper.

Die Swedish Obese Subjects-Studie (SOS-Studie) ist eine prospektive Kohortenstudie über die Langzeitauswirkungen von bariatrischen Eingriffen, sie beinhaltete eine Operations- und eine Kontrollgruppe. Die Operationsgruppe erhielt einen bariatrischen Eingriff (verschiedene Techniken) und die Kontrollgruppe eine Kombination aus Lifestyle-Intervention und Pharmakotherapie zur Behandlung des Übergewichts (Sjöström, 2013). Sjöström et al. analysierten dabei die Auswirkungen von bariatrischen Eingriffen auf Diabetesremission und diabetes-assoziierte Langzeitfolgen. Sie konnten zeigen, dass die Diabetesremissionrate, die als Nüchternblutglukose von weniger als 100 mg/dl und fehlende Diabetesmedikation definiert war, nach zwei Jahren in der OP-Gruppe deutlich höher war (72,3 %, Kontrollgruppe: 16,4 %). Außerdem zeigte sich, dass bariatrische Eingriffe mit weniger mikro- und makrovaskulären Komplikationen einhergingen (Sjöström, et al., 2014). Bei bereits an Diabetes erkrankten Patienten kann bariatrische Chirurgie darüber hinaus eine Remission bewirken. Bei noch nicht diabetischen Patienten scheint sie eine Diabetesprävention darzustellen (Sjöström, 2013). Die Studie belegt, dass bariatrische Eingriffe das Risiko, Diabetes zu entwickeln, im Vergleich zu normaler medikamentöser Versorgung zwei, zehn und 15 Jahren nach Operation um 96 %, 84 % und 78 % senken (Sjöström, 2013).

Die Exklusion des Duodenums ist für die positiven Effekte auf den Glukosestoffwechsel von großer Bedeutung: Bei Goto-Kakizaki-Ratten (T2DM, nicht übergewichtig) wird die Insulinsensitivität durch Resektion oder Bypass des Duodenums und proximalen Jejunums verbessert (Salinari, et al., 2014). Ein Versuch mit verschiedenen Operationstechniken und Reoperationen erbrachte das Ergebnis, dass die Exklusion des proximalen Intestinums nötig ist, um eine Verbesserung der Glukosetoleranz zu bewirken. Es konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass eine verringerte Kalorienaufnahme nach Bypass für den positiven Effekt sorgt: DJB-operierte Ratten zeigten eine bessere Glukosetoleranz als scheinoperierte Ratten mit identischer Kalorienaufnahme (Rubino, et al., 2006).

1.3 Das Herz und bariatrische Chirurgie

Bariatrische Eingriffe senken das Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln und verbessern die linksventrikuläre Funktion. Die Erforschung der Effekte von bariatrischer Chirurgie auf das Herz erlaubt es, ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu entwickeln und möglicherweise neue Therapieoptionen zu entdecken.

1.3.1 Das Herz - Übergewicht und Diabetes

Übergewicht und Diabetes können zahlreiche Veränderungen in der Hämodynamik und dem kardiovaskulären System nach sich ziehen. Übergewicht allein erhöht das zirkulierende Blutvolumen und den kardialen Auswurf, der systemische Gefäßwiderstand und der Füllungsdruck nehmen zu – die Arbeitsbelastung des ganzen Herzens nimmt zu (Lavie, et al., 2009). Als Folge dieser Veränderungen steigt das Risiko für linksventrikuläre Hypertrophie, konzentrisches Remodeling, systolische und diastolische Dysfunktion, Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern. Wichtige kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen werden durch Übergewicht negativ beeinflusst (Lavie, et al., 2009).

Übergewicht und Diabetes treten häufig gemeinsam auf und bedingen sich gegenseitig. Im diabetischen Herzen findet man vermehrt Fibrose, intramyokardiale Inflammation, gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, pro-apoptotische Signale und myokardiale Lipidakkumulation (Bugger und Abel, 2014). Auch der Stoffwechsel des diabetischen Herzens ist eindeutig beeinflusst: Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus zu einer gesteigerten kardialen Fettsäureoxidation führt (Fillmore, et al., 2014). Dieser vermehrte Umsatz resultierte vermutlich aus erhöhten Fettsäure- und Triacylglycerin-Spiegeln im Serum und einer vermehrten Aktivität von PPAR- α , das die Expression von Genen der Fettsäureoxidation steigert (Bugger und Abel, 2014; Finck, et al., 2002). Neben dem Fettstoffwechsel ist auch der Zuckerstoffwechsel verändert: Die Glukose-Aufnahme im diabetischen Herzen ist verringert, was möglicherweise durch eine verminderte Expression von Glukosetransporter 4 (GLUT4) begründet ist (Bugger und Abel, 2014).

Das *Calcium handling* der Kardiomyozyten wird ebenfalls durch Diabetes beeinflusst: Im ob/ob-Mausmodell, einem Leptin-defizienten Mausmodell für Typ-2-Diabetes, zeigte sich eine verminderte Reaktion auf extrazelluläres Calcium und eine verminderte Aktivität der Sarkoplasmatische Calcium-ATPase 2a (SERCA2a) (Banerjee, et al., 2009; Bugger und Abel, 2014). Ein weiteres diabetisches Mausmodell mit ausgeprägter Insulintoleranz (db/db) wies reduzierte diastolische und systolische Calcium-Level auf (Belke, et al., 2004; Bugger und

Abel, 2014). Eine direkte Verbindung zwischen dem veränderten Glukosestoffwechsel und der kontraktile Dysfunktion bei T2DM-Patienten wurde vor kurzem entdeckt: Im Herzen von diabetischen Menschen und Ratten führte akute Hyperglykämie zur Aktivierung der CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase 2), deren Aktivität direkte Auswirkungen auf Ionenkanäle, *Calcium handling* und Transkription hat (Erickson, et al., 2013).

All diese Veränderungen im diabetischen Herzen tragen dazu bei, dass die Häufigkeit von kardiovaskulären Ereignissen, die kardiovaskuläre Mortalität und das Risiko für ischämische Ereignisse bei Patienten mit Diabetes mellitus deutlich höher ist. Das Risiko aufgrund einer Herzinsuffizienz hospitalisiert zu werden, ist unter Diabetespatienten um ein Drittel höher als unter nicht-diabetischen Patienten (Cavender, et al., 2015).

1.3.2 Das Herz - Bariatrische Chirurgie

Bariatrische Eingriffe haben weitreichende Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System. Benotti et al. zeigten, dass das Risiko, ein schweres kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, in der RYGB-Kohorte auch acht Jahre nach dem Eingriff nur etwa halb so hoch ist wie in der Kontrollgruppe (Benotti, et al., 2017). Schwere kardiovaskuläre Ereignisse waren: Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Des Weiteren zeigten sie, dass auch fünf Jahre nach dem Eingriff wichtige kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Cholesterin-Level, systolischer Blutdruck, BMI und Diabetes in der RYGB-Gruppe klar niedriger waren. Der Framingham-Risk-Score, der das kardiovaskuläre Risiko in den nächsten zehn Jahren beschreibt, war ebenfalls deutlich geringer in der RYGB-Gruppe (Benotti, et al., 2017). Ein systematisches Review von Studien, die prä- und postoperative Analysen der kardialen Struktur und Funktion durchgeführt hatten, konnte eine Verbesserung der Herzfunktion nach bariatrischer Chirurgie zeigen: Die linksventrikuläre Masse nahm ab und die Ejektionsfraktion stieg. Der minimale Follow-up-Zeitraum betrug drei Monate (Aggarwal, et al., 2016).

Bariatrische Eingriffe sorgen neben den direkten Effekten auf das Herz auch für ein Absinken des C-reaktiven Proteins und anderer Inflammationsmarker. Oxidativer Stress und Inflammation spielen beim metabolischen Syndrom mit Übergewicht und Diabetes eine wichtige Rolle und begünstigen die Entwicklung von Arteriosklerose. Die Reduktion dieser inflammatorischen Biomarker trägt mutmaßlich zur Senkung des kardiovaskulären Risikos nach bariatrischer Intervention bei (Ashrafian, et al., 2008).

Viele Erkenntnisse zum Einfluss von bariatrischer Chirurgie auf das Herz sind vor allem aus dem Tiermodell bekannt. Im Rattenmodell wurden SG, DJB und Sham-Eingriff und deren Auswirkung auf das Herz verglichen. Ein DJB war trotz fehlendem starken Gewichtsverlust in der Lage, wichtige Funktionsparameter des Herzens positiv zu beeinflussen: Acht Wochen

nach Operation war die Ejektionsfraktion (EF) und die Kontraktilität, gemessen als das *Fractional shortening* (FS), erhöht und die Dicke der hinteren Wand des linken Ventrikel verkleinert. Das deutet darauf hin, dass ein Bypass des Duodenum auch ohne nennenswerten Gewichtsverlust eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion bewirkt (Zhang, et al., 2017). 16 Wochen nach einem DJB zeigten sich im Rattenmodell bei fehlendem signifikanten Gewichtsverlust sowohl eine diastolische als auch systolisch verbesserte Herzfunktion: Die DJB-Gruppe wies niedrigere BNP-Werte, eine gesteigerte Ejektionsfraktion und FS auf. Weiterhin fanden sich in den DJB-Herzen weniger myokardiale Fettablagerungen, der systolische Calcium-Peak war höher und die Dauer des Calciumstroms kürzer. Nicht nur funktionelle Unterschiede wurden deutlich, auch die Expression wichtiger Kontraktilitätsproteine war in der DJB-Gruppe verändert. Die DJB-Kohorte zeigte eine vermehrte kardiale SERCA2a- und Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) -Expression und eine verstärkte Phosphorylierung von PLB (Huang, et al., 2018). Die Veränderungen der myokardialen Expression von SERCA2a und RyR2 trug hier möglicherweise zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der Normalisierung der Calcium-Homöostase bei (Huang, et al., 2018).

1.3.3 Das Herz - Energiehaushalt

Der große ATP-Verbrauch des Herzens wird größtenteils durch die Oxidation von Fettsäuren und Kohlenhydraten gewährleistet (Szablewski, 2017). Unter physiologischen Bedingungen werden 60-90 % des kardialen ATPs durch die Oxidation von Fettsäuren erzeugt. Im Zytoplasma der Kardiomyozyten werden die Fettsäuren zu Acyl-CoA aktiviert, von den Fettsäure-Acyl-CoA-Produkten werden 75 % durch Membranshuttles wie Cpt-1 und -2 (Carnitine palmitoyltransferase-1/2) ins Mitochondrium transportiert. Im Mitochondrium findet dann die β -Oxidation statt. 25 % der Fettsäure-Acyl-CoA-Produkte werden nicht direkt ins Mitochondrium transportiert, sondern als Triglyzeride für spätere Oxidationen gespeichert (Azevedo, et al., 2013). Glukose und Laktat werden für 25-30 % der myokardialen ATP-Produktion verantwortlich gemacht (Shao und Tian, 2015). Die Glukoseaufnahme in die Kardiomyozyten erfolgt zum Großteil über erleichterte Diffusion durch die Glukosetransporter-Familie GLUT (siehe Abbildung 2). Im Herzen sind GLUT1 und GLUT4 die wichtigsten Vertreter dieser Familie. GLUT1 ist verantwortlich für den Insulin-unabhängigen, GLUT4 für den Insulin-abhängigen Glukosetransport in die Zelle. Unter Insulin-Stimulation wird GLUT4 vermehrt in die Zellmembran eingebaut und so die Glukoseaufnahme in die Herzmuskelzelle gesteigert (Azevedo, et al., 2013).

Die Expression von GLUT1 wird durch chronische Hypoxie gesteigert, was scheinbar der Apoptose von Kardiomyozyten entgegenwirkt. Man vermutet, dass Hypoxie wie in anderen

Zelltypen auch in Kardiomyozyten direkt durch Bindung von hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) an den GLUT1-Promoter wirkt. Fasten (48 h) induziert eine Herabregulation der Expression von GLUT1. Ein Anstieg von Glukose oder freien Fettsäuren im Plasma sorgt für eine GLUT1-Hochregulation. Insgesamt lässt sich sagen: Die GLUT1-Expression kann durch viele verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Insulin und auch der metabolische Status des Herzmuskels spielen eine wichtige Rolle (Shao und Tian, 2015). Neben der GLUT-Familie ist auch der Transporter *sodium-dependent glucose transporter 1* (SGLT1) von Bedeutung bei der Glukoseaufnahme des Herzens (siehe Abbildung 2). SGLT1 ist vor allem im Sarkolemm lokalisiert. Vermutlich ist auch dieser Transporter für die Hormon-stimulierte Aufnahme von Glukose wichtig ist (Szablewski, 2017).

Glukose ist nicht die Hauptenergiequelle des Herzens. Unter bestimmten Bedingungen wie Stress, Ischämie und Hypertrophie kann sich die Substratpräferenz von Fettsäuren in Richtung Glukose verschieben (Shao und Tian, 2015). Hypertrophierte Herzen weisen eine verstärkte Glykolyse und eine höhere Glukoseaufnahme auf (Kolwicz und Tian, 2011).

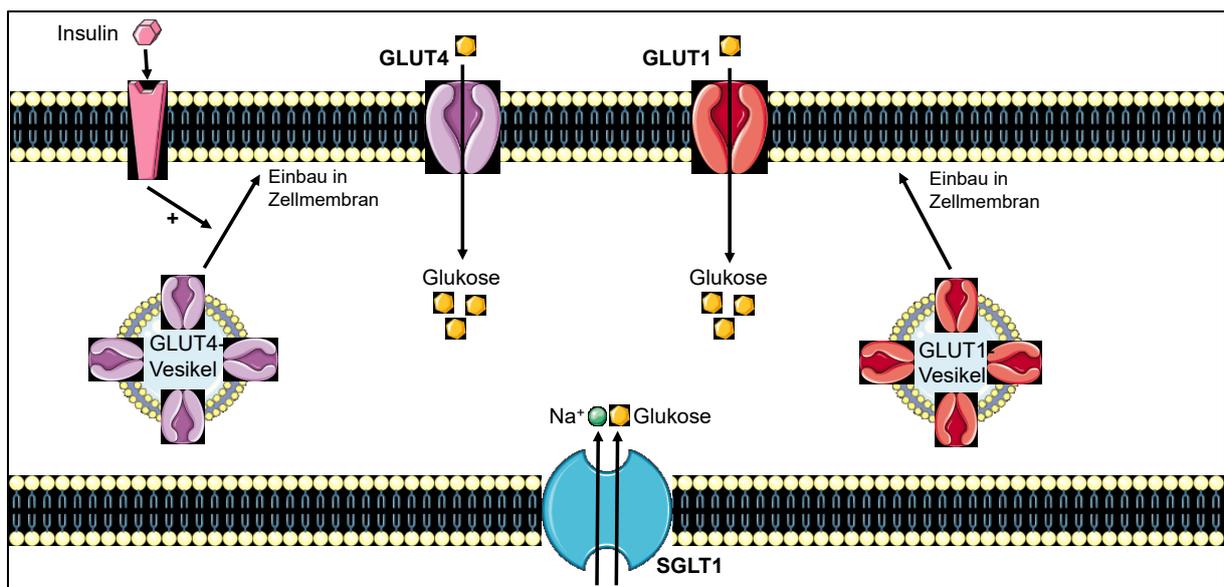


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glukoseaufnahme im Herzen

Vereinfachte Darstellung der Aufnahme von Glukose im Herzen. Zu sehen sind die wichtigsten Glukosetransporter im Herzen: SGLT1, GLUT1, GLUT4. Diese Abbildung wurde mithilfe von Servier Medical Art Vorlagen erstellt, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License lizenziert sind; <https://smart.servier.com>.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bariatrische Eingriffe sorgen gewichtsunabhängig für eine Verbesserung der Herzfunktion und senken das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, doch bisher ist wenig über die zugrunde liegenden Mechanismen bekannt. In dieser Arbeit soll zunächst der Einfluss einer Hochfettdiät auf die Herzfunktion im Mausmodell mittels Echokardiographie analysiert werden. Im zweiten Schritt sollen durch bariatrische Eingriffe hervorgerufene Veränderungen im kardialen Expressionsmuster untersucht werden. Das tiefere Verständnis der Verbindung zwischen gastrointestinaler Intervention und dem Herzen birgt womöglich großes Potenzial für Therapieansätze und das bessere Verständnis der Auswirkungen von Adipositas und Diabetes auf das Herz.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die folgenden Fragestellungen zu klären:

1. Auswirkungen von Übergewicht und Diabetes auf den kardialen Glukosestoffwechsel
 - Inwieweit ändert sich die Herzfunktion von Mäusen im Rahmen einer chronischen Hochfettdiät (zwölf Wochen)?
 - Welche Adaptationsprozesse finden in der Genexpression kardialer Glukosestoffwechsel-Gene statt?

Um den Einfluss von Adipositas und T2DM auf die Funktion und den Stoffwechsel des Herzens analysieren zu können, wurde männlichen C57BL/6-Mäusen für zwölf Wochen eine Hochfettdiät gefüttert und die Herzen funktionell und molekularbiologisch untersucht.

2. Molekulare Veränderungen im Herzen nach bariatrischer Intervention
 - Wie ändert sich das Expressionsmuster kardialer Gene nach bariatrischer Intervention?
 - Wird die Expression der β -Adrenorezeptoren oder der Calcium-handling Proteine durch eine bariatrische Intervention beeinflusst?
 - Inwieweit verändern sich die Expressionsmuster kardialer Gene, die für Glukose- und Fettsäurestoffwechsel relevant sind?

Um die Fragestellungen beantworten zu können, wurden Herzen von Ratten nach bariatrischem Eingriff untersucht. Vor dem Eingriff erhielten die Ratten eine Hochfettdiät, sodass Adipositas und Diabetes induziert wurden. Bei der durchgeführten bariatrischen Intervention handelte es sich um einen DJB (duodenojejunaler Bypass), die Kontrollgruppe wurde einem Schein-Eingriff (Sham-Operation) unterzogen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodelle

2.1.1.1 Mäuse

Für die Hochfettfütterung wurden männliche C57BL/6NRj-Mäuse verwendet. Sie wurden im Alter von acht Wochen von der Firma Janvier (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) erworben. Die Tiere wurden unter Barrierebedingungen und unter der Aufsicht durch tiermedizinisches und -pflegerisches Personal im Experimentellen Zentrum des Medizinisch-Theoretischen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden gehalten. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltung und alle Untersuchungen der Tiere entsprachen den gesetzlichen Bestimmungen (TVV 1/2017) und den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA).

2.1.1.2 Ratten

Durch die Zusammenarbeit mit Professor Francesco Rubino, Professor für Metabolische und Bariatrische Chirurgie am King's College London, im Rahmen des IRTG2251 „Immunological and Cellular Strategies in Metabolic Disease“ stand für die Untersuchungen dieser Arbeit linksventrikuläres Gewebe eines Rattenmodells nach bariatrischer Intervention zur Verfügung. Die männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden im Tierstall des James Black Centers des King's College in London unter Einhaltung aller gesetzlichen Bestimmungen gehalten.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel

Substanz	Firma
20%ige Glukoselösung	Braun
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DNA molecular weight standard (1 kb DNA ladder)	Thermo Scientific
Elektrodengel	Dahlhausen
Glukose-Eichlösung	Accu Check Aviva
Glukosemessstreifen	Accu Check Aviva
HD-Green	Intas
High fat diet Futter D12492, HFD (Maus)	Brogaarden

Material und Methoden

High fat diet Futter TD.88137, HFD (Ratte)	Envigo, UK
Insulin, Insuman® Infusat	Sanofi
Isofluran	Baxter
Loading dye 6x (agarose gel electrophoresis)	Thermo Scientific
Low molecular weight marker, LMW	GE Healthcare
Methanol	Roth
Milchpulver	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Normal diet Futter D12450B (Maus)	Brogaarden
Normal diet Futter, ND (Ratte)	Envigo, UK
Nuklease-freies, RNase-freies Wasser	Promega™
peqGOLD Universal Agarose	peqLab
Phosphate Buffer Saline Dulbecco's (PBS)	Biochrom
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Ponceau-S	Sigma Aldrich
Precision Plus Protein™ Standards	BioRad
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applichem
TRIzol®	ThermoFischer Scientific
Tween 20	Roth

2.1.3 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Funktion	Produktbezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammern	SGU-020T-2, MGU-102uT; 41-2025, 40-1515	C.B.S. Scientific Co.; peqlab
Analysewaage	BP3100S	Sartorius
Autoklav	Vakulab HP	Münchener Medizin Mechanik GmbH
Begasungsbrutschrank	BBD 6220 CO2 Inkubator	Thermo Scientific
Blot-System Western Blot	Mini-PROTEAN 3 Cell	BioRad
Blutzuckermessgerät	AccuCheck® Aviva 3 Set mg/dl	AccuCheck®

Material und Methoden

Echokardiographie	Vevo [®] 3100	Visualsonics
Gelelektrophorese-System Western Blot	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Biorad
Gradienten-PCR-Cycler	Mastercycler nexus gradient	Eppendorf
Homogenisator	TissueLyser LT	Qiagen [®]
Horizontalschüttler	Vibrax-VXR electronic	IKA
Kühlzentrifuge	3K30	Sigma-Aldrich
Magnetrührer	Variomag Mono	Thermo Scientific
Mikropipetten	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Labnet, Gilson
Mikrowellenherd	HF 22023	Siemens
Multifunktionsplattenreader	Synergy HTX	BioTek
Multipipetten	50 µl; 300 µl	Brand; Eppendorf
pH-Meter	pH Level 2	InoLab
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann
Real-Time PCR Cycler	CFX96 Touch [™] Real-Time PCR	BioRad
Reinstwasseranlage	Q-Pod Milli-Q	Millipore
Rollenmischer	RollerMixer SRT2	Stuart
Scanner	Scanjet 4890	HP
Spannungsquellen	Power Pac Basic, Power Pac 200, Power Pac HC	Biorad
Sterilbank	HeraSafe KS	Thermo Scientific
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Spectrafuge Mini	Labnet International
Tischzentrifuge für PCR- Tube-Strips	Perfect spin mini	Peqlab
UV-Vis Spectrophotometer	NanoDrop [™] One	ThermoFischer Scientific

Vortex	MS2 Minishaker	IKA
Wasserbad	M12	Lauda
Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße	Microfuge 18	Beckmann Coulter
Zentrifuge für 96-well Platten und Falcons	Heraeus Megafuge 8R	Thermo Scientific

2.1.4 Antikörper

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Bezeichnung/ Spezifität	Konjugat	Konzentra- tion	Hersteller, Artikelnummer	Bande kDa
cMyBP-C	Kaninchen	1:1000	Abcam, ab-133499	140
cMyBP-C-Ser 282	Kaninchen	1:2000	Enzo, ALX-215-057-R050	140
CSQ	Kaninchen	1:2000	Thermo, #PA1-913	54
EEF2	Kaninchen	1:50000	Abcam, ab408102	95
GLUT1	Kaninchen	1:1000	Abcam, ab652	55
PLB-ges	Maus	1:5000	Badrilla Ltd., A010-14	6
PLB-Ser 16	Kaninchen	1:5000	Badrilla Ltd., A010-12	6
PLB-Thr 17	Kaninchen	1:5000	Badrilla Ltd., A010-13	6
SERCA2a	Ziege	1:1000	Santa Cruz, sc-8094	110
Troponin-I ges	Kaninchen	1:1000	Abcam, ab47003	30
Troponin-I-Ser 23/24	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, #40045	30
α -SMA	Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich, A5228	42

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung/ Spezifität	Konjugat	Konzentration	Hersteller, Artikelnummer
Anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase	1:10000	Sigma-Aldrich, A3682
Anti-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	1:10000	Jackson Immuno Research, 111-035-045
Anti-Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	Santa Cruz, sc-2020

2.1.5 Primer

2.1.5.1 Primer Ratte

Tabelle 5: Primer Ratte

Beschreibung	Sequenz
<i>Adrb1</i>	F: CTACAACGACCCCAAGTGCT R: CGCAGCTGTCGATCTTCTTC
<i>Adrb2</i>	F: CAAGCAAGCCATCGACTGTT R: GCTGAGGTTTTGGGCATGAA
<i>Adrb3</i>	F: ACAAAAACGGCTCTCTGGCT R: ACGAGGAGTCCCCTACCAA
<i>Cpt-1b</i>	F: CTCCCGACAAGGTATGGCTC R: CAGCTTCAGGGTTTGTCGGA
<i>Glut1</i>	F: CTTATTGCCAGGTGTTCCGG R: GGCAGAAGGGCAACAGGATA
<i>Glut4</i>	F: GCCGGGACACTATACCCTAT R: TTCCCATCTTCAGAGCCGAT
<i>Hif-1α</i>	F: TCCATTTTCAGCTCAGGACAC R: GGTAGGTTTCTGTAAGTGGGTC
<i>Hprt1</i>	F: CCCAGCGTCGTGATTAGTGATG R: TTCAGTCCTGTCCATAATCAGTC
<i>Mcad</i>	F: TAGCTTCGAGTTGACGGAGC R: GGCGACCGGGATTATTTCTC
<i>Nhe1</i>	F: CGTCACTGTGGTCCTCTACC R: CCGAGGGACACGACAAAGAA
<i>Pgc-1α</i>	F: AAGCCAATGAGCACGAAAGG R: CACGGCGCTCTTCAATTGCT
<i>Sglt1</i>	Biorad, Assay ID: qRnoCID0008954
<i>Tbp</i>	F: CACCGTGAATCTTGGCTGTAAAC R: CGCAGTTGTTTCGTGGCTCTC
<i>β-Actin</i>	F: GCTCTCTTCCAGCCTTCCTT R: CAATGCCTGGGTACATGGTG

2.1.5.2 Primer Maus

Tabelle 6: Primer Maus

Beschreibung	Sequenz
<i>Glut1</i>	F: GATCCCAGCAGCAAGAAGGT R: GAGAGACCAAAGCGTGGTGA
<i>Glut4</i>	F: TGTTGCGGATGCTATGGGTC R: AAAAGGGAAGGTGTCCGTCG
<i>Sgl1</i>	F: AAAATCGCCTGTGTCCTCCC R: GGCCTCGCAGTCCATTAGG
<i>β-Actin</i>	F: ACTGTCGAGTCGCGTCCA R: ATCCATGGCGAACTGGTGG

2.1.6 Software

Tabelle 7: Software

Software	Funktion	Hersteller
Prism 6	Allgemeine Statistik	GraphPad Software
BioRad CFX Manager	Auswertung Real-Time PCR	BioRad®
FusionCapt Advance	Auswertung Western Blot	Vilber Lourmat
Ingenuity Pathway Analysis	Analyse Daten RNA-Sequencing	Qiagen®
Nanodrop 1000 v3.7	Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific™
Gen 5	Proteinmessung	BioTek®
Vevo Lab 3.1.1	Auswertung Echokardiographie	Visualsonics

2.1.7 Kits

Tabelle 8: Kits

Bezeichnung	Hersteller
iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for qPCR BioRad	BioRad®
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific™
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen®
RNase-Free DNase Set	Qiagen®

RNeasy® Mini Kit	Qiagen®
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad®
SuperSignal™ West Femto Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific™
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific™

2.1.8 Verbrauchsmittel

Tabelle 9: Verbrauchsmittel

Funktion	Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platte BCA	Microplate 96 Well	Greiner bio-one
96-Well-Platte RT-PCR	Hard-Shell Thin-Wall 96 Well	BioRad®
Blotting Filterpapiere	Blotting Paper Sheets	AHLSTROM Munktel
Cryoröhrchen 2 ml	Cryo S.	Greiner bio-one
Falkons 15, 50 ml	Cell-star tubes	Greiner bio-one
Filterspitzen 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Barrier pipet tips; Filter tips	Corning Deck Works; Corning Axygen, Sarstedt, Biosphere
Handschuhe	Micro-touch coated; Sterling nitrile powderfree exam gloves	Ansell; Halyard
Kanülen 18, 20, 22, 23, 24, 25 G	Eclipse Needle, Microlance 3; Sterican	BD; Braun
Mikroreaktionsgefäße 0,2; 0,5; 1,5; 2,0 ml	SafeSeal, Multiply Pro	Sarstedt
Mikroskopobjektträger	SuperFrost Plus	Thermo Scientific
Nitrocellulose Blotting Membran 0,45 µm	Amersham Protran	GE Healthcare Life Sciences
Nuklease-freies Wasser	Nuclease-free Water	promega
Parafilm	Parafilm	Bemis
Pipetten 5, 10, 25, 50 ml	Costar stripette	Corning

Material und Methoden

Plattenversiegelung RT-PCR	Microseal Adhesive Seal	BioRad
PVDF Blotting Membran	Roti-PVDF	Carl Roth GmbH + Co. KG
Reservoir Einweg für Pipetten	Reagent Reservoir 25 ml	VWR
Skalpelle	Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun
Spitzen 10, 20, 1000 µl	Tip	Sarstedt, Biosphere
Spitzen zum Pipettieren von Acrylamidgele	MultiFlex-Tips	Carl Roth GmbH + Co. KG
Spritzen 1 ml	Microlance 3	BD

2.1.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mit n wurde die Anzahl der Tierproben dargestellt. Zur statistischen Analyse dienten folgende statistische Tests: t-test (ungepaart, zweiseitig), 2-Way-ANOVA-Analyse.

P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Darstellung der statistischen Signifikanz: ns $P \geq 0,05$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Die Analysen erfolgten mit der Software Prism6.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimente

2.2.1.1 Duodenojejunaler Bypass bei adipösen Sprague-Dawley-Ratten

Tiere und experimentelle Planung. Das Tierexperiment wurde im Labor von Professor Francesco Rubino, Professor für Metabolische und Bariatrische Chirurgie am King's College London von ihm und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Dank einer Kollaboration stellte Professor Francesco Rubino für diese Arbeit linksventrikuläres Herzgewebe der Ratten zur Verfügung. Für das Experiment wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Ab einem Alter von sechs Wochen wurde den Ratten Hochfettfutter gefüttert (siehe Tabelle 10). Die Tiere erhielten Wasser und Hochfettfutter ad libitum (Envigo). Das Hochfettfutter (TD.881374) wurde von Envigo RMS Division (Indianapolis, United States) erworben, die Zusammensetzung ist Tabelle 10 zu entnehmen. Nach 18 Wochen der Hochfettfütterung wurden die Tiere randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt: Duodenojejunaler Bypass (DJB) und Schein-Eingriff (*Sham*). Nach Durchführung des Eingriffs erhielten die Tiere bis zur Organentnahme nach acht Wochen weiter Hochfettfutter. Die Haltung und alle Untersuchungen der Tiere entsprachen den gesetzlichen Bestimmungen.

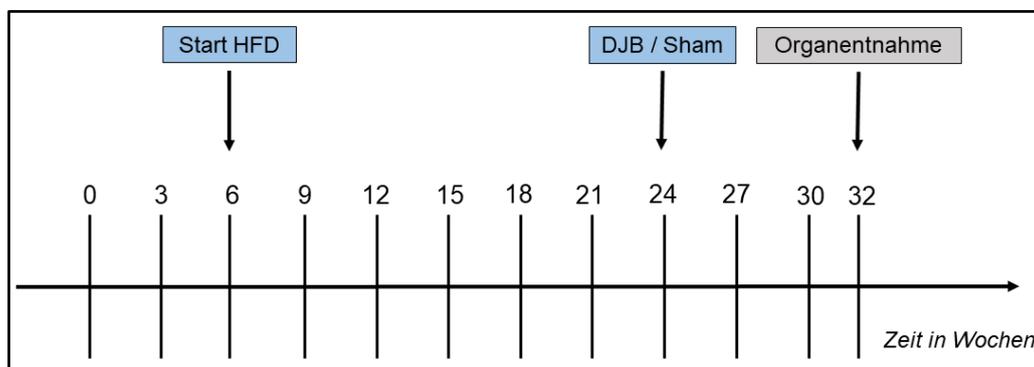


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tierversuches

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf des Tierversuches. Ab einem Alter von sechs Wochen wurde den Tieren ein hochkalorisches, fettreiches Futter (High fat diet, HFD) gefüttert. Nach 18 Wochen Fütterung wurden die Tiere operiert (Sham oder DJB) und acht Wochen nach Operation wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Futters, Ratte

	Hochfettfutter (HFD)	
	% Gesamtanteil	% kcal
Protein	17,3	15,2
Kohlenhydrate	48,5	42,7
Fett	21,2	42,0
Cholesterol	0,2	

Duodenojejunaler Bypass. Die in dem Tierexperiment verwendete bariatrische Operation wurde von Prof. Francesco Rubino und seinen Mitarbeitern durchgeführt und wird im Folgenden zum Verständnis kurz erklärt. Bei einem duodenojejunalen Bypass handelt es sich um einen bariatrischen Eingriff, der das Magenvolumen unverändert lässt. Bei der Operation der Versuchstiere wurden das gesamte Duodenum (Zwölffingerdarm) und 10 cm des proximalen Jejunums (Leerdarm) vom Nahrungsfluss exkludiert. Der Magen und das Jejunum wurden in einer gastrojejunalen Anastomose 10 cm distal des Treitz-Bandes mit einem resorbierbaren Faden verbunden. Um zu gewährleisten, dass die Sekrete aus Pankreas und Gallenblase in den Darm gelangen können, wurde eine End-zu-Seit-Anastomose gebildet: 15 cm distal der gastrojejunalen Anastomose wurde der biliopankreatische Ast in Roux-en-Y-Art mit dem Nahrungsast verbunden. Die Strecke Dünndarm, die bei einem duodenojejunalen Bypass umgangen wird, ist vergleichbar mit dem beim Menschen häufig durchgeführten proximalen RYGB (Rubino, et al., 2006). Abbildung 4 veranschaulicht die komplizierte Operationstechnik.

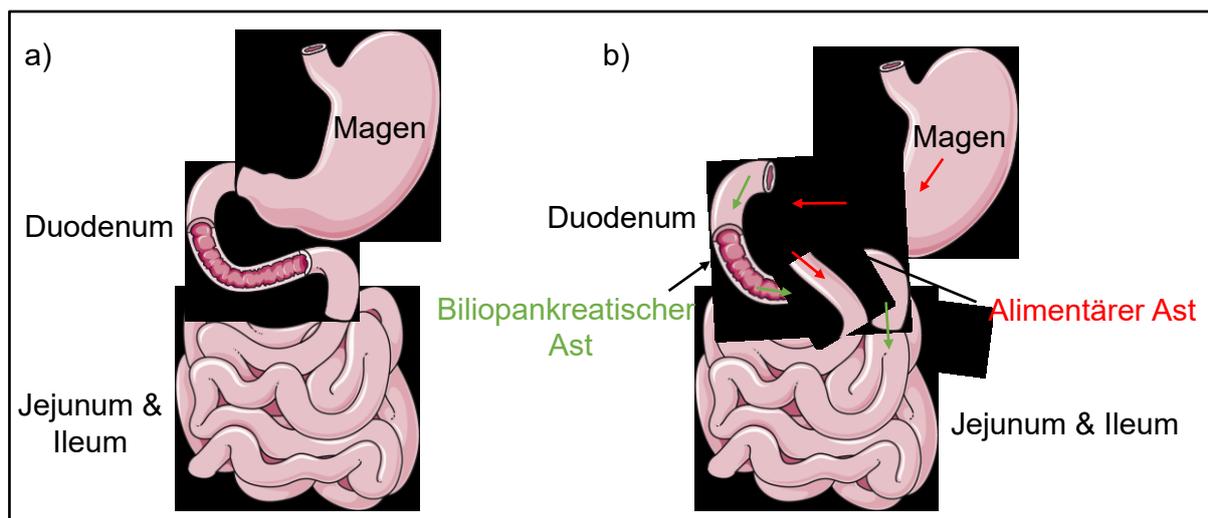


Abbildung 4: Schematische Darstellung des duodenojejunalen Bypasses

a) physiologische Anordnung des Gastrointestinaltraktes, b) Anordnung nach einem duodenojejunalen Bypass. Durch den DJB entstehen ein biliopankreatischer Ast und ein alimentärer Ast. Diese Abbildung wurde mithilfe von Servier Medical Art Vorlagen erstellt, die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License lizenziert sind; <https://smart.servier.com>.

Sham-/Schein-Eingriff. Während des Sham-Eingriffes wurden an den oben beschriebenen Stellen Schnitte im Gastrointestinaltrakt eingeführt, um die Belastung der Operation nachzustellen. Die Schnitte wurden zur Aufrechterhaltung des physiologischen Nahrungsflusses wieder reanastomosiert.

Gewinnung des Herzgewebes. Die Herzen wurden direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Folgenden bei -80°C gelagert. Im Rahmen der Kollaboration mit Prof. Francesco Rubino stand linksventrikuläres Herzgewebe der Ratten für die Experimente dieser Arbeit zur Verfügung.

2.2.1.2 Hochfettdiät bei C57BL/6NRj-Mäusen

Verwendete Tiere und experimentelle Planung. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um männliche C57BL/6NRj-Mäuse. Ab einem Alter von zehn Wochen erhielten die Mäuse entweder eine *high fat diet* (HFD) (D12492, Brogaarden®, Dänemark) oder eine *normal diet* (ND) (D12450B, Brogaarden®, Dänemark). Die Zusammensetzung des Futters ist in Tabelle 11 zu sehen. Die Tiere wurden während des Experiments zwei Mal wöchentlich gewogen. Zu Beginn, nach sechs und nach zwölf Wochen Fütterung wurden die Mäuse echokardiographisch untersucht. Glukose- und Insulintoleranztests wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt (siehe Abbildung 5). Die Haltung und alle Untersuchungen der Tiere entsprachen den gesetzlichen Bestimmungen (TVV 1/2017) und den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA).

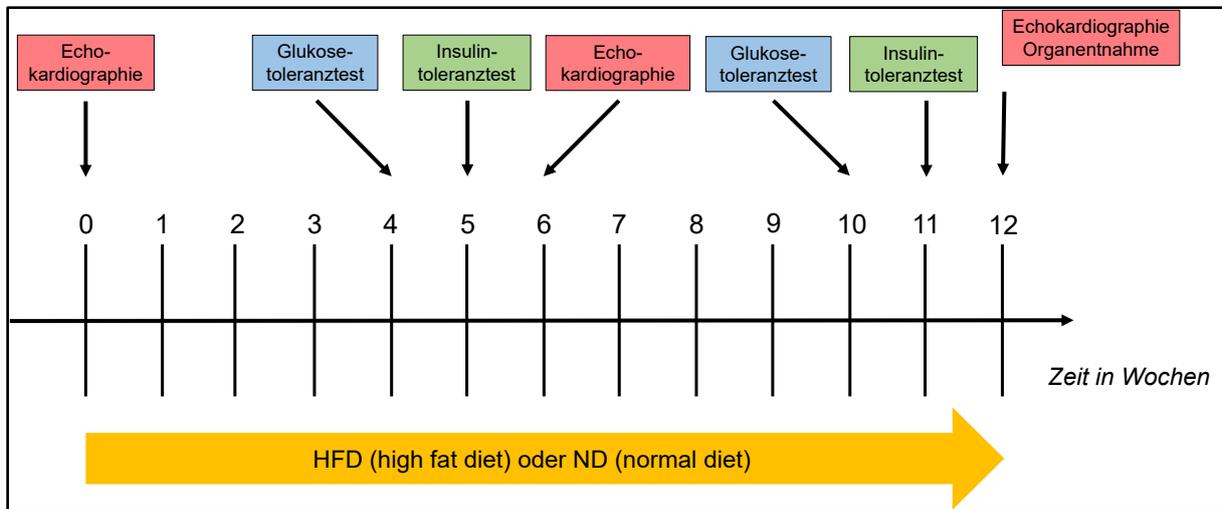


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tierversuches

In der Abbildung sind die Untersuchungen und Interventionen dargestellt, die während des Versuchszeitraumes durchgeführt worden sind. Vor Beginn der HFD-Fütterung, nach sechs und nach zwölf Wochen Fütterung wurde eine Echokardiographie durchgeführt. Ein Glukosetoleranztest wurde nach vier und nach zehn Wochen Fütterung durchgeführt. Einen Insulintoleranztest wurde nach fünf und elf Wochen der Fütterung durchgeführt. Die Organentnahme fand nach zwölf Wochen Hochfettdiät statt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Futters, Maus

	Hochfettfutter (HFD)		Normales Futter (ND)	
	% Gesamtanteil	% kcal	% Gesamtanteil	% kcal
Protein	26,2	20	19,2	20
Kohlenhydrate	26,3	20	67,3	70
Fett	34,9	60	4,3	10

Insulintoleranztest. Für den Insulintoleranztest (ITT) wurde den Mäusen nach einer fünfstündigen Fastenperiode 0,75U/kg Körpergewicht Insulin (Insuman® Infusat, Sanofi) intraperitoneal injiziert. Mithilfe eines Glukosemessgeräts und Glukoseteststreifen wurde vor

der Injektion sowie 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Injektion die Blutglukose im Schwanzvenenblut gemessen.

Glukosetoleranztest. Für den Glukosetoleranztest (GTT) wurde den Mäusen nach einer fünfstündigen Fastenperiode 1g/kg KG Glukoselösung intraperitoneal injiziert. Mithilfe eines Glukosemessgeräts und Glukoseteststreifen wurde vor der Injektion, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Injektion die Blutglukose im Schwanzvenenblut gemessen.

Echokardiographie. Die Echokardiographie wurde von wissenschaftlichen Mitarbeitern und technischen Assistenten des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt. Sie wurde mit einem Kleintierechogerät vom Typ Visualsonics Vevo3100 durchgeführt und dauerte circa 15-20 Minuten. Die Untersuchungen fanden unter Narkose mit Isofluran (0,5-4 % in Sauerstoff) statt. Nach der Narkoseeinleitung wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch fixiert, der linke Thorax mit Enthaarungscreme enthaart und mit Wasser gereinigt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Augensalbe aufgetragen. Für die Untersuchung wurde angewärmtes Ultraschallgel und eine Wärmeplatte verwendet, um eine Unterkühlung der Maus zu verhindern. Das Gel wurde nach Abschluss der Untersuchung entfernt, das Tier wieder in den Käfig überführt, wo es innerhalb von ein bis zwei Minuten aufwachte. Die Auswertung der Echokardiographien erfolgte durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie. Benutzt wurde die Software Vevo Lab 3.1.1. von Visualsonics.

Organentnahme. Nach Durchführung der Echokardiographie wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Post mortem wurde das Herz mit einer 27G-Kanüle punktiert und bis zu 1 ml Blut entnommen. Nach der Herzpunktion wurden Ventrikel und Atrien geteilt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Gewebe wurde bis zur Nutzung für RNA- oder Proteingewinnung bei -80° C aufbewahrt.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Real-Time PCR

RNA-Isolation aus Herzgewebe. Nach der Pulverisierung des Gewebes wurde das TRIzol[®]-Extraktionsverfahren nach Herstelleranweisung angewendet. Im Anschluss an die TRIzol[®]-Extraktion kam zur Aufreinigung der Probe das RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen zum Einsatz. Am NanoDrop[™] One wurden die Menge und Reinheit der isolierten RNA bestimmt. Angestrebt wurden ein 260/280-Verhältnis von 1,8-2,0 und ein 260/230-Verhältnis von 1,8-2,2. Die isolierte RNA wurde bei -80° C gelagert.

iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Zur Synthese von cDNA wurde das iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR von Biorad nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Synthetisierte cDNA wurde bei -20° C gelagert.

Tabelle 12: Komponenten und Reaktionszusammensetzung des Kits zur cDNA-Synthese

Komponente	Volumen pro Reaktion in µl
5x iScript Advanced Reaction Mix	4
iScript Advanced Reverse Transkriptase	1
RNA	variabel
Nuklease-freies Wasser	variabel
Endvolumen	20

Real-Time PCR. Für die Real-Time PCR wurde der SsOAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix nach Anleitung des Herstellers genutzt. Der Mastermix wurde in 96-Well-Platten pipettiert und am qPCR-Cycler (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) analysiert. Die Wahl des Housekeeper-Genes ist in den Abbildungsbeschreibungen ersichtlich. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software CFX Manager von BioRad®. Zur relativ-quantitativen Analyse der Expressionsmuster wurde die ΔC_T -Methode verwendet und die Genexpression der Interventionsgruppe ist zur besseren Veranschaulichung als Vielfaches der Genexpression der Kontrollgruppe dargestellt (*fold change*).

2.2.2.2 Western Blot

Proteinisolierung. Nach der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes mit Mörser und Pistill wurden RIPA-Puffer (siehe Tab. 13), 10 % Phosstop und 10 % Complete-Inhibitoren und eine Stahlkugel hinzugegeben. Das Gewebe wurde für vier Minuten im vorgekühlten Tissue Lyser LT mit 50/s homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4° C). Der Proteingehalt wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits und dem Multifunktionsplattenreader von BioTek gemessen. Die Proben wurden 1:5 mit 6x Lämmli-Puffer verdünnt, bei 95° C für 5 min in einem Thermomixer gekocht. Dies diente der Denaturierung der Proteine.

Gelelektrophorese. Die Proben wurden zusammen mit Markern (Prestained, LMW) auf ein Acrylamidtrenngel aufgetragen. Marker und Proben liefen bei 80 V für 15 Minuten in das Sammelgel. Dann wurde die Spannung für 75 Minuten auf 125 V erhöht. Die SDS-Page erfolgte in Laufpuffer im Mini-Protean Tetra Elektrophorese-System (BioRad). Nach Beendigung des Laufes wurde das Sammelgel verworfen, das Trenngel wurde für die weitere Analyse benutzt.

Western Blot. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Western Blots auf eine Membran (PVDF/Nitrozellulose) übertragen. Nach dem Transfer (220 mA, 4° C, 75 min) wurde die Membran zur Kontrolle eines positiven Proteintransfers bei Raumtemperatur für fünf Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert, nicht gebundener Farbstoff wurde mit Wasser entfernt. Mit einem Skalpell wurden die Membranen in Streifen geschnitten, um sie gezielt mit dem jeweiligen Antikörper inkubieren zu können. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % TBS-T für je fünf Minuten wurden die Streifen für eine Stunde in 5%iger Milchlösung (RT) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Über Nacht und bei 4° C erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem proteinspezifischen Primärantikörper. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden mehrfach mit 0,1 % TBS-T gewaschen und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert (1h, RT). Nach der Inkubation wurden die Membranen erneut mehrfach mit 0,1 % TBS-T gewaschen. Nun erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate oder SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit dem FusionFX7 Detektionssystem (Vilber Lourmat). Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Signalbanden erfolgte mit der Software FusionCapt Advance und die Auswertung der Daten mittels Excel und Prism6. Die Zusammensetzung aller Materialien für Proteinisolation und Western Blot ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Materialien Proteinisolation und Western Blot

Name	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	5 ml 1M Tris-HCl pH 7,4 0,2 ml 0,5M EDTA ph 8,0 10 ml 1,5M NaCl 1 ml NP-40 1 ml 10 % SDS 84,8 ml Milli-Q-H ₂ O
6x Lämmli	2,4 g SDS 12 mg Bromphenolblau 15 g Glycerol 99,8 % 4,8 ml TRIS-Base 1,0M; pH 6,8 1,86 g DTT
Sammelgel für 4 kleine Gele	5,6 ml H ₂ O 1,7 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 0,5 M Tris, pH 6,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % APS

	0,01 ml TEMED
Trenngel für 2 kleine 10 % Gele	4,0 ml H ₂ O 3,3 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED
10x Gel-Elektrophorese-Puffer = Laufpuffer (1x) pH 8,3	60,6 g 25 mM Tris HCL 288 g 192 mM Glycin 20 g 0,1 % SDS 2 l Milli-Q-H ₂ O
Blotpuffer	TRIS-Base 25 mM Glycin 192 mM Methanol 20 %
Ponceau S-Lösung	0,6 g Ponceau S 0,5 % 9 g Trichloressigsäure 1 % 9 g 5-Sulfosalicylsäure
Milchlösung	Milchpulver (fettarm, 5 %) in TBS-T gelöst
10x TBS	121,4 g Tris 50mM 175,32 g NaCl 150mM
0,1 % TBS-T	100 ml 10x TBS 900 ml Milli-Q-H ₂ O 1 g Tween 20 0,1 %

2.2.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

2.2.3.1 RNA-Isolation und Sequenzierung

RNA-Isolation. Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy[®] Mini Kit gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Elution in 30 µl nuklease-freiem Wasser wurde die RNA bei -80° C gelagert. Die Messung der Konzentration erfolgte am NanoDrop™ One.

RNA-Sequenzierung. Die RNA-Sequenzierung wurde von der Deep Sequencing Group am Biotechnologischen Zentrum der TU Dresden (BIOTEC) durchgeführt. Es wurde an einem Illumina HiSeq 2500 mit 75 bp single end reads sequenziert. Die statistische Auswertung

wurde von Dipl. Bioinf. Mathias Lesche, einem Mitarbeiter der Deep Sequencing Group vorgenommen.

2.2.3.2 Ingenuity Pathway Analysis

Zur Analyse der Daten wurde eine Testversion des Programms „Ingenuity Pathway Analysis“ (IPA) von Qiagen® verwendet. Das Programm nutzte folgende Daten aus der bioinformatischen Analyse: Ensembl identifiers, log₂fold change und p-adjusted. Innerhalb des Programmes wurde eine sogenannte „Core analysis“ durchgeführt, die Ergebnisse für folgende Kategorien liefert: Signalwege, Upstream Regulators, Disease & Functions. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde ein Fisher’s Exact Test verwendet, der eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit trifft, dass eine Assoziation zwischen Genen und dem Prozess oder Signalweg Zufall ist. Der p-Wert identifiziert eine statistisch signifikante Überrepräsentation von Genen innerhalb eines Prozesses. Des Weiteren berechnete das Programm anhand von Daten aus einer Knowledge Base und dem Datenset z-scores (siehe Abbildung 6). Der z-Score trifft eine Aussage über die Beeinflussung eines Signalweges, indem Knowledge Base und Genexpression innerhalb des Datensets verglichen werden (Krämer, et al., 2014). Ein weiterer wichtiger Begriff für das Verständnis der IPA ist die Ratio. Sie beschreibt den Anteil der Gene des Signalweges, die im Datenset enthalten sind.

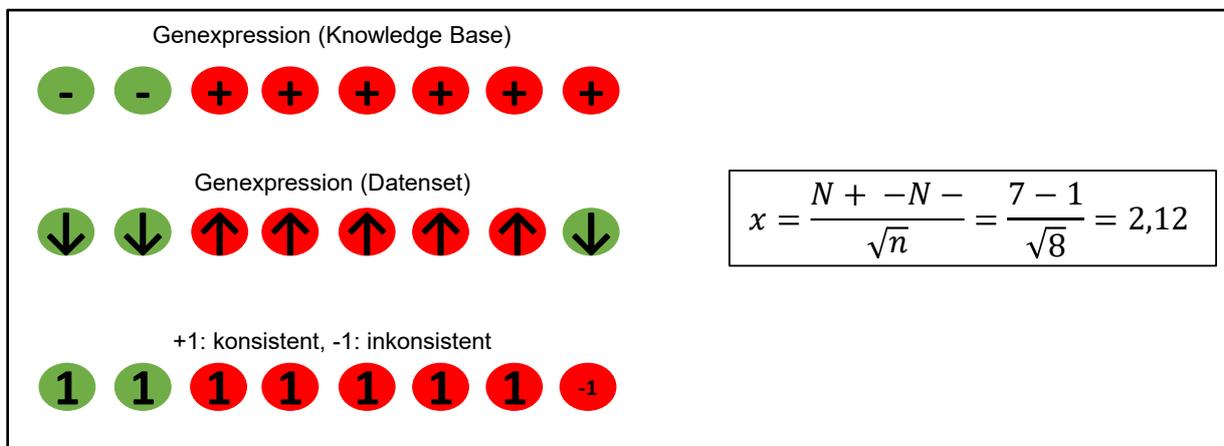


Abbildung 6: Berechnung einer Aktivitätsvorhersage mittels z-Score durch IPA

Die Ingenuity Pathway Analysis verwendet eine Knowledge Base und das Datenset und berechnet eine Aktivitäts- oder Inhibierungsvorhersage eines Signalweges. Anhand eines Beispiels erklärt die Abbildung die Berechnung des z-Scores: 8 Gene eines Signalweges liegen im Datenset verändert vor. Bei 7 von 8 Genen ist die Genexpression bezüglich der Auswirkung auf den Signalweg zwischen Datenset und Knowledge Base konsistent. Daraus ergibt sich nach Einsetzen in die Formel ein z-Score von 2,12, was einer Aktivitäts-Prädiktion entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Einflusses von Übergewicht auf das Herz im Mausmodell

Übergewicht (BMI: 25,0-29,9) und Adipositas (ab BMI \geq 30,0) wirken sich schnell und direkt auf das Herz aus und sind assoziiert mit einer Reihe von hämodynamischen Veränderungen, die *Remodeling* und eine ventrikuläre Dysfunktion nach sich ziehen können (Alpert, et al., 2014). Übergewicht geht häufig Hand in Hand mit der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes, der das Herz durch vermehrte Fibrosierung, intramyokardiale Inflammation und myokardiale Lipidakkumulation weiter beeinträchtigt (Bugger und Abel, 2014; Wu, et al., 2014).

Um den Einfluss von Übergewicht und Diabetes auf die Herzfunktion und den Glukosestoffwechsel des Herzens zu charakterisieren, wurde männlichen C57BL/6-Mäusen über zwölf Wochen eine Hochfett- (HFD-Gruppe) bzw. Normaldiät (ND-Gruppe) gefüttert. Ihre Herzfunktion wurde regelmäßig per Echokardiographie und ihr Glukosestoffwechsel per Glukosetoleranztest (GTT) und Insulintoleranztest (ITT) beobachtet.

3.1.1 Gewichtsverlauf

Um die Gewichtszunahme in beiden Versuchsgruppen zu bestimmen, wurden die Tiere zwei Mal pro Woche unter gleichbleibenden Bedingungen gewogen. Nach wenigen Wochen zeigte sich deutlich eine stärkere Gewichtszunahme in der HFD-Gruppe. Ab der siebten Woche zeigte die HFD-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant höheres Gewicht (siehe Abbildung 7). Auswirkungen dieser Fütterung auf das Herz und den Glukosestoffwechsel wurden in weiteren Tests geprüft.

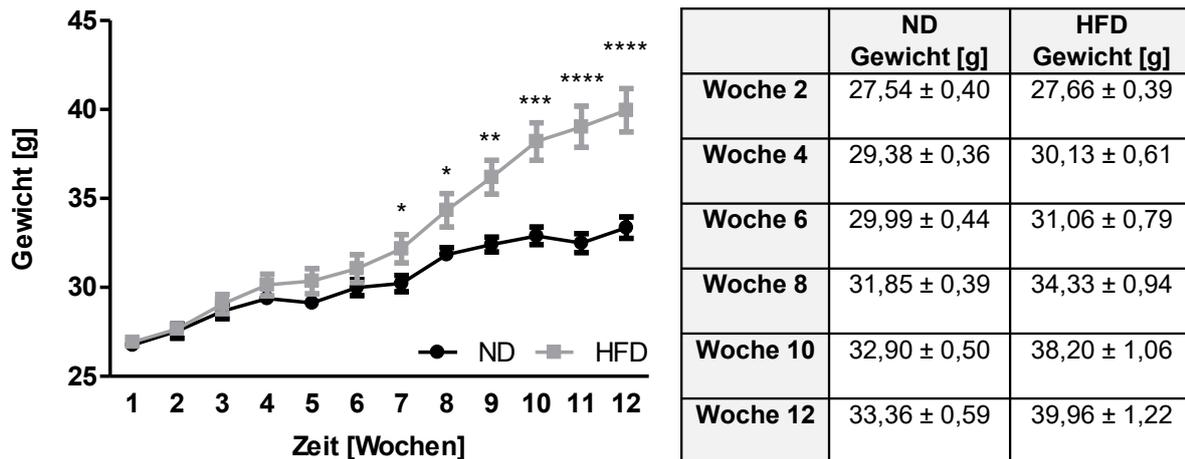


Abbildung 7: Gewichtsverlauf der ND- und HFD-Gruppe in zwölf Wochen Fütterung

Zwei Mal wöchentlich wurde das Gewicht der Mäuse festgehalten und das Gewicht im Laufe der Zeit graphisch dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test (ungepaart, zweiseitig) verwendet. Darstellung der statistischen Signifikanz: ns $P \geq 0,05$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

3.1.2 Glukosestoffwechsel

Zur Darstellung des Einflusses einer hochkalorischen, fettreichen Ernährung auf den Glukosestoffwechsel und die adäquate Insulinsekretion wurden Insulin- und Glukosetoleranz regelmäßig getestet.

Der nach vier Wochen Fütterung durchgeführte Glukosetoleranztest zeigte keinen Unterschied in der Reaktion auf eine festgelegte Menge Glukose (siehe Abbildung 8). Beide Gruppen reagierten auf die Glukosegabe zunächst mit einem Anstieg der Blutglukose, daraufhin sank die Blutglukose in beiden Gruppen stetig ab. Der nach zehn Wochen Fütterung durchgeführte Glukosetoleranztest zeigte, dass die HFD-Gruppe stetig signifikant höhere Blutglukosewerte aufwies. Vor der Injektion der Glukose war der Blutglukosewert in der HFD-Gruppe bereits höher als in der ND-Gruppe ($t = 0$ min; $157,3 \pm 9,61$ vs. $135,4 \pm 8,89$). Auf die Glukoseinjektion reagierten beide Gruppen mit einem deutlichen Anstieg der Blutglukose. Die ND-Gruppe hatte durchgehend niedrigere Blutglukosewerte als die HFD-Gruppe (siehe Abbildung 8). Während nach vier Wochen Fütterung keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennen ließ, wiesen die HFD-Tiere nach zehn Wochen Fütterung durchgehend deutlich höhere Blutglukosewerte auf als die ND-Tiere. Ein beginnender gestörter Glukosemetabolismus war zu erkennen.

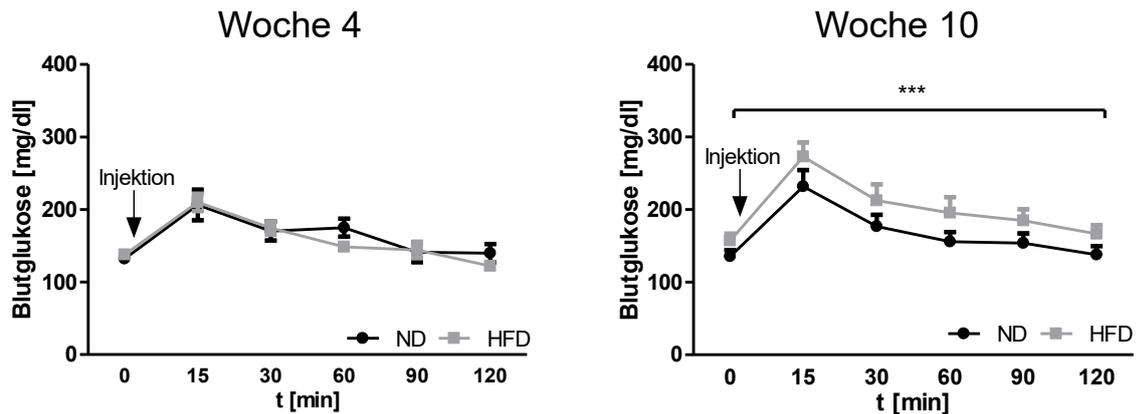


Abbildung 8: Ergebnisse der Glukosetoleranzteste

Die Glukosetoleranztests wurden durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Links ist der Glukosetoleranztest nach vier Wochen, rechts nach 10 Wochen Hochfettfütterung zu sehen. Zur statistischen Analyse wurde eine 2-Way-ANOVA-Analyse verwendet. Darstellung der statistischen Signifikanz: ns $P \geq 0,05$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$

Der nach fünf Wochen Fütterung durchgeführte Insulintoleranztest lässt zu zwei Zeitpunkten (60, 120 min) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ND und HFD erkennen (Abbildung 9): Beide Gruppen reagierten auf die Insulingabe mit einer initialen Absenkung der Blutglukose, anders als bei den ND-Tieren stieg die Blutglukose bei den HFD-Tieren allerdings schneller wieder an (t = 60 min; $85,08 \pm 5,04$ vs. $70,27 \pm 4,90$). Der nach elf Wochen Fütterung durchgeführte Insulintoleranztest zeigte nur zum Zeitpunkt 30 min (t = 30 min) einen signifikant erhöhten Blutglukosewert in der HFD-Gruppe (siehe Abbildung 9).

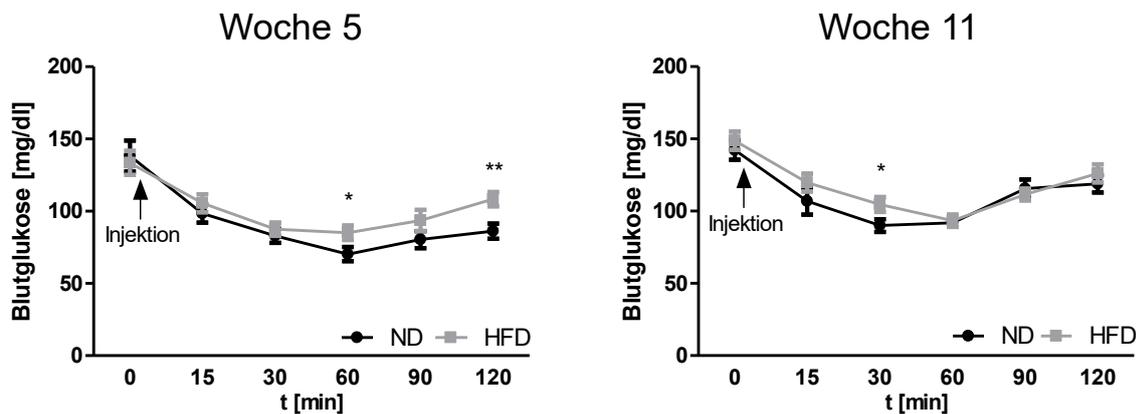


Abbildung 9: Ergebnisse der Insulintoleranzteste

Die Insulintoleranztests wurden durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Links ist der Insulintoleranztest nach 5 Wochen, rechts nach 11 Wochen Hochfettfütterung zu sehen. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test (ungepaart, zweiseitig) verwendet. Darstellung der statistischen Signifikanz: ns $P \geq 0,05$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die zwölf Wochen Hochfettfütterung ausreichend waren, um einen diabetischen/prädiabetischen Phänotyp in der HFD-Gruppe zu induzieren. Die Tiere der HFD-Gruppe wiesen zum Ende der Fütterung ein signifikant höheres Körpergewicht (mittleres Körpergewicht HFD = $39,95$ vs. ND = $33,35$) auf, sie hatten im

Vergleich zur ND-Gruppe erhöhte Blutglukosewerte und es zeigte sich eine beginnende Störung des Glukosestoffwechsels. Die funktionellen und molekularen Auswirkungen der Hochfettfütterung auf das Herz der Mäuse wurden per Echokardiographie und qPCR charakterisiert.

3.1.3 Herzfunktion

Zur Darstellung des Einflusses einer hochkalorischen, fettreichen Ernährung auf das Herz und seine Funktion wurde vor Beginn der Fütterung, nach sechs Wochen und nach zwölf Wochen eine Echokardiographie der Mäuseherzen durchgeführt. Abbildung 10 fasst die Ergebnisse aller echokardiographischen Parameter zusammen. Kein Parameter ist nach den zwölf Wochen Hochfettfütterung signifikant verändert. Deutlich sind allerdings Tendenzen zu erkennen: Das enddiastolische Volumen (EDV) und der linksventrikuläre enddiastolische Innendurchmesser (LVIDd) scheinen in der HFD-Kohorte nach zwölf Wochen erhöht zu sein. Größen wie die Ejektionsfraktion (EF) und das *Fractional area shortening* (FAS) gelten als gute Indikatoren für die Kontraktilität des Herzen; sie sind nach zwölf Wochen Hochfettfütterung nicht signifikant verändert in der HFD-Gruppe. Die Hochfettfütterung bewirkte keine signifikanten Einschränkungen der Herzfunktion.

	Woche 0		Woche 12	
	ND (n=9)	HFD (n=9)	ND (n=11)	HFD (n=12)
Morphologisch				
HW/BW	4,19 (± 0,19)	4,41 (± 0,44)	3,20 (± 1,04)	3,06 (± 0,57)
LVIDd (mm)	4,20 (± 0,07)	4,24 (± 0,13)	4,25 (± 0,17)	4,47 (± 0,11)
Diastolische Funktion				
EDV (µL)	82,75 (± 4,09)	89,72 (± 9,34)	85,32 (± 5,41)	98,30 (± 6,65)
Systolische Funktion				
EF %	58,69 (± 1,65)	56,45 (± 4,46)	52,38 (± 8,36)	49,62 (± 6,87)
FAS %	54,38 (± 1,38)	51,09 (± 4,83)	47,79 (± 9,66)	44,98 (± 6,35)
Herzfrequenz	431,3 (± 15,83)	407,3 (± 21,97)	451,4 (± 14,98)	448,8 (± 18,57)
Schlagvolumen (µL)	48,22 (± 1,89)	48,14 (± 2,46)	43,87 (± 7,84)	48,13 (± 8,98)

Abbildung 10: Ergebnisse der Echokardiographien

HW, heart weight; BW, body weight; LVIDd, linksventrikulärer enddiastolischer Innendurchmesser; EDV, enddiastolisches Volumen; EF, Ejektionsfraktion; FAS, Fractional area shortening. Die Echokardiographie wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt, die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung, MW (±STABWN). Die Daten-Sets wurden mittels t-Test (ungepaart, zweiseitig) verglichen. Darstellung der statistischen Signifikanz: * P ≤ 0,05.

3.1.4 Expression von Glukosetransportern

Es ist bekannt, dass Übergewicht und Diabetes im Herzen zu Veränderungen des Stoffwechsels führen. Die Fettsäureoxidation ist im diabetischen Herzen gesteigert (Fillmore, et al., 2014). Um nun zu klären, welchen Einfluss Diabetes und Übergewicht auf den Glukosestoffwechsel haben, wurde die Expression der drei wichtigsten kardialen Glukosetransporter im linksventrikulären Gewebe des HFD-Mausmodells untersucht. Die Expression des Transporters *Sglt1* war durch die HFD-Fütterung nicht beeinflusst, die mRNA-Level zwischen ND und HFD waren nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 11). Die mRNA-Expression der Transporter *Glut1* und *Glut4* allerdings war in der HFD-Gruppe deutlich niedriger als in der ND-Gruppe (siehe Abbildung 11). Die Hochfettfütterung sorgte für eine Herabregulation der Glukosetransporter *Glut1* und *Glut4*.

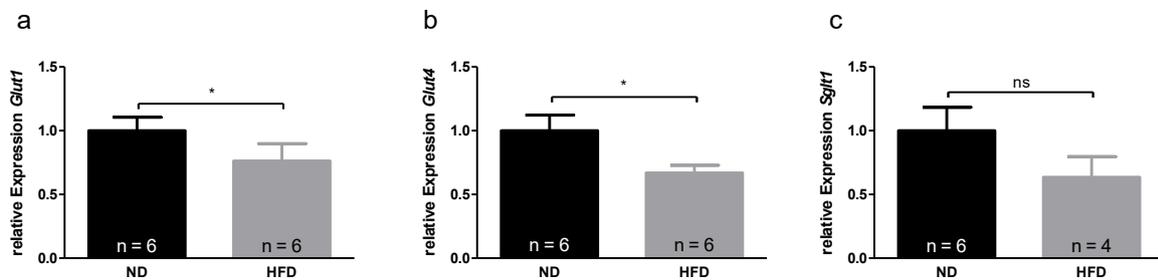


Abbildung 11: Expression von *Glut1*, *Glut4* und *Sglt1*

Die Probengewinnung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qPCR, als Referenzgen wurde β -Actin verwendet. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). Die Datensets wurden mittels t-Test (ungepaart, zweiseitig) verglichen. P-Werte von $<0,05$ (*) werden als statistisch signifikant angesehen. P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

3.2 Differentielle Genexpressionsanalyse – RNA-Sequencing nach bariatrischer Operation im Rattenmodell

Bariatrische Eingriffe haben weitreichende Auswirkungen auf den gesamten Körper und gewinnen als Therapieoption für übergewichtige und diabetische Patienten zunehmend an Relevanz. Die positiven Auswirkungen auf das Herz sind zahlreich, die molekularen Grundlagen jedoch wenig verstanden.

Dank des IRTG2251 („Immunological and Cellular Strategies in Metabolic Disease“) entstand eine Zusammenarbeit mit Professor Francesco Rubino, dem Chair of Metabolic and Bariatric Surgery am King's College London. Im Rahmen dieser Kollaboration konnte für diese Arbeit linksventrikuläres Gewebe eines DJB-Rattenmodells verwendet werden: Männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten nach 18 Wochen Hochfettfütterung entweder einen Schein-Eingriff (Sham) oder einen duodenojejunalen Bypass (DJB). Nach weiteren acht Wochen Hochfettfütterung wurden die Herzen entnommen und molekularbiologisch analysiert. Um einen möglichst großen Erkenntnisgewinn aus den Proben zu erhalten, wurde das Genexpressionsprofil der Herzen mittels RNA-Sequenzierung charakterisiert. Sequenziert wurde RNA, die aus dem linken Ventrikel von zehn DJB-Ratten und zehn Sham-Ratten gewonnen wurde.

3.2.1 Hauptkomponentenanalyse (Gruppenzugehörigkeit)

Die in der RNA-Sequenzierung generierten Daten wurden zunächst einer Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis, PCA) unterzogen. Diese diente dazu, einen Überblick über mögliche Ausreißer und die Gruppenzugehörigkeit der Proben zu erhalten. Eine PCA reduziert miteinander korrelierte Variablen auf wenige voneinander unabhängige Variablengruppen, die sogenannten Hauptkomponenten (engl. principal components, PC). Durch Projektion auf die Hauptkomponenten lassen sich Zusammenhänge unterschiedlicher Datensätze darstellen.

In Abbildung 12a ist das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse aller 20 Proben zu sehen. Auf der x-Achse ist die Hauptkomponente 1 (PC1) aufgetragen, die den größten Varianzanteil repräsentiert (36 %). Im Koordinatensystem nah beieinander liegende Punkte weisen eine gesteigerte Ähnlichkeit auf. In Abbildung 12b ist die Hauptkomponentenanalyse der Gruppen nach Exklusion des Ausreißers s2 und der sechs Mismatches zu sehen (DJB vs Sham). Auf der x-Achse ist der Hauptkomponent 1 (PC1) aufgetragen, der den größten Varianzanteil beinhaltet (41 %). Der Hauptkomponent 1 erklärt hier folglich 41 % der Varianz zwischen den Gruppen DJB und Sham.

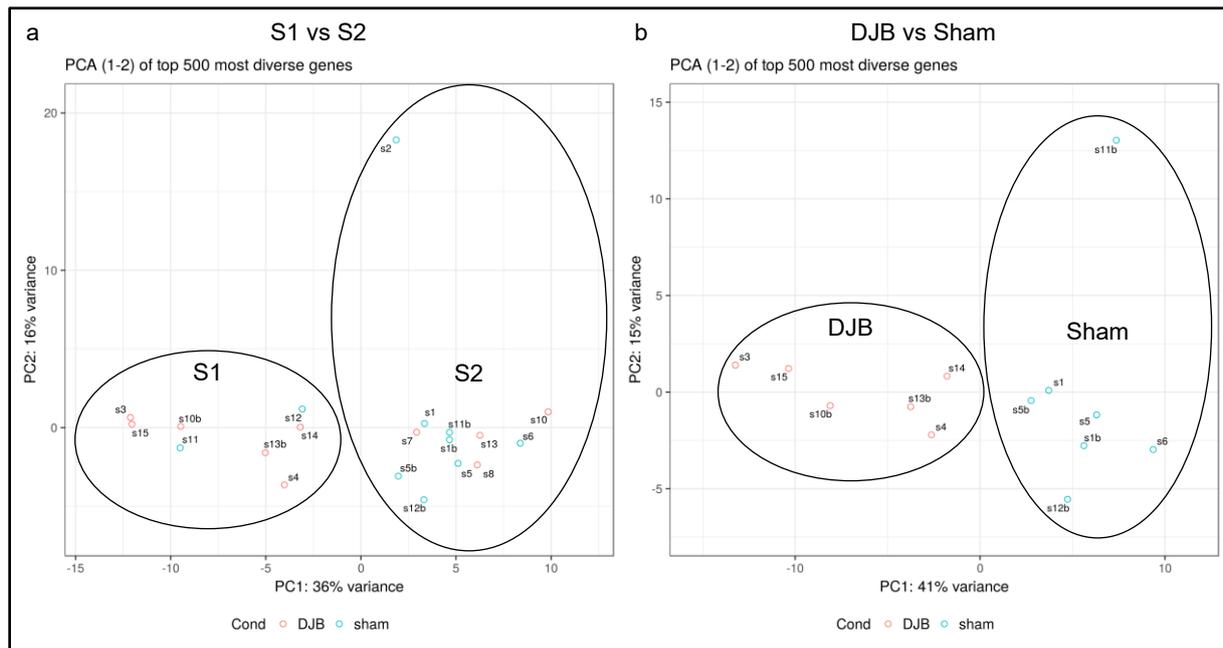


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Expressionsprofile

a) Hauptkomponentenanalyse S1 vs S2 b) Hauptkomponentenanalyse DJB vs Sham. Basierend auf den 500 am stärksten regulierten Genen erklären PC1 und PC2, die beiden ersten Hauptkomponenten, in a) 52 % in b) 56 % der Varianz. Jede Probe wird durch einen Punkt repräsentiert, ein roter Punkt repräsentiert eine Ratte mit duodenojejunalem Bypass, ein blauer Punkt eine Ratte mit Schein-Eingriff.

3.2.2 Orientierende Genexpressionsanalyse

Nach der allgemeinen Analyse der Daten mittels PCA sollten die Ergebnisse auf Gen-Ebene analysiert werden. Bei einer False Discovery Rate von 1 % (FDR = 1 %) waren 3634 Gene signifikant differentiell exprimiert. Es wird deutlich, dass die Intervention DJB eine große Auswirkung auf das Herz zu haben scheint. Zur Veranschaulichung der großen Datenmenge wurde eine *Heatmap* der 25 am stärksten herauf- und herabregulierten Gene erstellt (siehe Abbildung 13). Diese *Heatmap* arbeitet mit dem z-score als Maß für die Darstellung der relativen Expressionsunterschiede. Der z-score beschreibt hier die in Standardabweichungen ausgedrückte Entfernung eines Wertes vom arithmetischen Mittel aller Werte.

Ein interessantes, durch DJB vermindert exprimiert vorliegendes Gen in dieser heatmap ist zum Beispiel *Slc8a1* (solute carrier family 8 member A1), das für den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) codiert. Dieser Transporter transportiert drei Natriumionen im Austausch gegen ein Calciumion in die Kardiomyozyte und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der regelhaften Relaxation und zellulären Calcium-Homöostase (Shattock, et al., 2015). Seine Expression ist auch deshalb von Interesse, weil sie in pathologischen Zuständen wie Herzinsuffizienz verändert vorliegen kann (Xu, et al., 2012).

Das Gen *Vwa8*, das in der DJB-Gruppe eine verminderte Expression zeigt, codiert für das Von Willebrand-Containing Protein 8, über dessen Funktion bisher wenig bekannt ist. Sicher

ist, dass es u. a. im Herzen exprimiert wird und seine hepatische Expression nach HFD erhöht ist (Luo, et al., 2017).

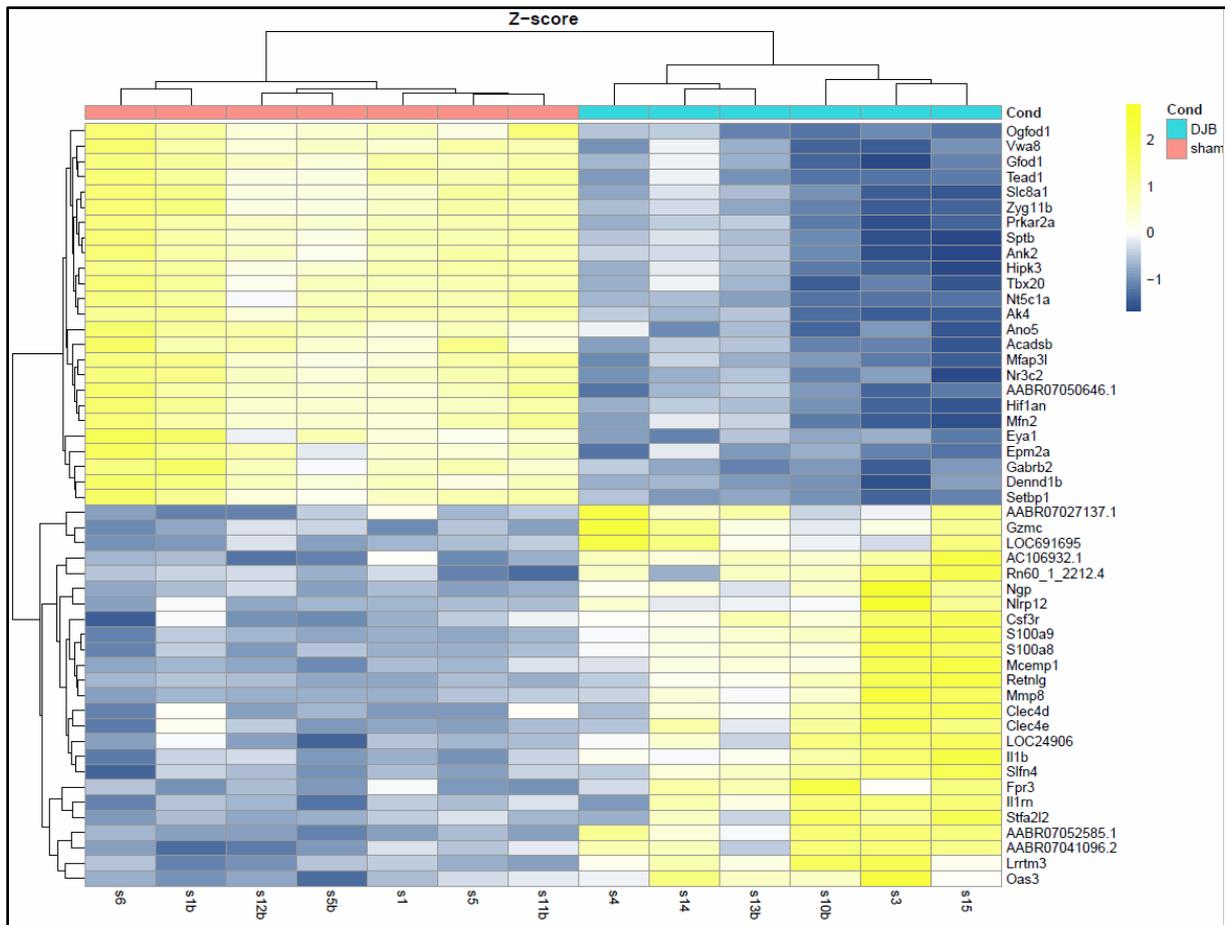


Abbildung 13: Heatmap der 25 am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene.

Die Farbcodierung repräsentiert den z-score, ein Wert über (gelb) bzw. unter (hell- bis dunkelblau) 0 einer gesteigerten bzw. verminderten Expression gegenüber dem arithmetischen Mittel aller Werte entspricht.

3.2.3 Überblick über die Signalwege

Nach der bioinformatischen Analyse durch die Deep Sequencing Group am CRTD Dresden wurden die Sequenzierungsdaten mithilfe der „Core Analysis“ des Programmes Ingenuity Pathway Analysis (IPA) von Qiagen® analysiert. Die Expressionsmuster der DJB- und der Sham-Kohorte wurden verglichen und Signalweganalysen durchgeführt.

Die 15 signifikantesten Ergebnisse der Signalweganalyse sind in der Abbildung 14 zu sehen. Einen positiven z-Score (oranger Balken) und damit eine vorhergesagte Aktivierung durch DJB-Intervention weist u. a. der Signalweg „Oxidative Phosphorylation“ auf. Das Herz als dauerhaft kontrahierender Muskel verbraucht viel Energie und ist auf eine stetige ATP-Versorgung angewiesen. Der Großteil der ATP-Produktion findet im Mitochondrium durch oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette statt. Fehlfunktionen dieser essentiellen Prozesse spielen eine Rolle bei der Entstehung von erblichen Kardiomyopathien, Herzinsuffizienz, Herzhypertrophie und ungünstigen Alterungsprozessen im Herzen (Schwarz, et al., 2014).

Einen negativen z-Score (blauer Balken) und damit eine vorhergesagte Inhibierung durch die DJB-Operation weist u. a. der Signalweg „Renin-Angiotensin-Signaling“ auf (siehe Abbildung 14). Das Renin-Angiotensin-System spielt eine essentielle Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz und seine Blockade durch ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Inhibition gilt als etablierte Therapieoption bei Herzinsuffizienz (Mori, et al., 2013).

Für den Signalweg „Cardiac Hypertrophy Signaling“ wurde ebenfalls ein negativer z-score für die DJB-Kohorte berechnet (siehe Abbildung 14). Hypertrophie dient als Kompensationsmechanismus bei vermehrter Belastung des Herzens, mit der Zeit kann sich aus dieser kompensierten Hypertrophie allerdings eine dekompenzierte Hypertrophie und Herzinsuffizienz entwickeln (Tham, et al., 2015). Übergewicht ist außerdem häufig mit der Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie und Dilatation verbunden (Kenchiah, et al., 2002).

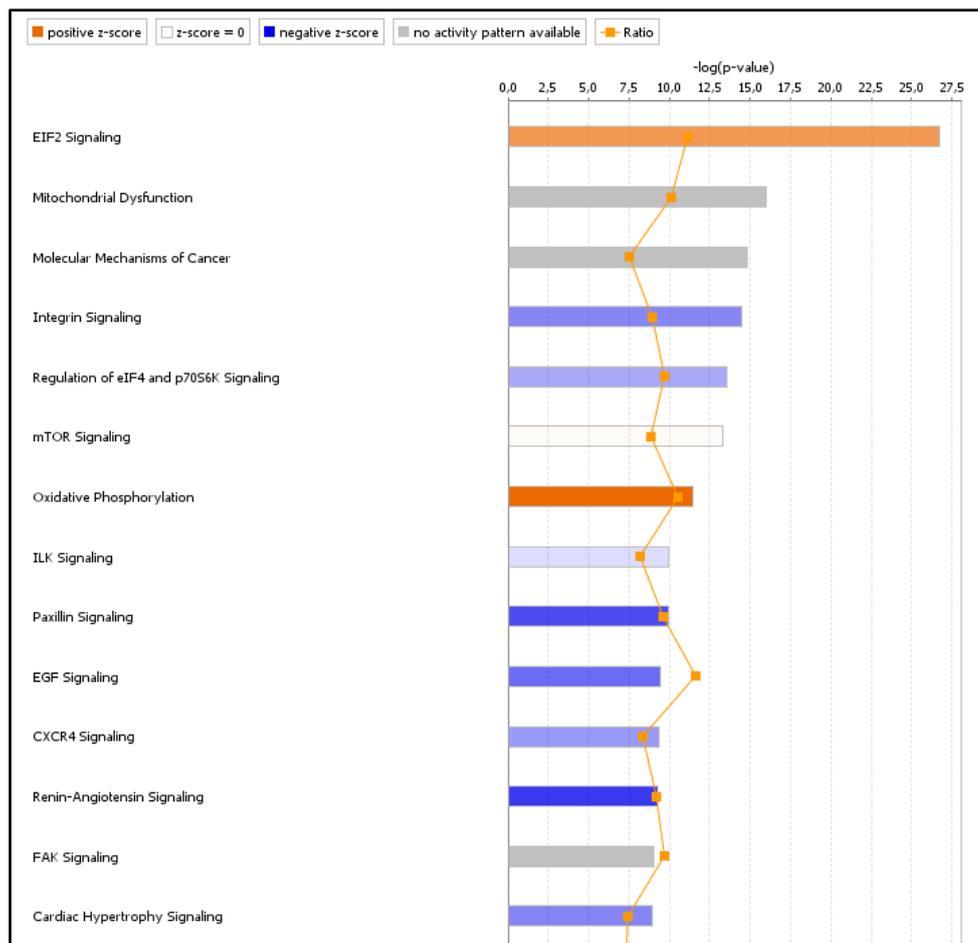


Abbildung 14: Signalwege und z-Scores

Mithilfe der „Core Analysis“ der Software IPA[®] wurden in den Proben regulierte Signalwege identifiziert und ihre Aktivierung bzw. Inhibierung mithilfe eines z-Scores vorhergesagt. Ein positiver z-Score (orange) sagt eine Aktivierung, ein negativer z-score (blau) eine Inhibierung des Signalweges durch DJB vorher. Als minimales Signifikanzniveau wurde $p=0,05$ gewählt (Fisher's exact test).

3.2.3.1 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung dient der Generierung des Energieträgers ATP und spielt im Herzen eine große Rolle. Das Herz als ständig arbeitender Muskel hat einen großen ATP-Verbrauch und ist somit auf eine intakte Atmungskette und oxidative Phosphorylierung angewiesen. Herzinsuffizienz wird bekanntermaßen begleitet von einer Kapazitätsminderung der oxidativen Phosphorylierung, einer verminderten Aktivität der Atmungskette und vermehrtem Elektronen-Leak (Schwarz, et al., 2014). In der IPA zeigte sich der Komplex „Oxidative Phosphorylierung“ als einer der wichtigsten regulierten Signalwege. Es wurde eine Aktivierung des Signalweges berechnet (z-Score: 4,62). In Abbildung 15 sind die einzelnen Komplexe der Atmungskette zu sehen, die Farbgebung symbolisiert eine Aktivierung (rot) oder Inhibierung (grün). Es fällt auf, dass vor allem der Komplex V, die ATP-Synthase, nach DJB hochreguliert ist.

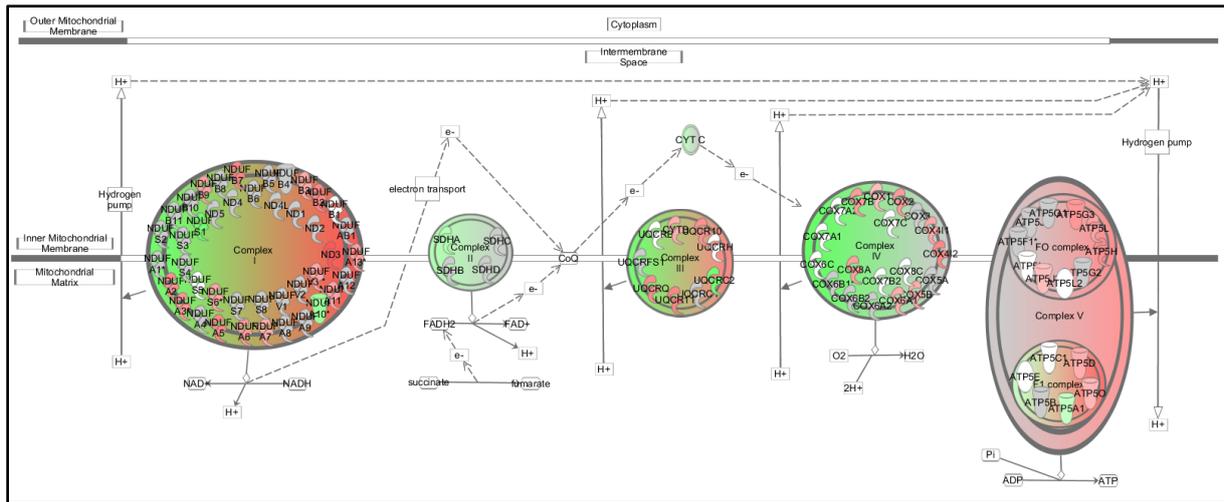


Abbildung 15: Oxidative Phosphorylierung, Ingenuity Pathway Analysis

Die IPA[®]-Analyse für den Komplex „Oxidative Phosphorylierung“ ergab folgende Werte: z-score: 4,62, p-value: $3,19 \cdot 10^{-12}$, Ratio: 45/109.

3.2.3.2 Der Renin-Angiotensin-Signalweg

Ein weiterer interessanter regulierter Signalweg ist das Renin-Angiotensin-Signaling. Klassische Herzinsuffizienz-Medikamente wie ACE-Hemmer setzen genau an diesem System an, indem sie die Konversion von Angiotensin zu Angiotensin II verhindern. In den Herzen der Ratten mit duodenojejunalem Bypass ist das Renin-Angiotensin-Signaling laut der IPA[®] vermindert (z-Score: -3,59). Eine weitere molekularbiologische Validierung mittels qPCR und Western Blot ist jedoch notwendig, um abschließende Aussagen über die Bedeutung dieser Ergebnisse treffen zu können.

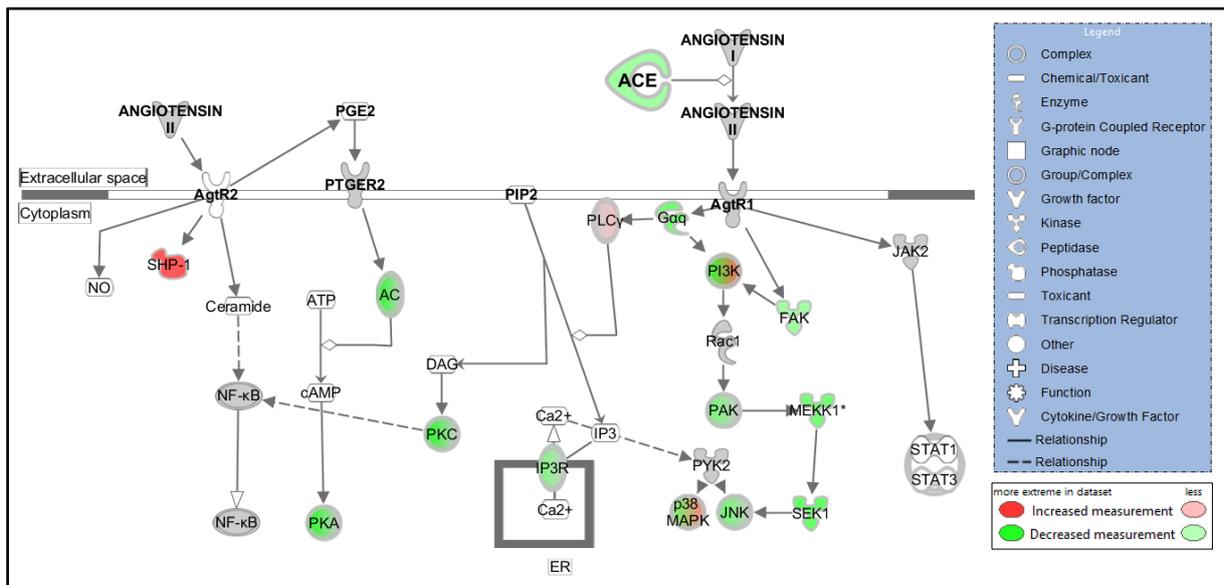


Abbildung 16: Renin-Angiotensin-System, Ingenuity Pathway Analysis

Die IPA[®]-Analyse für den Komplex „Renin-Angiotensin Signaling“ ergab folgende Werte: z-score: -3,59, p-value: $4,97 \cdot 10^{-10}$, Ratio: 46/128 (0,359).

3.2.3.3 Adrenerge Signalwege

Adrenerge Stimulation spielt bei der Regulation der Herzfunktion eine essentielle Rolle. In der IPA[®] ergab sich, dass sowohl die α - als auch die β -adrenerge Signalkaskade in den Herzen der DJB-Ratten verändert sind (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Für die α -adrenerge Signalkaskade (Abbildung 17) zeigte sich, dass nicht nur die RNA-Level des α -Adrenorezeptors, sondern auch weitere Signalmoleküle innerhalb der Kaskade vermindert vorliegen. Mit einem z-Score von -2,68 wurde für das „ α -adrenergic signaling“ insgesamt eine Inhibition vorhergesagt. Interessante Moleküle für weitere Analysen sind u. a. der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), der α -Adrenorezeptor selbst und Proteinkinasen.

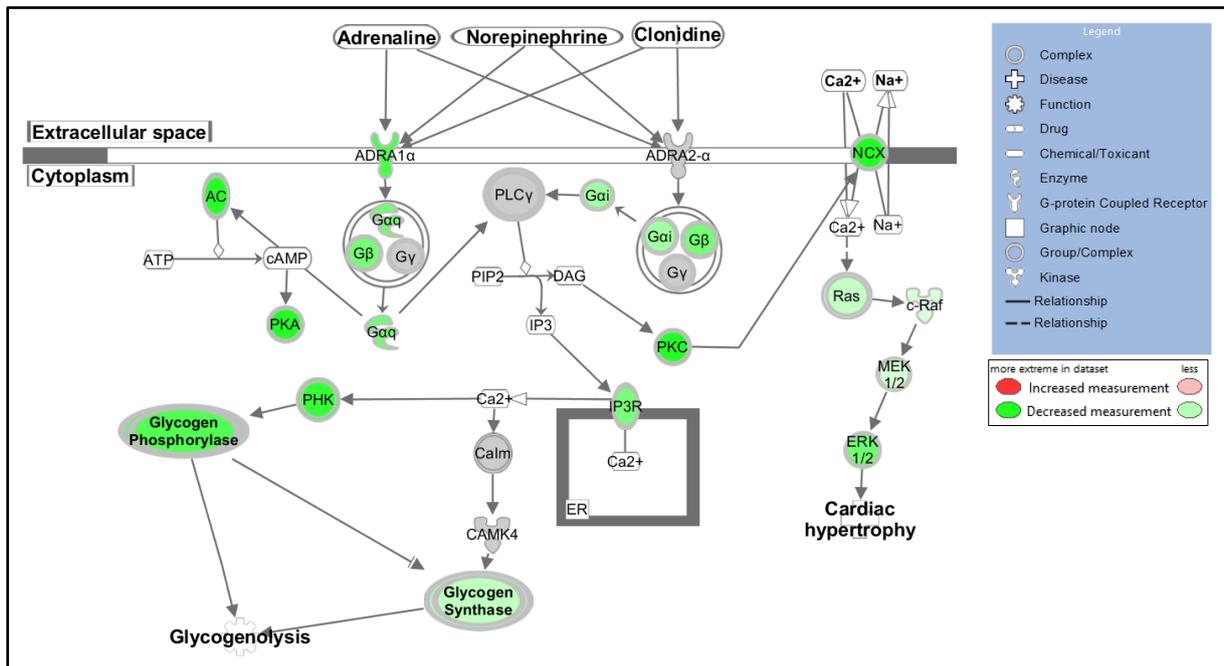


Abbildung 17: α -adrenerge Signalkaskade, Ingenuity Pathway Analysis

Die IPA[®]-Analyse für den Komplex „Alpha-adrenergic signaling“ ergab folgende Werte: z-score: -2,68, p-value: $6,43 \cdot 10^{-7}$, Ratio: 32/93 (0,34).

Die β -adrenerge Signalkaskade (Abbildung 18) erhielt in den Berechnungen einen z-Score von -1,96. Es wurde ebenfalls eine Inhibierung des Signalweges vorhergesagt. Während der β_1 -Rezeptor auf RNA-Ebene nicht reguliert zu sein scheint, sind viele andere für das Herz relevante Moleküle in der DJB-Gruppe herunterreguliert: Der L-Typ-Calciumkanal, der eine wichtige Rolle bei der Herzmuskelkontraktion spielt; der Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2), der bei Aktivierung Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freisetzt und die SERCA, eine Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Bers, 2002; El-Armouche und Eschenhagen, 2009).

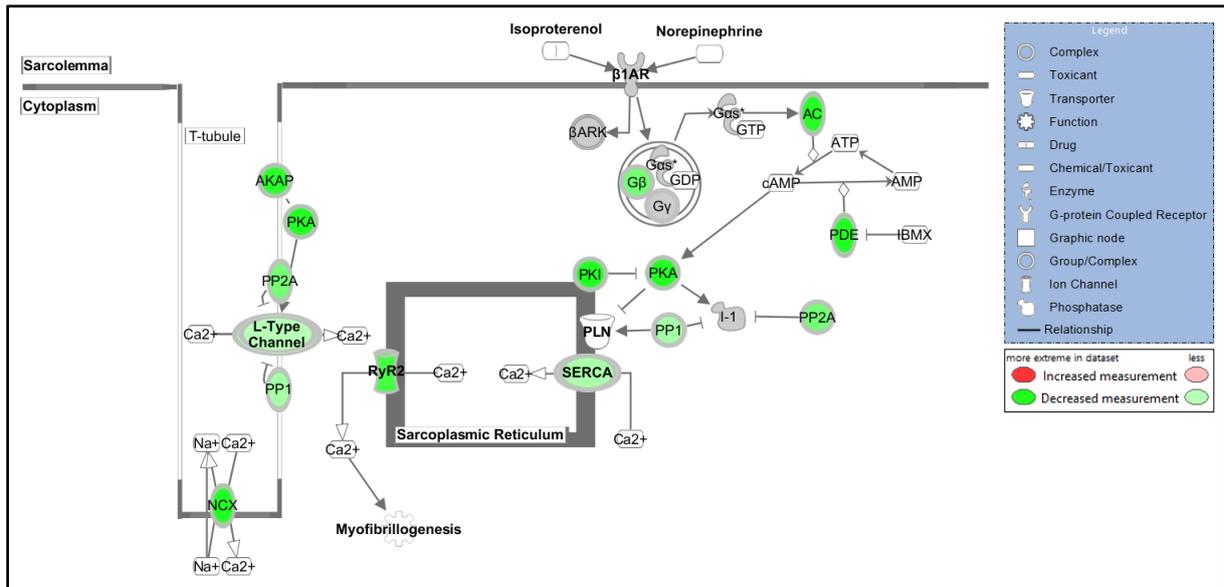


Abbildung 18: β -adrenerge Signalkaskade, Ingenuity Pathway Analysis

Die IPA[®]-Analyse für den Komplex „Beta-adrenergic signaling“ ergab folgende Werte: z-score: -1,96, p-value: $4,42 \cdot 10^{-5}$, Ratio: 38/141 (0,27).

3.3 Genexpression ausgewählter Gene innerhalb der adrenergen Signalkaskade

Die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse (siehe Kapitel 3.2) sollten im Folgenden molekularbiologisch mittels Western Blot und qPCR überprüft werden. Neben den targets, die in der RNA-Sequenzierung eine Regulation gezeigt hatten, wurden auch in der Sequenzierung unauffällige Moleküle untersucht, um eine mögliche Regulation auf Proteinebene zu finden.

3.3.1 Expression von β -Adrenorezeptoren

Bariatrische Eingriffe wirken sich positiv auf die Herzfunktion aus und verringern das Risiko, eine Herzerkrankung zu entwickeln. Im Herzen spielen vor allem β -Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Regulation funktioneller Parameter wie der Herzfrequenz, der Kontraktilität und der Überleitungsgeschwindigkeit (El-Armouche und Eschenhagen, 2009). Um dem molekularen Mechanismus hinter der verbesserten Herzfunktion nach bariatrischen Eingriffen auf den Grund zu gehen, wurde die kardiale Expression von β -Rezeptoren nach DJB bzw. Scheineingriff verglichen.

3.3.1.1 Auswahl eines Referenzgenes

In kardiovaskulären Fragestellungen und Experimenten werden häufig Gene aus dem Kohlenhydratstoffwechsel als Referenzgene verwendet (z. B. *Gapdh*), da sie über Interventionsgruppen hinweg stabil exprimiert werden. Bei dem vorliegenden Experiment, das Übergewicht, Diabetes und Gewichtsverlust beinhaltet, war allerdings zu erwarten, dass gerade diese Stoffwechselwege im Herzen beeinflusst sein werden. Klassische Referenzgene wie *Gapdh* zeigten sich als ungeeignet und es musste vor Beginn der Experimente ein geeignetes Housekeeping-Gen identifiziert werden. Um ein mögliches Referenzgen zu finden, wurde zunächst Literaturrecherche betrieben. Ähnliche Rattenmodelle, ähnliche Interventionen und die verwendeten Housekeeping-Gene wurden verglichen und drei möglicherweise geeignete Gene konnten identifiziert werden: *Hprt1* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*), *Tbp* (*TATA binding protein*) und β -*Actin* (Cabiati, et al., 2012). Die Expression von *Hprt1*, *Tbp* und *Actin* wurde in der DJB-Gruppe und der Sham-Gruppe in einer qPCR analysiert und ihre Cq-Werte in der Software NormFinder verglichen (Andersen, et al., 2004). NormFinder berücksichtigt inter- und intragroup variations und berechnet einen sogenannten stability value (M). Das stabilste Housekeeping-Gen einer Analyse besitzt den kleinsten M-Wert. β -*Actin* wurde als das stabilste Referenzgen (M-Value = 0,2) identifiziert und für die folgenden Analysen als Housekeeping-Gen verwendet (siehe Tabelle 14).

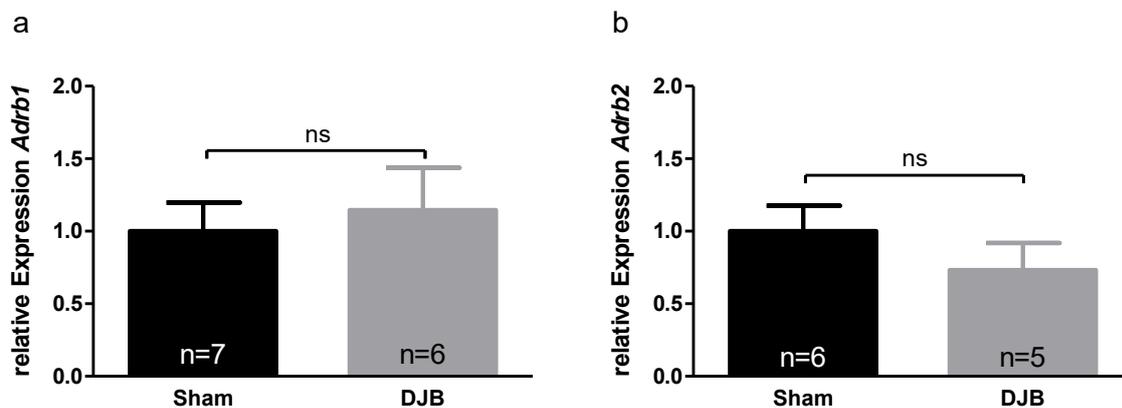
Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse möglicher Referenzgene mittels Normfinder

Die Software Normfinder berechnet für Referenzgene einen stability value (M). In der Tabelle sind die M-Werte für die möglichen Referenzgene *Tbp*, *Hprt1* und β -Actin zu sehen.

Gen	Stability value (M)
<i>Tbp</i>	0,32
<i>Hprt1</i>	0,22
β -Actin	0,2

3.3.1.2 Expression der β -Adrenorezeptoren

Nach der erfolgreichen Identifizierung eines Referenzgenes wurde zunächst die Expression von β_1 -Rezeptoren im linken Ventrikel der Ratten analysiert. Die statistische Analyse zeigte, dass zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression von β_1 -Rezeptoren besteht (siehe Abbildung 19a). Neben dem β_1 -Rezeptor spielt auch der β_2 -Rezeptor eine wichtige Rolle im Herzen. Es wurde auch seine Expression im linken Ventrikel von Ratten der Sham- und DJB-Gruppe in einer Real-Time PCR verglichen (siehe Abbildung 19b). Die statistische Analyse zeigte auch hier keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Nach einem DJB kommt es nicht zu einer Änderung der β_2 -Rezeptorexpression in den Herzen. Die verbesserte Kontraktilität und die erhöhte Ejektionsfraktion nach bariatrischen Eingriffen lassen sich demnach weder durch eine Änderung der β_1 - noch der β_2 -mRNA-Expression erklären.

**Abbildung 19: mRNA-Expression von β_1 - und β_2 -Rezeptoren im linken Ventrikel**

Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von β_1 - (Adrb1) und β_2 -Rezeptor (Adrb2) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff) mittels qPCR. β -Actin wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Der β_3 -Rezeptor wird im Herzen in deutlich geringerem Maße exprimiert als die β_1 - und β_2 -Rezeptoren. Es wird vermutet, dass der β_3 -Rezeptor als Sicherung gegenüber adrenerger Überstimulation dient (Lympopoulos, et al., 2013). Eine Aktivierung des β_3 -Rezeptors führt demnach über NO-Produktion und eine verminderte Aktivität der L-Typ-Calcium-Kanäle zu

einer erhöhten Vasodilatation und einer verbesserten diastolischen Funktion (Rozec, et al., 2009).

Es war nicht möglich, in den Rattenherzen eine Expression des β_3 -Rezeptors nachzuweisen. Bei der Primer-Validierung im β_3 -Rezeptor-reichen Fettgewebe (Abbildung 20b) zeigte sich ein Produkt-Peak der Schmelzkurve bei ca. 90° C. Bei der für die Genexpressionsanalyse der Rattenherzen durchgeführten qPCR (Abbildung 20a) fehlte dieser Produkt-Peak vollständig. Stattdessen zeigte sich ein Peak bei circa 78° C. Dieser Peak entstand durch Primer-Dimere, die aufgrund ihrer verminderten Größe eine niedrigere Schmelztemperatur als das eigentliche Produkt (244 bp) aufweisen.

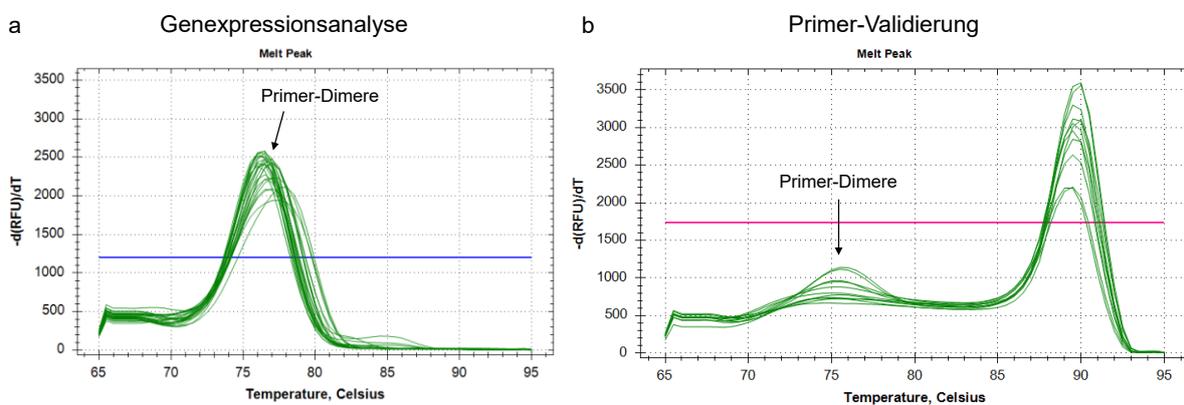


Abbildung 20: mRNA-Expression von β_3 -Rezeptoren im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von β_3 -Rezeptor im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff) mittels qPCR. In a ist die Schmelzkurve der Genexpressionsanalyse zu sehen, in b die Schmelzkurve der Primer-Validierung. Bei der Primer-Validierung entsteht das gewünschte Produkt, bei der Genexpressionsanalyse bilden sich Primer-Dimere.

3.3.2 Expression von Calcium-handling Proteinen

Nach Analyse der β -Adrenorezeptoren folgte die Quantifizierung der Kontraktilitätsproteine, deren Aktivität von den β -Adrenorezeptoren reguliert wird.

Die SERCA2a, eine Calcium-Pumpe im sarkoplasmatischen Retikulum (SR), sorgt dafür, dass Calcium aus dem Zytosol in das SR gelangt. Calcium wird so aus dem Zytosol entfernt, die Relaxation des Herzmuskels gefördert und der Calcium-Load des SRs erhöht. Der erhöhte Calcium-Load führt während der Systole zu vermehrtem Calcium-Ausstrom und einer gesteigerten Kontraktionskraft (El-Armouche und Eschenhagen, 2009).

Die Proteinexpression der SERCA2a wurde mittels Western Blot vergleichend untersucht. Eine Probe innerhalb der Sham-Gruppe musste aufgrund niedriger Proteinkonzentration exkludiert werden. Wie in Abbildung 21 ersichtlich wird, bestand kein Unterschied in der Proteinexpression von SERCA2a zwischen den Gruppen DJB und Sham. In der RNA-Sequenzierung (siehe Abbildung 18) zeigten sich verminderte RNA-Level in der DJB-Gruppe. Diese Tendenz wird auf Proteinebene ebenfalls sichtbar (siehe Abbildung 21b), ist allerdings statistisch nicht signifikant.

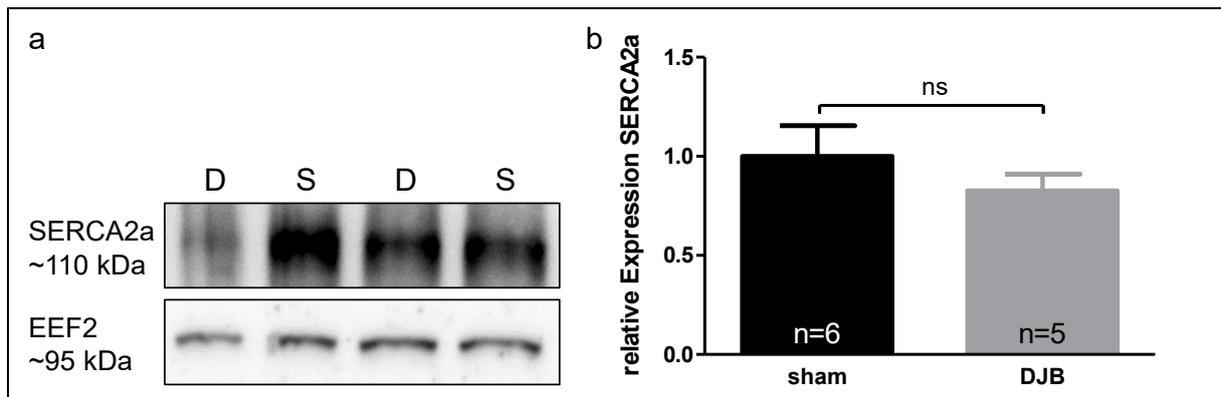


Abbildung 21: Proteinexpression von SERCA2a im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von SERCA2a (sarkoplasmatische Calcium-ATPase 2a) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). EIF2 (eukaryotischer Elongationsfaktor 2) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Neben der SERCA spielt auch Phospholamban (PLB) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktilität des Myokards. Phospholamban ist der endogene Inhibitor der SERCA. Unter adrenerger Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von Phospholamban durch die Proteinkinase A (PKA) oder die CaMKII. Dadurch wird die hemmende Wirkung von Phospholamban auf die SERCA aufgehoben, dies erlaubt eine schnelle Relaxation (Bers, 2002).

Auch eine veränderte Expression oder Phosphorylierung dieses hemmenden Proteins könnte folglich die Herzaktivität beeinflussen. Daher wurde die Proteinexpression und die

Phosphorylierung von PLB an Serin-16 und Threonin-17 per Western Blot untersucht. Die Proteinexpression von Phospholamban war zwischen den beiden Gruppen nicht verändert (siehe Abbildung 22a, b). Ein Nachweis von phosphoryliertem Phospholamban war in den Rattenherzen kaum möglich (siehe Abbildung 22c, d). Bei den Western Blots wurde eine Positivkontrolle (+) mitgeführt. Die Ratten erhielten vor der Organentnahme weder Medikamente wie Isoproterenol, die eine Phosphorylierung vermuten ließen, noch waren sie großem Stress ausgesetzt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Herzen sich bei der Organentnahme im unphosphorylierten Basalzustand befanden.

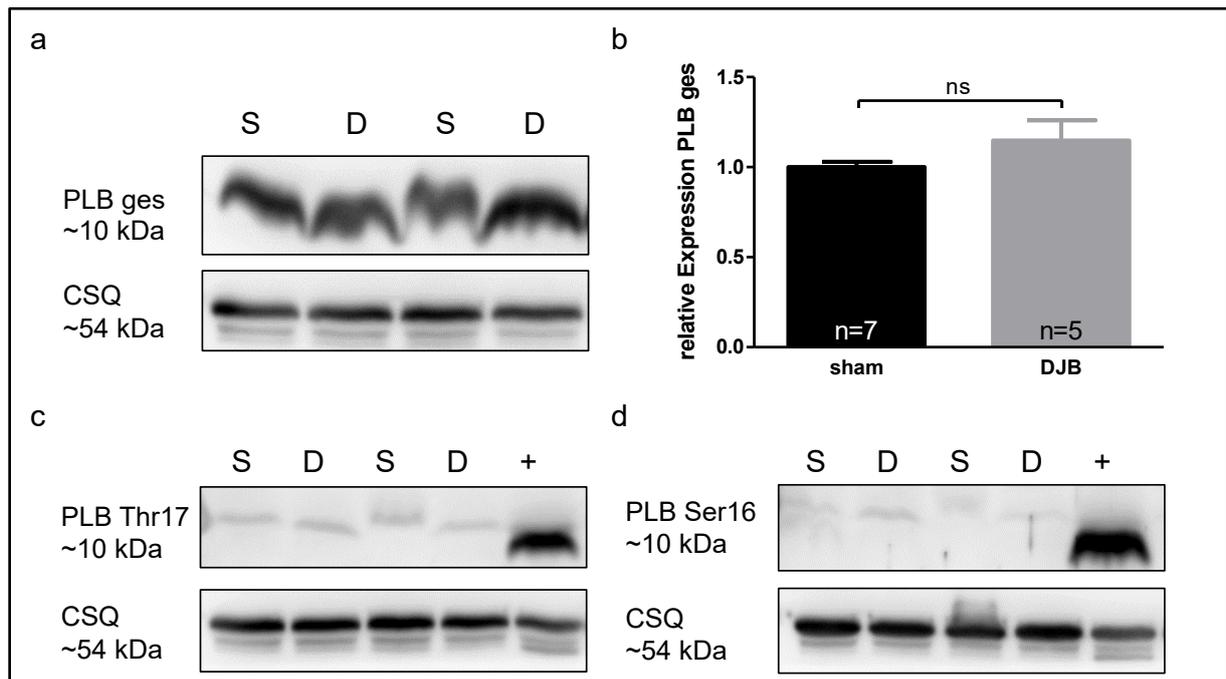


Abbildung 22: Proteinexpression und Phosphorylierung von PLB im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von PLB ges (Phospholamban gesamt), PLB-Ser16 (an Serin16 phosphoryliert) und PLB-Thr17 (an Threonin17 phosphoryliert) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). CSQ (Calsequestrin) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Ein weiteres Protein, das von der PKA phosphoryliert werden kann, ist Troponin I (Tn-I). Die Phosphorylierung an Ser23/24 sorgt für eine verminderte myofibrilläre Calcium-Sensitivität und eine beschleunigte Relaxation (El-Armouche und Eschenhagen, 2009). Um einen Einblick in die Expression und den Phosphorylierungszustand von Troponin I (Tn-I) zu bekommen, wurde ein Western Blot auf Tn-I und die phosphorylierte Form Tn-I-Ser 23/24 durchgeführt. Wie in Abbildung 23 ersichtlich wird, war die Expression und Phosphorylierung von Troponin I nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Es ist allerdings erkennbar, dass die DJB-Kohorte tendenziell eine niedrigere Troponin I-Expression aufweist.

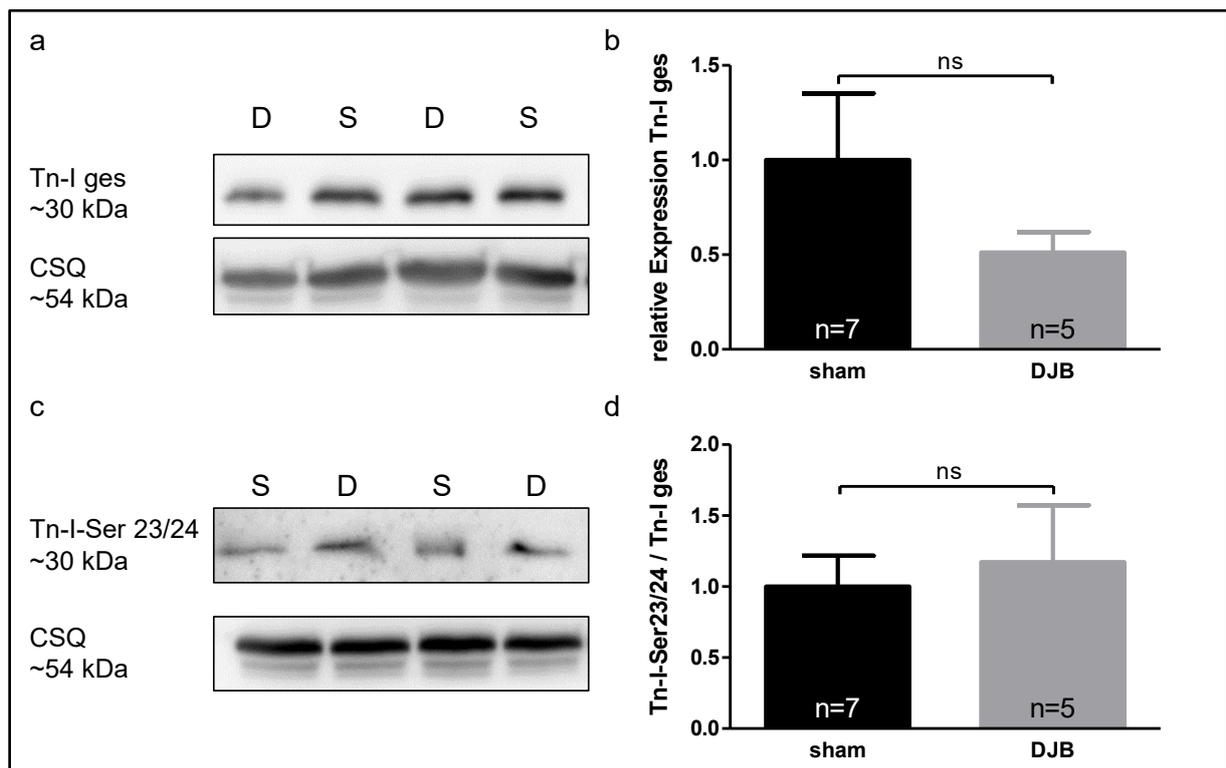


Abbildung 23: Proteinexpression und Phosphorylierung von Troponin I im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von Tn-I (Troponin I), Tn-I-Ser23/24 (an Serin23/24 phosphoryliert) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). CSQ (Calsequestrin) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Ein weiteres Calcium-handling Protein, das eine Rolle bei der Regulation der kardialen Kontraktilität spielt, ist das kardiale Myosin-binding Protein C (cMyBP-C). Durch die PKA oder die CaMKII kann cMyBP-C an Serin-282 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von cMyBP-C ist wichtig für eine adäquate Kraftentwicklung, wirkt kardioprotektiv und ermöglicht eine normale Herzfunktion. In pathologischen Zuständen wie atrialer Fibrillation und Ischämie zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von cMyBP-C (El-Armouche, et al., 2007). Die Proteinexpression von phosphoryliertem cMyBP-C (Ser-282-cMyBP-C) und dem gesamten cMyBP-C wurde untersucht (siehe Abbildung 24). Es konnte gezeigt werden, dass weder die Phosphorylierung noch die Gesamtexpression in den Ratten mit DJB verändert ist.

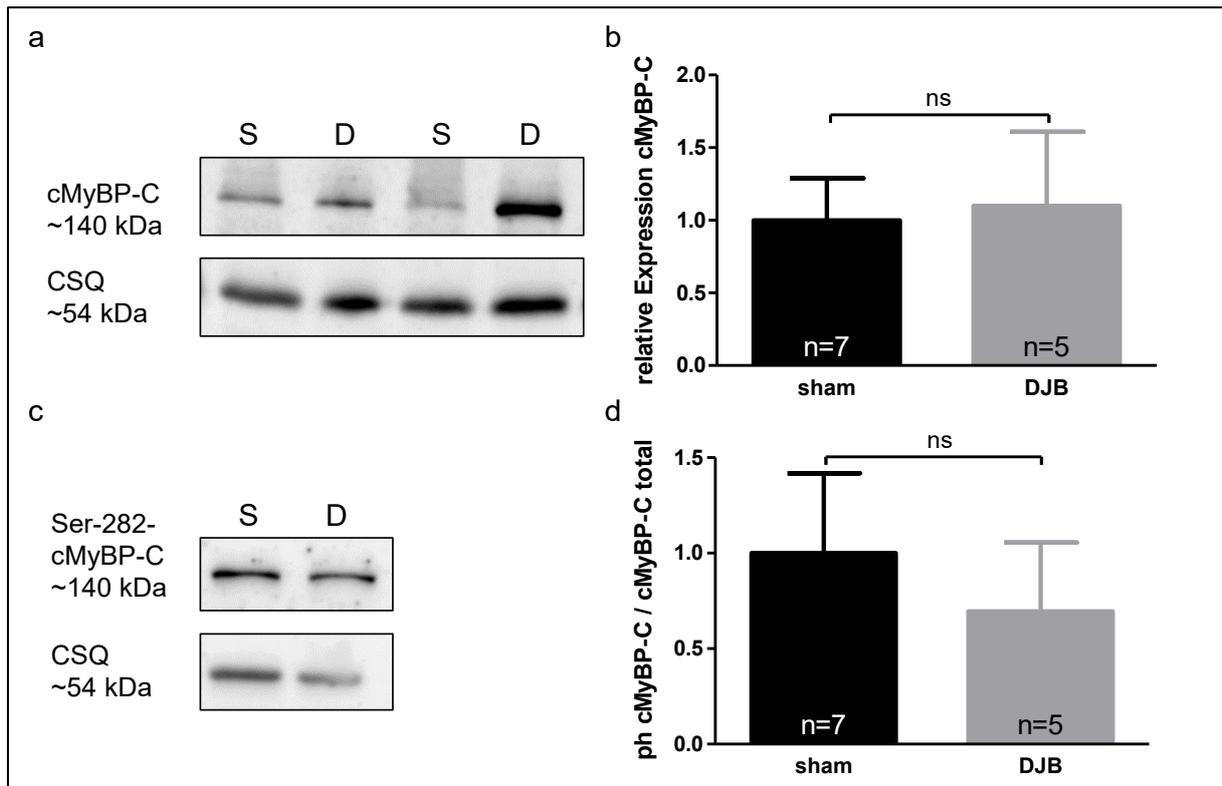


Abbildung 24: Proteinexpression und Phosphorylierung von cMyBP-C im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von cMyBP-C (cardiac myosin-binding Protein) und Ser282-cMyBP-C (an Serin282 phosphoryliertes cMy-BP) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). CSQ (Calsequestrin) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

3.4 Der Fibrosemarker α -SMA

Fibrose kann die Kontraktilität des Herzens vermindern und trägt zur Entstehung kardialer Krankheitsbilder bei (Kemp und Conte, 2012). Histologisch konnte nachgewiesen werden, dass ein duodenojejunaler Bypass myokardiale Fibrose vermindert (Zhang, et al., 2017). Auf Proteinebene sollte dies nun anhand des Fibrosemarkers α -SMA (alpha-smooth muscle actin) überprüft werden. Die Proteinexpression von α -SMA war zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant verändert. Es ist aber erkennbar, dass die α -SMA-Proteinexpression in der DJB-Gruppe tendenziell niedriger ist (siehe Abbildung 25). Eine Probe innerhalb der Sham-Gruppe musste aufgrund niedriger Proteinkonzentration exkludiert werden.

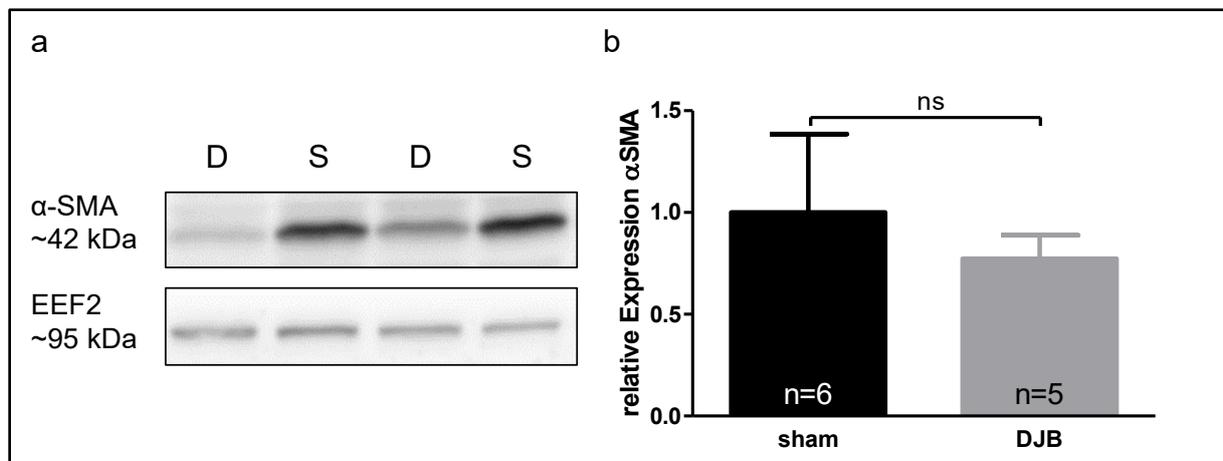


Abbildung 25: Proteinexpression von α -SMA im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von α -SMA (alpha smooth muscle actin) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). EEF2 (eukaryotischer Elongationsfaktor 2) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

3.5 Ausgewählte Gene im Glukose- und Fettsäurestoffwechsel

Physiologischerweise gewinnt das Herz den Großteil seines ATPs aus Fettsäuren. In Stresssituationen wie Ischämie und pathologischer Hypertrophie beginnt das Herz nach und nach auf den Glukosestoffwechsel umzustellen (Shao und Tian, 2015).

Ob sich die Expression der Glukosetransporter *Glut1*, *Glut4* und *Sglt1* nach dem DJB verändert, wurde mit einer Real-Time PCR untersucht (siehe Abbildung 26). Die Analyse zeigte, dass sich die Expression von *Glut4* und *Sglt1* nicht verändert. Die *Glut1*-Expression hingegen war in der Gruppe mit bariatrischem Eingriff signifikant erhöht. Möglicherweise lässt sich die bessere Herzfunktion durch eine vermehrte Expression von *Glut1* und eine dadurch vermehrte Glukoseaufnahme ins Herzen erklären.

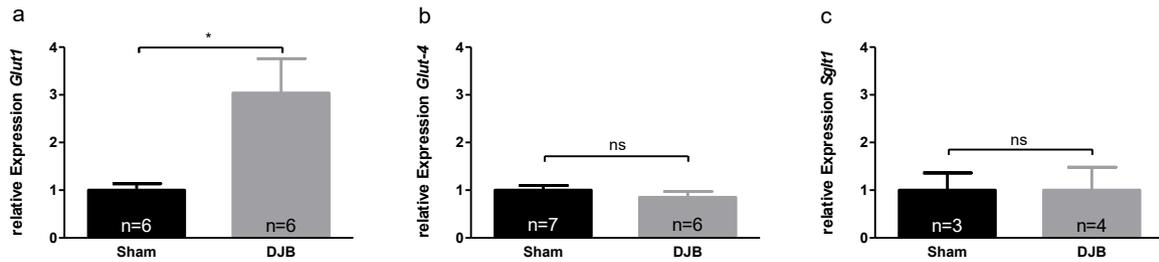


Abbildung 26: mRNA-Expression von Glukosetransportern

Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von a) *Glut1* (Glukosetransporter 1), b) *Glut4* (Glukosetransporter 4) und c) *Sglt1* (sodium-dependent glucose transporter 1) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff) mittels qPCR. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte von < 0,05 (*) werden als statistisch signifikant angesehen, P-Werte > 0,05 werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Nachdem eine Erhöhung der mRNA-Expression von *Glut1* gezeigt werden konnte, sollte diese Beobachtung ebenfalls auf Proteinebene überprüft werden. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blots analysiert (siehe Abbildung 27). Eine Probe innerhalb der Sham-Gruppe musste aufgrund niedriger Proteinkonzentration exkludiert werden. Eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge nach DJB konnte nicht nachgewiesen werden.

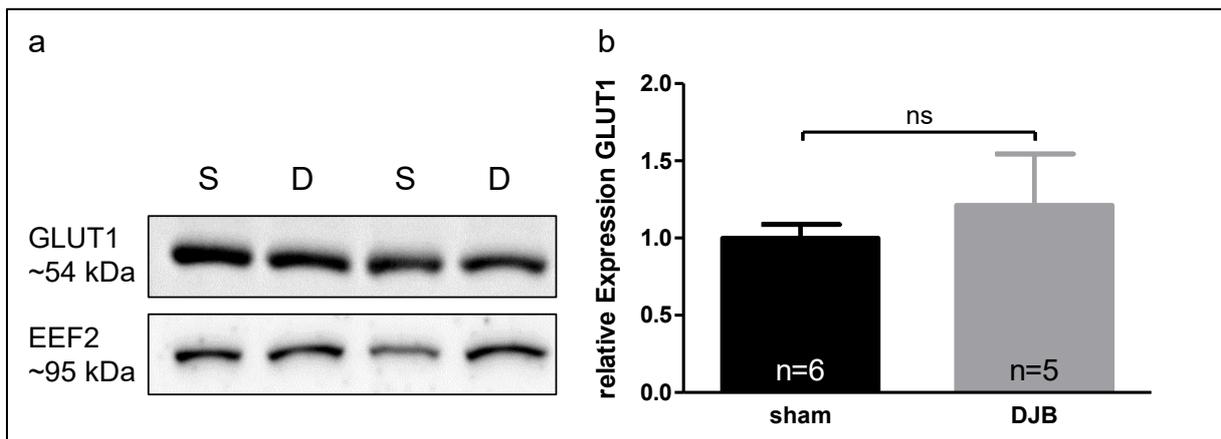


Abbildung 27: Proteinexpression von GLUT1 im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der Proteinexpression von GLUT1 (Glukosetransporter 1) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff). EEF2 (eukaryotischer Elongationsfaktor 2) wurde zur Normalisierung genutzt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte > 0,05 werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Um den Einfluss eines bariatrischen Eingriffs auf den Fettsäurestoffwechsel des Herzens zu analysieren, wurde die Expression von drei für die Fettsäureoxidation wichtige Gene, untersucht: *Cpt-1b* (*Carnitine palmitoyltransferase 1b*) ist ein Membranshuttle, das Fettsäure-Acyl-CoA-Moleküle in das Mitochondrium transportiert (Azevedo, et al., 2013). Neben *Cpt-1b* wurden noch das Enzym MCAD (Medium-Acyl-CoA-Dehydrogenase) und PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), ein Co-Aktivatoren von PPAR- α untersucht (Pereira, et al., 2013; Yang, et al., 2015). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse machen deutlich, dass zwischen den Gruppen DJB und Sham keine

Unterschiede in der mRNA-Expression der analysierten Fettsäure-Gene *Cpt-1b*, *Mcad* und *Pgc-1α* bestanden (Abbildung 28).

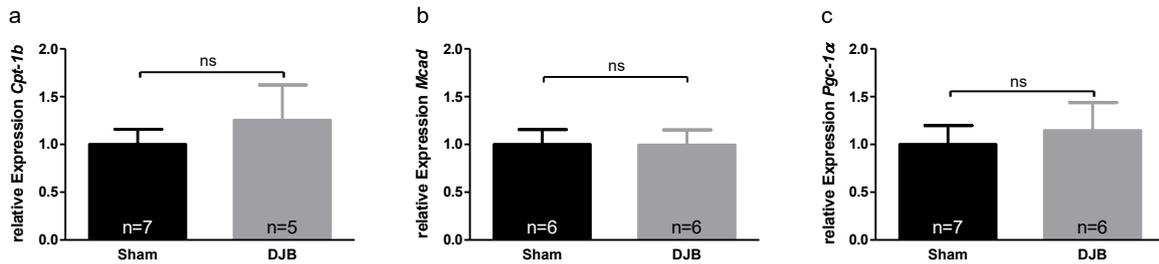


Abbildung 28: mRNA-Expression von Genen der Fettsäureoxidation im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von *Cpt-1b* (Carnithin-Palmitoyl-Transferase 1b), *Mcad* (Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase) und *Pgc-1α* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff) mittels qPCR. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

3.6 Die Gene *Hif-1α* und *Nhe1*

Der Transporter GLUT1 zählt zu den Hypoxie-induzierbaren Genen, seine Genexpression wird u. a. direkt über das Hypoxia-inducible Factor-1-System reguliert. Die Aktivität dieses Systems wiederum wird über den Faktor HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α) reguliert. Die Synthese dieses Faktors wird von Inflammationsmediatoren stimuliert, sauerstoff-abhängige Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung fördern seine Degradierung (Bateman, et al., 2007) Die Expression von HIF-1α kann somit erste Hinweise auf den Versorgungszustand des Herzens geben und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Expression von GLUT1. Um festzustellen, ob eine vermehrte Expression von HIF-1α vorliegt und in diesem Modell möglicherweise zur vermehrten Expression von GLUT1 beiträgt, wurde eine Analyse der *Hif-1α*-Genexpression durchgeführt. In Abbildung 29a ist die mRNA-Expression von *Hif-1α* in der DJB- und Sham-Gruppe dargestellt. Es konnten kein Unterschied in der *Hif-1α*-Expression gezeigt werden. Die DJB-Gruppe zeigte keine verminderte mRNA-Expression von *Hif-1α*. Die erhöhte *Glut1*-Expression in der DJB-Gruppe lässt sich demnach nicht durch eine erhöhte *Hif-1α*-Expression erklären.

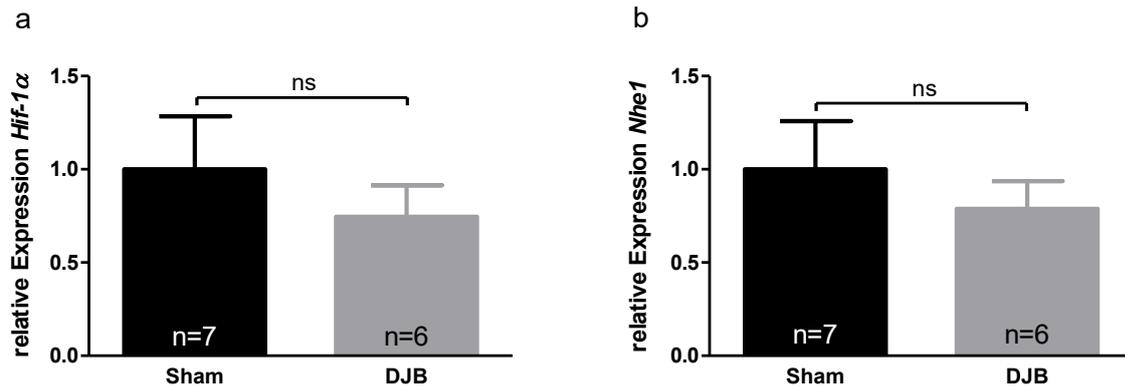


Abbildung 29: mRNA-Expression von *Hif-1α* und *Nhe1* im linken Ventrikel

Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von *Hif-1α* (hypoxia-inducible factor 1α) und *Nhe1* (sodium-hydrogen antiporter 1) im linken Ventrikel von Ratten mit DJB (duodenojejunaler Bypass) oder Sham (Schein-Eingriff) mittels qPCR. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). P-Werte $> 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) angesehen.

Sodium-hydrogen antiporter 1 (NHE1) ist ein Antiporter, der Natrium im Austausch für Protonen in die Zelle transportiert. Bei Herzinsuffizienz ist die Aktivität des NHE1-Transporters erhöht. Durch eine erhöhte NHE1-Aktivität kommt es zu Zellschäden und Kardiomyopathien. Eine Inhibition von NHE1 mit dem NHE-1-Inhibitor Cariporid verminderte kardiale Nekrose, Fibroseneigung, Infarktgröße, Remodeling und die Entwicklung einer Hypertrophie oder einer systolischen Dysfunktion (Packer, 2017). Die Expression von NHE1 sollte auch in dem Kontext von bariatrischer Chirurgie untersucht werden. Durch eine qPCR konnte gezeigt werden, dass ein DJB keine Änderung der *Nhe1*-mRNA-Expression herbeiführte (siehe Abbildung 29b). Eine möglicherweise protektive verringerte *Nhe1*-mRNA-Expression in den Herzen der DJB-Ratten konnte nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Inzidenz und Prävalenz der Adipositas werden in Zukunft stark zunehmen, für die nächsten 50 Jahre prognostizieren Statistiker eine Verdopplung der übergewichtigen und eine Verdreifachung der adipösen Menschen (Hamzeh, et al., 2017). Effiziente, non-invasive Therapieansätze für einen dauerhaften Gewichtsverlust fehlen, ein bariatrischer Eingriff ist momentan die einzige dauerhaft erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit der Adipositas (Bruinsma, et al., 2015). Bariatrische Eingriffe sorgen über Modifikationen der gastrointestinalen Anatomie für einen dauerhaften Gewichtsverlust (Bruinsma, et al., 2015). Das Spektrum der positiven Auswirkungen bariatrischer Chirurgie auf den gesamten Körper ist enorm: Durch den Eingriff verbessert sich der Glukosestoffwechsel der Patienten drastisch bis hin zu einer Remission des Typ-2-Diabetes und die Patienten sind nach dem Eingriff häufig nicht mehr auf Insulin oder orale Antidiabetika, wie Metformin, angewiesen (Rubino, et al., 2016). Neben den eindrucksvollen Effekten auf den Glukosestoffwechsel wurde auch ein positiver Effekt auf das kardiovaskuläre System beobachtet: Funktionelle Parameter des Herzens, wie beispielsweise die Ejektionsfraktion oder die Herzfrequenz verbessern sich kurz nach dem Eingriff und das Risiko schwerer kardiovaskulärer Ereignisse sinkt deutlich (Aggarwal, et al., 2016; Benotti, et al., 2017; Zhang, et al., 2017).

Diese bisher wenig erforschte Verbindung zwischen der Modulation des Stoffwechsels durch bariatrische Eingriffe im Gastrointestinaltrakt und dem Herzen birgt großes Potential, um zu einem tieferen Verständnis der Auswirkungen von Adipositas, Diabetes und Gewichtsverlust auf das Herz zu gelangen. Interessant ist vor allem, dass das zuvor diabetische Herz, welches gekennzeichnet ist durch linksventrikuläre Hypertrophie, Dilatation und Fibrose, durch die Operation in einen physiologischeren Zustand gebracht wird.

Das Verständnis molekularer zellulärer Mechanismen und Signalwege, die zur Verbesserung der kardialen Funktion durch bariatrische Operation führen, liefert möglicherweise neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen und könnte helfen, neue Therapieoptionen für schwerwiegende Erkrankungen wie Herzinsuffizienz abzuleiten.

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Um Einblick in die Effekte von Übergewicht und bariatrischer Chirurgie auf das Herz zu erlangen, wurde in dieser Arbeit mit linksventrikulärem Gewebe diabetischer Ratten, die einen duodenojejunalen Bypass erhielten und mit linksventrikulärem Gewebe übergewichtiger, prädiabetischer Mäuse gearbeitet. Dabei sind die folgenden Ergebnisse generiert worden:

1. Übergewicht und ein prädiabetischer Zustand induzierten im HFD-Mausmodell eine drastische Herabregulation der mRNA-Expression der Glukosetransporter *Glut1* und *Glut4*.
2. Die differentielle Genexpressionsanalyse der Rattengewebeproben (DJB vs. Kontrolle) lieferte einen Überblick über die verschiedenen Signalwege, die nach bariatrischer Intervention verändert sind. Das *in silico modeling*, die sogenannte *Pathway*-Analyse, ergab eine hypothetische Regulation der oxidativen Phosphorylierung, der adrenergen Signalkaskade und des Renin-Angiotensin-Signalsystems.
3. Die daraufhin durchgeführte Analyse des β -adrenergen Signalweges zeigte keine differentielle Expression relevanter Gene oder Proteine zwischen den bariatrischen Interventionsgruppen.
4. Abschließend wurden die Auswirkungen eines DJB auf die Expression von Genen des kardialen Stoffwechsels untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des Glukosetransporters *Glut1* mit bariatrischem Eingriff signifikant erhöht war, während die Glukosetransporter *Glut4* und *Sgt1* und repräsentative Gene des Fettsäurestoffwechsels wie *Mcad*, *Pgc-1 α* und *Cpt-1b* nicht durch den bariatrischen Eingriff beeinflusst waren.

4.2 Das Herz - Adipositas und Diabetes

Um den Einfluss von Übergewicht und Typ-2-Diabetes auf die Herzfunktion und das kardiale Gen- und Proteinexpressionsprofil zu analysieren, wurden männliche C57BL/6-Mäuse über zwölf Wochen mit einer speziellen Hochfettdiät gefüttert. Mittels GTT und ITT wurde die Blutzuckerregulation der Tiere regelmäßig überprüft und am Ende des Experimentes konnte eine diabetische bzw. prädiabetische Stoffwechsellage festgestellt werden (siehe 3.1.2).

4.2.1 Funktionelle Analyse mittels Echokardiographie

Die funktionellen Auswirkungen der Hochfettfütterung auf das Herz wurden mittels Echokardiographie evaluiert. Die auch klinisch relevanten Parameter Herzfrequenz, Schlagvolumen, Ejektionsfraktion (EF), enddiastolisches Volumen und *fractional area shortening* (FAS) dienten hier als Indikatoren für die Herzfunktion und Kontraktilität. Zu keinem

der Zeitpunkte (Woche 0, 6, 12) zeigten sich signifikante Unterschiede in den oben genannten funktionellen Parametern. Die zwölfwöchige Hochfettfütterung führte zu keinen echokardiographisch darstellbaren pathologischen Veränderungen der Herzen.

Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu bisher publizierten Arbeiten über die Auswirkungen einer Hochfettdiät auf das kardiovaskuläre System im Mausmodell. Dabei war eine Fütterung über zwölf Wochen ausreichend, um kardiale Veränderungen zu induzieren: Roberts et al. zeigten, dass bereits nach zwölf Wochen Fütterung die linksventrikuläre Masse der HFD-Tiere signifikant erhöht war. Verwendet wurden hier C57BL/6J-Mäuse und eine Hochfettfütterung mit 60 % kcal % Fett (Roberts, et al., 2015). Andere Parameter wie die EF, das *Fractional shortening* (FS) und die Herzfrequenz waren jedoch auch hier durch die zwölf Wochen Hochfettfütterung nicht verändert (Roberts, et al., 2015). Das bestätigt unsere Ergebnisse teilweise. Eine beeinträchtigte kardiale Kontraktilität durch Hochfettfütterung konnte bei 16-monatiger HFD (60 % der Kalorien aus Fett) bestätigt werden. In dieser Studie zeigten die Tiere unter basalen Bedingungen in der Echokardiographie keine Dysfunktion. Jedoch konnte durch pharmakologische Stressinduktion eine verminderte Kontraktilität nachgewiesen werden (Calligaris, et al., 2013). Außerdem nahm das Herzgewicht zu, die Wand des linken Ventrikels und das intraventrikuläre Septum hypertrophierten. Insgesamt kam es durch die Hochfettfütterung zu pathologischen Umbauprozessen im Herzen (Calligaris, et al., 2013). Für weitreichende funktionelle Einschränkungen des Herzens sorgten bei C57BL/6 auch 22 Wochen Hochfettfütterung mit einem weniger fetthaltigen Futter (45 % der Kalorien aus Fett): Das linksventrikuläre FS nahm ab und die linksventrikuläre Masse zu (Guo, et al., 2013). Insgesamt korrelieren strukturelle Veränderungen des Herzens mit der Dauer der HFD und der Futtersorte und dies muss in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

4.2.2 Veränderungen im Glukosemetabolismus

Neben der funktionellen Evaluation mittels Echokardiographie wurden die Herzen auch hinsichtlich der Expression bestimmter Glukosetransporter analysiert. Es wurde die mRNA-Expression von *Glut1*, *Glut4* und *SglT1* vergleichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Glut1* und *Glut4* in der HFD-Gruppe signifikant vermindert war (siehe Kapitel 3.1.4).

Von anderen Arbeitsgruppen wurde bereits bewiesen, dass durch Hochfettfütterung induziertes Übergewicht im Herzen von Mäusen für metabolische Veränderungen sorgt: Nach acht Monaten Fütterung waren die mRNA-Level von *Glut1* und *Glut4* im Herz signifikant vermindert (Calligaris, et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits drei Monate Hochfettfütterung ausreichend sind, um diese Veränderungen im kardialen

Expressionsmuster zu induzieren. Auf Proteinebene zeigten Roberts et al. eine Verminderung der GLUT4-Expression nach zwölf Wochen Hochfettfütterung (Roberts, et al., 2015).

Für den Transporter SglT1 konnte keine signifikante Beeinflussung durch HFD gezeigt werden. Andere Arbeitsgruppen allerdings waren in der Lage nachzuweisen, dass die SGLT1-Expression in verschiedenen Setups verändert sein kann. In hypertrophierten und ischämischen humanen Herzen war die SGLT1-Expression signifikant erhöht (Di Franco, et al., 2017). Für das T2DM-Mausmodell ob/ob konnte eine zwei- bis dreifache Erhöhung der mRNA-Expression von *SglT1* gezeigt werden (Banerjee, et al., 2009).

Die hier generierten Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass es schon durch eine vergleichsweise kurze Hochfettfütterung und die damit einhergehende Gewichtszunahme zu einer Herabregulation der Expression von *Glut1* und *Glut4* kommt, dieser Effekt konnte für *SglT1* nicht gezeigt werden.

4.2.3 Limitationen des HFD-Mausmodells

In unserem Tiermodell verwendeten wir C57BL/6NRj-Mäuse. Diese gelten als besonders gut geeignet, um metabolische Auswirkungen von hochkalorischer, fettreicher Ernährung auf den menschlichen Körper zu imitieren (Wang und Liao, 2012). Bei einer ad libitum-Fütterung mit HFD-Futter entwickeln Mäuse dieses Stammes Übergewicht, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Hypertonie. Erhalten diese Tiere allerdings ND-Futter ad libitum, bleiben sie normalgewichtig und entwickeln keine metabolischen Einschränkungen (Wang und Liao, 2012). Mäuse des C57BL/6-Stammes sind demnach prinzipiell gut geeignet zur Beantwortung unserer Fragestellung und entwickeln bei Hochfettfütterung Veränderungen des Herzens.

Neben der Wahl des Stammes, ist auch die Dauer der HFD-Fütterung ein Parameter, der das Ausmaß der Auswirkungen auf das Herz limitiert. R. Guo et al. zeigten, dass 22 Wochen Hochfettfütterung Veränderungen kardialer Parameter wie des Fractional shortenings (FS) und des Herzgewichts induzieren. Verwendet wurden C57BL/6-Mäuse, die zu Beginn der Fütterung vier Monate alt waren (Guo, et al., 2013). Eine andere Arbeitsgruppe, die CD-1-Mäusen ab dem Alter von acht Wochen einer Hochfettfütterung unterzogen, konnten bereits nach acht Wochen Fütterung echokardiographisch Veränderungen in der HFD-Gruppe feststellen (Carbone, et al., 2015). Faktoren wie die Wahl des Mausstammes, die Dauer der Hochfettfütterung und das Alter der Tiere spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung kardialer Veränderungen. Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Veränderungen in der Echokardiographie könnte die Dauer der Fütterung und das Alter der Tiere sein. Für unseren experimentellen Ansatz ist die Wahl des Mausstammes C57BL/6 durchaus geeignet und spielt wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle für die fehlenden kardialen Einschränkungen.

Um Veränderungen der Herzfunktion in der Echokardiographie zeigen zu können, hätte die Dauer der Hochfettfütterung oder das Alter der Tiere bei Versuchsbeginn möglicherweise angepasst werden müssen.

Zu bedenken ist außerdem, dass die Tiere während der zwölf Wochen Fütterung wiederholtem Stress in Form von Blutentnahmen oder Gewichtskontrollen ausgesetzt waren. Stress, z.B. durch Einschränkung ihrer Bewegungsfreiheit in einem Restraîner, sorgt dafür, dass die Tiere weniger an Gewicht zunehmen als eine Vergleichsgruppe ohne Einschränkungen (Jeong, et al., 2013). Auch Stress durch Separation führt zu einem deutlichen Gewichtsverlust (Hao, et al., 2001). Über den Versuchszeitraum waren die Tiere mehrfach Episoden der Separation und des Handlings ausgesetzt: Insgesamt wurden vier metabolische Tests durchgeführt, die Tiere wurden zweimal wöchentlich gewogen und es wurden drei Echokardiographien durchgeführt. Möglicherweise hätten die Tiere bei weniger Interventionen und somit weniger Stress durch Handling mehr an Gewicht zugenommen. Die Einschränkungen des Herzens wären so eventuell früher und vermehrt eingetreten.

Die Reproduzierbarkeit echokardiographischer Analysen ist abhängig von einer konsistenten Analyse der Bilder (Pistner, et al., 2010). In unserem Fall stieg der Schwierigkeitsgrad der echokardiographischen Beurteilbarkeit mit zunehmendem Körpergewicht und damit verbundenem subkutanem Fett der Tiere. Eine Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund der zunehmend komplizierteren Bedingungen ist auch in unserem Versuchsaufbau nicht auszuschließen.

4.3 Das Herz - Bariatrische Chirurgie

Bariatrische Eingriffe haben weitreichende Auswirkungen auf das Herz und seine Funktion. Patienten weisen nach einem bariatrischen Eingriff ein deutlich geringeres Risiko für schwere kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt und Schlaganfall auf (Benotti, et al., 2017). Darüber hinaus zeigen sich Verbesserungen der Ejektionsfraktion und eine Abnahme der linksventrikulären Masse (Aggarwal, et al., 2016). Dass sich diese Effekte gewichtsunabhängig manifestieren, konnte im Tiermodell gezeigt werden (Zhang, et al., 2017).

4.3.1 Differentielle Genexpressionsanalyse – RNA-Sequenzierung

Die RNA für die Sequenzierung wurde direkt nach Erhalt der Herzen aus London isoliert und an die Deep Sequencing Group am Biotechnologischen Zentrum der TU Dresden (BIOTEC) weitergegeben. Die RNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.2) ergab, dass die Intervention DJB zu einer großen Anzahl von signifikant veränderten Transkripten führte. Insgesamt waren weit über 3000 Gene in den Herzen der DJB-Gruppe differentiell exprimiert. Dies bestätigte die Annahme, dass der Eingriff im Gastrointestinaltrakt große Auswirkungen auf das Herz hat und zeigte, dass eine dezidierte Analyse der regulierten Signalwege weiterführend ist.

Die Analyse der Sequenzierung mittels IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen®) diente dazu, *in silico* regulierte Signalwege durch automatisierte Mustererkennung aufzuzeigen und grafisch darzustellen. Durch dieses Computermodeling werden dem Anwender auch potenzielle Interaktionen zwischen regulierten Genen aufgezeigt, die Einblicke in bisher unbekannte Regulationsmechanismen liefern können. Ferner liefert dieses experimentelle Vorgehen auch Angriffspunkte für künftige Forschungsvorhaben.

In der IPA auffällig gewordene Moleküle wurden mittels molekularbiologischer Verfahren analysiert und so eine Regulation auch auf Proteinebene untersucht. Auch in der IPA primär unauffällige Moleküle wurden molekularbiologisch untersucht, da eine fehlende Regulation auf RNA-Ebene eine Regulation auf Proteinebene nicht ausschließt (Maier, et al., 2009). Die IPA-Analyse identifizierte zahlreiche Signalwege als aktiviert oder inhibiert. In den folgenden Abschnitten soll auf einzelne, für das Herz besonders relevante Signalwege eingegangen werden.

4.3.1.1 Oxidative Phosphorylierung und mitochondriale Funktion

Die IPA sagte eine Aktivierung (z-Score: 4,62) des Komplexes „Oxidative Phosphorylierung“ vorher (siehe Kapitel 3.2.3.1). Als Organ mit großem Energiebedarf ist das Herz auf eine effiziente und konstante mitochondriale ATP-Synthese angewiesen (Anupama, et al., 2018). Syntheseort von ATP sind die Mitochondrien mit der Elektronentransportkette (ETC, *electron transport chain*) und der Oxidativen Phosphorylierung (Schwarz, et al., 2014). Ein über der

inneren Mitochondrienmembran entstehender elektrochemischer Gradient sorgt letztlich für die Synthese von ATP, denn er treibt die Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase (Komplex V) an (Schwarz, et al., 2014). Zur kardialen ATP-Synthese stehen neben Glukose auch Fettsäuren als Hauptenergiequelle zur Verfügung. Für das diabetische Herz ist bekannt, dass häufig ein Ungleichgewicht zwischen Aufnahme und Abbau von Fettsäuren herrscht, dies kann zur sogenannten Lipotoxizität, der intramyokardialen Akkumulation von Lipiden, führen (Anupama, et al., 2018; Giordano, 2005). Typische Folgen der Lipotoxizität sind ein erhöhter Sauerstoffverbrauch, mitochondriales Uncoupling, kontraktile Dysfunktion und eine reduzierte ATP-Synthese (Anupama, et al., 2018; Giordano, 2005). Ein weiterer Grund für eine reduzierte ATP-Synthese kann eine sogenannte mitochondriale Dysfunktion darstellen. Die Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und Arteriosklerose ist mit einer mitochondrialer Dysfunktion verbunden (Siasos, et al., 2018). Bei einer mitochondrialer Dysfunktion kommt es zur vermehrten Entstehung von toxischen *reactive oxygen species* (ROS), die einerseits als wichtige Signalmoleküle fungieren, andererseits bei übermäßiger Produktion für makromolekulare Schäden sorgen können (Cadenas, 2018; Siasos, et al., 2018). Vermehrte Anwesenheit von ROS im Herzen begünstigt Inflamationsprozesse, strukturelle Veränderungen der mitochondrialen Membran und verändert sowohl mitochondriale als auch nukleäre Expressionsmuster (Wu, et al., 2015; Yao, et al., 2015).

In unseren Analysen lieferte die IPA den Hinweis auf eine verbesserte oxidative Phosphorylierung innerhalb der DJB-Kohorte. Vor allem Gene des Komplexes V, der für die ATP-Synthese zuständig ist, scheinen in den Herzen der DJB-Ratten überrepräsentiert zu sein. Dankel et al. zeigten bereits Veränderungen von Genen der ATP-Synthase im Kontext bariatrischer Chirurgie. Bei der Analyse von subkutanem Fettgewebe ein Jahr nach bariatrischem Eingriff (hier verwendet: BPD/DS, *biliopancreatic diversion with duodenal stitch*) trat eine vermehrte Expression von *ATP5G2*, einer Untereinheit der ATP-Synthase und *COX5B*, einer Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase, auf (Dankel, et al., 2011). Eine andere Arbeitsgruppe analysierte die mitochondriale Funktion im Skelettmuskel nach *biliopancreatic diversion* (BPD) und konnte Veränderungen in Genen zeigen, die die mitochondriale Aktivität und Funktion beeinflussen und die mitochondriale Biogenese regulieren (Hernández-Alvarez, et al., 2009). Eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch einen bariatrischen Eingriff ist demnach durchaus auch im Herzen vorstellbar.

Um eine valide Aussage über die genauen Auswirkungen der vermehrten Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung auf die mitochondriale Funktion und die ATP-Produktion treffen zu können, sind weitere Experimente nötig. Eine gesteigerte ATP-Synthese

könnte die positiven Effekte der gastrointestinalen Intervention auf die Pumpfunktion des Herzens und die kardiovaskuläre Prognose erklären.

4.3.1.2 Adrenerge Signalwege

Auch der α - und der β -adrenerge Signalweg wurden mittels IPA analysiert (siehe 3.2.3.3): Für die α -adrenerge Signalkaskade wurde eine Inhibition vorhergesagt, der α -Adrenorezeptor selbst und weitere Signalmoleküle wie der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) lagen auf RNA-Ebene in der DJB-Gruppe vermindert vor. Bekannt ist, dass die diabetische Kardiomyopathie häufig mit einer Dysfunktion des NCX einhergeht, die Calcium-Homöostase gestört ist und es zu einem erhöhten diastolischen Calcium-Level kommt (Singh, et al., 2018). Eine Hochregulation des NCX konnte beispielsweise bei Vorhofflimmern nachgewiesen werden (Schotten, et al., 2002). Insgesamt lieferte die Analyse mittels IPA hier vor allem interessante neue Angriffspunkte für zukünftige Experimente und Projekte.

Durch die IPA wurde auch für die β -adrenerge Signalkaskade eine Inhibition (z-Score: -1,96) vorhergesagt (siehe Kapitel 3.2.3.3). Während der β_1 -Rezeptor selbst auf RNA-Ebene nicht reguliert war, sind viele andere für das Herz relevante Moleküle in der DJB-Gruppe herunterreguliert: Der L-Typ-Calciumkanal, der eine wichtige Rolle bei der Herzmuskelkontraktion spielt; der RyR2, der bei Aktivierung Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freisetzt und die SERCA, eine Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Bers, 2002; El-Armouche und Eschenhagen, 2009). Abnormales intrazelluläres Calcium-handling gilt als einer der Hauptgründe für die Entstehung verminderter kardialer Kontraktilität und Störungen der Relaxation bei Herzinsuffizienz (Santulli, et al., 2017). Bekannt ist auch, dass es im Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz zu einer vermehrten spontanen Freisetzung von Calcium aus entkoppelten Ryanodin-Rezeptoren kommt, was möglicherweise zur Entstehung von Arrhythmien beiträgt (Dries, et al., 2018).

Die Bedeutung der Alterationen innerhalb beider Signalkaskaden müssen auf verschiedenen Ebenen geprüft werden. Alle Ergebnisse der IPA müssen molekularbiologisch bestätigt werden, um valide Aussagen über die Auswirkungen auf die Herzfunktion treffen zu können. Die IPA lieferte auch hier nur erste Hinweise auf regulierte Signalwege innerhalb der Interventionsgruppe.

4.3.1.3 Limitationen der RNA-Sequenzierung

Bei der RNA-Sequenzierung zeigten sich Schwierigkeiten, die in Zukunft bedacht und verbessert werden sollten. In der Hauptkomponentenanalyse (siehe Kapitel 3.2.1) wurde deutlich, dass sich die Proben eindeutig in zwei Gruppen aufteilen (S1 und S2), diese Gruppeneinteilung entsprach allerdings nicht komplett den experimentellen Gruppen (DJB und

Sham). Die Gruppen S1 und S2 waren in sich sehr homogen, innerhalb des experimentellen Setups gab es keine andere Intervention als die DJB-Operation, die eine derart klare Auftrennung erklären könnte. Nach ausführlicher Diskussion wurde entschieden, die Mismatches für alle folgenden Analysen der Sequencing-Daten und quantitative Bestimmungen mittels Western Blot und Real-Time PCR zu exkludieren. Nach Exklusion der Mismatches und der Probe s2 ergaben sich die Gruppen DJB und Sham (siehe Abbildung 12b), mit denen im Folgenden weitergearbeitet wurde. Mögliche Gründe für die Fehlzuordnung einiger Proben: Es muss bei der Organgewinnung, dem Transport von London nach Dresden oder der RNA-Isolation zu Verwechslungen gekommen sein, die diese nicht korrekte Gruppenzuordnung erklären. Insgesamt waren viele Personen in die Bearbeitung, Übermittlung und Auswertung der Proben involviert, sodass Fehler in der Zuordnung nicht auszuschließen sind. Weitere Fehlerquellen könnten eine nicht suffiziente Operation oder ein Nicht-Ansprechen auf die Operation sein. Ein Nicht-Ansprechen (*non-responder*) auf bariatrische Interventionen ist in der Literatur beschrieben und teilweise wurde daraufhin eine Unterteilung in *non-responder* (Nicht-Ansprechen) und *responder* (Ansprechen) vorgenommen (Kindel, et al., 2017). Befanden sich auch in der DJB-Kohorte *non-responder* könnte das die relativ breite Streuung der Ergebnisse erklären. Eine weitere Schwierigkeit war die hohe Menge an mitochondrialer RNA innerhalb der Proben, die allerdings charakteristisch ist für das mitochondrienreiche Herz (Siasos, et al., 2018). Für die Zukunft wäre eine dezidierte Analyse der nicht-mitochondrialen Anteile ebenfalls sehr interessant. Eine Nukleus-Sequenzierung, die Transkripte außerhalb des Nukleus exkludiert, könnte dies ermöglichen (Hu, et al., 2018)

4.3.2 Die adrenerge Signalkaskade

Eine Charakterisierung wichtiger Gene und Proteine innerhalb der adrenergen Signalkaskade wurde mittels qPCR und Western Blot durchgeführt. Die mRNA-Expression des β_1 - und des β_2 -Rezeptors war in den linken Ventrikeln der Sham- und DJB-Herzen nicht verändert (siehe Kapitel 3.3.1). Eine Expression des β_3 -Rezeptors in den linken Ventrikeln konnte nicht nachgewiesen werden. Calcium-handling Proteine, die den β -Rezeptoren nachgeschaltet sind, zeigten weder eine veränderte Expression noch eine veränderte Phosphorylierung (3.3.2). Die Proteinexpression der SERCA 2a war nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Ebenso unverändert waren die Proteinexpression und Phosphorylierung von Troponin I und cMy-BP. Die PLB-Proteinexpression war nicht verändert, eine Phosphorylierung von PLB an Serin-16 oder Threonin-17 konnte nur in Einzelfällen nachgewiesen werden und wurde deshalb nicht vergleichend ausgewertet.

Über die kardiale Expression von β -Adrenorezeptoren nach bariatrischer Chirurgie ist wenig bekannt. Frühere Studien zeigten jedoch, dass die Aktivität des sympathischen Nervensystems durch einen RYGB beeinflusst wird: Patienten, die vor mindestens zwölf Monaten einen RYGB erhalten hatten, wiesen im Ruhezustand eine verminderte Aktivierung des sympathischen Nervensystems auf. Gemessen wurde die sympathische Aktivierung über eine MSNA (MSNA, *muscle sympathetic nerve activity*) am N. peroneus (Curry, et al., 2013). Falls es in unserem Modell ebenfalls zum Rückgang sympathischer Erregung gekommen ist, dann führte diese zu keiner Veränderung der Expression kardialer Adrenorezeptoren. Posttranskriptionelle Mechanismen wie die Veränderung der β -Adrenorezeptordichte und eine Desensitivierung der Rezeptoren konnten hier nicht untersucht werden. Veränderungen dieser posttranskriptionellen Mechanismen kommen unter anderem bei Herzinsuffizienz vor (Lymperopoulos, et al., 2013). Eine mögliche posttranskriptionelle Beeinflussung der kardialen β -Adrenorezeptoren wäre durchaus denkbar und könnte ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Experimente sein.

Die Calcium-handling Proteine sind bereits besser untersucht: Im linken Ventrikel von Sprague-Dawley-Ratten, die mittels Streptozocin-Injektion und nachfolgender HFD in einen T2DM-Zustand gebracht und dann entweder DJB oder SG unterzogen wurden, konnten Veränderungen der Proteinexpression von RyR2, SERCA2 und PLB festgestellt werden (Huang, et al., 2018). Die linksventrikuläre RyR2-Expression war sowohl bei DJB-, wie auch bei SG-Ratten signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Auch die Serca2a-Proteinexpression war in beiden Interventionsgruppen signifikant erhöht. Die Proteinexpression von PLB war bei DJB- und SG-Ratten vermindert, es kam jedoch zu einer vermehrten Phosphorylierung (PLB-Ser16, PLB-Thr17) (Huang, et al., 2018). Für das DJB-Modell in dieser Arbeit war es nicht möglich, signifikante Veränderungen in PLB-Expression und -Phosphorylierung und SERCA2-Expression zu zeigen. Es waren allerdings deutliche Tendenzen beispielsweise bei der SERCA2- und der Troponin I-Expression erkennbar, diese waren aber statistisch nicht belegbar (siehe Kapitel 3.3.2). Eine mögliche Ursache für die fehlenden signifikanten Veränderungen in unserem Modell ist die kürzere Lebenszeit nach Operation: Huang et al. führten die molekularbiologischen Analysen der Herzen 16 Wochen nach Operation aus, in unserem Modell erfolgte die Organentnahme bereits sechs Wochen postoperativ. Des Weiteren war die Anzahl der Tiere pro Gruppe deutlich höher als in unserem Tierexperiment ($n = 15$ pro Gruppe vs. $n = 5/6$ pro Gruppe) (Huang, et al., 2018). Diese höhere Anzahl bedingt, dass auch kleinere Unterschiede in statistischen Tests das Signifikanzniveau erreichen können (Sullivan und Feinn, 2012). Möglicherweise wäre es mit einer höheren Anzahl an Tieren möglich gewesen, kleinere Veränderungen zu entdecken und signifikante Ergebnisse zu generieren.

Insgesamt konnte für unser DJB-Modell auf Protein- oder RNA-Ebene keine Veränderung der Expression oder Phosphorylierung ausgewählter Zielmoleküle innerhalb der β -adrenergen Signalkaskade gezeigt werden. Da hier nur ein Ausschnitt der relevanten Gene und Proteine beleuchtet wurde, kann eine Beteiligung der adrenergen Signalwege an den positiven Effekten allerdings nicht ausgeschlossen werden. Neben den in dieser Arbeit analysierten Rezeptoren und Proteinen existieren zahlreiche weitere interessante Targets innerhalb der adrenergen Signalkaskade. In der RNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.2.3.3 und Kapitel 4.3.1) auffällig gewordene Moleküle wie der NCX-Kanal, die Adenylatcyclase (AC), der L-Typ-Calcium-Kanal und die Proteinkinase A (PKA) werden in Zukunft interessante Ansatzpunkte für weitere Experimente sein.

4.3.3 Expression von Glukosetransportern

Ratten, die einem duodenojejunalen Bypass unterzogen wurden, zeigten in unseren Versuchen im Vergleich zu Sham-operierten Tieren Veränderungen der mRNA-Expression eines wichtigen kardialen Glukosetransporters: Die kardiale mRNA-Expression von *Sglt1* und *Glut4* war unverändert, die Expression von *Glut1* allerdings war um das 2,39-fache erhöht (siehe Kapitel 3.5). Auf Proteinebene konnte eine signifikante Erhöhung von GLUT1 allerdings nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27).

Interessanterweise konnte eine lokalisierte Heraufregulation des Transporters GLUT1 nach RYGB bereits für den Gastrointestinaltrakt gezeigt werden (Saeidi, et al., 2013). Die hier gezeigten Veränderungen im Herzen decken sich mit den publizierten Ergebnissen für den Gastrointestinaltrakt von RYGB-operierten Ratten.

Den Effekt einer vermehrten GLUT1-Expression auf Herzfunktion und kardialen Stoffwechsel untersuchten bereits andere Arbeitsgruppen: Eine herzspezifische Überexpression von GLUT1 führte im Mausmodell zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und vermehrter Glykolyse (Liao, et al., 2002). Nach AAC (*ascending aortic constriction*), die durch Verengung der Aorta eine chronische Druckbelastung des Herzens bewirkt, zeigte sich in den transgenen Mäusen ein protektiver Effekt der GLUT1-Überexpression: Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen entwickelten sie keine linksventrikuläre Dysfunktion und ihre Mortalität war deutlich niedriger. Vermehrte Glukoseaufnahme in das hypertrophierte Herz wirkt sich demnach protektiv auf die Entwicklung einer kontraktilen Dysfunktion und linksventrikulärer Dilatation aus (Liao, et al., 2002). Protektive Effekte von GLUT1 wurden auch von Luptak et al. gezeigt: Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt transienter Ischämie auf die kardialen ATP-Spiegel. Sie zeigten, dass GLUT1-transgene Mäuse am Ende einer ischämischen Phase doppelt so hohe ATP-Spiegel wie Mäuse gleichen Alters aufwiesen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine dauerhaft erhöhte Glukoseaufnahme ins Herz die kardiale Energieversorgung verbessert

(Luptak, et al., 2007). In einem Mausmodell induzierbarer GLUT1-Überexpression zeigte sich nach einer TAC (*transverse ascending constriction*)-Operation, die für eine Druckbelastung des Herzens sorgt, eine verminderte Fibroseneigung, eine Aufrechterhaltung der ATP-Produktion und eine erhöhte mRNA-Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung und Fettsäureoxidation. Diese kurzzeitige GLUT1-Überexpression war allerdings nicht in der Lage die Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion nach TAC zu verhindern (Pereira, et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine vermehrte Expression von GLUT1 protektiv auf das Herz auszuwirken scheint: Die Mortalität nach AAC war vermindert, eine linksventrikuläre Dysfunktion war seltener, die ATP-Versorgung des Herzen war deutlich erhöht und es kam seltener zu Fibrose (Liao, et al., 2002; Luptak, et al., 2007; Pereira, et al., 2013). Für das DJB-Rattenmodell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein DJB zu einer erhöhten mRNA-Expression von *Glut1* im Herzen führt. Die protektive Wirkung, die diese bariatrische Intervention auf das Herz hat, könnte möglicherweise durch vermehrte Glukoseaufnahme und verbesserte Energieversorgung erklärt werden. Ein weiterer Hinweis sind die Ergebnisse der IPA, die eine Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung und vermehrte Expression bestimmter Gene der Atmungskette zeigte (siehe Kapitel 4.3.1). Um diese These zu bestätigen, sind weitere Experimente wie eine Messung der ATP-Synthese in Herzen nach bariatrischer Chirurgie von Nöten.

Die Familie der Natrium-/Glukose-Cotransporter (SGLT) hat in den letzten Jahren aufgrund der Gliflozine, die erfolgreich zur Therapie des Typ-2-Diabetes verwendet werden, viel Aufmerksamkeit genossen. Gliflozine als SGLT2-Inhibitoren haben in Studien eine bisher größtenteils unverstandene Senkung der kardiovaskulären Mortalität bewirkt (Di Franco, et al., 2017). Auch im Herzen wird ein Transporter dieser Familie, nämlich SGLT1, exprimiert (Banerjee, et al., 2009). Die Expression dieses Transporters scheint durch diabetische Stoffwechsellagen beeinflusst zu werden. In einem diabetischen Mausmodell für Typ-1-Diabetes war die mRNA-Expression geringer als in der Kontrollgruppe, in einem Modell für Typ-2-Diabetes (*ob/ob*-Mäuse) allerdings war die mRNA-Expression deutlich erhöht. Leptin, aber nicht Insulin sorgten für eine erhöhte mRNA-Expression von *Sglt1*. Mithilfe eines spezifischen Inhibitors von SGLT1 wurde des Weiteren gezeigt, dass SGLT1 für einen Teil der Insulin- und Leptin-stimulierten Glukoseaufnahme verantwortlich ist (Banerjee, et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte weder der Insulin- noch der Leptinspiegel im Blut der Tiere gemessen werden, da nur linksventrikuläres Herzgewebe zur Verfügung stand. In unseren Experimenten konnten wir keine Beeinflussung der *Sglt1*-mRNA-Expression durch den bariatrischen Eingriff zeigen. Zwischen der Sham- und der DJB-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der *Sglt1*-Expression.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass die Intervention DJB zu einer interessanten Hochregulation von *Glut1* auf RNA-Ebene führte. Die Auswirkungen dieser Hochregulation auf die mitochondriale Funktion und wichtige Parameter wie Fibroseneigung und kardiovaskuläre Mortalität müssen in weiteren Experimenten charakterisiert werden.

4.3.4 Expression von Genen der Fettsäureoxidation

Neben den Glukosetransportern wurden auch drei wichtige Gene der Fettsäureoxidation vergleichend untersucht. Die mRNA-Expression von *Cpt-1b*, *Mcad* und *Pgc-1 α* wurde in den linken Ventrikeln der Ratten analysiert und es zeigte sich für keines der Gene eine signifikante Beeinflussung durch die bariatrische Intervention (siehe Kapitel 3.5).

Bekannt ist, dass die Fettsäureoxidation im Herzen von Diabetikern und Übergewichtigen erhöht ist, die Glukoseoxidation ist vermindert und die Herzen sind auf Fettsäuren als Hauptenergiequelle angewiesen. Diese metabolischen Alterationen leiten die Entstehung von kardialer Hypertrophie und Glukoseintoleranz ein (Fillmore, et al., 2014). Vor der gastrointestinalen Intervention befanden sich alle unserer Versuchstiere in einem diabetischen Zustand, nach der DJB-Operation verbesserte sich der Zuckerstoffwechsel der DJB-Gruppe. Daraus entstand die Arbeitshypothese, dass nach der Reversion des Diabetes die Expression repräsentativer Gene, die bei Fettsäureoxidation eine Rolle spielen, verändert ist. Dies war jedoch nicht der Fall, es kam durch den DJB nicht zu Alterationen innerhalb der Expression dieser repräsentativen Gene (*Mcad*, *Cpt-1b*, *Pgc-1 α*). Allerdings können wir in diesem Kontext keine Aussagen über mögliche posttranskriptionelle Auswirkungen des DJB auf die Fettsäureoxidation treffen, da sich unsere Analyse auf die mRNA-Ebene beschränkt (Wigestrand, et al., 2011).

4.3.5 Limitationen des DJB-Rattenmodells

Die Transition vom kranken, diabetischen Herz zum gesunden Herzen durch einen bariatrischen Eingriff gilt es zu erforschen und zu verstehen. Um diesen Effekt bestmöglich zu studieren, wäre eine weitere Gruppe im experimentellen Setup dieses Rattenmodells günstig gewesen: normalgewichtige, herzgesunde Ratten gleichen Alters. So wäre ein Vergleich zwischen den gesunden Herzen ohne DJB-Intervention und den gesunden Herzen mit DJB-Intervention ermöglicht worden. Des Weiteren wäre eine funktionelle Charakterisierung der Rattenherzen zu verschiedenen Zeitpunkten interessant gewesen. Eine Echokardiographie, die Auskunft über Parameter wie Ejektionsfraktion, Herzfrequenz, Schlagvolumen und Kontraktilität gibt, hätte weiteren Einblick in die Auswirkungen eines DJBs auf das Herz geben können. In Folgestudien, die auf der vorliegenden Arbeit aufbauen, müssen diese Erkenntnisse beim Design der Studie bedacht und eingeplant werden.

4.4 Synopsis – Der duodenojejunale Bypass und das Herz

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollten dazu beitragen, die Interaktion zwischen bariatrischen Eingriffen und dem Herzen besser zu verstehen. Die initial aufgeworfenen Fragen sollen nun kurz zusammenfassend beantwortet werden.

Auswirkungen von Übergewicht und Diabetes auf den kardialen Glukosestoffwechsel

- Inwieweit ändert sich die Herzfunktion von Mäusen im Rahmen einer chronischen Hochfettdiät (zwölf Wochen)?

Die zwölfwöchige HFD war nicht in der Lage, echokardiographisch darstellbare Veränderungen der Herzfunktion zu induzieren. Mögliche Ursachen hierfür sind Stress durch zahlreiche Interventionen über den Versuchszeitraum hinweg, geringe Dauer der HFD und ein junges Alter bei Beginn der Fütterung.

- Welche Adaptationsprozesse finden in der Genexpression kardialer Glukosestoffwechsel-Gene statt?

Obwohl keine funktionelle Einschränkung der Herzen gezeigt werden konnte, konnten molekularbiologische Veränderungen nachgewiesen werden. Die HFD sorgte für eine verminderte Expression der Glukosetransporter *Glut1* und *Glut4*. Die Expression des Glukosetransporters *SglT1* blieb von der HFD unbeeinflusst.

Molekulare Veränderungen im Herzen nach bariatrischer Intervention

- Wie ändert sich das Expressionsmuster kardialer Gene nach bariatrischer Intervention?

Eine Beeinflussung der adrenergen Signalwege und der oxidativen Phosphorylierung durch DJB zeigte sich in der Pathway-Analyse. Eine mögliche verbesserte mitochondriale Funktion gilt es in weiteren Experimenten zu beweisen. Einige der Signalmoleküle innerhalb der adrenergen Signalkaskade konnten auf Proteinebene bereits untersucht werden, für andere interessante Signalmoleküle steht dies noch aus.

- Wird die Expression der β -Adrenorezeptoren oder der Calcium-handling Proteine durch eine bariatrische Intervention beeinflusst?

Es konnte keine signifikante Veränderung der Expression des β_1 - oder des β_2 -Rezeptors in der DJB-Gruppe gezeigt werden. Auch wichtige Calcium-handling Proteine zeigten weder in Proteinexpression noch in Phosphorylierung signifikante Unterschiede.

- Inwieweit verändern sich die Expressionsmuster kardialer Gene, die für Glukose- und Fettsäurestoffwechsel relevant sind?

Während repräsentative Gene der Fettsäureoxidation durch DJB nicht verändert exprimiert wurden, zeigten sich Alterationen im Glukosestoffwechsel. Die Transporter *Glut4* und *Sglt1* lagen nicht differentiell reguliert vor, *Glut1* allerdings war in der DJB-Gruppe auf RNA-Ebene vermehrt vorhanden. Der laut Literatur protektive Effekt vermehrter *Glut1*-Expression erklärt hier möglicherweise die verbesserte kardiale Performance nach DJB.

4.5 Experimenteller Ausblick

Um das volle Spektrum des Effekts bariatrischer Chirurgie auf das Herz verstehen zu können und so möglicherweise neue Targets für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen zu identifizieren, bedarf es weiterer Forschung.

Die weiterführende Analyse interessanter Targets innerhalb der adrenergen Signalkaskade wird dabei helfen, eine detailliertere Aussage über die mögliche Beteiligung an den positiven Effekten auf das Herz-Kreislaufsystem zu treffen. In diesem Kontext wäre vor allem die Untersuchung weiterer Calcium-handling Proteine, kardialer Kanäle wie NCX und Proteinkinasen von Interesse. Für eine dezidiertere Analyse der einzelnen Zellpopulationen innerhalb des Herzens und eine isolierte Analyse nukleärer Expressionsmuster wäre eine Nukleus-Sequenzierung ratsam (Hu, et al., 2018). Des Weiteren wäre es denkbar, bei einem neuen Tierversuch eine Langendorff-Isolation durchzuführen, die die Auftrennung in Fibroblasten und Kardiomyozyten ermöglicht (Künzel, et al., 2018; Vettel, et al., 2017). Bei einem weiteren Versuchsdurchlauf wäre neben einer Langendorff-Isolation am Ende des Zeitraums die Einplanung regelmäßiger Echokardiographien und zusätzliche Interventionsgruppen (ND, HFD, HFD+Sham, DJB) sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung. Übergewicht und Diabetes werden zunehmend zum globalen Gesundheitsproblem, eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit der therapieresistenten Adipositas stellen bariatrische Eingriffe dar. Ein positiver Effekt bariatrischer Chirurgie auf die Herzfunktion und das kardiovaskuläre Risiko wurde beobachtet, molekularbiologische Erklärungen dieses Zusammenhanges fehlen bislang.

Material und Methoden. Es wurden zwei verschiedene Tiermodelle genutzt, um den Auswirkungen von Übergewicht und bariatrischer Chirurgie auf das Herz nachzugehen: ein HFD-Mausmodell und ein HFD-Rattenmodell mit duodenojejunalem Bypass (DJB). Linksventrikuläres Gewebe beider Modelle wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR und Western Blot auf Expression der Zielgene und -proteine untersucht. Aus dem linksventrikulären Gewebe des DJB-Rattenmodells wurde RNA für eine differentielle Genexpressionsanalyse gewonnen. Die Genexpressionsanalyse wurde von der Deep Sequencing Group am CRTD Dresden durchgeführt. Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels Ingenuity Pathway Analyse.

Ergebnisse. Die zwölfwöchige Hochfettfütterung führte bei den Mäusen zu keiner echokardiographisch darstellbaren Einschränkung des Herzens. Die Tiere wiesen allerdings eine prä- bzw. diabetische Stoffwechsellage auf. Das linksventrikuläre Gewebe der HFD-Mäuse zeigte eine Herabregulation der Glukosetransporter *Glut1* und *Glut4*. Die bariatrische Intervention führte im linksventrikulären Gewebe der Ratten zu einer Heraufregulation des Glukosetransporters *Glut1*, die Proteinexpression war unverändert. Die Expression des β_1 -, des β_2 -Rezeptors und ausgewählter Calcium-handling Proteine war zwischen den beiden Gruppen ebenfalls nicht verschieden. Repräsentative Gene des kardialen Fettsäurestoffwechsels zeigten keine Beeinflussung durch die bariatrische Intervention. Die Analyse der differentiellen Genexpressionsanalyse zeigte für die DJB-Gruppe Veränderungen innerhalb der oxidativen Phosphorylierung und innerhalb adrenerger Signalwege.

Zusammenfassung. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Übergewicht und eine (prä-) diabetische Stoffwechsellage im linken Ventrikel zur Herabregulation der *Glut1*- und *Glut4*-Expression kommt. Nach bariatrischer Chirurgie zeigten Herzen der Interventionsgruppe eine vermehrte *Glut1*-Expression. Ausgewählte Gene und Proteine der adrenergen Signalkaskade zeigten keine Veränderung innerhalb der DJB-Gruppe, die Pathway-Analyse lässt allerdings vermuten, dass andere Proteine innerhalb dieses Signalweges durchaus differentiell exprimiert vorliegen. Die Überrepräsentation von Genen der oxidativen Phosphorylierung und die protektive Heraufregulation von *Glut1* könnten neue Ansatzpunkte für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen liefern.

6 Summary

Background and aims. Obesity and diabetes are turning into global health issues. A promising therapeutic option for the treatment of severe obesity is bariatric surgery. Bariatric interventions lead to an improved heart function and help to reduce the cardiovascular risk. The molecular links between bariatric interventions and the heart are not yet understood.

Material and methods. To investigate the effects of obesity and bariatric interventions upon the heart we used a high fat diet mouse model and a high fat diet rat model with bariatric intervention (duodenojejunal bypass, DJB). Left ventricular tissue of those models was analysed using qPCR and Western Blot. RNA sequencing of the rat heart tissue was performed. The RNA sequencing and analysis took place at the CRTD Dresden. To analyse the RNA sequencing data the program Ingenuity Pathway Analysis was used.

Results. The HFD did not result in alterations in the contractility parameters analysed by echocardiography of the mouse hearts. The high fat feeding led to alterations in the glucose metabolism, the HFD mice showed a different reaction to glucose and insulin injections. The analysis of left ventricular tissue showed a down-regulation of *Glut1* and *Glut4*. In the left ventricular tissue of the rats we observed an upregulation of *Glut1* expression in the DJB group. Protein expression was not altered. The expression of representative genes in the fatty acid oxidation was not affected by DJB. The RNA sequencing showed alterations in the adrenergic signalling pathway and the oxidative phosphorylation.

Summary. Obesity and a prediabetic metabolism lead to down-regulation of *Glut1* and *Glut4* in the left ventricle. The bariatric intervention DJB promoted an upregulation of cardiac *Glut1* expression. The molecular analysis of representative genes involved in the adrenergic signalling cascade did not show any alterations but RNA sequencing analysis showed significant changes in other genes involved in this pathway. The protective effects of *Glut1* upregulation and the possible role of oxidative phosphorylation seem like promising targets for future experiments.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	Atrial natriuretic peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BCA-Assay	Bicinchoninsäureassay
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain natriuretic peptide
bp	Basenpaar
BPD	Biliopancreatic diversion
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cMyBP-C	Kardiales Myosin-binding Protein C
CNP	C-type natriuretic peptide
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cpt1b	Carnitine palmitoyltransferase 1b
DJB	Duodenojejunaler Bypass
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dihydrat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EEF2	Eukaryotic elongation factor 2

EF	Ejektionsfraktion
FAS	Fractional area shortening
FS	Fractional shortening
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
GTT	Glukosetoleranztest
HFD	High fat diet
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
Hprt1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ITT	Insulintoleranztest
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg/m ²	Kilogramm pro Quadratmeter
l	Liter
LVIDd	Linksventrikulärer enddiastolischer Innendurchmesser
M	Molar
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MCAD	Medium-Acyl-CoA-Dehydrogenase

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	„Messenger-RNA“
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
ND	Normal diet
Nhe1	Sodium-hydrogen antiporter 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pgc-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Real-Time-PCR
RYGB	Roux-en-Y-Magenbypass
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
SG	Sleeve Gastrectomy, Schlauchmagen
SGLT	Sodium-dependent glucose transporter
Sham-Eingriff	Schein-Eingriff

T	Temperatur/Schmelztemperatur
T2DM	Typ-2-Diabetes mellitus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tbp	TATA binding protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tn-I	Troponin I
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
α -SMA	α -smooth muscle actin

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel	12
Tabelle 2: Geräte.....	13
Tabelle 3: Primäre Antikörper	15
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper	15
Tabelle 5: Primer Ratte.....	16
Tabelle 6: Primer Maus	17
Tabelle 7: Software	17
Tabelle 8: Kits	17
Tabelle 9: Verbrauchsmittel	18
Tabelle 10: Zusammensetzung des Futters, Ratte	20
Tabelle 11: Zusammensetzung des Futters, Maus	22
Tabelle 12: Komponenten und Reaktionszusammensetzung des Kits zur cDNA-Synthese ..	24
Tabelle 13: Materialien Proteinisolation und Western Blot	25
Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse möglicher Referenzgene mittels Normfinder	42

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktion der kardiale β -Adrenorezeptoren	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glukoseaufnahme im Herzen.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tierversuches	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung des duodenojejunalen Bypasses.....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tierversuches	22
Abbildung 6: Berechnung einer Aktivitätsvorhersage mittels z-Score durch IPA.....	27
Abbildung 7: Gewichtsverlauf der ND- und HFD-Gruppe in zwölf Wochen Fütterung	29
Abbildung 8: Ergebnisse der Glukosetoleranzteste	30
Abbildung 9: Ergebnisse der Insulintoleranzteste	30
Abbildung 10: Ergebnisse der Echokardiographien	31
Abbildung 11: Expression von <i>Glut1</i> , <i>Glut4</i> und <i>SglT1</i>	32
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse der Expressionsprofile	34
Abbildung 13: Heatmap der 25 am stärksten herauf- und herunterregulierten Gene.	35
Abbildung 14: Signalwege und z-Scores	37
Abbildung 15: Oxidative Phosphorylierung, Ingenuity Pathway Analysis	38
Abbildung 16: Renin-Angiotensin-System, Ingenuity Pathway Analysis.....	38
Abbildung 17: α -adrenerge Signalkaskade, Ingenuity Pathway Analysis	39
Abbildung 18: β -adrenerge Signalkaskade, Ingenuity Pathway Analysis	40
Abbildung 19: mRNA-Expression von β_1 - und β_2 -Rezeptoren im linken Ventrikel	42
Abbildung 20: mRNA-Expression von β_3 -Rezeptoren im linken Ventrikel	43
Abbildung 21: Proteinexpression von SERCA2a im linken Ventrikel.....	44
Abbildung 22: Proteinexpression und Phosphorylierung von PLB im linken Ventrikel.....	45
Abbildung 23: Proteinexpression und Phosphorylierung von Troponin I im linken Ventrikel..	46
Abbildung 24: Proteinexpression und Phosphorylierung von cMyBP-C im linken Ventrikel...	47
Abbildung 25: Proteinexpression von α -SMA im linken Ventrikel	48
Abbildung 26: mRNA-Expression von Glukosetransportern.....	49
Abbildung 27: Proteinexpression von GLUT1 im linken Ventrikel	49
Abbildung 28: mRNA-Expression von Genen der Fettsäureoxidation im linken Ventrikel	50
Abbildung 29: mRNA-Expression von <i>Hif-1α</i> und <i>Nhe1</i> im linken Ventrikel	51

7.4 Literaturverzeichnis

- Aggarwal R, Harling L, Efthimiou E, Darzi A, Athanasiou T, Ashrafian H. 2016. The Effects of Bariatric Surgery on Cardiac Structure and Function: a Systematic Review of Cardiac Imaging Outcomes. *Obes Surg* 26(5):1030-1040.
- Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Aggarwal KB, Kumar SA. 2014. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl Res* 164(4):345-356.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 64(15):5245-5250.
- Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N. 2015. Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg* 25(10):1822-1832.
- Anupama N, Sindhu G, Raghu KG. 2018. Significance of mitochondria on cardiometabolic syndromes. *Fundam Clin Pharmacol* 32(4):346-356.
- Ashrafian H, le Roux CW, Darzi A, Athanasiou T. 2008. Effects of bariatric surgery on cardiovascular function. *Circulation* 118(20):2091-2102.
- Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SAR, Zornoff LAM. 2013. Energy Metabolism in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Cardiol Rev* 21(3):135-140.
- Banerjee SK, McGaffin KR, Pastor-Soler NM, Ahmad F. 2009. SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovasc Res* 84(1):111-118.
- Bateman RM, Tokunaga C, Kareco T, Dorscheid DR, Walley KR. 2007. Myocardial hypoxia-inducible HIF-1alpha, VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1):H448-456.
- Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH. 2004. Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic db/db Mouse Heart. *Diabetes* 53(12):3201-3208.
- Benotti PN, Wood GC, Carey DJ, Mehra VC, Mirshahi T, Lent MR, Petrick AT, Still C, Gerhard GS, Hirsch AG. 2017. Gastric Bypass Surgery Produces a Durable Reduction in

- Cardiovascular Disease Risk Factors and Reduces the Long-Term Risks of Congestive Heart Failure. *J Am Heart Assoc* 6(5).
- Berliner D, Bauersachs J. 2017. Current Drug Therapy in Chronic Heart Failure: the New Guidelines of the European Society of Cardiology (ESC). *Korean Circ J* 47(5):543-554.
- Bers DM. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868):198-205.
- Bruinsma BG, Uygun K, Yarmush ML, Saeidi N. 2015. Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. *Nat Protoc* 10(3):495-507.
- Bugger H, Abel ED. 2014. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 57(4):660-671.
- Cabiati M, Raucci S, Caselli C, Guzzardi MA, D'Amico A, Prescimone T, Giannessi D, Del Ry S. 2012. Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model. *J Mol Endocrinol* 48(3):251-60.
- Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859(9):940-950.
- Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L, Conget P. 2013. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* 8(4):e60931.
- Carbone S, Mauro AG, Mezzaroma E, Kraskauskas D, Marchetti C, Buzzetti R, Van Tassell BW, Abbate A, Toldo S. 2015. A high-sugar and high-fat diet impairs cardiac systolic and diastolic function in mice. *Int J Cardiol* 198:66-69.
- Cavender MA, Steg PG, Smith SC, Jr, Eagle K, Ohman EM, Goto S, Kuder J, Im K, Wilson PW, Bhatt DL. 2015. Impact of Diabetes Mellitus on Hospitalization for Heart Failure, Cardiovascular Events, and Death: Outcomes at 4 Years From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Circulation* 132(10):923-931.
- Curry TB, Somaraju M, Hines CN, Groenewald CB, Miles JM, Joyner MJ, Charkoudian N. 2013. Sympathetic support of energy expenditure and sympathetic nervous system activity after gastric bypass surgery. *Obesity (Silver Spring)* 21(3):480-485.

- Dankel SN, Staalesen V, Bjorndal B, Berge RK, Mellgren G, Burri L. 2011. Tissue-specific effects of bariatric surgery including mitochondrial function. *J Obes* 2011.
- DGAV-CAADIP. 2018. S3-Leitlinie: Chirurgie der Adipositas und metabolischer Erkrankungen. AWMF Online: DGAV-CAADIP [Aufruf am: 06.05.2019] URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-001I_S3_Chirurgie-Adipositas-metabolische-Erkrankungen_2018-02.pdf.
- Di Franco A, Cantini G, Tani A, Coppini R, Zecchi-Orlandini S, Raimondi L, Luconi M, Mannucci E. 2017. Sodium-dependent glucose transporters (SGLT) in human ischemic heart: A new potential pharmacological target. *Int J Cardiol* 243:86-90.
- Dixon JB, Lambert EA, Lambert GW. 2015. Neuroendocrine adaptations to bariatric surgery. *Mol Cell Endocrinol* 418:143-152.
- Dries E, Santiago DJ, Gilbert G, Lenaerts I, Vandenberk B, Nagaraju CK, Johnson DM, Holemans P, Roderick HL, Macquaide N, Claus P, Sipido KR. 2018. Hyperactive ryanodine receptors in human heart failure and ischaemic cardiomyopathy reside outside of couplons. *Cardiovasc Res* 114(11):1512-1524.
- EI-Armouche A, Eschenhagen T. 2009. β -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14(4):225-241.
- EI-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L. 2007. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43(2):223-229.
- Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ. 1996. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction of beta1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27(1):146-154.
- Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. 2013. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502(7471):372-376.
- Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. 2014. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 171(8):2080-2090.

- Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. 2002. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109(1):121-130.
- Giordano FJ. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115(3):500-508.
- Guo R, Zhang Y, Turdi S, Ren J. 2013. Adiponectin knockout accentuates high fat diet-induced obesity and cardiac dysfunction: role of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1832(8):1136-1148.
- Hamzeh N, Ghadimi F, Farzaneh R, Hosseini SK. 2017. Obesity, Heart Failure, and Obesity Paradox. *J Tehran Heart Cent* 12(1):1-5.
- Hao S, Avraham Y, Bonne O, Berry EM. 2001. Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. *Pharmacol Biochem Behav* 68(2):273-281.
- Hernández-Alvarez MI, Chiellini C, Manco M, Naon D, Liesa M, Palacín M, Mingrone G, Zorzano A. 2009. Genes involved in mitochondrial biogenesis/function are induced in response to bilio-pancreatic diversion in morbidly obese individuals with normal glucose tolerance but not in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 52(8):1618–1627.
- Hu P, Liu J, Zhao J, Wilkins BJ, Lupino K, Wu H, Pei L. 2018. Single-nucleus transcriptomic survey of cell diversity and functional maturation in postnatal mammalian hearts. *Genes Dev* 32(19-20):1344-1357.
- Huang X, Liu S, Wu D, Cheng Y, Han H, Wang K, Zhang G, Hu S. 2018. Facilitated Ca²⁺ homeostasis and attenuated myocardial autophagy contribute to alleviation of diabetic cardiomyopathy after bariatric surgery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315(5):1258-1268.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS. 2013. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab (Seoul)* 28(4):288-296.
- Kemp CD, Conte JV. 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 21(5):365-371.
- Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. 2002. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347(5):305-313.

- Kindel TL, Foster T, Goldspink P, Kindel SJ, Corbett J, Widlanksy M, Strande J. 2017. Early Weight Loss Independent Effects of Sleeve Gastrectomy on Diet-Induced Cardiac Dysfunction in Obese, Wistar Rats. *Obes Surg* 27(9):2370-2377.
- Kolwicz SC, Jr., Tian R. 2011. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 90(2):194-201.
- Krämer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S. 2014. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 30(4):523-530.
- Künzel SR, Sekeres K, Kämmerer S, Kolanowski T, Meyer-Roxlau S, Piorkowski C, Tugtekin SM, Rose-John S, Yin X, Mayr M, Kuhlmann JD, Wimberger P, Grützmann K, Herzog N, Küpper J-H, Guan K, Wagner M, Ravens U, Weber S, El-Armouche A. 2018. Hypoxia-induced epigenetic silencing of polo-like kinase 2 promotes fibrosis in atrial fibrillation. *bioRxiv*.
- Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. 2009. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 53(21):1925-1932.
- Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM, Tian R. 2002. Cardiac-Specific Overexpression of GLUT1 Prevents the Development of Heart Failure Attributable to Pressure Overload in Mice. *Circulation* 106(16):2125-2131.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. 2003. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93(10):896-906.
- Luo M, Mengos AE, Ma W, Finlayson J, Bustos RZ, Xiao Zhu Y, Shi CX, Stubblefield TM, Willis WT, Mandarino LJ. 2017. Characterization of the novel protein KIAA0564 (Von Willebrand Domain-containing Protein 8). *Biochem Biophys Res Commun* 487(3):545-551.
- Luptak I, Yan J, Cui L, Jain M, Liao R, Tian R. 2007. Long-term effects of increased glucose entry on mouse hearts during normal aging and ischemic stress. *Circulation* 116(8):901-909.
- Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. 2013. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113(6):739-753.
- Maier T, Güell M, Serrano L. 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583(24):3966-3973.

- McGuire MM, Nadler EP, Qureshi FG. 2014. Laparoscopic vertical sleeve gastrectomy for adolescents with morbid obesity. *Semin Pediatr Surg* 23(1):21-23.
- Mori J, Zhang L, Oudit GY, Lopaschuk GD. 2013. Impact of the renin–angiotensin system on cardiac energy metabolism in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 63:98-106.
- Packer M. 2017. Activation and Inhibition of Sodium-Hydrogen Exchanger Is a Mechanism That Links the Pathophysiology and Treatment of Diabetes Mellitus With That of Heart Failure. *Circulation* 136(16):1548-1559.
- Pereira RO, Wende AR, Olsen C, Soto J, Rawlings T, Zhu Y, Anderson SM, Abel ED. 2013. Inducible overexpression of GLUT1 prevents mitochondrial dysfunction and attenuates structural remodeling in pressure overload but does not prevent left ventricular dysfunction. *J Am Heart Assoc* 2(5):e000301.
- Pistner A, Belmonte S, Coulthard T, Blaxall B. 2010. Murine echocardiography and ultrasound imaging. *J Vis Exp*(42).
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Authors/Task Force Members, Document Reviewers. 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18(8):891-975.
- Roberts NW, Gonzalez-Vega M, Berhanu TK, Mull A, Garcia J, Heydemann A. 2015. Successful metabolic adaptations leading to the prevention of high fat diet-induced murine cardiac remodeling. *Cardiovasc Diabetol* 14(127).
- Rozec B, Erfanian M, Laurent K, Trochu JN, Gauthier C. 2009. Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart. *J Am Coll Cardiol* 53(17):1532-1538.
- Rubino F. 2016. Medical Research: Time to think differently about diabetes. *Nature* 533(7604).
- Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. 2006. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 244(5):741-749.

- Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E. 2004. The Early Effect of the Roux-en-Y Gastric Bypass on Hormones Involved in Body Weight Regulation and Glucose Metabolism. *Ann Surg* 240(2):236-242.
- Rubino F, Nathan DM, Eckel RH, Schauer PR, Alberti KGMM, Zimmet PZ, Del Prato S, Ji L, Sadikot SM, Herman WH, Amiel SA, Kaplan LM, Taroncher-Oldenburg G, Cummings DE, Delegates of the 2nd Diabetes Surgery Summit. 2016. Metabolic surgery in the treatment algorithm for type 2 diabetes: a joint statement by international diabetes organizations. *Diabetes Care* 39(6):861-877.
- Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S, Kucharczyk J, Bonab AA, Fischman AJ, Yamush ML, Stylopoulos N. 2013. Reprogramming of Intestinal Glucose Metabolism and Glycemic Control in Rats After Gastric Bypass. *Science* 341(6144):406-410.
- Salinari S, le Roux CW, Bertuzzi A, Rubino F, Mingrone G. 2014. Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats without changes in incretins or insulin secretion. *Diabetes* 63(3):1069-1078.
- Santulli G, Nakashima R, Yuan Q, Marks AR. 2017. Intracellular calcium release channels: an update. *J Physiol* 595(10):3041-3051.
- Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M. 2002. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 53(1):192-201.
- Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP. 2014. The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int J Cardiol* 171(2):134-143.
- Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Yokoyama R, Porciuncula JP, Kurokawa Y. 2018. The Effects of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy with Duodenojejunal Bypass on Japanese Patients with BMI < 35 kg/m² on Type 2 Diabetes Mellitus and the Prediction of Successful Glycemic Control. *Obes Surg* 28(8):2429-2438.
- Shao D, Tian R. 2015. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr Physiol* 6(1):331-351.
- Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JH, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie ZJ. 2015. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *J Physiol* 593(6):1361-1382.

- Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, Tsimpiktsioglou A, Stampouloglou PK, Oikonomou E, Mourouzis K, Philippou A, Vavuranakis M, Stefanadis C, Tousoulis D, Papavassiliou AG. 2018. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med* 6(12):256.
- Singh RM, Waqar T, Howarth FC, Adeghate E, Bidasee K, Singh J. 2018. Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 23(1):37-54.
- Sjöstrom L. 2013. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 273(3):219-234.
- Sjöstrom L, Peltonen M, Jacobson P, Ahlin S, Andersson-Assarsson J, Anveden A, Bouchard C, Carlsson B, Karason K, Lönroth H, Näslund I, Sjöstrom E, Taube M, Wedel H, Svensson PA, Sjöholm K, Carlsson LM. 2014. Association of bariatric surgery with long-term remission of type 2 diabetes and with microvascular and macrovascular complications. *JAMA* 311(22):2297-2304.
- Sullivan GM, Feinn R. 2012. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* 4(3):279-282.
- Szablewski L. 2017. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol* 230:70-75.
- Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. 2015. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 89(9):1401-1438.
- Vettel C, Lindner M, Dewenter M, Lorenz K, Schanbacher C, Riedel M, Lämmle S, Meinecke S, Mason FE, Sossalla S, Geerts A, Hoffmann M, Wunder F, Brunner FJ, Wieland T, Mehel H, Karam S, Lechene P, Leroy J, Vandecasteele G, Wagner M, Fischmeister R, El-Armouche A. 2017. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* 120(1):120-132.
- Wang CY, Liao JK. 2012. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* 821:421-433.

- Wigstrand MB, Mineur YS, Heath CJ, Fonnum F, Picciotto MR, Walaas SI. 2011. Decreased $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor number in the absence of mRNA changes suggests post-transcriptional regulation in the spontaneously hypertensive rat model of ADHD. *J Neurochem* 119(1):240-250.
- Wu SP, Kao CY, Wang L, Creighton CJ, Yang J, Donti TR, Harmancey R, Vasquez HG, Graham BH, Bellen HJ, Taegtmeyer H, Chang CP, Tsai MJ, Tsai SY. 2015. Increased COUP-TFII expression in adult hearts induces mitochondrial dysfunction resulting in heart failure. *Nat Commun* 6.
- Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. 2014. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 11(11):1185-200.
- Xu L, Chen J, Li XY, Ren S, Huang CX, Wu G, Li XY, Jiang XJ. 2012. Analysis of Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) function and current in murine cardiac myocytes during heart failure. *Mol Biol Rep* 39(4):3847-3852.
- Yang Y, Zhang H, Li X, Yang T, Jiang Q. 2015. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the energy metabolism remodeling and apoptosis in the doxorubicin induced mice cardiomyocytes in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 8(10):12216-12224.
- Yao X, Carlson D, Sun Y, Ma L, Wolf SE, Minei JP, Zang QS. 2015. Mitochondrial ROS Induces Cardiac Inflammation via a Pathway through mtDNA Damage in a Pneumonia-Related Sepsis Model. *PLoS One* 10(10):e0139416.
- Zhang X, Liu S, Zhang G, Zhong M, Liu T, Wei M, Wu D, Huang X, Cheng Y, Wu Q, Hu S. 2017. Bariatric Surgery Ameliorates Diabetic Cardiac Dysfunction by Inhibiting ER Stress in a Diabetic Rat Model. *Obes Surg* 27(5):1324-1334.

7.5 Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

7.5.1 Erklärung über die Eigenständigkeit

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Prof. Dr. Ali El-Armouche
- Dr. Silvio Weber
- Dr. Stephan Künzel
- Dr. Susanne Kämmerer
- Prof. Francesco Rubino
- Dipl. Bioinf. Mathias Lesche

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden,

(Pia Schlinkert)

7.5.2 Erklärung über die Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen der Dissertation

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
 - Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: entfällt

- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
 - Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung: TVV 1/2017

- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
 - Projektnummer: Az.: 54-8452146, Az.: 54-8451/89

- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden,

(Pia Schlinkert)

7.6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ali El-Armouche danken, der diese Promotion ermöglicht, begleitet und immer vorangetrieben hat. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Silvio Weber, der mir als mein Betreuer half, die alltäglichen Hürden des Laborlebens zu meistern. Prof. Dr. Jochen Hampe und Prof. Dr. Ben Wielockx waren als meine TAC-Betreuer prägend für die Entwicklung und Fortführung des Projektes. Prof. Francesco Rubino danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben, die spannende Zeit in seinem Labor und den regelmäßigen Austausch.

Als MD-Studentin im „IRTG2251“ danke ich allen beteiligten Personen für den regen Austausch und die Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Stefan Bornstein und Prof. Mark Peakman für die Möglichkeit, Teil dieses Programmes sein zu dürfen. Dankbar bin ich auch für die Assoziation an das „Carus Promotionskolleg Dresden“.

Ein Dankeschön geht an meine Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Danke für all die Hilfe, die offenen Ohren und die schöne Zeit. Dr. Susanne Kämmerer möchte ich für die verlässliche Betreuung und das Korrekturlesen danken. Dr. med. Stephan Künzel danke ich für die durchgehende Unterstützung, das Korrigieren meiner Arbeit und die schöne Zeit nebeneinander im Büro.

An letzter Stelle danke ich den Menschen, die mich schon mein Leben lang unterstützt haben und es immer tun werden: meinen Eltern. Danke, dass ihr mir all das ermöglicht habt, immer an mich glaubt und für mich da seid. Auch meinen Großeltern und Geschwistern danke ich für ihre Unterstützung. Maximilian Hoffmann danke ich dafür, dass er immer an meiner Seite war, die Arbeit mit Präzision korrigiert hat und mich nach schlechten Tagen aufgebaut hat.