

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Univ. Professor Dr. med. Stefan Frantz

Mechanismen des veränderten Glucosestoffwechsels in Leber, Myokard und Skelettmuskel bei Herzinsuffizienz im Mausmodell der thorakalen Aortenligatur

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ilonka Morsch
aus Raubling

Würzburg, März 2020

Referent: Univ. Prof. Dr. med. Stefan Frantz

Koreferent bzw. Koreferentin: Prof. Dr. Kristina Lorenz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2020

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Mutter

für Anjuli

und

für Manfred

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Herzmuskelhypertrophie als Ursache der Herzinsuffizienz	3
1.3 Energiestoffwechsel des Herzens	4
1.4 Systemischer Glucosestoffwechsel und Signalwege der insulinvermittelten Glucoseaufnahme.....	5
1.5 Myokardialer Glucosestoffwechsel bei Herzinsuffizienz und diabetische Kardiomyopathie.....	9
1.6 Veränderungen des Nüchtern-Blutzuckers und der systemischen Glucosetoleranz bei Herzinsuffizienz einschließlich Sucrose ad libitum	10
1.7 Therapie der Herzinsuffizienz	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Enzyme.....	16
2.1.4 Antikörper	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Versuchstiere.....	17
2.2.2 Tiermodelle	17
2.2.3 Transversale Aortenligatur.....	17
2.2.4 Tierhaltung	18
2.2.5 Materialgewinnung	18
2.2.6 Proteinanalyse	19
2.2.7 Proteinextraktion.....	19
2.2.8 Angleichen der Proteinkonzentration.....	20
2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot.....	21
2.2.10 Glykogenassay	25
2.2.11 Statistik.....	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Entleerungen der Glykogen-Speicher bei Herzinsuffizienz (Leber und Muskel)	28
3.2 Marker der myokardialen Glucoseaufnahme bei Herzinsuffizienz.....	29

3.3	Marker des myokardialen Energiehaushalts bei Herzinsuffizienz	36
3.4	Marker der peripheren Glucoseaufnahme in der Leber und im Muskel	38
3.5	Marker des hepatischen und muskulären Energiehaushaltes bei Herzinsuffizienz	44
3.6	Zusammenfassung der Befunde.....	46
4	Diskussion	46
4.1	Metabolische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz.....	47
4.2	Kardiale Kachexie und Sucrose-Substitution.....	49
4.3	Innovative Therapieansätze der Herzinsuffizienz	51
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole:

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
al.	alii
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriysin-Inhibition
ATP	Adenosintriphosphat
A. U.	Arbitrary Unit
BCA	Bicinchoninic Acid Solution (Bicinchoninsäurelösung)
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovine Serum Albumine (bovines Serumalbumin)
cAMP	cyclic AMP
dest.	destilliert
DM II	Diabetes mellitus Typ II
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
fFS	freie Fettsäure(n)
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3
GTT	Glucosetoleranztest
HFmEF	HF with mid-range EF (Herzinsuffizienz mit einer mittleren Auswurfleistung)
HFpEF	HF with preserved EF (Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfleistung, diastolische HI)
HfrEF	HF with reduced EF (Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfleistung, systolische HI)
HI	Herzinsuffizienz (engl. HF: heart failure)
HK	Hexokinase
HR	heart rate (Herzfrequenz)

Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITT	Insulintoleranztest
KHK	koronare Herzkrankheit
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Lysis-Buffer (Lysepuffer)
LV	links ventrikulär
M	Molar
M.	Musculus
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mTor	mechanistic target of Rapamycin
n	Anzahl
N	Normalität
NYHA	New York Heart Association
oGTT	orale Glucosetoleranztest
OP	Operation
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI-3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Elektrophorese
Std.	Standard
TAC	transverse aortic constriction (transversale Aortenligatur)
TBS	Tris buffered saline (Tris gepuffete Kochsalzlösung)
TBST	Tris buffered saline & Tween [®] 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
WHO	world health organisation (Weltgesundheitsorganisation)

Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer Herzinsuffizienz (HI; engl. heart failure, HF) auf den systemischen Glucosestoffwechsel und die Insulinsensitivität. Bisher ist nicht genau bekannt, inwiefern ein veränderter Glucosestoffwechsel des Myokards den systemischen Glucosestoffwechsel beeinflusst. In Vorarbeiten, in denen über einen operativen Eingriff mittels TAC (engl. transverse aortic constriction) artifiziell eine Herzinsuffizienz induziert wurde, fanden sich deutliche Veränderungen des systemischen Glucosestoffwechsels mit gesteigerter myokardialer Glucoseaufnahme, erhöhter Glucose-Verstoffwechslung und reduzierter Nüchtern-Glucose.

Ziel dieser Untersuchung ist es, potentiell damit einhergehende Änderungen der Signalwege des Glucosestoffwechsels an Myokard und insulinsensitiven Organen aufzuzeigen. Deshalb wurden sowohl die Glucosespeicherung in Form von Glykogen als auch die Insulin-Signaltransduktion an Myokard, Leber und Skelettmuskulatur analysiert.

Herzinsuffizienz und ein gestörter Glucose-Stoffwechsel sind zwei häufig miteinander vergesellschaftete Krankheitsbilder. Zum einen ist bei Diabetikern die Inzidenz der Herzinsuffizienz mit bis zu 3% pro Jahr¹ gegenüber 0,4% pro Jahr in einem Kontrollkollektiv erhöht.² Zum anderen haben Patienten, die zusätzlich zu einer Herzinsuffizienz an einem Diabetes leiden, eine deutlich schlechtere Prognose hinsichtlich ihrer Überlebensrate.^{3,4} Da das Myokard als ein wesentlicher Verbraucher von Glucose einen entscheidenden Anteil am gesamten Körperstoffwechsel hat und in Zuständen erhöhter Arbeitslast bis zu 50% der Glucose nutzt, die nicht bereits im Gehirn verstoffwechselt wird,⁵ können Änderungen des myokardialen Glucoseverbrauchs den gesamten Organismus beeinflussen.

1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist eine enorme medizinische, soziale und gesundheitsökonomische Belastung.⁶ In Deutschland leiden etwa 1,8 Millionen Menschen an einer Herzmuskelschwäche, jährlich kommen 300.000 Neuerkrankungen hinzu.^{7,8} Weltweit gesehen handelt es sich um geschätzte 26 Millionen Menschen, die an einer Herzinsuffizienz leiden.⁹ Hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Lebensqualität sowie auf die Prognose stellt die Diagnose eine erhebliche Einschränkung dar. Die mittlere Überlebenszeit bei herzinsuffizienten Patienten liegt bei unter fünf Jahren.¹⁰ Im ersten Jahr nach Diagnosestellung sterben 30 bis 40% an Herzversagen.⁶

Herzinsuffizienz ist in Deutschland derzeit der häufigste Grund für eine stationäre Aufnahme ins Krankenhaus; auch zukünftig wird durch die alternde Gesellschaft diese Diagnose einen zentralen Stellenwert bei der ärztlichen Versorgung der Bevölkerung einnehmen. Dabei werden neue Konzepte

sowohl in der Prävention als auch in der Therapie erforderlich sein, um eine adäquate Versorgung der Patienten mit Herzschwäche zu ermöglichen.⁷ Trotz der erheblichen Fortschritte in der Therapie der HI verbleibt eine inakzeptabel erhöhte Mortalität sowie Morbidität, die sich in einem Fünf-Jahresüberleben von rund 50% widerspiegelt.

Definiert ist die Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit als Folge einer ventrikulären Funktionsstörung,¹¹ charakterisiert durch typische Symptome (Dyspnoe, gestauten Halsvenen, pulmonale Rasselgeräusche, periphere Ödeme und Antriebschwäche). Sie kann von Zeichen der strukturellen und/oder funktionellen kardialen Fehlfunktion begleitet werden.¹² Zur Diagnosestellung kommt es demnach, wenn

1. die typischen Symptome einer Herzinsuffizienz vorliegen (in Ruhe oder unter Belastung): häufig Dyspnoe, Leistungseinschränkung, Wasser- und Natriumionenretention¹³ und
2. ein objektivierbarer Nachweis einer kardialen Dysfunktion (in Ruhe) vorliegt.^{8,14}

Die funktionellen Auswirkungen des Herzens können dabei isoliert die Systole, Diastole oder beide Pumpphasen betreffen.^{8,11}

Die diastolische Herzinsuffizienz, HFpEF (engl. heart failure with preserved ejection fraction), ist die Folge einer verminderten Compliance (Dehnbarkeit) und Entspannung der linken Kammer bei erhaltener systolischer Pumpfunktion.^{8,12,14} Sie ist definiert als linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) $\geq 50\%$, erhöhten Plasmakonzentrationen des natriuretischen Peptides (z. B. N-terminales pro B-Typ NP (BNP) >125 ng/l) und der Erfüllung von mindestens einem der zusätzlichen Kriterien:

- a. relevante strukturelle Herzerkrankung (links ventrikuläre Hypertrophie und/oder links atriale Vergrößerung) oder
- b. diastolische Dysfunktion.

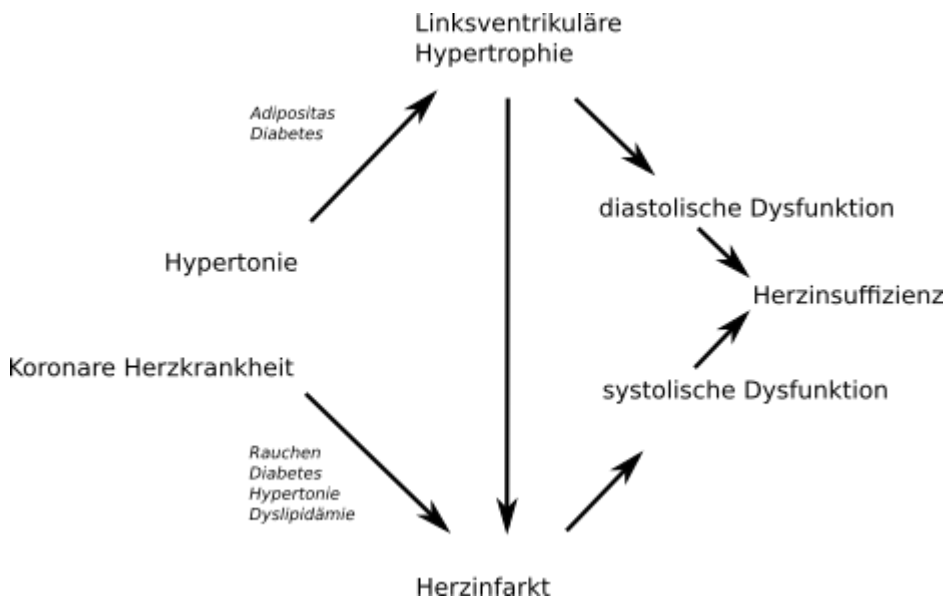
Die systolische Herzinsuffizienz, HFrEF (engl. heart failure with reduced ejection fraction), ist dabei eine Folge regionaler oder globaler Inotropiestörungen, die zu einem Abfall der Ejektionsfraktion auf unter 40% führt.

Der Bereich dazwischen, mit einer EF von 40 bis 49%, wird durch die HFmEF (engl. heart failure with mid-range ejection fraction) repräsentiert. Auch hierbei zeigt sich eine erhöhte NP-Plasmakonzentration sowie eines der beiden bei HfpEF genannten zusätzlichen Kriterien.

Typische Zeichen der Herzinsuffizienz können in der Frühphase und bei diuretisch behandelten Patienten fehlen.¹²

Der chronischen Herzinsuffizienz als klinisches Syndrom liegen unterschiedliche Ätiologien zugrunde.^{8,11} Häufige Ursachen sind Perfusionsstörungen durch eine koronare Herzkrankheit (KHK), Hypertrophie durch Druck- oder Volumenbelastung bei Vitien oder arterieller bzw. pulmonaler Hypertonie, Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen, Stoffwechselstörungen, Myokarditis oder Perikarditis.⁸

Abbildung 1: Ätiologie der Herzinsuffizienz
 modifiziert nach 8



Auf zwei häufige Ursachen soll im Weiteren eingegangen werden: Hypertrophie und Störung des Glucosestoffwechsels.

1.2 Herzmuskelhypertrophie als Ursache der Herzinsuffizienz

Definiert wird die Herzmuskelhypertrophie als Zunahme der Muskulatur des linken oder rechten Ventrikels. Das normale durchschnittliche Herzgewicht liegt bei gesunden Frauen zwischen 250 und 350 g, bei gesunden Männern bei 300 bis 400 g. Durch körperliche Belastung kann dieses Gewicht auf bis zu 500 g zunehmen. Steigt es weiter an, kommt es zu einer pathologischen Herzhypertrophie. Ab 500 g spricht man von einem kritischen Herzgewicht.¹⁵

Im Allgemeinen ist das Myokard ein zellkonstantes Organ, das nicht, beziehungsweise kaum, zur mitotischen Teilung fähig ist, weshalb es bei kardialer Überbelastung nicht zu einer kompensatorischen Zunahme der funktionellen Zellen kommt, sondern die physiologischen Reserven ausgenutzt werden, indem die Muskelmasse zunimmt. Diese Umstrukturierung führt zum Ausgleich der erhöhten Erfordernisse an das Herz, allerdings nur bis zum Erreichen des kritischen Herzgewichts, denn bei fortbestehender Überlastung führt diese unter anderem durch mangelnde Perfusion zu Muskelzellnekrosen und Fibrosierung mit erhöhter Steifigkeit des Herzens.^{15,16} Der „maladaptive“ Umbau des Myokards (Remodeling) manifestiert sich klinisch als Herzinsuffizienz. Im Verlauf kann diese zu einer Dilatation mit zunehmender Linksherzinsuffizienz führen.

Seit einiger Zeit ist die Bedeutung der begleitenden metabolischen Umgestaltungsprozesse bei diesem hypertrophen Wachstum in den Mittelpunkt des Interesses geraten. Im hypertrophierten Herzen sind Veränderungen im Energiebedarf sowie Substratverbrauch und erhöhter oxidativer Stress zu beobachten, die auf molekularer Ebene u. a. zu einem modifizierten Glucosetransport und einer erhöhten Glykolyse führen.¹⁷

1.3 Energiestoffwechsel des Herzens

Das Herz verbraucht mehr Energie als jedes andere Organ im Körper.^{6,18,19} Es schlägt täglich rund 100.000-mal und pumpt dabei ungefähr zehn Tonnen Blut durch den Körper. Die benötigte Energie spiegelt sich im täglichen Verbrauch von ATP wider, der mehr als sechs kg beträgt. Zu beachten ist dabei, dass das Herz nur eine geringe Substratspeicherkapazität besitzt.^{5,6,20-24}

Dieser enorme Verbrauch an ATP entspricht dabei etwa dem 20- bis 30-fachen des Herzgewichts.^{6,18,19,25} Selbst gesunde Herzen vermögen nur ca. 25% der Energie zu extrahieren, ein Großteil der Energie geht durch Wärmeproduktion verloren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass selbst eine geringfügige Änderung der Energieproduktion oder -verwendung zu einem schwerwiegenden, sich verstärkenden Einfluss auf die zellulären Energiespiegel führt.²⁶

Unter Ruhebedingungen ist der Stoffwechsel des Herzens hauptsächlich oxidativer Natur, bei der freie Fettsäuren und Glucose die Hauptenergiequellen darstellen. Dabei wird ein Drittel der gesamten Glucose, die nicht bereits im Gehirn metabolisiert wird, durch das Myokard genutzt.^{5,23} Unter akuter Last erhöht sich dieser Anteil bis auf die Hälfte dessen, was nicht im Gehirn verbraucht wird.^{5,20-22} Das bevorzugte Substrat hängt von vielen Faktoren ab, u.a. von der arteriellen Substratverfügbarkeit (Ernährungssituation), den hormonellen Faktoren (hauptsächlich Insulin) und der Arbeitslast. Meist verstoffwechselt das Myokard etwa zu 70% freie Fettsäuren, dies ändert sich nur während der postprandialen Phase.²⁴ Unter ischämischen Bedingungen mit vermindertem O₂-Angebot wird die exogene Glucose zum Hauptenergielieferanten für das Myokard. Die durch anaerobe Glykolyse verfügbare Energie reicht dann allein nicht aus, um die kontraktile Funktion aufrechtzuerhalten, vielmehr wird durch sie der Erhalt der zellulären Integrität gewährleistet.^{19,27}

Unter physiologischen Bedingungen besitzt das Herz die Fähigkeit, eine große Anzahl verschiedener Substrate zu verstoffwechseln und den Verbrauch den äußeren Bedingungen anzupassen. Diese metabolische Flexibilität befähigt das Herz, sich veränderten Bedingungen bzw. Substratverfügbarkeiten anzupassen, um den kontinuierlichen ATP-Bedarf zu decken.²⁸

Glykogen als Speichermolekül von Glucose trägt nicht nur signifikant zur ATP-Produktion im aerob arbeitenden Herzen bei, sondern spielt eine essentielle Rolle im Energiemetabolismus des Herzens unter bestimmten Bedingungen. Zu diesen gehören u. a. eine hohe Arbeitslast, Ischämie ebenso auch die druckinduzierte Hypertrophie, Sport und die tachykarde Schrittmacherstimulation.^{6,29-31} Hypertrophierte Herzen beispielsweise bevorzugen die Glucoseoxidation aus Glykogenspeichern im Gegensatz zur Verwertung der exogenen Zufuhr in gesunden Herzen.²⁸

Im Folgenden werden die Regulation des Glucose-Stoffwechsels und der Insulin-Signaltransduktion

beschrieben, da bei den Vorarbeiten auch signifikante systemische Veränderungen des Glucosestoffwechsels festgestellt und deren Entstehung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

1.4 Systemischer Glucosestoffwechsel und Signalwege der insulinvermittelten Glucoseaufnahme

Glucose ist ein lebenswichtiger Brennstoff für alle Säugetierzellen. Für das Myokard ist Glucose ein besonders wichtiger Energielieferant, da sie in Bezug auf den Sauerstoffverbrauch effizienter als andere Substrate verwertbar ist, d.h. pro verbrauchtem Mol O₂ eine höhere ATP-Synthese generiert.³² Unter physiologischen Bedingungen ist die Zellaktivität und das Überleben stark vom kontinuierlichen Angebot an Nährstoffen durch das Blut abhängig.³³ Daher ist die Erhaltung des Blutglucosespiegels hormonell durch Insulin, Glucagon und Katecholamine eng reguliert. In Nüchternphasen wird der Blutglucosespiegel vor allem über die Glykolyse aus hepatischen und muskulären Glykogenspeichern aufrechterhalten.

Die Lipiddoppelschicht der Zellwand ist aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Zuckermoleküls für dieses impermeabel. Daher ist die Glucoseaufnahme der Zelle über eine Vielfalt von Glucosetransportern (GLUT) geregelt. Es gilt hierbei zwischen der basalen Glucose-Aufnahme, die kontinuierlich entlang des Konzentrationsgradienten erfolgt, und der insulininduzierten Glucoseaufnahme, die postprandial bzw. nach Ausschüttung von Insulin bzw. 5'AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Muskulatur und Fettgewebe erfolgt, zu unterscheiden. Das Verteilungsmuster der Expression von Glucosetransportern in verschiedenen Geweben ist an die spezifischen metabolischen Erfordernisse angepasst.

1970 wurde von Kasahara et al. in der Membran menschlicher Erythrozyten erstmals die transmembranöse Struktur eines faszilierten Glucosetransports beschrieben. Inzwischen sind bereits 14 Mitglieder der Glucosetransporter-Familie bekannt.³³⁻³⁵

Die GLUT-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Transports, Mechanismus, ihrer Regulation, Kinetik, Lokalisation und des Expressionsmusters, das eine Feinregulation der Glucoseaufnahme als Antwort auf zelluläre Umweltveränderungen ermöglicht.^{34,36}

Die GLUT-vermittelte Glucoseaufnahme ist im Herzen mindestens vierfach höher als im Skelettmuskel und Fettgewebe. Im Myokard sind fast ausschließlich GLUT1 und GLUT4 anzutreffen.^{34,37,38}

Die insulinunabhängige GLUT1-Isoform findet sich in der Plasmamembran fast aller Zellen, hauptsächlich an der sarkolemmalen Membran. Ihre Funktion liegt in der Sicherstellung der basalen Energieversorgung über eine kontinuierliche Glucoseaufnahme.^{36,39}

GLUT4 wird vor allem in insulinsensitivem Gewebe wie der Skelettmuskulatur, dem Fettgewebe und eben dem Myokard exprimiert.⁶ Unter basaler metabolischer Stoffwechsellaage sind weniger als 1%

der GLUT4-Isoform an der Plasmamembran vorzufinden.³¹

Ein weiterer wichtiger insulinunabhängiger Glucose-Transporter (GLUT2), findet sich überwiegend in Leber, Niere, Pankreas-Betazellen und im Dünndarm.⁴⁰ Über GLUT2 werden Glucose, Galaktose und Fruktose entlang des Konzentrationsgradienten aufgenommen.

Zusammenfassend gibt es also die basale Glucoseaufnahme, die über GLUTs im Allgemeinen und GLUT1 und 2 im Besonderen sowie die bedarfsorientierte Glucoseaufnahme, die über Insulin oder AMPK vermittelt werden kann.

In der Leber erfolgt die Glykogensynthese: Im ersten Schritt wird Glucose bei hohen Konzentrationen durch das Enzym Hexokinase IV (=Glukokinase) in Glucose-6-Phosphat umgewandelt, sodass es die Zelle nicht mehr verlassen kann. Die Hexokinase katalysiert somit den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykogensynthese und der Glykolyse.

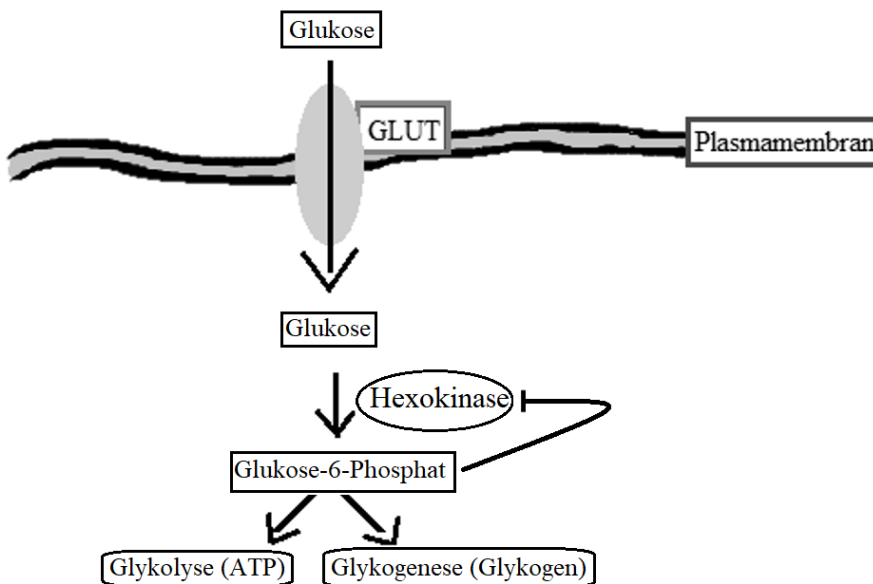


Abbildung 2: Metabolische Aufgaben der Hexokinase

modifiziert nach 41

Glucose-6-Phosphat reduziert über einen negativen Feedback-Mechanismus die Hexikinasenaktivität (s. Abb. 2). Insgesamt gibt es vier Isoformen der Hexokinase (HK I-IV).

Hexokinase II ist die prädominante Isoform im insulin sensitiven Gewebe wie dem Myokard, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe. Sie besitzt eine höhere Glucoseaffinität als die HK IV, auch Glukokinase genannt.

Die Expression der Hexokinase II ist wiederum über die Akt/mTOR Signalkaskade reguliert (s. Abb. 3), zudem wird sie durch Hypoxie verstärkt, um einen zellulären Schutz zu gewährleisten.⁴¹

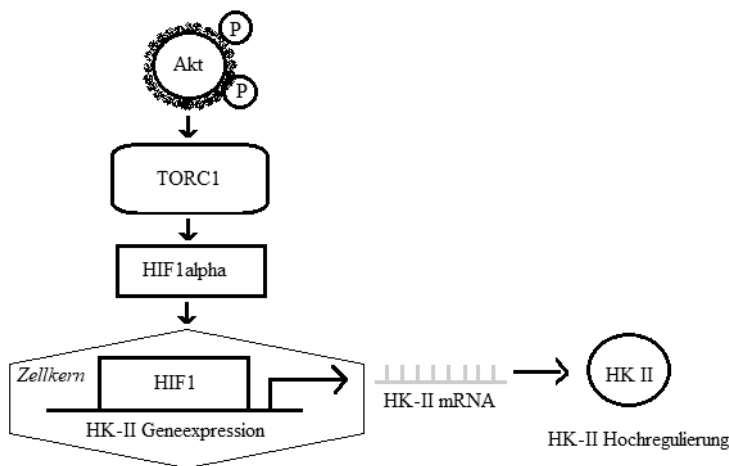


Abbildung 3: Regulierung der HK-II-Expression, die durch den Akt/mTORC1-Pfad vermittelt wird modifiziert nach ⁴¹

Neben Insulin gilt die AMPK als wichtiger Regulator der zellulären Energiehomöostase. Sie moduliert unter anderem den Glucoseverbrauch und dient als Energiesensor der Zelle.^{42,43}

Die Aktivierung der AMPK erfolgt durch eine Phosphorylierung, die durch vorgeschaltete Kinasen reguliert wird. AMPK wird beispielsweise während körperlicher Anstrengung oder einer myokardialen Ischämie als Antwort auf ein erhöhtes AMP/ATP-Verhältnis aktiviert.^{43–45}

Die AMPK hemmt die Fettsäurebiosynthese durch Phosphorylierung der Acetyl-Coenzym A-Carboxylase,⁴⁶ aktiviert die Expression sowie die Translokation von GLUT4^{47–49} und ist somit dem Effekt des Insulins ähnlich.⁵⁰ Zudem stimuliert es glykolytische Enzyme. Eine hohe AMPK-Aktivität während einer Ischämie erhöht die myokardiale Glucosetransporteraktivität und reduziert die Apoptose der Kardiomyozyten.^{48,51}

Die postprandiale zelluläre Glucoseaufnahme wird vor allem durch Insulin reguliert, das in den B-Zellen des Pankreas synthetisiert wird. Es fördert die Aufnahme und senkt damit den Verbrauch an freien Fettsäuren.⁵² Die Sekretion des Peptidhormons wird hauptsächlich durch die Glucosekonzentration im Blut sowie über das vegetative Nervensystem gesteuert. Es bewirkt durch seine vielfältige anabole Wirkung auf Leber, Muskulatur und Fettgewebe eine rasche Blutzuckerspiegelsenkung. Durch insulininduzierte Aufnahme der Glucose in die Insulin-Zielgewebe können Speichermoleküle wie Glykogen, Triglyceride und Proteine in Leber und Muskel gebildet werden. Zusätzlich hemmt Insulin die Proteolyse und wirkt antilipolytisch.⁴¹

In insulinempfindlichen Organen (Skelettmuskel, Fettgewebe, Myokard) bindet es an die Insulinrezeptoren an der Zelloberfläche und aktiviert intrazellulär Signalproteine. Diese bewirken die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors, Thyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS) und Aktivierung von Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3-K), Akt (auch als Proteinkinase B [PKB] bezeichnet) und Proteinkinase C. Die Aktivierung des Insulin-Signalwegs führt letztlich zur Translokation von GLUT4 aus dem intrazellulären Pool an die Zelloberfläche und erhöht dadurch den Glucosetransport in die Zellen um das zehnfache bis 20-fache (s. Abb. 4).^{37,40,47,50}

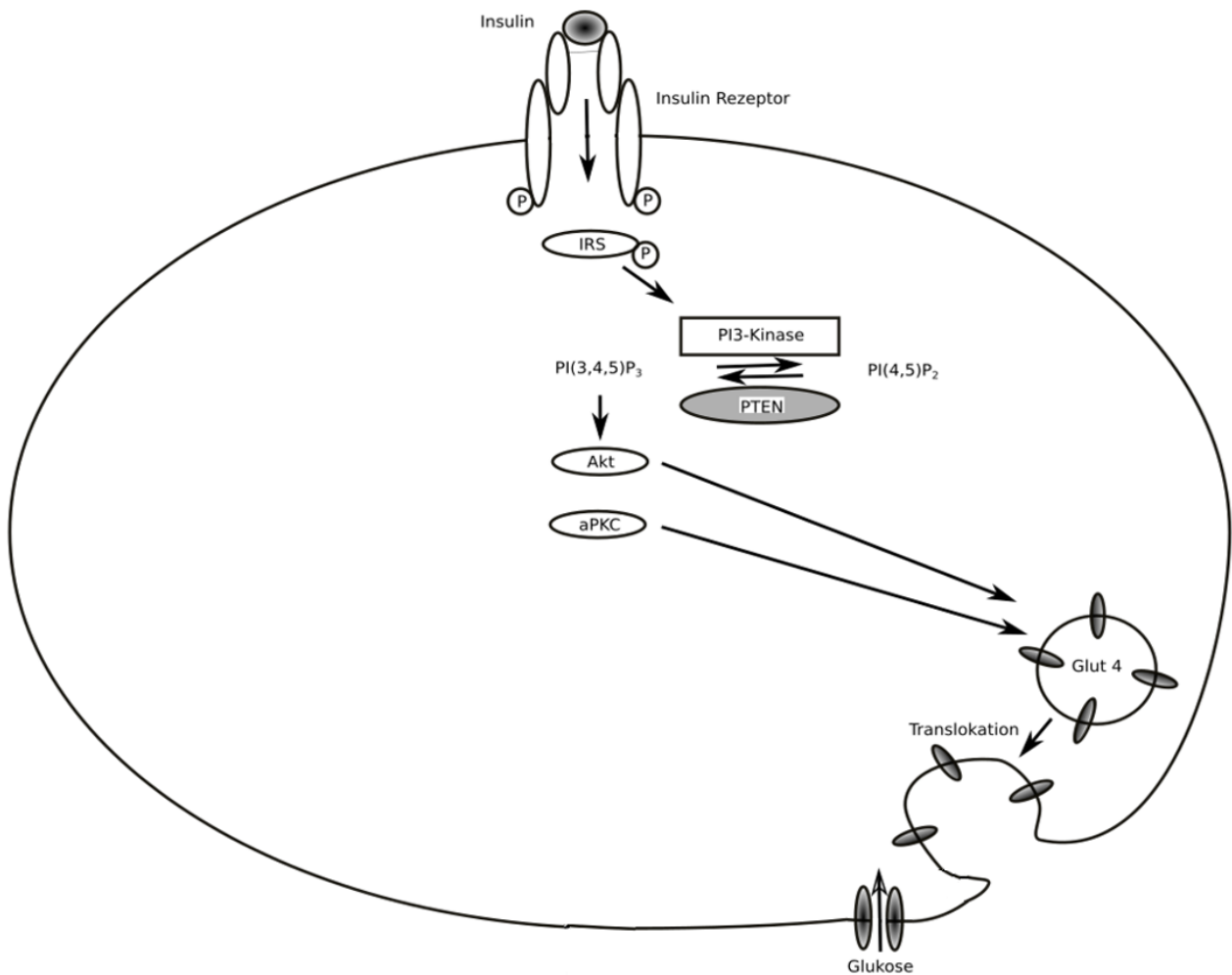


Abbildung 4: Signaltransduktion durch Insulin atypical Protein Kinase C (aPKC), Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten (PTEN) *modifiziert nach 43*

Die PI-3-Kinasen sind nicht nur an der insulinvermittelten Glucoseaufnahme beteiligt, sondern spielen bei vielfältigen Signaltransduktionswegen eine bedeutende Rolle. Aktiviert werden sie über verschiedene Rezeptoren mit einer Thyrosin-Kinase-Aktivität wie beispielsweise IGF-1 und G-Protein gekoppelten α - und β -2-Adrenorezeptoren.⁵³ Ihre Funktionen liegen in der Regulation des Zellwachstums, -überlebens und der -proliferation.⁵⁴ Prasad et. al. konnten zeigen, dass sie ebenfalls an der druckinduzierten Hypertrophie bei Mäuseherzen beteiligt sind.⁵⁵

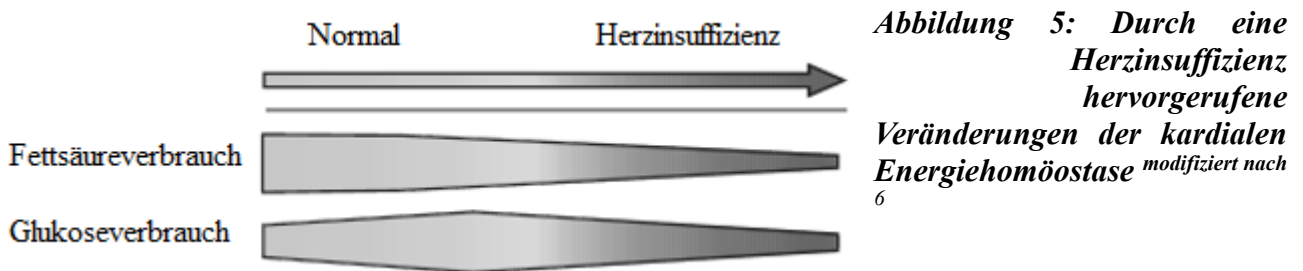
Akt stellt eines der wichtigsten Ziele für die PI-3-Kinase dar, sie aktiviert eine große Anzahl weiterer Signalmoleküle wie z.B. die Hexikinase II (s. Abb. 3, S. 7), zudem hemmt sie die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3, s. Abb 44 S. 50). Auch die Inhibition der AMPK ist Akt-abhängig.⁵⁶

Auch wenn der IGF-1-PI-3-K-Akt-Signalweg als physiologische Signalkaskade gilt, kann eine Überexpression von IGF-1 oder Akt pathologische Vorgänge induzieren. Unter anderem eine Hypertrophie mit eingeschränkter systolischer Funktion oder eine Herzdilatation, die bis zum Tode führen kann.⁴⁹

1.5 Myokardialer Glucosestoffwechsel bei Herzinsuffizienz und diabetische Kardiomyopathie

Es ist bereits bekannt, dass ein gestörter Glucosestoffwechsel am Herzen eine Herzinsuffizienz verursacht. Ziel dieser Arbeit ist es nun herauszufinden, wie eine Herzinsuffizienz den Glucosestoffwechsel systemisch beeinflusst.

Im frühen Stadium der Herzinsuffizienz ist der Verbrauch an Kohlenhydraten deutlich erhöht, der anaerobe Glucosestoffwechsel spielt daher eine bedeutendere Rolle, den Kardiomyozyten die benötigte Energie zu liefern.^{28,33} Zudem kommt es bei fortschreitender HI zu einer Reduktion des Fettsäurestoffwechsels (s. Abb. 5).⁶



Auch wenn diese Veränderungen im myokardialen Stoffwechsel bei Herzschwäche auf eine erhöhte myokardiale Glucose-Verstoffwechslung deuten, ist bei Herzinsuffizienz gleichzeitig eine Insulinresistenz zu beobachten. Die basale Glucoseaufnahme ist über eine gesteigerte Anzahl der GLUT1-Isoform deutlich erhöht.^{6,28,30,39,57} Allerdings wird im Verlauf der Herzinsuffizienz zunehmend die insulininduzierte Glucose-Aufnahme durch eine verminderte Anzahl an GLUT4 und gestörte Insulintransduktionswege eingeschränkt.⁵⁸ Die Glucoseaufnahme als Antwort auf Insulin ist im hypertrophierten Herzen sowie bei einer eingeschränkten Ejektionsfraktion reduziert. Diese Reduktion ist unabhängig vom myokardialen Blutfluss und prädisponierenden Konditionen (Hypertonie, KHK, Diabetes).

Die eingeschränkte Insulinsensitivität kann per se zur Entstehung einer Herzinsuffizienz führen. Das zeigt sich bei Patienten mit Diabetes,^{59,60} bei denen häufig auch ohne weitere Komorbiditäten wie der KHK oder einem arteriellen Hypertonus eine Herzinsuffizienz entsteht. Ähnlich wie in anderen Stoffwechselorganen entwickelt das diabetische Herz eine Insulinresistenz.^{39,59} Als Krankheitsentität wurde hierfür der Begriff der diabetischen Kardiomyopathie geprägt.

Makroskopisch zeigt sich im Rahmen einer HI eine konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie mit zunehmendem LV- Wanddickenindex, eine dilatative Kardiomyopathie und extrazelluläre Fibrose.⁶¹ Außerdem kommt es zu Stoffwechselveränderungen, wie beispielsweise einer erhöhten Lipidoxidation und intramyokardialen Ansammlung an Triglyzeriden. Die Akkumulation freier Fettsäuren beeinträchtigt zusätzlich die insulingesteuerte Glucoseaufnahme durch Hemmung des

Insulinrezeptorsubstrates. Die Anhäufung weiterer toxischer Metabolite und reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS)⁵⁹ im Herzen trägt zu der Entwicklung der Insulinresistenz und kardialer Fehlfunktionen bei.⁶²⁻⁶⁶ Diese frühen Veränderungen der kardialen Funktion führt mit der Zeit zum Verlust der kontraktile Funktion und mündet bei bis zu 75% der asymptomatischen Diabetespatienten in einer diastolischen Herzinsuffizienz.^{19,43,67}

Die Ergebnisse großer epidemiologischer Studien, z.B. die Framingham Studie, deuten darauf hin, dass allein das Vorhandensein von DM II mit der auftretenden Insulinresistenz sowie dem metabolischen Syndrom ein erhöhter Risikofaktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz darstellt.^{68,69} DM II ist ein aussagekräftiger Prädiktor kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität und ein unabhängiger Risikofaktor für den Tod von Patienten mit manifester Herzinsuffizienz.⁷⁰

Umgekehrt belegen klinische wie auch epidemiologische Studien einen engen Zusammenhang zwischen einer bestehenden Herzinsuffizienz und dem Auftreten eines Diabetes mellitus. Fast zwei Drittel der Patienten, die an einer chronischen Herzerkrankung leiden, zeigen eine gestörte Glucosehomöostase.^{59,71-73}

Unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache ist die HI mit einer systemischen und myokardialen Insulinresistenz assoziiert, die wiederum selbst einer erhöhten Mortalität unterliegt.⁷⁴ Die insulinvermittelte Glucoseaufnahme gilt als unabhängiger Prognosefaktor der HI.⁷⁰

Patienten im Stadium NYHA Klasse I entwickeln bis zu 13% einen Diabetes, die steigende Tendenz bestätigt sich in Klasse II mit 15% Diabetikern, in Klasse III haben bereits 20% der Patienten einen Diabetes entwickelt.⁷⁵

Patienten mit einem DM II, dabei aber erhaltener LV-Funktion, weisen noch eine normale myokardiale Insulinantwort auf, was darauf hindeutet, dass die LV-Funktion und die Insulinsensitivität des Organismus voneinander abhängen.^{76,77}

Im Weiteren ist das seltene Alström Syndrom als Einflussfaktor zu nennen, auch wenn diese genetische Erkrankung nur etwa 300 Patienten weltweit betrifft. Bei diesen Patienten entsteht eine schwere Insulinresistenz, die sekundär in ca. 60% der Fälle zu einer fatalen Kardiomyopathie führt,⁷⁸ sodass die Schlussfolgerung nahe liegt, dass eine Insulinresistenz zu einer Herzinsuffizienz führen kann.

1.6 Veränderungen des Nüchtern-Blutzuckers und der systemischen Glucosetoleranz bei Herzinsuffizienz einschließlich Sucrose ad libitum

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatte sich gezeigt, dass der Nüchternserumglucosegehalt bei männlichen Wildtyp-Mäusen drei und vier Wochen nach der TAC-Operation signifikant niedriger

war. Bereits zehn Tage nach der OP fiel ein signifikant erhöhter Glucoseumsatz auf (s. Abb. 6).

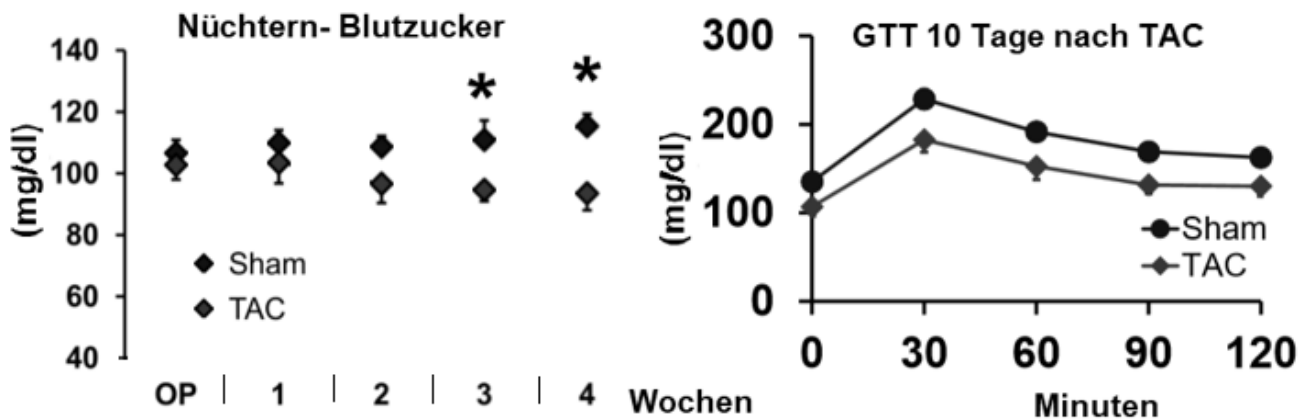


Abbildung 6: Veränderung der Nüchtern-Blutzuckerwerte im Verlauf von vier Wochen (Woche 3: 111 ± 6 vs. 95 ± 4 mg/dl, $p < 0.05^*$, Woche 4: 115 ± 4 vs. 94 ± 6 mg/dl, $p < 0.05^*$, $n = 9$ vs. 8) und Glucosetoleranztest zehn Tage nach TAC (AUC 11075 ± 439 vs. 8787 ± 702 , $p < 0.05^*$, $n = 10$ vs. 7)

Auch bei einer Verlängerung des Beobachtungszeitraumes von bis zu sechs Monaten bestätigt sich der erhöhte Glucoseumsatz bei den TAC-Mäusen (s. Abb. 7 und 8).

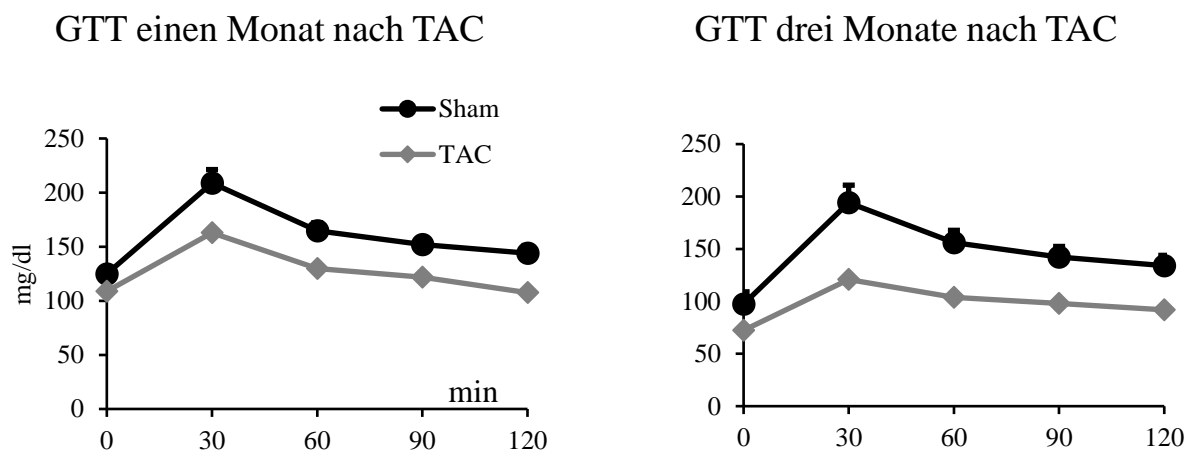


Abbildung 7: Glucosetoleranztests im zeitlichen Verlauf von drei Monaten (AUC nach einem Monat: 9898 ± 424 vs. 7834 ± 805 , $p < 0.05^*$, $n = 10$ vs. 6, nach drei Monaten: 9120 ± 602 vs. 5150 ± 1031 , $p < 0.05^*$, $n = 10$ vs. 6)

Um die Veränderungen der systemischen Glucosetoleranz aufzudecken, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Glucosetoleranztests bei den Versuchstieren durchgeführt. Graphisch dargestellt ist hier der zeitliche Verlauf während der Tests von zwei Stunden und die dazugehörige Blutzuckerkonzentration. Den bereits beschriebenen myokardialen und systemischen metabolischen Veränderungen, die durch eine Herzinsuffizienz ausgelöst werden, wurde durch eine Sucrosefütterung versucht entgegenzuwirken. Das Ergebnis der Glucosetoleranztests nach sechs

Monaten zeigt, dass sich der Glucoseumsatz mit der Sucrosubstitution bei den TAC-Tieren auf ein Niveau normalisiert, das mit den Forschungsergebnissen der Sham-Tiere vergleichbar ist (s. Abb. 8).

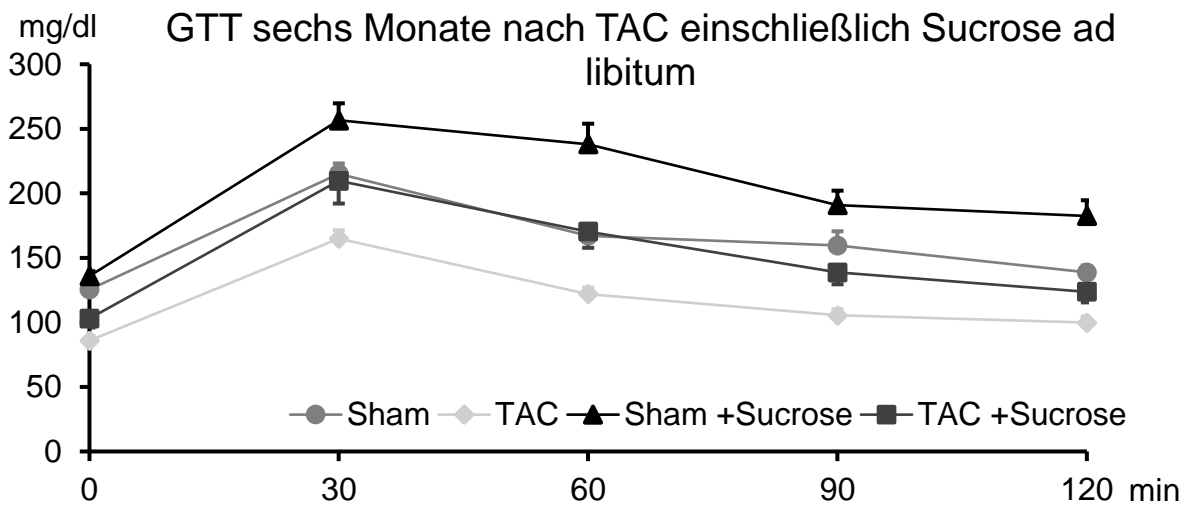


Abbildung 8: Glucosetoleranztests nach sechs Monaten einschließlich zusätzlicher Sucrosefütterung

Ebenso zeigte sich in der Gruppe der Nicht-Sucrose-gefütterten Tiere, dass gegenüber den Sucrose-gefütterten TAC-Tieren, bei denen 67% überleben, signifikant weniger TAC-Tiere, nämlich nur 37%, überleben ($p < 0.05$ * vs. Sham † vs TAC, s. Abb. 9).

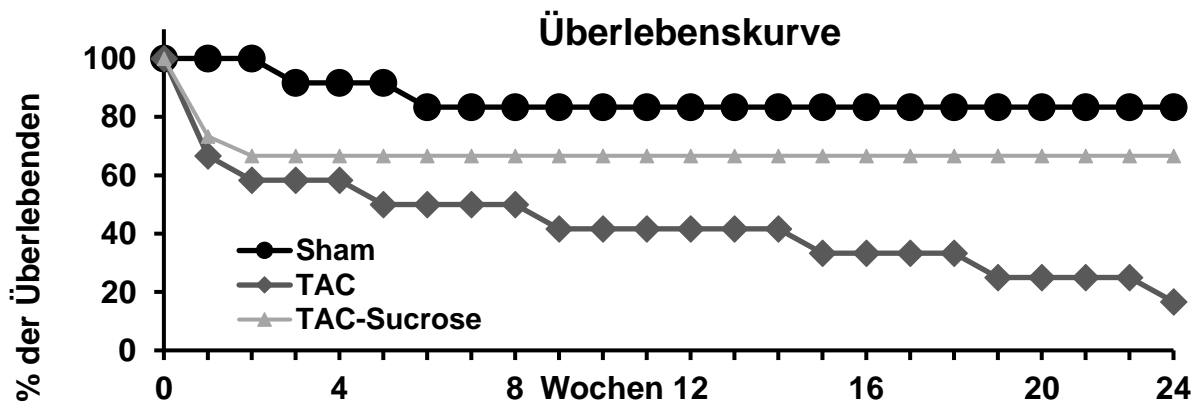


Abbildung 9: Überlebenskurve nach Sham, TAC bzw. TAC + Sucrose ad libitum im zeitlichen Verlauf von sechs Monaten

Aufgrund dieser Befunde werden in dieser Arbeit nun pathophysiologische Veränderungen an wichtigen Zielgeweben der Glucose untersucht werden.

1.7 Therapie der Herzinsuffizienz

Therapien der chronischen Herzinsuffizienz erzielten in den letzten 20 Jahren wesentliche Fortschritte. Grundlage der Herzinsuffizienztherapie ist die Unterbrechung der neuroendokrinen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) durch den Einsatz von Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Inhibitoren,^{79,80} bzw. Angiotensinrezeptor-Blockern, sowie bei fortgeschrittener Erkrankung auch Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten.⁸¹ Die Inhibitoren des RAAS verbessern nebenbefundlich auch die Insulinsensitivität³⁹ und sind daher Mittel der Wahl bei Patienten mit zusätzlichem metabolischen Syndrom. Außerdem sind sie eine der wenigen therapeutischen Optionen bei der Behandlung der kardialen Kachexie.⁸² Beta-Rezeptor-Blocker erreichen über die Senkung der Herzfrequenz (negative Chronotropie) eine Verminderung des Energieverbrauchs (=Ökonomisierung),⁸³ die meisten fördern jedoch die Entstehung einer Insulinresistenz.⁸⁴ Eine Ausnahme stellt Carvedilol dar, das zusätzlich eine Alpha-Rezeptorblockade bewirkt. Carvedilol reduziert die zirkulierenden freien Fettsäuren, verringert den myokardialen Verbrauch an fFS und erhöht die Glucoseaufnahme.^{85,86}

Zusätzlich kann bei ventrikulärer Asynchronie durch die Resynchronisationstherapie^{51,87} eine Optimierung der Hämodynamik mit Verbesserung der Auswurfleistung erreicht werden. Hierbei wird zudem der myokardiale Glucosemetabolismus gesteigert und es kommt zu einer reduzierten Insulinresistenz.^{88,89} Auch im Rahmen der akuten oder terminalen Herzinsuffizienz kommen zunehmend mechanische Unterstützungssysteme zum Einsatz, die ebenfalls die Insulinresistenz günstig beeinflussen.⁹⁰

Mit Sacubitril/Valsartan (Entresto[®]) ist seit Januar 2016 ein neuer Wirkstoff verfügbar, der erstmals seit Jahren eine zusätzliche Behandlungsoption eröffnet. Dieses Kombinationspräparat wurde in der PARADIGM-HF-Studie⁹¹ untersucht und zeigte in der kombinierten Wirkung des AT-1-Blockers sowie der Hemmung der Nephrylsin-Endopeptidase bessere Ergebnisse, als die alleinige Therapie mit ACE-Hemmern in Bezug auf das Sterberisiko sowie Hospitalisierung durch eine Herzinsuffizienz. Zudem konnte in einer post-hoc Analyse der PARADIGM-HF-Studie ein günstiger Effekt von Sacubitril/Valsartan auf die Blutzuckereinstellung bei Patienten mit HF und DM II beobachtet werden⁹² und in einer Studie⁹³ bei adipösen und hypertensiven Patienten zeigte sich ein direkter Einfluss von Sacubitril/Valsartan auf die Verbesserung der Insulinsensitivität.

Bei vielen therapeutischen Eingriffen tritt also der enge Zusammenhang zwischen einer Verbesserung der Herzinsuffizienz, der myokardialen Energetik und des systemischen Glucosestoffwechsels hervor. Zurzeit kommt daher der Regulation der Energiehomöostase im Myokard und systemisch als Mitverursacher der multifaktoriellen Erkrankung Herzinsuffizienz eine zunehmende Bedeutung in der Erforschung der Pathophysiologie und neuer Therapieansätze zu.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Artikel und Bezugsquelle

- 96-well-Mikrotiterplatte, Mikrotiterplatte-96-well, Sarstedt, Nümbrecht
- Accu-Check Sensor + Comfort Teststreifen, Roche, Mannheim
- Autoklav, VE-75, Systec, Linden
- Cellstar 15 und 50 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- CO₂-Inkubator, C150, Brand, Tuttlingen
- Einschweißgerät, Typ Vacupack plus, Krups
- Eppendorf-Cups, Eppendorf, Hamburg
- Feinwaage, Electronic Balance Typ ABS 120-4, Kern und Sohn, Balingen-Frommern
- Filterpapier, BioRad #1704085
- Gefrierschrank, Bioline, Gram, Vojens, Dänemark
- Gelkammer, 10+2 Well, BioRad #3459901
- Geweblysator, Eppendorf, Hamburg
- Hamilton Pipette, Hamilton
- Kombitips, Combitips plus 0,1; 0,2; 1; 2; 5; 10 ml, Eppendorf, Hamburg
- Latexhandschuhe, Micro touch, Ansell, Iselin, USA
- Multipipette, E3, Eppendorf, Hamburg
- pH-Meter, pH 537, wissenschaftlich technische Werkstätte Weilheim
- Photometer, SSYS UVM 340, Biochrom, Cambridge, England
- Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
- Pipettenspitzen, Research Einkanal: 0,1-2,5µl; 0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg
- PowerPac Universal power supply, Biorad
- Reaktionsgefäße: SafeSeal Gefäß 1,5 und 2 ml Sarstedt, Nümbrecht
- Röntgenfilm Fuji Super RX 13 x 18 #6001 und 18x24 #6002
- Rüttlerplatte, REAX3, Heidolph, Schwabach
- SDS-Page, Typ Criterion Gel chamber, BioRad
- Serologische Pipetten: 5, 10, 25 ml steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Sterilfiltereinheit, Nalgene Rapid-Flow, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Thermomix comfort, Eppendorf, Hamburg
- Transferpipette- 12-200 µl, Brand, Wertheim

- Vortexer, Typ L 46, Hartenstein
- Wärmeplatte, Typ L35 Hartenstein
- Western Blot, Typ Criterion Blotter, BioRAD
- Whatman gel blot paper, GB003, 58x60 cm, 0.8 mm, Fisher Sci., Whatman, no. 10402468 #09-301-124
- Zentrifugen: Heraeus Biofuge fresco, Thermo Fisher Scientific, Waltman, USA
 - Universal 32 R, Hettich, Tuttlingen
 - Micro Centrifuge SD, Roth, Karlsruhe
 - Mikro 20, Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien

Artikel und Bezugsquelle

- 30% Acrylamid/Bis Solution, BioRad #1610158
- Aprotinin, Sigma-Aldrich Steinheim # A6103
- APS (Ammoniumpersulfat), Sigma-Aldrich Steinheim #A3678
- Aqua bidest, Fresenius Kabi, Bad Homburg
- Bromphenolblau, Roth #T116.1
- BSA, Sigma-Aldrich Steinheim #P0914-5AMP
- D(+)- Saccharose, Roth #4661.1
- EDTA, Sigma-Aldrich Steinheim #E5134
- Ethanol abs., Sigma-Aldrich Steinheim #32205
- Formaldehyd, Sigma-Aldrich Steinheim #47630
- Glycin, Sigma-Aldrich Steinheim #G8898
- Glykogen Type III (liver), Sigma-Aldrich Steinheim #G8876
- Igepal CA-630, Sigma-Aldrich Steinheim I3021-100ML
- Insulin, Sigma-Aldrich Steinheim #I2643
- Isopropanol, Merck #1009940500
- Kaliumchlorid, Sigma-Aldrich Steinheim #P5405
- Kaliumhydroxid Plätzchen, Roth #P747.1
- Kupfersulfatlösung, Sigma-Aldrich Steinheim #C2284
- Laemli Sample Puffer, BioRad #161-0737
- Leupeptin, Sigma-Aldrich Steinheim # L9783
- Magnesiumsulfat, Sigma-Aldrich Steinheim
- Methanol, Sigma-Aldrich Steinheim #32213
- Na₃VO₄ (Natriumorthovanadat) Sigma-Aldrich Steinheim # S6508

- Na₄P₂O₇ (Natriumdiphosphat), Sigma-Aldrich Steinheim #P8010, Sigma #P8010
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich Steinheim #S3014
- Natriumfluorid, Sigma-Aldrich Steinheim #S1504
- Natriumhydroxid, Sigma-Aldrich Steinheim
- Nonfat dry milk, Cell Signaling #9999S
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Steinheim
- Ponceau-S, Fluka #09189-11-F
- Salzsäure 5N, Sigma-Aldrich Steinheim
- SDS, Sigma-Aldrich Steinheim #L4390-250g
- TEMED, Sigma-Aldrich Steinheim #T9281-25 ml
- Tris, Roth # 4855.1
- Tris-HCl, Sigma-Aldrich Steinheim #T4661
- Tween-20, Sigma-Aldrich Steinheim #P9416-100 ml
- Western Lightning ECL Plus, PerkinElmer #NEL105001EA
- β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Steinheim #M6250

2.1.3 Enzyme

Artikel und Bezugsquelle

Glucoseoxidase, Thermo TR 15103

Amyloglykosidase, Sigma-Aldrich Steinheim #A7420

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
GLUT1	Anti-Kaninchen Ig G (Cell Signaling #7074-S)	1:1000	Milipore # 07-1401
GLUT2	1:2000 in 5% Milchlösung	1:500	Milipore #07-1402
GLUT4		1:100	Milipore #CBL243x
P 85-PI3K agarose-conj.		1:1000	Millipore/Upstate #16-107
Hexokinase II		1:2000	Cell Signaling #C64G5
Hexokinase IV		1:1000	Abcam Anti-GLK ab137714
Phospho-Akt Ser 473		1:1000	Cell Signaling #9271
Akt 1		1:1000	Millipore/Upstate #05-591
Phospho-AMPK Thr 172		1:1000	Cell Signaling #2531
AMPK alpha 2		1:1000	Cell Signaling #2757-S

Größenstandard: Kaleidoscope Precision Plus Protein Standards, BioRad # 161-0375

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden männliche acht bis zehn Wochen alte C57BL/6N Mäuse verwendet, um wachstumsbedingte Effekte zu vermeiden. Sie wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

2.2.2 Tiermodelle

Um die Pathomechanismen bei der Entstehung von Krankheiten zu verstehen, bzw. zur Erforschung neuer Therapieoptionen und Medikamente stehen der Forschung unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Hierzu zählen insbesondere die Studien an lebenden Tieren oder Zellkulturen. Beide Methoden zeigen eine Reihe an Vor- und Nachteilen. Allerdings stößt die isolierte Betrachtung von Zellkulturen besonders dann an ihre Grenzen, wenn es darum geht, erhobene Daten und aufgestellte Thesen auf den lebenden Organismus zu übertragen. Somit ist der Einsatz von Tieren oft unvermeidlich, bei multifaktoriellen Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz im Besonderen, da die Betrachtung isolierter Zellen nicht ausreichen würde.

2.2.3 Transversale Aortenligatur

Das murine TAC-Modell wurde erstmals von Rockman et al. eingeführt und hat sich seitdem als gängiges Verfahren etabliert, um humane kardiovaskuläre Erkrankungen nachzuahmen und zur Aufklärung zugrundeliegender Signalwege, die bei einer Herzhypertrophie auftreten und zu der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen, zu verstehen.⁹⁴

Durch Ligatur der Aorta auf Höhe des Aortenbogens kommt es initial zu einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzens, die anfänglich mit einer temporär erhöhten Kontraktilität assoziiert ist. Innerhalb von zwei bis sieben Tagen entwickelt sich kompensatorisch eine hochgradige, linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie. Dabei kommt es, bezogen auf das Körpergewicht, zu einer Zunahme des Herzgewichts der Versuchstiere um 40-60%. Allerdings führt dies als Antwort auf die chronisch hämodynamische Belastung im Verlauf zu maladaptiven Anpassungsreaktionen, die schließlich in einer kardialen Dilatation und einer Herzinsuffizienz münden.

Durchführung:

Bei einem Teil der acht bis zehn Wochen alten männlichen Mäuse wurde eine TAC-Operation (engl. transverse aortic constriction) vorgenommen. Dabei wird die Aorta im Bereich der Aorta transversalis mittels Ligatur verengt, sodass vor und hinter der künstlich hergestellten Stenose ein Druckgradient von mindestens 30 mmHg entsteht.

Die Intubationsnarkose erfolgt über Isofluran, das sich über die nur geringe kardiodepressive Wirkung besonders gut dafür eignet. Über eine Kugelkopfschere eröffnet man den Thorax im Bereich des Sternums und legt die Aorta transversalis frei. Die Aorta wird mit einem nicht resorbierbaren Faden

verknötet. Zur Sicherstellung eines Größenstandards des Verfahrens wird vor dem Verknöten eine 27G Nadel parallel zum Gefäß eingeführt, die im Anschluss wieder entfernt wird, sodass jede Ligatur gleich weit ist. Als Kontrollgruppe wurden die sog. Sham-Tiere genommen, die sich einer Scheinoperation unterzogen, bei der keine Aortenkonstriktion durchgeführt wurde.

2.2.4 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen bei gleichmäßiger Temperatur (21.5 ± 0.5 °C) und einer Luftfeuchtigkeit von $50 \pm 5\%$ gehalten sowie einem Tages-Nacht-Rhythmus von 14/10 h (das Licht wurde um 7.00 Uhr angeschaltet). Während der ganzen Zeit hatten die Tiere Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Es wurden zwei Mäuse pro Käfig gehalten, sodass sie sich an die Gegebenheiten gewöhnen konnten, bevor nach ca. einer Woche die TAC- oder Sham- Operation durchgeführt wurde. Sämtliche Versuche folgten den Vorschriften des Tierschutzgesetzes nach den Richtlinien des europäischen Wirtschaftsgemeinschaftsrates von 1986 (86/609/EEC [engl. european economic community]) und wurden durch den Regierungsbezirk Unterfranken und die Universität Würzburg überprüft und genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2531.01-96/11).

Sowohl das Körpergewicht als auch die Nahrungsaufnahme wurden kontrolliert. Die Insulinsensitivität und Glucosetoleranz wurden durch wöchentliche (Kurzzeit-Versuch) bzw. monatliche (6-Monats-Gruppe) Serum-Glucose- und -Insulinmessungen wie auch Glucose- und Insulintoleranztests dokumentiert.

Eine Subgruppe an Mäusen erhielt eine zusätzliche Sucroslösung ad libitum. Der Leber-, Herz- und Muskelglykogengehalt, die GLUT-Expression und Insulinsignaltransduktionswege im Herzen, der Leber und den Skelettmuskelzellen wurden nach der Tötung enzymatisch und über Western Blot Analysen quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte über ANOVA mit Daniel's XL toolbox software.

2.2.5 Materialgewinnung

Nachdem die Tiere über Nacht nüchtern waren, wurden sie getrennt in Plastikbehältern in das Labor transportiert. Dort wurden die Mäuse gewogen und der Blutzuckerspiegel bestimmt, bevor die Organentnahme erfolgte. Dafür wurde je eine Maus in einen Kunststoffkasten gesetzt, der Deckel verschlossen und diese Kammer über einen Anschluss mit Kohlenstoffmonoxid gefüllt. Sobald die Maus bewusstlos war, wurde ihr über eine Pinzette, die man im cervikalen Wirbelbereich anlegte, das Genick gebrochen und sie somit getötet. Direkt darauf erfolgte die Präparation des Herzens. Dieses wurde entnommen, in einer eiskalten 0,9%-igen NaCl-Lösung gespült, anschließend in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben, abgewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um ein Fortschreiten biochemischer Prozesse zu unterbinden, ist ein schnelles und genaues Arbeiten nötig.

Im Anschluss erfolgte die Entnahme der Leber. Diese wurde direkt in einen Eppendorf-Behälter gegeben, abgewogen und eingefroren. Anschließend erfolgte die Präparation des *M. gastrocnemius* und des weißen und braunen Fettgewebes, das ebenfalls in Eppendorf-Röhrchen gewogen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde. Die Tibialänge wurde gemessen, sie gilt als Maß für den Entwicklungsstand des Tieres und kann zur Ermittlung des Verhältnisses von Herzgewicht zu Tibialänge verwendet werden, das eine Einschätzung der Myokardhypertrophie unabhängig vom Körpergewicht erlaubt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.6 Proteinanalyse

Durch proteinanalytische Methoden können Aussagen über Qualität und Quantität spezifischer Proteine getroffen werden. Daraus ergeben sich Rückschlüsse auf ihre Funktion und Auswirkung auf verschiedene Signal- und Aktivierungswege.

2.2.7 Proteinextraktion

Zur Durchführung der Proteinextraktion werden von den unterschiedlichen Geweben der diversen Proben auf Trockeneis annäherungsweise gleich große Stücke abgetrennt und auf der Feinwaage in vorgekühlten Eppendorf-Röhrchen abgewogen. Bei den Leberproben handelt es sich dabei um Gewichte von ca. 30 mg. Die Herzen werden auf Trockeneis in einer mit Alufolie ausgelegten Mörser mit einem in flüssigem Stickstoff gekühlten Pistill pulverisiert, sodass für die Proteinextraktion zwei Löffel verwendet werden können. Vom *M. gastrocnemius* wird die Hälfte des Muskels verwendet. Zur Herstellung der Gewebelysate wird dem zu untersuchenden gefrorenen Gewebe Lysepuffer beigegeben, der folgendermaßen zusammengesetzt ist:

Substanz	Volumen	Konzentration
Tris, pH 7,4	4,8 ml	1M; MW 12114 g/mol
EDTA	2,4 ml	500 mM; MW 372,24 g/mol
Na ₄ P ₂ O ₇	24 ml	100 mM; MW 265,9 g/mol
NaF	120 ml	200 mM
Na ₃ VO ₄	4,8 ml	
Igepal/NP-40	24 ml	(10%)
Aprotinin	160 µl	10 mg/ml
Leupeptin	160 µl	10 mg/ml
PMSF	2,4 ml	100 mM
AMPUWA	57,28 ml	

Der Lysepuffer (engl. lysis buffer, LB) enthält zur Suppression von Dephosphorylasen und als

Proteasen-Inhibitor PMSF (1:100), Leupeptin (1:1000) und Aprotinin (1:1000). Je nach verwendetem Gewebe werden unterschiedliche Mengen Lysepuffer verwendet, um eine gleichmäßige Proteinkonzentration in den Homogenisaten zu gewährleisten. Bei Herzproben wird für 20 mg ca. 200 µl Lysepuffer hinzugefügt, beim M. gastrocnemius und der Leber 500 µl. Für die Western Blot Analysen werden 20-30 µg Protein eingesetzt.

Zur Homogenisierung wird in jedes Eppendorf-Röhrchen eine Metallkugel hinzugefügt und für eineinhalb Minuten im Gewebslyikator bei 30 Hertz geschüttelt. Um durch enzymatische Reaktion ein homogenes Gemisch zu erhalten, werden die Proben in der Kältekammer bei 4 °C für 30 Minuten geschwenkt. Zur Trennung der homogenisierten Proteine von Zelldetritus werden die Eppendorf-Röhrchen danach bei 14000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen transferiert und eine Proteinbestimmung dieses Gemisches durchgeführt.

Damit eine gleiche Ladungsmenge gewährleistet ist, muss zuvor die Proteinkonzentration bestimmt werden. Diese wird über die Bicinchoninsäure-Reaktion photometrisch gemessen. Hierfür wird eine 96-well-Platte und das BCA-Reagenz vorbereitet. Das BCA-Reagenz besteht aus 9,8 ml BCA mit 200 µl 4%-igem CuSO₄, dieses Gemisch wird 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wird als Standard bovines Serumalbumin verwendet. Diese wird wie folgt vorbereitet:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0 µl	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl	9 µl	10 µl
BSA+10 µl LB	BSA+ 9 µl LB	BSA+ 8 µl LB	BSA+ 7 µl LB	BSA+ 6 µl LB	BSA+ 5 µl LB	BSA+ 4 µl LB	BSA+ 3 µl LB	BSA+ 2 µl LB	BSA+ 1 µl LB	BSA+ 0 µl LB

Es werden des Weiteren je 10 µl jeder Probe mit 20 µl Lysepuffer in ein neues Eppendorf-Röhrchen transferiert. Von diesem Gemisch werden 10 µl in die Platte eingebracht. Dazu wird im Anschluss die Mischung aus Kupfersulfat und BCA zu je 200 µl als Indikator hinzugefügt. Um die Genauigkeit zu erhöhen, werden der Standard und die Proben jeweils in Duplikaten aufgetragen.

Chemisch wird bei diesem Prozess das zweifach positiv geladene Kupferion durch die Proteine zu einem einfach positiv geladenen Kupferion reduziert. Zusammen mit der Bicinchoninsäure komplexiert dieses zu einem violetten Farbstoff.

Die 96-well-Platte wird für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wird sie in den Plate Reader eingelegt. In diesem wird die Extinktion mit dem Programm Digi-Read bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

2.2.8 Angleichen der Proteinkonzentration

Abhängig davon, welches Protein nachgewiesen werden soll, werden unterschiedliche

Gesamtproteinmengen benötigt. Die photometrisch bestimmten Werte werden danach in eine vorbereitete Excel-Datei übernommen und somit die Proteinkonzentration jeder Probe errechnet. Um auf Konzentrationen zwischen 10-20 µg/µl zu kommen, werden die Lysate entsprechend mit Lysepuffer in einem neuen Eppendorf-Behälter verdünnt und im Anschluss mit Laemmli-Puffer versetzt, der folgendermaßen zusammengesetzt ist:

Für 20 ml	Masse/Volumen	Konzentration
2 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml	250 mmol/l
20% SDS	8 ml	8%
Glycerol	8 ml	40%
DTT (MW 154,3)	1,234 g	400 mmol/l
Bromphenolblau	1 Spatelspitze	
Aqua dest.	1,5 ml	

Zur Denaturierung der Proteine werden alle Proben mit dem Eppendorf Thermomixer bei 95 °C im Rüttler gekocht und im Anschluss in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Handelte es sich bei den zu untersuchenden Proteinen um die GLUT-Transporter, so wurden diese nicht gekocht, da sich gezeigt hat, dass sie in ungekochtem Zustand besser nachzuweisen sind. Die Proben können nach diesem Schritt aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder direkt für den Western Blot verwendet werden. Waren die Proben tiefgefroren, wurden sie vor der weiteren Bearbeitung kurz aufgekocht und anschließend herunterzentrifugiert.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Western Blot

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Nachweisverfahren von Proteinen durch elektrophoretische Auftrennung und Übertragung (Blotting) auf eine Trägermembran. Anschließend können dann spezifisch Proteine durch Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden.

Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemischs erfolgt mittels SDS-Page. Bei dieser Methode wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe (in kDa) in einem elektrischen Feld unterschiedlich weit auf einem Polyacrylamid-Gel. Das Wanderungsverhalten ist abhängig von der Konzentration des Polyacrylamidgels, von der Größe der Proteine, die nach Denaturierung mithilfe des anionischen Tensids SDS entsprechend der Anzahl ihrer Eigenladung negativ geladen sind und somit unterschiedlich schnell zur Kathode gezogen werden. Die Konzentration der SDS-Moleküle verhält sich dabei proportional zur Proteingröße.

Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche sich durch den pH-Wert und die Porengröße unterscheiden und folgendermaßen zusammengesetzt sind:

Sammelgel (4%):	Trenngel (7%):
30% Acrylamid/bis 0,66 ml	30% Acrylamid/bis 3,5 ml
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 1,26 ml	1,5 M Tris-Cl, pH 8,8 3,5 ml
10% SDS 50 µl	10% SDS 140 µl
Aqua dest. 3 ml	Aqua dest. 6,8 ml
10% APS 25 µl	10% APS 70 µl
TEMED 5 µl	TEMED 7 µl

Durch Zugabe von APS und TEMED wird die Gelpolymerisation initiiert, die Grundlage für die Entstehung des Gels ist. Es erfolgt hierbei eine N,N'-Methylenbisacrylamidmolekülvernetzung, aus der ein dreidimensionales Maschenwerk mit definierter Porengröße entsteht. Das Sammelgel hat eine geringere Konzentration an Acrylamid, da so größere Poren geschaffen werden, sodass dieser Teil des Gels schnell von den Proteinen durchwandert wird. Es dient der Ladung und Ordnung der Proteine, bis diese am Trenngel ankommen, in dem die Auftrennung nach Größe stattfindet, wobei sich die kleinen Proteine schneller bewegen und somit weiter wandern.

Für diese Arbeit wurden 7,5%-ige Gele verwendet, da sie gut geeignet für die zu bestimmenden Proteine zwischen ca. 50 (z. B. GLUT1) und 100 kDa (z. B. Hexokinase II) sind.

Die Sammelgelmatrix wird zuerst bis etwa 1 cm unter den Rand der eingezeichneten Taschen in die Plastikkammer gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet, sodass ein luftfreier Gelabschluss erreicht wird, damit das Gel vor dem Austrocknen geschützt ist.

Nach abgeschlossener Aushärtung wird anschließend das überstehende Wasser abgegossen und das Trenngel in den noch bestehenden Raum eingefüllt bevor der Stackerkamm eingesetzt wird.

Im Anschluss können die Gelkammern zur weiteren Bearbeitung in feuchten Zellstoff gewickelt und bei 4 °C gelagert oder direkt weiterverwendet werden.

Nach der Aushärtung können die Kämmen vorsichtig entfernt und die entstehenden Geltaschen langsam mit Laufpuffer befüllt werden, nachdem die Gelkammern entsprechend in die mit 1000 ml Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt wurden. Der zehnfach konzentrierte Laufpuffer ist wie folgt zusammengesetzt:

Für 1000 ml	Masse/Volumen	Konzentration
Tris-Base	30,3 g	250 mmol/l

Glycin	144 g	1,918 mol/l
20% SDS	50 ml	1%
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Zur Verdünnung des Zehnfachkonzentrats wird für einen Liter Laufpuffer 100 ml Zehnfachkonzentrat mit 900 ml Aqua dest. gemischt.

Die Beladung des Polyacrylamidgels erfolgt mit dem Gemisch nach Angleichen der Proteinkonzentration. Die entsprechenden Proben werden zu je 30 µl pro Spur eingefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wird an beide Seiten der Gelkammer jeweils 5-8 µl Kaleidoscope Precision Plus Protein Standards in die Spur eingebracht.

An die über die Kathode und Anode an das Powersupplygerät angeschlossene Elektrophoresekammer wird eine Spannung von 100 V angelegt.

Sobald die Proben das Sammelgel durchwandert haben, wird die Spannung für das Trenngel auf 150 V erhöht. Insgesamt dauert dieser Vorgang eineinhalb bis zwei Stunden.

Transfer:

Zur Immobilisation der Proteine erfolgt dann der Elektrotransfer der Eiweiße in dem nach Größe aufgetrennten Acrylamidgel auf eine Cellulose Membran. Dieser geschieht über die Einbettung des Gels in ein Transfersandwich, in dem von der Kathoden- zur Anodenseite Schaumstoff, Filterpapier, Trenngel, Cellulose-Membran und wiederum Filterpapier und Schaumstoff übereinandergeschichtet werden. All dies wird in einem mit Transfer-Puffer getränktem Plastikbehältnis durchgeführt, nachdem die das Gel enthaltende Plastikkammer vorsichtig aufgebrochen wurde. Es wird darauf geachtet, dass alles gut mit Puffer befeuchtet und möglichst luftblasenfrei übereinandergeschichtet ist.

Der zehnfach konzentrierte Transfer-Puffer hat folgende Zusammensetzung:

Für 1000 ml	Masse/Volumen	Konzentration
Tris Base	30,3 g	250 mmol/l
Glycin	144 g	1,918 mol/l
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Zur Verdünnung des Zehnfachkonzentrats wird für einen Liter Transfer-Puffer 100 ml Zehnfachkonzentrat, 200 ml Methanol und 700 ml Aqua dest. gemischt.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an die Transferkammer, in die die Sandwiche eingebracht werden, wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und können dadurch von dem

Polyacrylamidgel auf die Cellulosemembran transferiert werden (Western Blot). Für eine ausreichende Kühlung sorgt zusätzlich ein gefrorener Kühlakku in der Kammer. Der Transfer erfolgt in der Kühlkammer (4 °C) unter einer Spannung von 105 V bei einer Stromstärke von unter 0,5 A für 60 Minuten.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers wird im Anschluss die Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Dieses Reagenz bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Sie kann im Anschluss durch dreimalige Waschschrte mit TBST sehr leicht entfernt werden. Zur Herstellung des zehnfach konzentrierten TBS bzw. TBST wird folgendes Protokoll herangezogen.

Für 1000 ml	Masse/Volumen	Konzentration
Tris-Base	24,23 g	200 mmol/l
NaCl	87 g	1,49 mol/l (8,7%)
Aqua dest.	ad 1000 ml; pH auf 7,4 einstellen	

TBST (TBS mit Tween-20):

Für 1000 ml	Masse/Volumen	Konzentration
10x TBS	100 ml	200 mmol/l
Tween-20	500 µl	0,05%
Aqua dest.	ad 1000 ml; pH 7,4 einstellen	

Danach wird die Membran mit 5%-iger Milchlösung folgender Zusammensetzung

Für 300 ml	Masse/Volumen
Milchpulver	15 g
TBST	ad 300 ml

in der Kältekammer unter leichtem Schütteln für eine Stunde geblockt. Dieser Vorgang verbessert durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Cellulose die anschließende Immundetektion der gewünschten Zielproteine.

Danach wird die Membran zusammen mit dem Primärantikörper (Verdünnung siehe Tabelle) zusammengebracht und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es werden dafür ungefähr 10 ml in 1- bzw. 5%-iger Milch gelösten Primärantikörper verwendet.

Am Folgetag wird die Membran dreimal für zehn Minuten in TBST gewaschen, um die ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Es folgt dann die 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem spezifischen, an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper, der in einer

Verdünnung von 1:2000 in 5%-iger Milchlösung hinzugegeben wird.

Anschließend wird die Membran wiederum von den überschüssigen Sekundärantikörpern durch dreimalige, 15-minütige Waschvorgänge mit TBST befreit.

Zur Detektion des gesuchten Proteins wird eine Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert, die aufgrund der an die Zweitantikörper gebundene Enzym Peroxidase erfolgt.

Bei diesem Vorgang kommt es zur oxidativen Umsetzung von Luminol mittels Natriumdithionit, bei der die entstehende Chemolumineszenz durch Schwärzung eines Fotofilms sichtbar gemacht werden kann. Diese Durchführung erfolgt in einer Röntgenkassette mit unterschiedlich langen Belichtungszeiten in der Dunkelkammer. Anschließend wird der Film in einen Entwickler gegeben. Die Membran kann dann in TBST mit Natriumazid als Konservierungsmittel eingeschweißt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Zum Nachweis phosphorylierter Proteine werden die ersten Schritte wie oben beschrieben durchgeführt. Um im Anschluss die Expression der Gesamtproteine (phosphoryliert und nicht-phosphoryliert) darzustellen, werden die Membranen gestripped, d.h. von der vorherigen Antikörper-Bindung befreit.

Zur Herstellung des Stripping-Puffers wird folgende Zusammensetzung verwendet:

Für 10 ml Stripping-Puffer:	Volumen	Konzentration
20% SDS	1 ml	2%
1 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl	62,5 mmol/l
β-Mercaptoethanol	75 µl	7,5%
Aqua dest.	8,3 ml	

Hierfür wird die Membran nach dem Entwickeln zehn Minuten in TBST gewaschen, um sie anschließend 30 Minuten bei 37 °C in einem Strippingbuffer schwenkend zu inkubieren, der die Proteinbindung zwischen Antikörpern bzw. Milch und den Proteinen auf der Membran löst.

Dann erfolgen weitere Waschschritte mit TBST. Anschließend wird die Membran erneut eine Stunde bei Raumtemperatur in 5%-iger Milchlösung geblockt und danach über Nacht mit dem Primärantikörper für das Gesamtprotein bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Waschen und Visualisieren erfolgt entsprechend den zuvor beschriebenen Schritten.

2.2.10 Glykogenassay

Bei der Bestimmung des Glykogengehalts der Leber werden die Proben auf Trockeneis geschnitten. Präparate von ca. 30 mg werden mit dem Skalpell abgetrennt, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und das genaue Gewicht auf der Feinwaage kontrolliert und dokumentiert, wie beim M. Gastrocnemius auch.

Bei der Bearbeitung des *M. gastrocnemius* werden die tiefgefrorenen Proben auf Trockeneis gebracht und dort ein Muskel halbiert, die hälftigen Muskeln werden in ein Eppendorf-Röhrchen eingebracht, um bei diesen den Glykogengehalt zu bestimmen.

Im weiteren Verlauf wird die Standardkurve, aus sechs Proben bestehend, wie folgt auf Eis vorbereitet:

	0 µg std.	6 µg std.	12 µg std.	18 µg std.	24 µg std.	30 µg std.
Glykogen 0.1 mg/ml	0 µl	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
0.5 N KOH	300 µl	240 µl	180 µl	120 µl	60 µl	0 µl

Für die Leber werden wegen des hohen Glykogengehalts Konzentrationen von 1 mg/ml Glykogen für den Glykogenstandard verwendet. Im Folgenden werden die Eppendorf-Röhrchen, die das zu untersuchende Gewebe enthalten, bei 4 °C auf Eis gebracht und je 300 µl 0,5 N KOH-Lösung hinzugefügt. Danach werden die Proben 30 Minuten bei 95 °C auf dem Thermomix inkubiert. Anschließend werden die Proben gevortext, bis das Gewebe vollständig gelöst ist.

Es werden daraufhin je 25 µl 6%-ige Natriumsulfatlösung und 750 µl 100%-iges Ethanol in die Behältnisse gefüllt. Nach 60-minütiger Inkubation des Gemisches bei -80 °C werden die Proben mit 16000 x g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Zu dem im Eppendorf-Röhrchen verbleibenden Pellet wird je 1 ml 70%-iges Ethanol pipettiert und im Anschluss für zehn Minuten bei -20 °C gelagert. Danach werden die Proben mit der gleichen Umdrehung für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Wahlweise können die Proben im Anschluss nach Zugabe von 25µl destilliertem Wasser über Nacht bei -80 °C aufbewahrt werden, damit der Versuch am nächsten Tag fortgesetzt werden kann.

Im nächsten Arbeitsschritt gibt man 120 µl Amyloglucosidase (2 mg/ml in 0,2 M Natriumacetat mit einem pH von 4,9) zu jeder Probe und vortext diese bis zur völligen Auflösung der Pellets. Bei diesem Schritt wird das Glykogen an den 1,4- und 1,6 glykosidischen Bindungen hydrolytisch gespalten, sodass die Glucosemoleküle frei werden.

Nach Zugabe des Enzyms inkubiert man die Proben für 60 Minuten bei 37 °C, im Anschluss werden sie bei 16000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Für die Konzentrationsbestimmung werden die Proben im Weiteren zu je 5 µl in eine 96-well-Platte pipettiert, dazu jeweils 200 µl Glucoseoxidase hinzugegeben. Durch den Prozess der enzymatischen Oxidation kommt es zum Farbumschlag von rosa zu violett. Damit das Enzym unter optimalen Bedingungen wirken kann, wird diese Platte bei 37 °C für weitere zehn Minuten inkubiert. Im Anschluss wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm, bei einer Referenzwellenlänge von 600 nm, gemessen.

Über die von dem Photometer bestimmten Konzentrationen des verwendeten Gewebes sowie die Werte der Standardkurve lässt sich die Menge an Glykogen pro Milligramm Gewebe bestimmen. Des Weiteren kann dadurch der Glykogengehalt des ganzen Organs errechnet werden.

2.2.11 Statistik

Die gesamten Daten der vorliegenden Studie sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse (ANOVA-Test) über die Software Daniel's XL Toolbox. Bei den erstellten Schaubildern wurde der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung mittels Fehlerbalken dargestellt. Die Nullhypothese wurde bei Überschreiten eines Wahrscheinlichkeitsniveaus von 95% verworfen ($p < 0.05$).

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die zugrunde liegenden Veränderungen im Glucosestoffwechsel zu eruieren, die den erhöhten systemischen Glucoseumsatz und den erniedrigten Nüchtern-Blutzucker in der Herzinsuffizienz im Mausmodell der Aortenligatur (TAC) erklären könnten. Der Glykogengehalt verschiedener Gewebe, die Proteinexpression sowie die Insulintransduktionswege wurden post mortem quantifiziert sowie enzymatischen Messungen und Western Blot Analysen zugeführt.

3.1 Entleerungen der Glykogen-Speicher bei Herzinsuffizienz (Leber und Muskel)

Wie bereits beschrieben, wird Glykogen als Speichermolekül von Glucose in Phasen der Nahrungskarenz und bei erhöhtem Energiebedarf des Organismus gespalten und als Glucose in das Blut freigesetzt. Da die Leber als Hauptspeicherort von Glykogen gilt, wurde ihr Gehalt bei den unterschiedlichen Tieren ermittelt. Zudem wurde untersucht, wie sich der Muskelglykogengehalt des M. gastrocnemius im zeitlichen Verlauf nach der TAC-Operation verändert.

Glykogengehalt der Leber nach einem Monat:

Die enzymatischen Bestimmungen ergaben hinsichtlich der Glykogenkonzentrationen, dass die TAC-Mäuse eine Abnahme der Glykogenspeicher gegenüber den Sham-Tieren zeigten (s. Abb. 10: Sham $7,2 \pm 1$ mg/g vs. TAC 2 ± 1 mg/g, $n = 9$ vs. 7 , $p < 0.05$ *).

Glykogengehalt der Leber [mg/g]

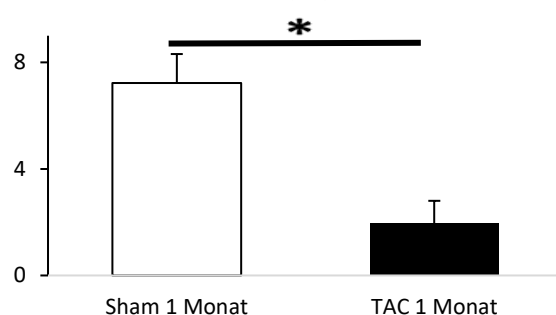


Abbildung 10: Glykogengehalt der Leber nach einem Monat

Glykogengehalt der Leber nach sechs Monaten:

Nach diesem Zeitraum sah man ebenfalls eine Minderung des Glykogengehalts bei der TAC-Gruppe (Sham $7,4 \pm 1$ mg/g vs. TAC $4,6 \pm 1$ mg/g, $n = 6$ vs. 5 , $p = 0.16$), was durch Gabe von Sucroselösung ad libitum (TAC-Sucrose 16 ± 5 ,

Glykogengehalt der Leber [mg/g]

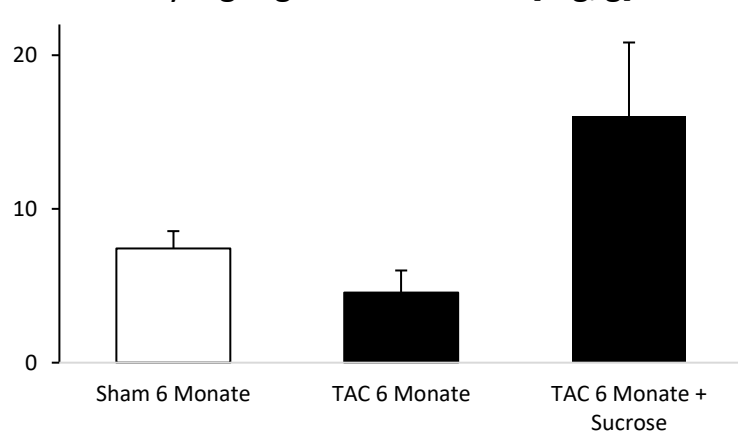


Abbildung 11: Glykogengehalt der Leber nach sechs Monaten

n = 8, TAC vs. TAC + Sucrose: p = 0.095) verhindert werden konnte (s. Abb.11).

Glykogengehalt des *M. gastrocnemius* nach einem Monat:

Bei der Bestimmung der Glykogenkonzentration des *M. gastrocnemius* nach einem Monat kam es zu keiner Änderung zwischen den Gruppen (Sham 37 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. TAC 41 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$, n = 9 vs. 8, p = 0.51, s. Abb. 12).

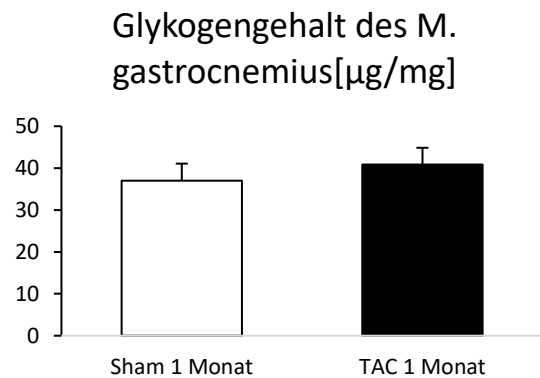


Abbildung 12: Glykogengehalt des *M. gastrocnemius* nach einem Monat

Glykogengehalt des *M. gastrocnemius* nach sechs Monaten:

Nach sechs Monaten fanden sich tendenziell reduzierte Glykogenspeicher bei den TAC-Mäusen (Sham 56 ± 19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. TAC 25 ± 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, n = 6 vs. 5, p = 0.13). Diese ließen sich durch die zusätzliche Gabe von Sucrose (TAC + Sucrose 57 ± 11 $\mu\text{g}/\text{mg}$, n = 8, TAC vs. TAC + Sucrose: p < 0.05 \diamond) nach sechs Monaten dem Glykogengehalt der Sham-Tiere angleichen (s. Abb. 13).

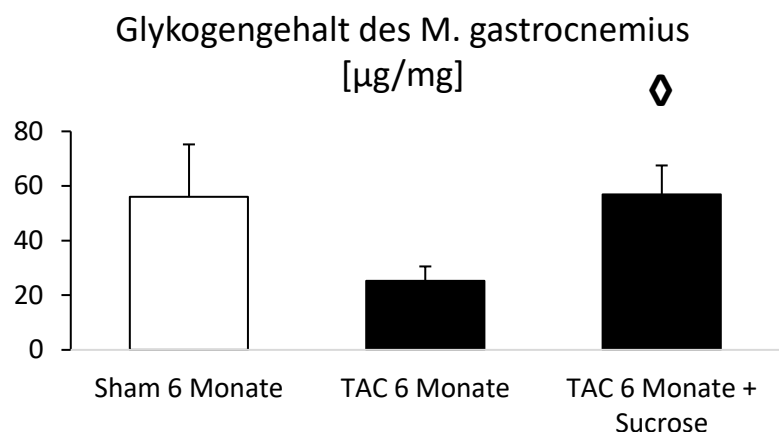


Abbildung 13: Glykogengehalt des *M. gastrocnemius* nach sechs Monaten

3.2 Marker der myokardialen Glucoseaufnahme bei Herzinsuffizienz

Zur Quantifizierung der Proteine, die bei der myokardialen Glucoseaufnahme und -verwertung bzw. der Entstehung einer Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle spielen, wurden Western Blot Analysen von GLUT1 und 4, Hexokinase II und Akt durchgeführt, auf die im Weiteren eingegangen werden soll.

Die Western Blot Analysen der Expression der GLUT1/p85 im Myokard, über die die basale Glucoseaufnahme sichergestellt wird, zeigen bereits nach einem Monat einen Trend zur erhöhten Konzentration der GLUT1 Transporter bei den TAC-Tieren (s. Abb. 14: Sham: 100 ± 21 A. U. vs.

TAC 147 ± 25 A. U., $p = 0.18$, $n = 9$ vs. 6). Dieser Trend bestätigt sich nach sechs Monaten (s. Abb. 15) als signifikante Zunahme der Glucosetransporter bei den TAC-operierten Tieren (Sham 100 ± 16 A. U. vs. TAC 233 ± 50 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 5$ vs. 5). Diese signifikante Zunahme zeigte sich ebenfalls bei zusätzlicher Sucrosefütterung (s. Abb. 16) bei der Versuchsgruppe nach sechs Monaten bei den TAC-Tieren (Sham-Sucrose 100 ± 23 A. U. vs. TAC-Sucrose 203 ± 21 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 6$ vs. 6).

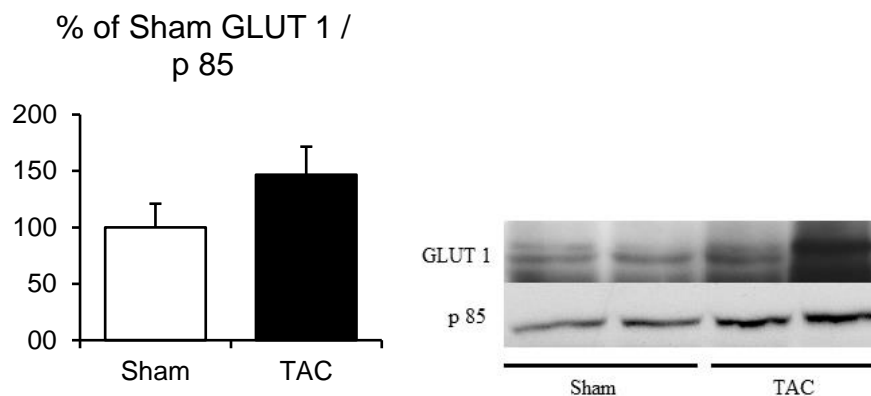


Abbildung 14: GLUT1 Expression am Herzen nach einem Monat. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT1 mit Proteinlysaten aus dem Myokard einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT1 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

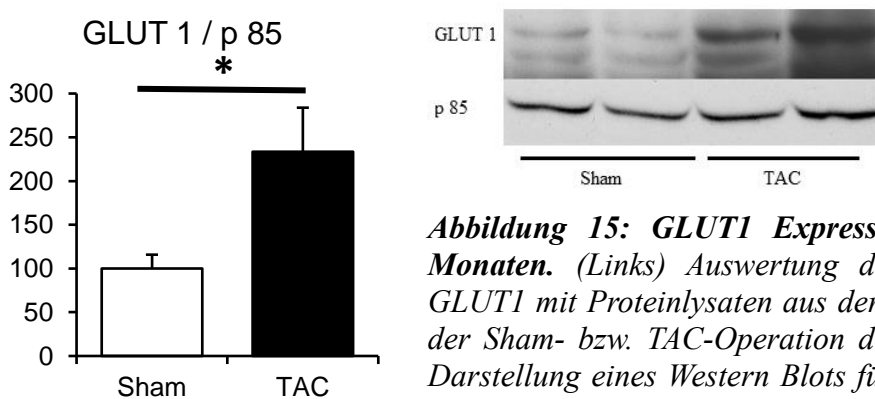


Abbildung 15: GLUT1 Expression am Herzen nach sechs Monaten. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT1 mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT1 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

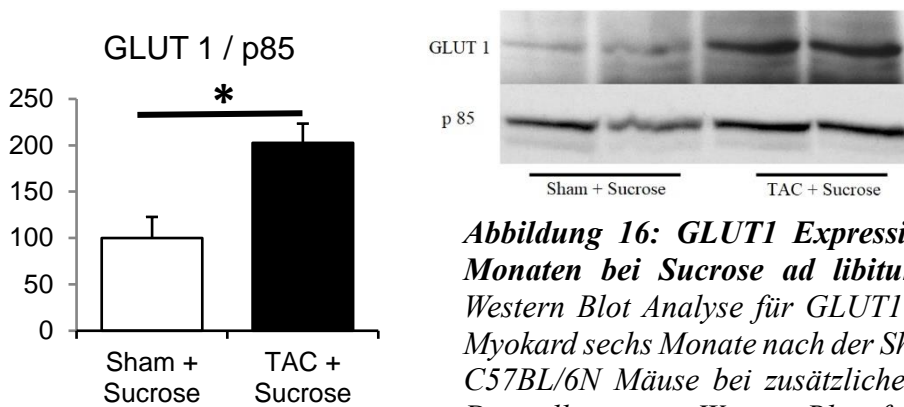


Abbildung 16: GLUT1 Expression am Herzen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT1 mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT1 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

Zur Identifizierung der Auswirkungen einer HI auf die insulin sensitiven GLUT4-Transporter, wurden diese über Western Blot Analysen am Myokard untersucht.

Die Quantifizierung der Expression der insulinabhängigen GLUT4/p85 erbrachte bereits nach einem Monat (s. Abb. 17) eine signifikante Verminderung im TAC Myokard (Sham 100 ± 12 A. U. vs. TAC 63 ± 9 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 9$ vs. 6

). Der Befund dieses Expressionsmusters kann nach einem Zeitraum von sechs Monaten (s. Abb. 18) ebenfalls als signifikante Minderung des GLUT4 Gehalts bei TAC nachgewiesen werden (Sham 100 ± 12 A. U. vs. TAC 46 ± 8 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 6$ vs. 5), auch bei zusätzlicher Sucrosefütterung (s. Abb. 19) ist der GLUT4 Gehalt nach sechs Monaten vermindert (Sham-Sucrose 100 ± 16 A. U. vs. TAC-Sucrose 45 ± 10 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 6$ vs. 5).

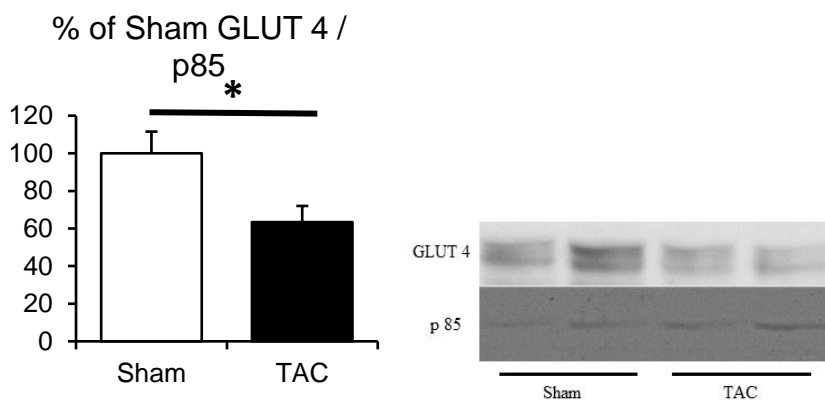


Abbildung 17: GLUT4 Expression am Herzen nach einem Monat. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT4 mit Proteinlysaten aus dem Myokard einen Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT4 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

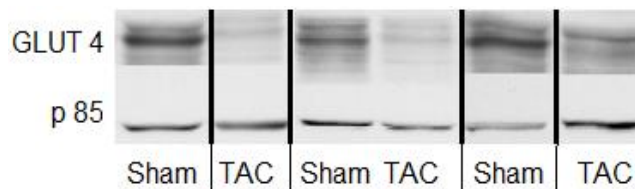
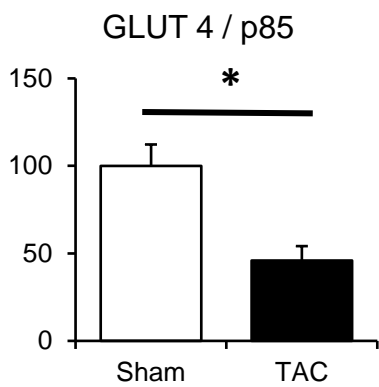


Abbildung 18: GLUT4 Expression am Herzen nach sechs Monaten. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT4 mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT4 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

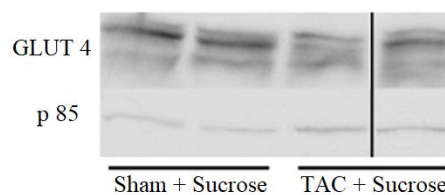
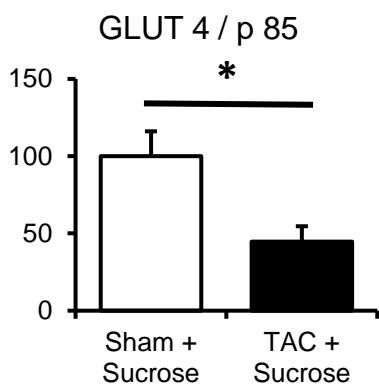


Abbildung 19: GLUT4 Expression am Herzen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für GLUT4 mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für GLUT4 und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

Die Hexokinase, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse ist und außerdem den ersten Schritt der Glykogensynthese katalytisch einleitet, dient zur Phosphorylierung der aufgenommenen Glucose in Glucose-6-Phosphat. Dieses kann die Zellen nicht mehr durch Rückdiffusion verlassen. Im Myokard ist das Isoenzym Hexokinase II aktiv, das zum Teil mitochondrial gebunden ist. Generell ist HK II die prädominante Form an insulinsensitivem Gewebe, dessen Aktivität von der hormonellen Kontrolle durch Insulin abhängig ist. Zur Identifikation des Glucosekatabolismus wurde diese Kinase über Western-Blot Analysen gemessen.

Einen Monat nach TAC zeigte sich kaum ein Unterschied der Expression der Hexokinase II/p85 zwischen den Versuchsgruppen (s. Abb. 20: Sham 100 ± 21 A. U. vs. TAC 69 ± 8 A. U., $p = 0.23$, $n = 9$ vs. 7). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Betrachtung des Expressionsmusters nach sechs Monaten (s. Abb. 21: Sham 100 ± 23 A. U. vs. TAC 75 ± 12 A. U., $p = 0.41$, $n = 6$ vs. 5). Bei zusätzlicher Sucrosefütterung kommt es bei den TAC-operierten Mäusen nach sechs Monaten zu einer signifikanten Abnahme der Hexokinase II (s. Abb. 22: Sham 100 ± 14 A. U. vs. TAC 64 ± 7 A. U., $p < 0.05$ *, $n = 6$ vs. 6).

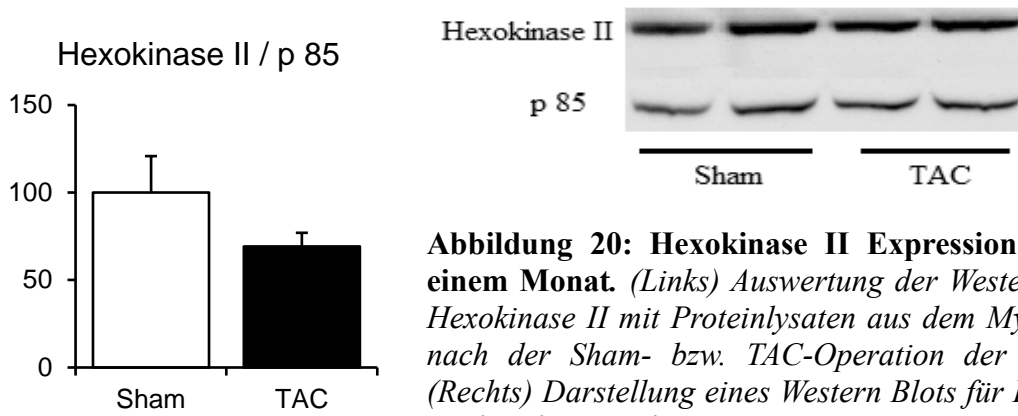


Abbildung 20: Hexokinase II Expression am Herzen nach einem Monat. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem Myokard einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

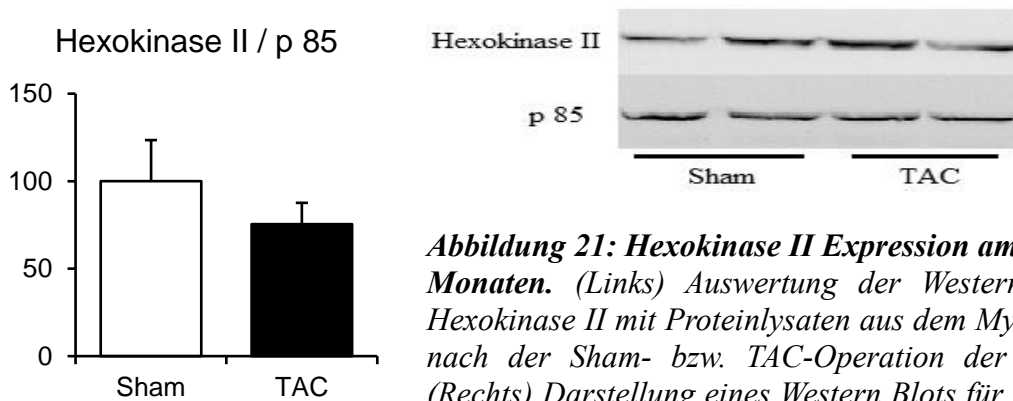


Abbildung 21: Hexokinase II Expression am Herzen nach sechs Monaten. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

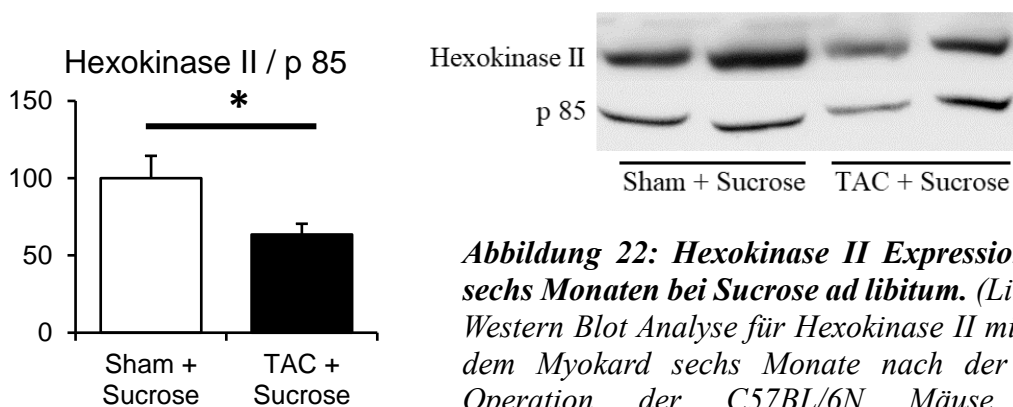


Abbildung 22: Hexokinase II Expression am Herzen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem Myokard sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85 der Sham- und TAC-Tiere.

Die Protein Kinase Akt, die durch andere Kinasen über eine Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 aktiviert wird, nimmt an der Regulation des kardialen Wachstums teil. Durch eine Aktivierung kommt es zu einem ungünstigen Zellwachstum und einer Proliferation, die in einer Hypertrophie enden kann. Zudem aktiviert sie die Glykogensynthese. Weiterhin wurde dieses Protein wegen ihrer spezifischen Wirkung in der Insulinsignaltransduktion untersucht.

Die Western-Blot Analysen zeigen einen Monat nach TAC (s. Abb. 23) eine geringe Tendenz Richtung Reduktion der Expression von Akt/p85 (Sham 100 ± 16 A. U. vs. 63 ± 11 A. U., $p = 0.10$, $n = 9$ vs. 7), allerdings auch der phosphorylierten Form der Akt (P-Akt(S473)/p85) Sham 100 ± 21 A. U. vs. TAC 55 ± 8 A. U., $p = 0.09$, $n = 9$ vs. 7). Im Verhältnis P- zu total Akt ergab sich daher kein Unterschied (Sham 100 ± 17 A. U. vs. TAC 103 ± 25 A. U., $p = 0.92$, $n = 9$ vs. 7).

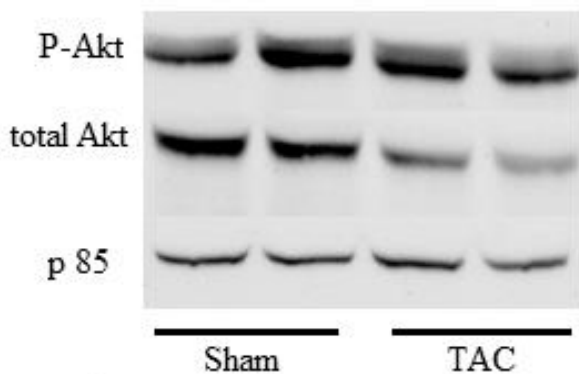
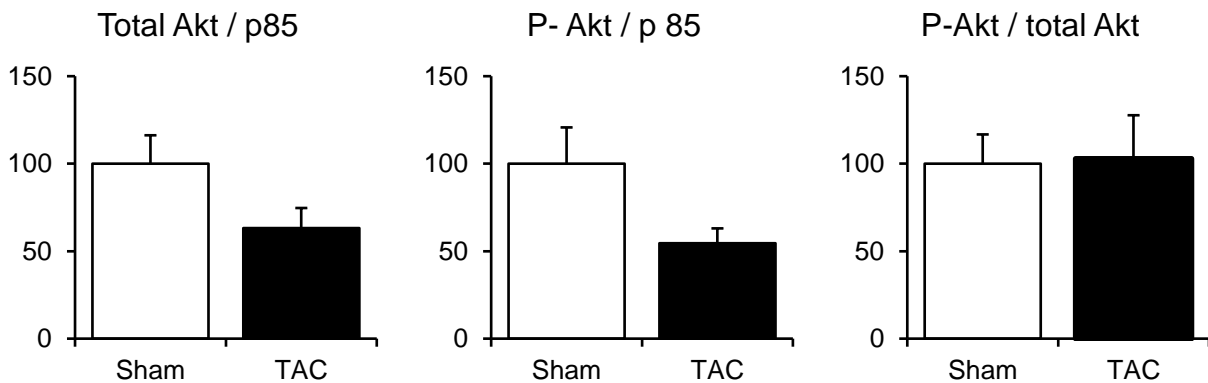


Abbildung 23: Total Akt Expression und Phosphorylierung der Akt sowie ihr Verhältnis am Herzen mit Western Blot Analysen nach einem Monat. Auswertung der Western Blot Analyse für Total Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem Myokard sowie dem Verhältnis P- zu total Akt einen Monat nach der

Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

Nach sechs Monaten zeigen die Analysen keinen Unterschied (s. Abb. 24), weder in der Akt-Expression (Sham 100 ± 30 A. U. vs. TAC 88 ± 26 A. U., $p = 0.77$, $n = 6$ vs. 5), noch bei der Phosphorylierung des Proteins (Sham 100 ± 20 A. U. vs. TAC 89 ± 14 A. U., $p = 0.68$, $n = 6$ vs. 5) oder im Verhältnis der beiden zueinander (Sham 100 ± 18 A. U. vs. TAC 121 ± 44 A. U., $p = 0.64$, $n = 6$ vs. 5).

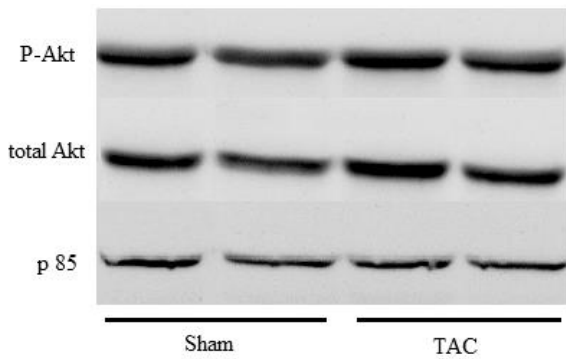
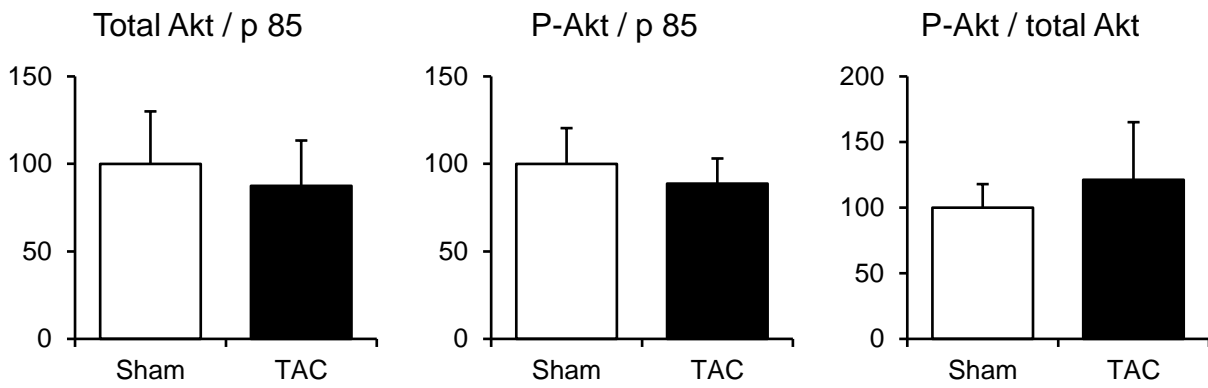
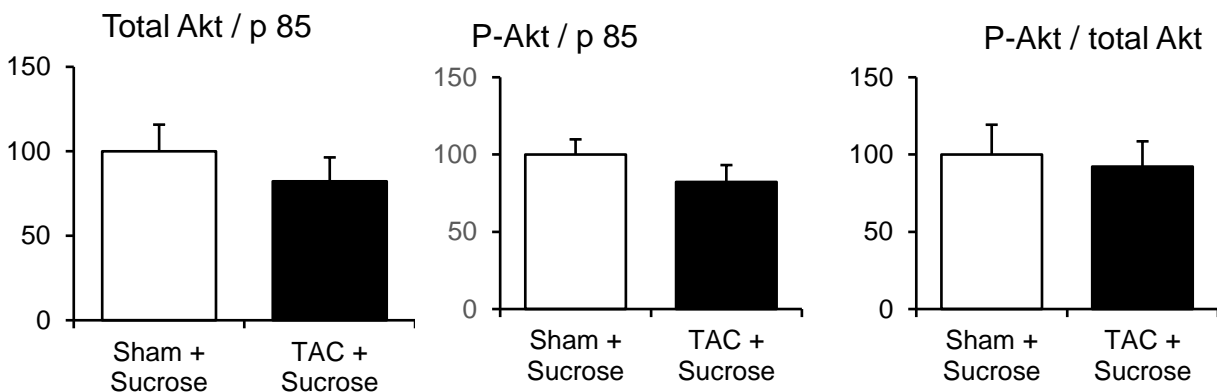


Abbildung 24: Total Akt Expression und Phosphorylierung (S473) der Akt sowie ihr Verhältnis am Herzen mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten. Auswertung der Western Blot Analyse für total Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem Myokard sowie dem Verhältnis P- zu total Akt sechs Monate nach der

Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

Die Gruppe, die eine zusätzliche Sucroselösung erhielt, zeigt in der Expression nach einem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten ebenfalls keine wesentliche Änderung der total Akt (s. Abb. 25: Sham 100 ± 16 A. U. vs, TAC 82 ± 14 A. U., $p = 0.42$, $n = 6$ vs. 6), des phosphorylierten Zustands (Sham 100 ± 10 A. U. vs, TAC 80 ± 11 A. U., $p = 0.20$, $n = 6$ vs. 6) oder des Verhältnisses der beiden (Sham 100 ± 19 A. U. vs, TAC 92 ± 16 A. U., $p = 0.77$, $n = 6$ vs. 6).



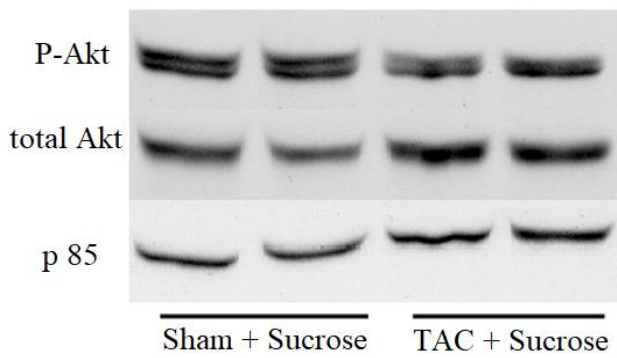


Abbildung 25: Total Akt Expression und Phosphorylierung am Herzen sowie ihr Verhältnis nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum mit Western Blot Analysen. Auswertung der Western Blot Analyse für total Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem Myokard sowie dem Verhältnis P- zu total Akt sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

3.3 Marker des myokardialen Energiehaushalts bei Herzinsuffizienz

Eine Schlüsselrolle in der Regulation des myokardialen Energiemetabolismus spielt die 5'AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK). Sie wird als protektive Antwort des Myokards bei energetischer Belastung, wie z. B. der HI, aktiviert. Über Western-Blot Analysen wurde der Gehalt der aktiven, phosphorylierten Form, sowie der Grundform des Enzyms quantifiziert.

Die Ergebnisse nach einem Monat (s. Abb. 26) zeigen keinen Unterschied beim Gesamtproteingehalt der AMPK nach TAC (Sham 100 ± 8 A. U. vs. TAC 97 ± 27 A. U., $p = 0.87$, $n = 9$ vs. 7), ebenso ist kein Unterschied der Phosphorylierung zwischen den Gruppen zu detektieren (Sham 100 ± 10 A. U. vs. TAC 86 ± 23 A. U., $p = 0.55$, $n = 9$ vs. 7). Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Betrachtung des Verhältnisses (Sham 100 ± 9 A. U. vs. TAC 89 ± 11 A. U., $p = 0.43$, $n = 9$ vs. 7).

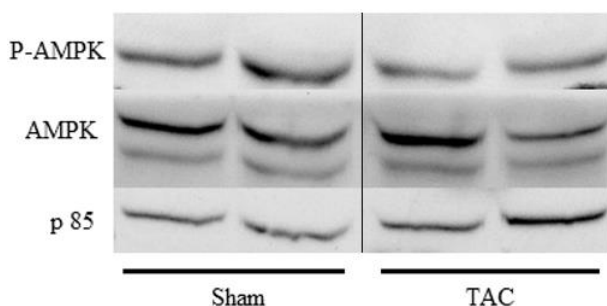
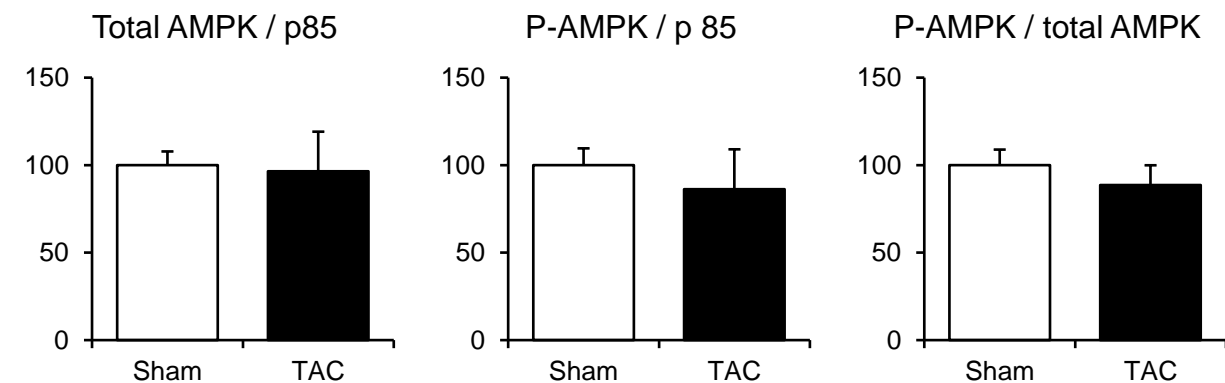


Abbildung 26: Total AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis am Herzen mit Western Blot Analysen nach einem Monat. Auswertung der Western Blot Analyse für total-AMPK und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem Myokard sowie ihr

Verhältnis einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

Nach sechs Monaten (s. Abb. 27) allerdings kommt es im Mittel zu keiner Änderung, einige der Versuchstiere zeigen eine erhöhte, andere eine niedrigere Expression (Total AMPK / p 85: Sham 100 ± 7 A. U. vs. TAC 102 ± 7 A. U., $p = 0.83$, $n = 6$ vs. 5; P-AMPK / p85: Sham 100 ± 8 A. U. vs. TAC 101 ± 11 A. U., $p = 0.96$, $n = 6$ vs. 5; P- / total AMPK: Sham 100 ± 7 A. U. vs. TAC 96 ± 6 A. U., $p = 0.70$, $n = 6$ vs. 5).

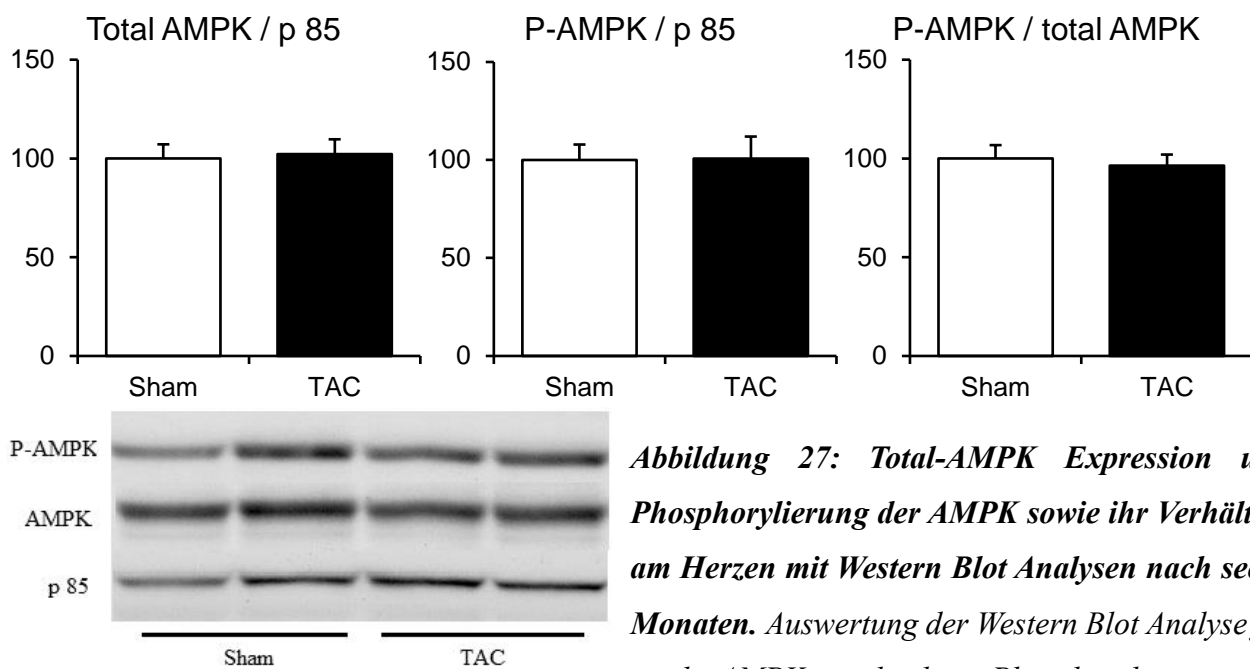


Abbildung 27: Total-AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis am Herzen mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten. Auswertung der Western Blot Analyse für total AMPK und ihre Phosphorylierung mit

Proteinlysaten aus dem Myokard sowie dem Verhältnis von P- zu total AMPK sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

Bei den Tieren, die sechs Monate zusätzlich Sucrose erhielten, bildet sich das Ergebnis wie folgt ab (s. Abb. 28): Es zeigte sich eine signifikante Minderung der Expression von Akt/p85 nach TAC (Sham 100 ± 6 A. U. vs, TAC 67 ± 10 A. U., $p < 0.05^*$, $n = 6$ vs. 6), ein Unterschied der Phosphorylierung war nicht feststellbar (Sham 100 ± 10 A. U. vs, TAC 107 ± 8 A. U., $p = 0.63$, $n = 6$ vs. 6), woraus sich im Verhältnis eine Erhöhung des relativen Phosphorylierungsgrades bei den TAC-

Tieren ergab (Sham-Sucrose 100 ± 15 A. U. vs. TAC-Sucrose 172 ± 29 A. U., $p = 0.05$, $n = 6$ vs. 6).

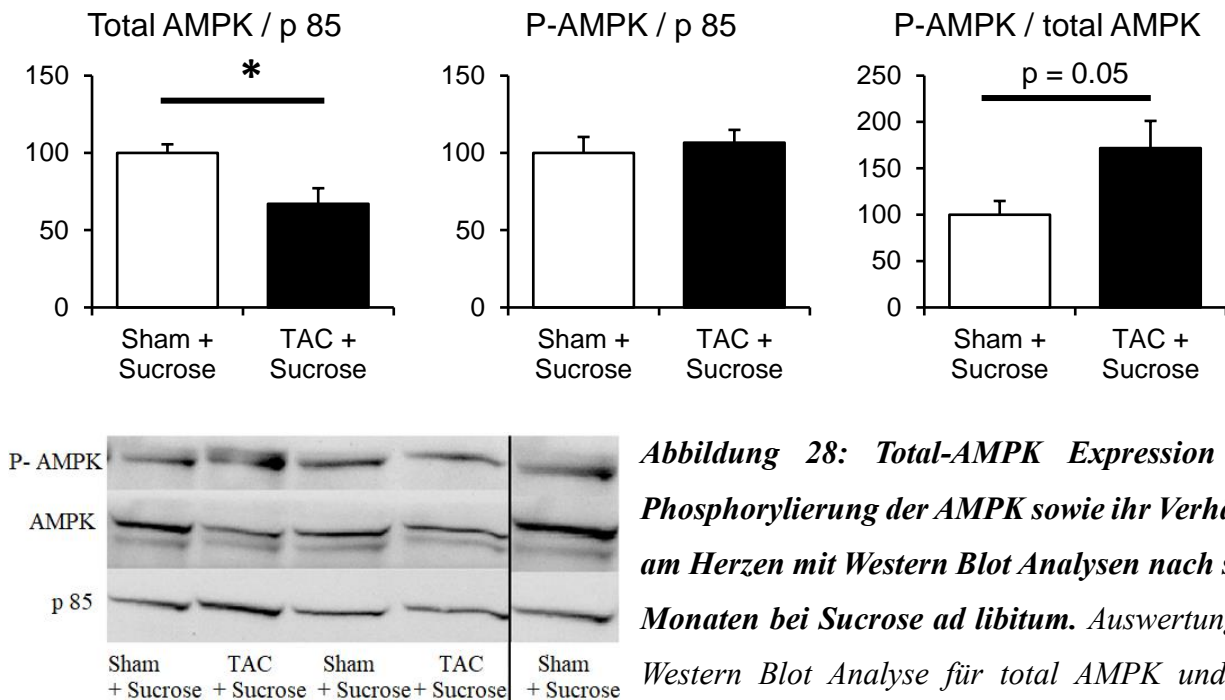


Abbildung 28: Total-AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis am Herzen mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. Auswertung der Western Blot Analyse für total AMPK und ihre

Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem Myokard sowie dem Verhältnis von P- zu total AMPK sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

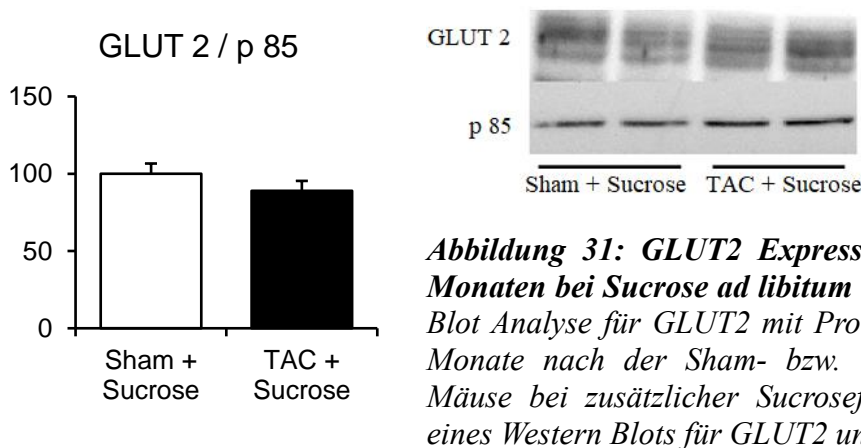
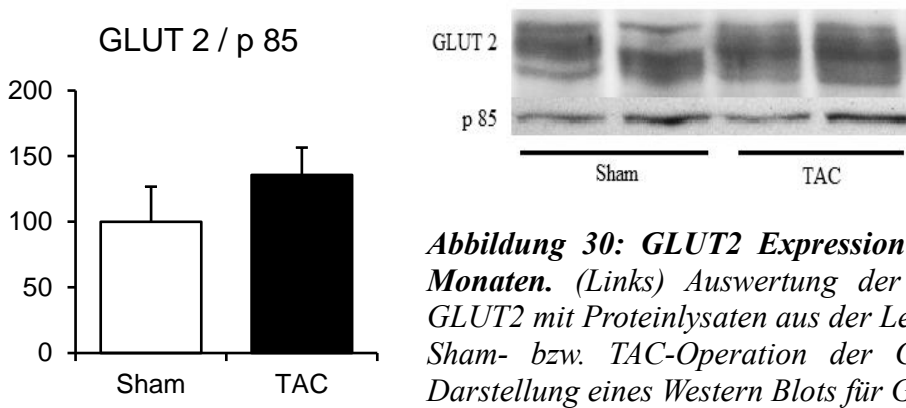
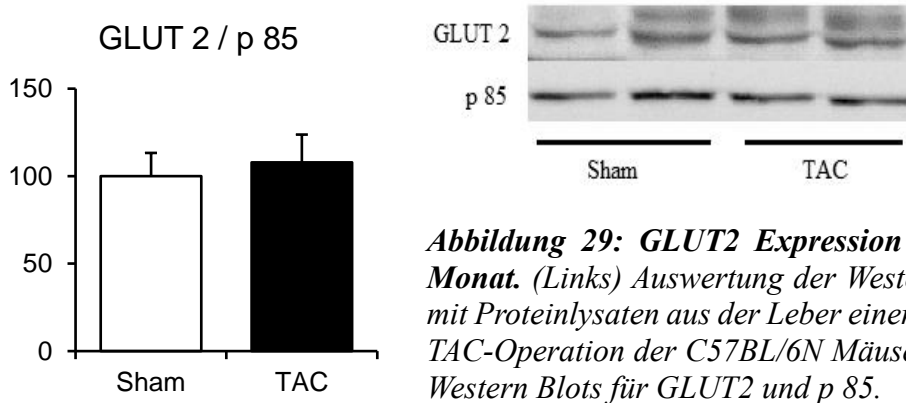
3.4 Marker der peripheren Glucoseaufnahme in der Leber und im Muskel

Im Folgenden wurde die Glucoseaufnahme in die Leber und Skelettmuskulatur untersucht. Die Skelettmuskulatur dient nach der Leber als wichtigster Speicherort für Glykogen. Die Funktion des in der Leber gespeicherten Glykogens besteht vornehmlich in der Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels, die Glykogenspeicher der Muskulatur werden insbesondere für die Bereitstellung von Energie in Form des ATPs verwendet, das für die Muskelkontraktion eingesetzt wird.

Um aufzudecken, wie, bzw. ob sich die periphere Glucoseaufnahme durch eine HI ändert, wurde die Expression des GLUT2-Transporters an der Leber untersucht. Dieser dient zur Glucoseaufnahme, die nach Phosphorylierung durch die Hexokinase IV (HK IV) in der Leber bzw. der Hexokinase II im M. gastrocnemius u. a. der Glykogensynthese zugeführt wird.

Die Expression von GLUT2/p85 in der Leber war weder nach einem Monat (s. Abb. 29: Sham 100 ± 13 A. U. vs. TAC 108 ± 16 A. U., $p = 0.71$, $n = 9$ vs. 8) noch nach sechs Monaten (s. Abb. 30: Sham 100 ± 27 A. U. vs. TAC 136 ± 21 A. U., $p = 0.36$, $n = 6$ vs. 4) oder zusätzlicher Sucrosefütterung (s.

Abb. 31: Sham-Sucrose 100 ± 7 A. U. vs. TAC-Sucrose 89 ± 6 A. U., $p = 0.68$, $n = 5$ vs. 6) signifikant verändert.



In der Leber ist das Isoenzym Hexokinase IV aktiv, in der Muskulatur und dem Myokard die Hexokinase II. Zur Identifikation des Glucosekatabolismus wurde diese Kinase über Western-Blot Analysen gemessen.

Bei Bestimmung der Hexokinase IV/p85 an der Leber ließ sich nach einem Monat (s. Abb. 32) kein

Unterschied zwischen den Versuchsgruppen eruieren (Sham 100 ± 14 A. U. vs. TAC 87 ± 13 A. U., $p = 0.52$, $n = 9$ vs. 7). Nach sechs Monaten (s. Abb. 33) deutet sich eine leichte Reduktion des Enzyms bei den TAC-Mäusen an (Sham 100 ± 12 A. U. vs. TAC 67 ± 20 A. U., $p = 0.17$, $n = 5$ vs. 6). Bei zusätzlicher Sucrosefütterung (s. Abb. 34) ergibt sich nach sechs Monaten keine Differenz im Ergebnis (Sham 100 ± 20 A. U. vs. TAC 106 ± 21 A. U., $p = 0.85$, $n = 6$ vs. 6).

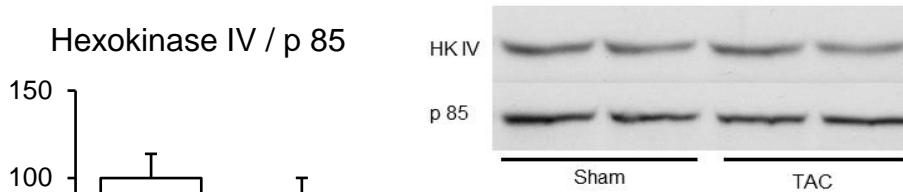


Abbildung 32: Hexokinase IV Expression der Leber nach einem Monat. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase IV mit Proteinlysaten aus der Leber einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase IV und p 85.

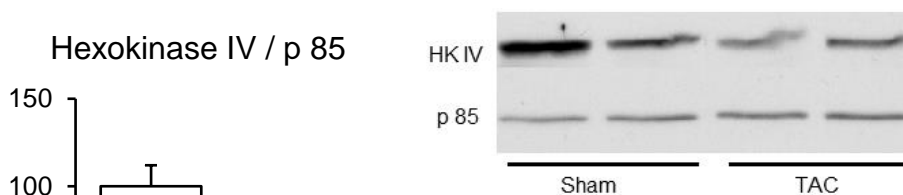


Abbildung 33: Hexokinase IV Expression der Leber nach sechs Monaten. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase IV mit Proteinlysaten aus der Leber sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase IV und p 85.

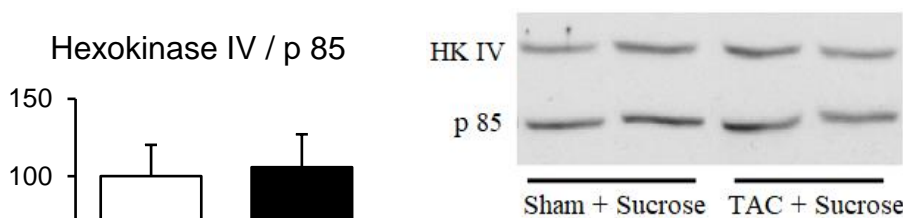


Abbildung 34: Hexokinase IV Expression der Leber nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase IV mit Proteinlysaten aus der Leber sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase IV und p 85.

Da die Hexokinase auch als Marker der Glucoseaufnahme im Muskel herangezogen wird, wurde der Gehalt dieses Enzyms durch Western Blot Analysen untersucht.

Bereits einen Monat (s. Abb. 35) nach der TAC- bzw. Sham-Operation zeigt sich ein Trend zur erhöhten Expression der HK II/p85 im M. gastrocnemius der TAC-Tiere (Sham 100 ± 19 A.U. vs. TAC 134 ± 28 A.U., $p = 0.33$, $n = 9$ vs. 8), die sich im zeitlichen Verlauf von sechs Monaten (s. Abb. 36) zu einer signifikanten Steigerung der Expression entwickelt (Sham 100 ± 19 A.U. vs. TAC 181 ± 35 A.U., $p < 0.05^*$, $n = 10$ vs. 7).

Im Vergleich dazu kommt es nach sechs Monaten mit Sucrose ad libitum (s. Abb. 37) zu einem annähernd gleichen Konzentrationsgehalt beider Versuchsgruppen (Sham 100 ± 24 A.U. vs. TAC 90 ± 28 A.U., $p = 0.79$, $n = 6$ vs. 6).

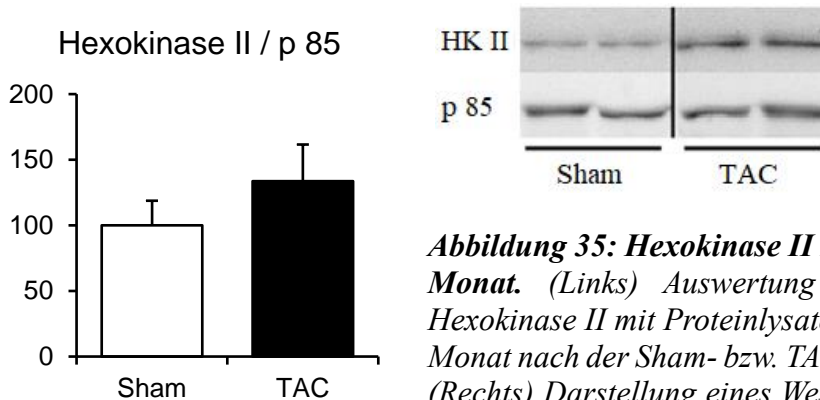


Abbildung 35: Hexokinase II Expression im Muskel nach einem Monat. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem M. gastrocnemius einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85.

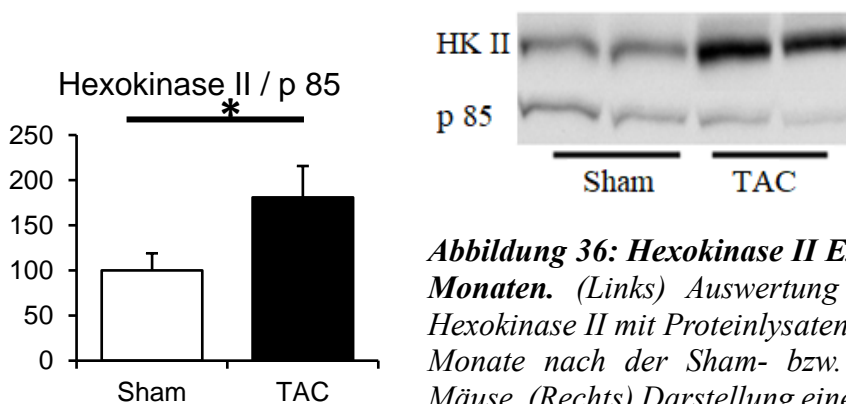


Abbildung 36: Hexokinase II Expression im Muskel nach sechs Monaten. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem M. gastrocnemius sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85.

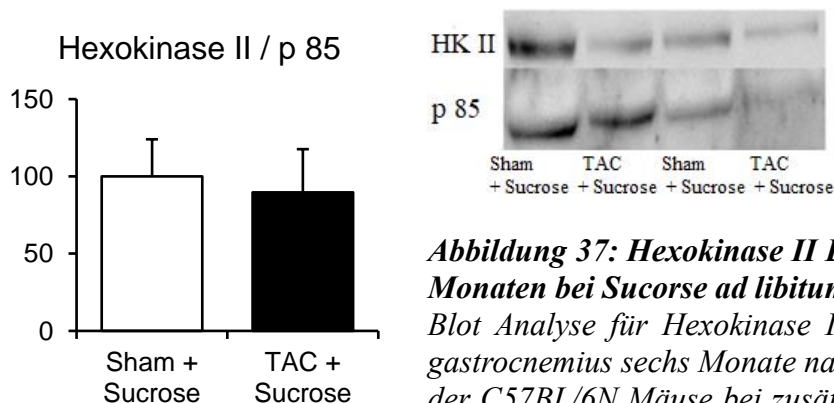


Abbildung 37: Hexokinase II Expression im Muskel nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. (Links) Auswertung der Western Blot Analyse für Hexokinase II mit Proteinlysaten aus dem M. gastrocnemius sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung. (Rechts) Darstellung eines Western Blots für Hexokinase II und p 85.

Wie bereits erwähnt gilt die Protein Kinase Akt als bedeutende Regelgröße im zellulären Metabolismus und der Homöostase. Sie trägt einen großen Teil zur Integration der zellulären anabolischen, katabolischen Signalwege und mechanischen Antworten bei. Eine Aktivierung führt unter anderem zu einem Wachstumsstimulus, zusätzlich ist sie an der Aktivierung der Glykogensynthese beteiligt. Zur Identifizierung möglicher Veränderungen dieses Enzyms wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Nach einem Monat (s. Abb. 38) zeigt sich im untersuchten Muskel bezüglich der Gesamtexpression Akt/p85 keine Änderung (Sham 100 ± 21 A.U. vs. TAC 114 ± 22 A.U., $p = 0.65$, $n = 8$ vs. 7), wohingegen sich eine geringere Phosphorylierung der Akt nach TAC ergab (Sham 100 ± 25 A.U. vs. TAC 42 ± 14 A.U., $p = 0.06$, $n = 8$ vs. 7). Im Verhältnis zeigt sich die Phosphorylierung als nicht signifikant (Sham 100 ± 39 A.U. vs. TAC 36 ± 14 A.U., $p = 0.13$, $n = 8$ vs. 7).

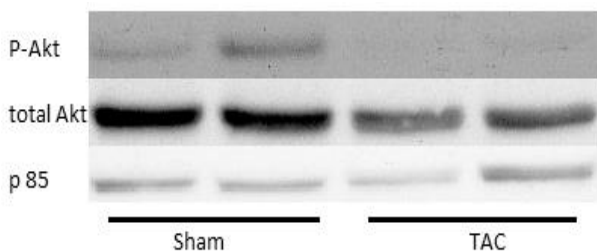
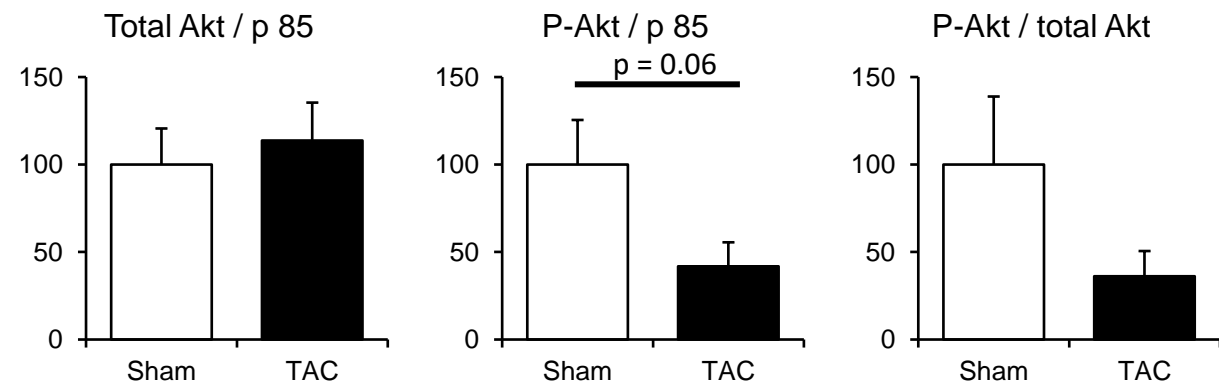


Abbildung 38: Total Akt Expression und Phosphorylierung im Muskel mit Western Blot Analysen nach einem Monat. Auswertung der Western Blot Analyse für total Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem *M. gastrocnemius* sowie dem Verhältnis P- zu total Akt einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse.

Nach einem Monat (s. Abb. 39) zeigt sich im untersuchten Muskel bezüglich der Gesamtexpression Akt/p85 keine Änderung (Sham 100 ± 21 A.U. vs. TAC 114 ± 22 A.U., $p = 0.65$, $n = 8$ vs. 7), wohingegen sich eine geringere Phosphorylierung der Akt nach TAC ergab (Sham 100 ± 25 A.U. vs. TAC 42 ± 14 A.U., $p = 0.06$, $n = 8$ vs. 7). Im Verhältnis zeigt sich die Phosphorylierung als nicht signifikant (Sham 100 ± 39 A.U. vs. TAC 36 ± 14 A.U., $p = 0.13$, $n = 8$ vs. 7).

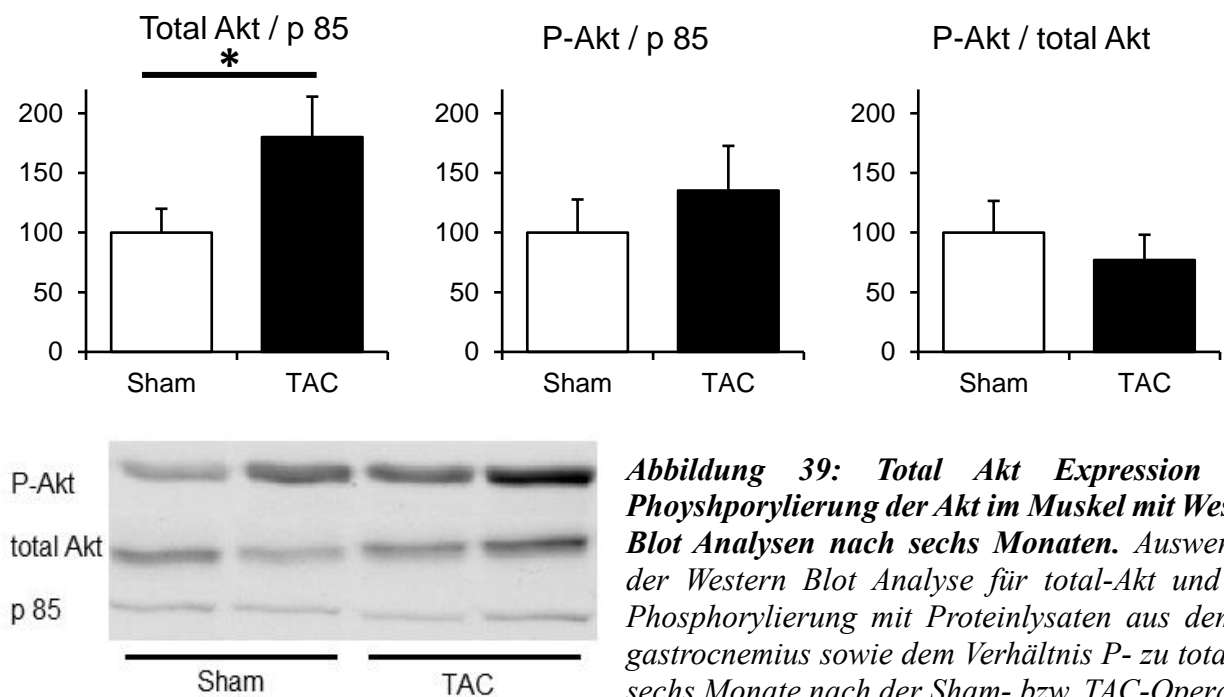


Abbildung 39: Total Akt Expression und Phosphorylierung der Akt im Muskel mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten. Auswertung der Western Blot Analyse für total-Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem *M. gastrocnemius* sowie dem Verhältnis P- zu total Akt sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation

der C57BL/6N Mäuse.

Bei zusätzlicher Sucrosefütterung (s. Abb. 40) zeigt sich nach sechs Monaten bei der total-Akt/p85 kein Expressionsunterschied (Sham 100 ± 11 A.U. vs. TAC 71 ± 27 A.U., $p = 0.35$, $n = 4$ vs. 4), ähnlich stellen sich die Ergebnisse der phosphorylierten Akt dar (Sham 100 ± 28 A.U. vs. TAC 89 ± 36 A.U., $p = 0.81$, $n = 4$ vs. 4). Im Verhältnis von P- zu total Akt ist kein bedeutender Trend zu erkennen (Sham 100 ± 43 A.U. vs. TAC 511 ± 461 A.U., $p = 0.41$, $n = 4$ vs. 4).

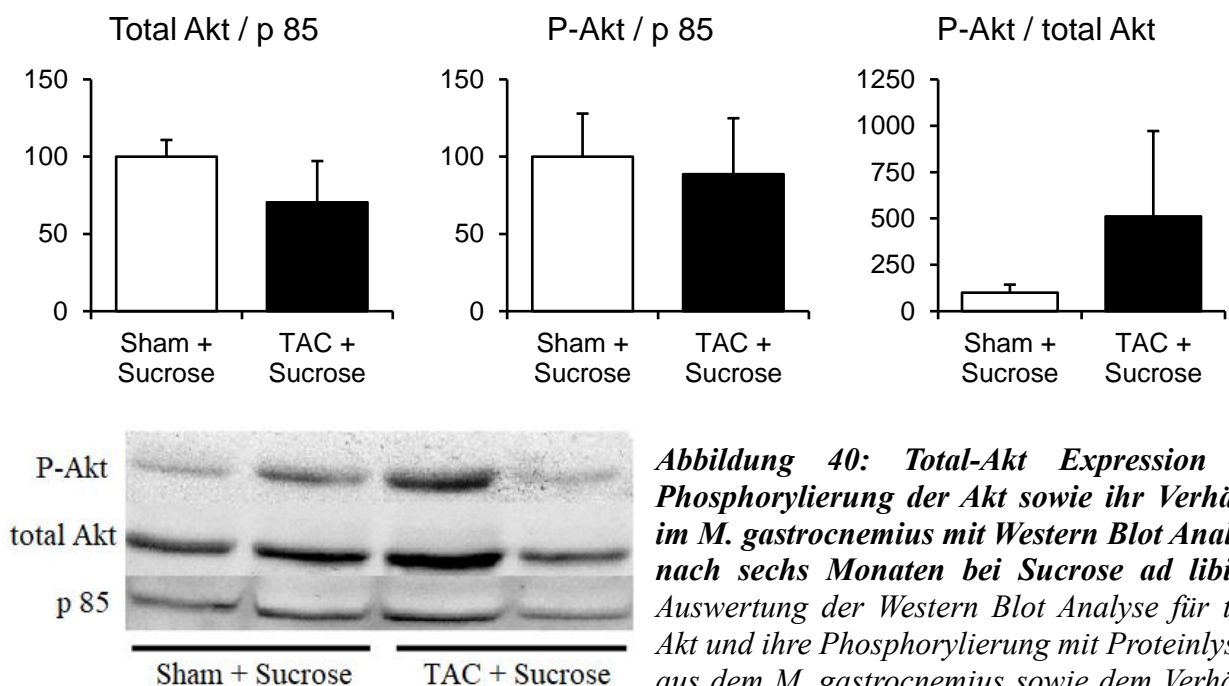


Abbildung 40: Total-Akt Expression und Phosphorylierung der Akt sowie ihr Verhältnis im *M. gastrocnemius* mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. Auswertung der Western Blot Analyse für total-Akt und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem *M. gastrocnemius* sowie dem Verhältnis

P- zu total Akt sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

3.5 Marker des hepatischen und muskulären Energiehaushaltes bei Herzinsuffizienz

Die AMP- Kinase besitzt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Energiehomöostase, außerdem führt sie zu einer Reduktion der ROS-Produktion im Zytosol. Da sie diese wichtigen Schritte mit beeinflusst, wurde ihr Gehalt durch Western-Blot Analysen zusätzlich zum Herzen auch im M. gastrocnemius quantifiziert. Das Enzym wird durch metabolische Belastungen, die zu einem geringeren ATP-Gehalt führen, sowie durch eine weitere Anzahl verschiedenster physiologischer Prozesse, die dazu dienen, die Energiebalance wiederherzustellen, aktiviert.

Über Western Blot Analyse konnten nach einem Monat (s. Abb. 41) keinen Unterschied der Expression der AMPK/p85 gezeigt werden (Sham 100 ± 20 A.U. vs. TAC 88 ± 19 A.U., $p = 0.68$, $n = 9$ vs. 7), ebenso ergab sich keine Differenz in der Phosphorylierung zwischen den Versuchsgruppen (Sham 100 ± 19 A.U. vs. TAC 81 ± 17 A.U., $p = 0.49$, $n = 9$ vs. 7) sowie sich auch im Verhältnis keine Änderung ergab (Sham 100 ± 8 A.U. vs. TAC 89 ± 9 A.U., $p = 0.37$, $n = 9$ vs. 7).

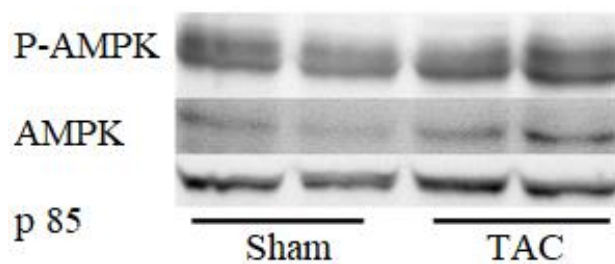
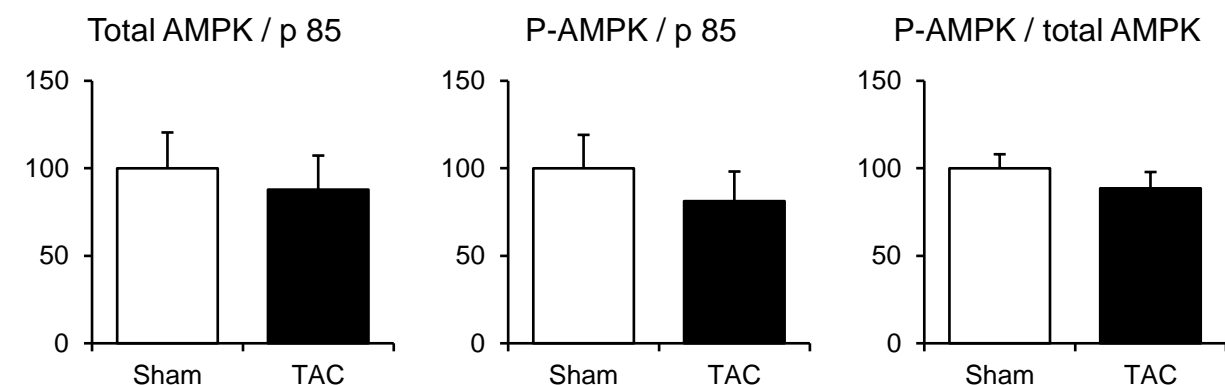


Abbildung 41: Total-AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis im Muskel mit Western Blot Analysen nach einem Monat. Auswertung der Western Blot Analyse für total-AMPK und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem M. gastrocnemius sowie dem Verhältnis P- zu total AMPK einen Monat nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse.

Im Verlauf von sechs Monaten (s. Abb. 42) erbrachten die Analysen der Gesamtexpression des Enzyms keinen Unterschied (Sham 100 ± 12 A.U. vs. TAC 97 ± 15 A.U., $p = 0.89$, $n = 10$ vs. 7), das gleiche Ergebnis ergab die Untersuchung der Phosphorylierung (Sham 100 ± 10 A.U. vs. TAC 130 ± 23 A.U., $p = 0.20$, $n = 10$ vs. 7). Im Verhältnis zeigte sich ebenfalls kein Unterschied (Sham 100 ± 7 A.U. vs. TAC 143 ± 37 A.U., $p = 0.20$, $n = 10$ vs. 7).

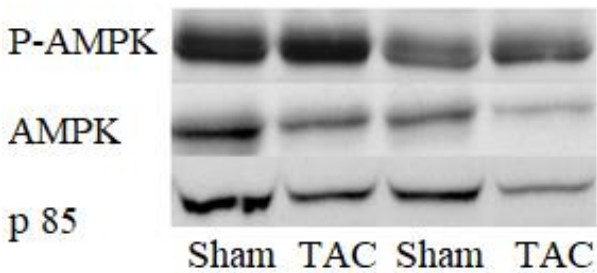
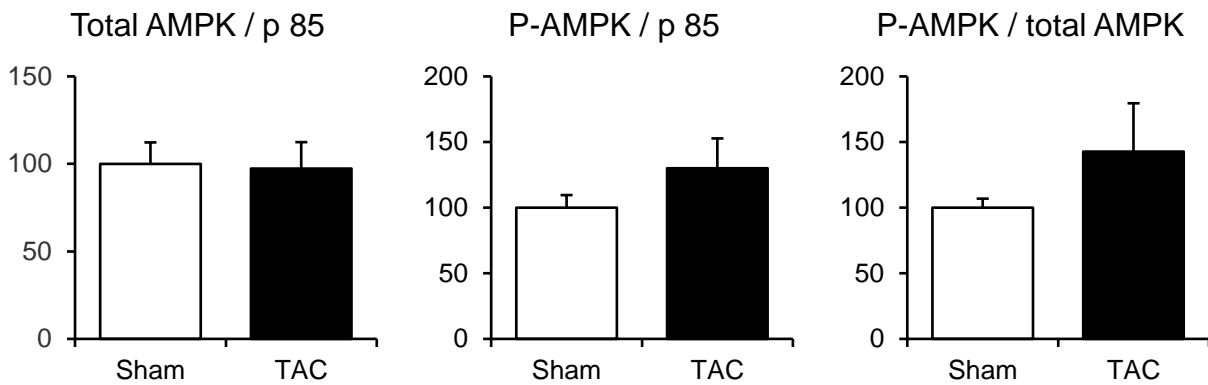


Abbildung 42: Total-AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis im Muskel mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten. Auswertung der Western Blot Analyse für total-AMPK und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem *M. gastrocnemius* sowie dem Verhältnis P- zu total AMPK sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N

Mäuse mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

Die Ergebnisse der Western Blots der Tiere, die über einen Zeitraum von sechs Monaten zusätzlich eine Sucroselösung erhielten (s. Abb. 43), zeigen bei Quantifizierung der total AMPK keine Änderung (Sham 100 ± 11 A.U. vs. TAC 88 ± 7 A.U., $p = 0.12$, $n = 6$ vs. 6), ebenso auch bezüglich der Phosphorylierung zwischen den Versuchsgruppen (Sham 100 ± 10 A.U. vs. TAC 129 ± 29 A.U., $p = 0.35$, $n = 6$ vs. 6). Insgesamt gibt es auch bei dem Verhältnis keine Unterschiede (Sham 100 ± 8 A.U. vs. TAC 142 ± 23 A.U., $p = 0.12$, $n = 6$ vs. 6).

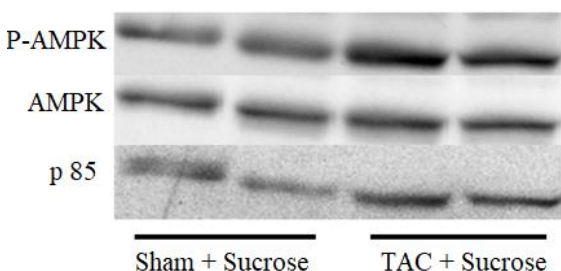
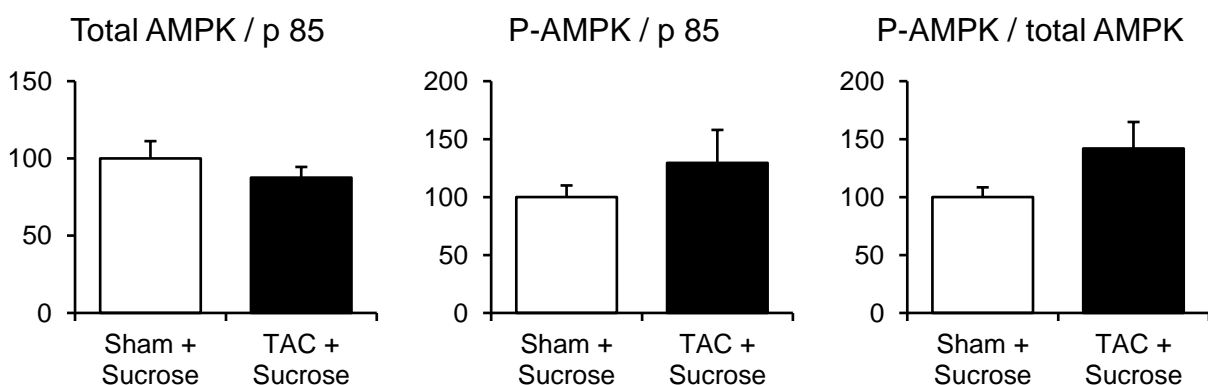


Abbildung 43: Total-AMPK Expression und Phosphorylierung der AMPK sowie ihr Verhältnis im Muskel mit Western Blot Analysen nach sechs Monaten bei Sucrose ad libitum. Auswertung der Western Blot Analyse für total-AMPK und ihre Phosphorylierung mit Proteinlysaten aus dem *M. gastrocnemius* sowie dem Verhältnis P- zu total AMPK

sechs Monate nach der Sham- bzw. TAC-Operation der C57BL/6N Mäuse bei zusätzlicher Sucrosefütterung mit den dazugehörigen Darstellungen der Western Blots.

3.6 Zusammenfassung der Befunde

Am Myokard zeigte sich die Expression des Glucosetransporters für die basale Glucoseaufnahme (GLUT1) in den TAC-operierten Tieren erhöht, während die Expression des insulinabhängigen Glucosetransporters GLUT4 erniedrigt war. Expression und Aktivierung von Schlüsselenzymen der Glucose-Nutzung Akt, AMPK und Hexokinase II im Myokard waren unverändert.

Die Glykogenspeicher in Leber und Muskel waren nach der TAC-Operation reduziert, wobei die Leerung der hepatischen Speicher bereits nach einem Monat, im Muskel erst nach sechs Monaten signifikant ausgeprägt war. Die Expression des hepatischen Glukostransporter GLUT2 und die des Schlüsselenzyms der Glykogensynthese Hexokinase IV war zu keinem Zeitpunkt zwischen den Behandlungsarmen verändert. Am Skelettmuskel fand sich einen Monat nach TAC eine transiente Reduktion der Akt-Phosphorylierung, die nach sechs Monaten nicht mehr zu verzeichnen war. Jedoch kam es sechs Monate nach TAC zu einer gesteigerten Expression sowohl der Akt als auch von Hexokinase II.

Sucrosefütterung über sechs Monate hatte keinen Einfluss auf die Expression der myokardialen Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4. GLUT1 war - ebenso wie bei Tieren ohne Sucrosefütterung - in TAC vs. Sham erhöht, GLUT4 erniedrigt. Die myokardiale Expression und Aktivierung von Akt waren unverändert. Die AMPK-Expression war nach TAC unter Sucrose-Substitution reduziert, jedoch bei gleichzeitig gesteigerter Phosphorylierung, so dass die relative Aktivierung unverändert blieb. Die Expression der Hexokinase II war im Myokard nach TAC unter Sucrosefütterung reduziert, nicht jedoch im Skelettmuskel. Die nach TAC erhöhte HK II-Expression im Skelettmuskel hatte sich somit normalisiert.

Mit Sucrosefütterung konnten sechs Monate nach TAC sowohl bei den hepatischen als auch den muskulären Glykogen-Speicher mit Sham-operierten Tieren vergleichbare oder höhere Werte verzeichnet werden.

4 Diskussion

4.1 Metabolische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz

Durch diese Arbeiten wurden die Signalwege an Leber, Myokard und Skelettmuskulatur untersucht, die den Veränderungen des Glucosestoffwechsels im zeitlichen Verlauf bei TAC-induzierter systolischer Herzinsuffizienz zu Grunde liegen können. Zudem wurde untersucht, welche Veränderungen des Glucosestoffwechsels im Modell der Sucrose-Substitution bei TAC-induzierter Herzinsuffizienz zum verbesserten Überleben der Tiere beigetragen haben können.

Da sich in den Blutzuckermessungen und Glukos-Toleranz-Tests gezeigt hatte, dass der systemische Glucoseverbrauch in der Herzinsuffizienz erhöht und der Nüchtern-Blutzucker trotz unveränderter Insulinspiegel vermindert war, wurden weitere wichtige Regulatoren des systemischen Blutzuckerspiegels untersucht.

Zunächst wurde die Glucoseaufnahme des Myokards untersucht, da hier die Manipulation erfolgt und direkte Auswirkungen zu erwarten waren. Wie bereits aus anderen Arbeiten zu TAC-induzierter Hypertrophie und Herzinsuffizienz bekannt,^{29,30,37,59} fand sich auch in unserem Modell die Expression des insulinabhängigen Glucosetransporters GLUT4 sowohl nach einem als auch nach sechs Monaten erniedrigt, was auf das Vorliegen einer myokardialen Insulinresistenz hinweist. Die sechsmonatige Sucrosefütterung änderte diese Beobachtung jedoch nicht, sodass davon auszugehen ist, dass die erreichte Prognoseverbesserung nicht auf eine verbesserte Insulinsensitivität des Myokards zurückzuführen ist.

Allerdings zeigte sich, ähnlich wie in den Beobachtungen vorangegangener Arbeiten,⁹⁵⁻⁹⁸ eine Erhöhung der Expression für die basale Glucoseaufnahme (GLUT1) bei den TAC-operierten Tieren, und wir konnten dies über einen Beobachtungszeitraum von bis zu sechs Monaten bestätigen. In weiterführenden Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe mit Hilfe von PET-Bildgebung zeigen, dass dies auch funktionell von einer erhöhten basalen Glucoseaufnahme begleitet war.

Andere wichtige Regulatoren der Glucose-Nutzung wie Akt, AMPK und Hexokinase II waren im Myokard sowohl frühzeitig nach TAC als auch im Verlauf in ihrer Expression oder Phosphorylierung nicht verändert.

Die Senkung des Nüchtern-Blutzuckers nach TAC (s. Abb. 6, S. 11) ist jedoch nicht ausreichend durch die erhöhte kardiale Glucose-Aufnahme allein erklärbar. Vielmehr ist zur Aufrechterhaltung des Nüchternblutzuckers vor allem die Bereitstellung von Glykogen aus Leber und Muskel relevant. Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei erhöhtem systemischen Glucosebedarf zur Ausschüttung von Glucagon und Adrenalin. Durch diese endokrine Aktivierung werden über die Phosphorylase-Kinasen die Glykogenphosphorylasen stimuliert und Glucose aus der Leber freigesetzt. In der Muskulatur dient Glykogen vornehmlich der direkten Energiegewinnung bei

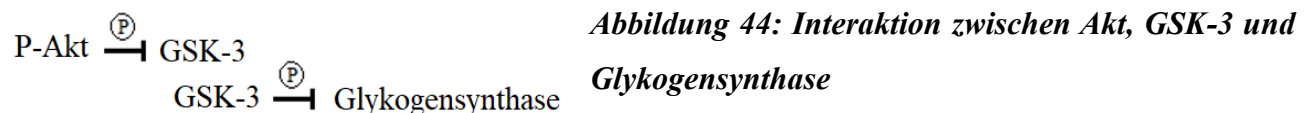
kurzfristigen Mangelzuständen oder in der Hypoglykämie. Konsistent erniedrigte Nüchtern-Blutzuckerspiegel sind nur bei fehlerhafter Regulation der Glykogen-Mobilisation oder durch eine Entleerung der Speicher möglich.

Die Glykogenspeicher in Leber und Muskel waren nach der TAC-Operation reduziert, wobei die Leerung der hepatischen Speicher bereits nach einem Monat, im Muskel erst nach sechs Monaten signifikant war. Aus Studien zu Hungerzuständen wurde berichtet, dass das Muskelglykogen erst nach Erschöpfung des Leberglykogens eingesetzt wird, dass aber bei längeren Hungerzuständen auch das Skelettmuskelglykogen zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels verwendet wird.⁹⁹ Die Daten dieser Arbeit deuten nun darauf hin, dass dies auch im hier verwendeten Modell der TAC-induzierten Herzinsuffizienz eine vergleichbaren Hintergrund haben könnten.

In Ratten, die bei körperlichem Training eine kohlenhydratreiche Ernährung bekommen hatten, konnte ein deutlicher Anstieg der gesamten Glykogensynthese-Aktivität im Gastrocnemius-Muskel nachgewiesen werden.¹⁰⁰ So zeigten auch die Ergebnisse dieser Arbeit bei zusätzlicher Sucrosefütterung sowohl für die hepatischen als auch die muskulären Speicher einen Anstieg des Glykogengehalts auf Werte vergleichbar mit Sham-operierten Tieren bzw. höher (s. Abb. 11 und 13, S. 28 f.). Diese Wiederherstellung der Glykogenspeicher und des systemischen Glucosestoffwechsels scheint also Anteil an der verbesserten Prognose der Sucrose-gefütterten herzinsuffizienten Tiere zu haben.

Um zu verstehen, über welche Signalwege die Reduktion der Glykogenspeicher in Muskel und Leber vermittelt wird, wurden die Insulinsignaltransduktion und Mediatoren der Glucoseaufnahme an Muskel und Leber untersucht.

So fand sich am Skelettmuskel einen Monat nach TAC eine transiente Reduktion der Akt-Phosphorylierung, die nach sechs Monaten nicht mehr zu verzeichnen war. Akt hemmt über Phosphorylierung die Glykogensynthase-Kinase 3 und aktiviert damit die Glykogensynthase (s. Abb. 44). Somit könnte die zu Beginn (nach einem Monat) reduzierte P-Akt im Skelettmuskel die Glykogensynthase erhöhen und die Glykogenspeicher dort aufrechterhalten.



Sechs Monate nach TAC zeigte sich im Skelettmuskel hingegen eine gesteigerte Expression sowohl der Akt als auch von Hexokinase II (deren Expression wiederum u. a. über Akt gesteigert wird, s. auch Abb. 3, S. 7). Da eine verminderte Akt Expression mit Muskelatrophie einhergeht¹⁰¹ und eine Überexpression die Atrophie verhindern kann¹⁰² interpretieren wird dies als Kompensationsmechanismus der Skelettmuskulatur. Durch die Hexokinase wiederum soll der Zelle Glucose-6-Phosphat und damit mehr direkte Energie zur Verfügung gestellt werden (s. auch Abb. 2,

S.6). Dies war jedoch in unserem Modell durch die fehlende Verfügbarkeit von Serum-Glucose eingeschränkt, weshalb wir die erhöhte Expression als Gegenregulation auf ihren Mangel interpretieren. Interessanterweise fand sich nämlich keine erhöhte Expression von Akt oder HK II wenn durch Sucrosefütterung die Serum-Glucose normalisiert war (s. Abschnitt 4.2 „Kardiale Kachexie und Sucrosefütterung“).

Um Veränderungen des Glucosestoffwechsels der Leber zu untersuchen, wurde die Expression des hepatischen Glukostransporters GLUT2 und des Schlüsselenzyms der Glucosenutzung (Hexokinase IV) detektiert. Hier fand sich keine Veränderung der Expression, so dass der Reduktion der Speicher nicht eine Hemmung der Aufnahme, sondern die fehlende Verfügbarkeit von Glucose zu Grund zu liegen scheint. Lediglich nach sechs Monaten deutet sich eine leichte Reduktion der HK IV bei den TAC-operierten Mäusen an, nicht jedoch, wenn sie gleichzeitig Sucrose erhielten. Die Glukokinase trägt zur Glykogensynthese aus Serumglucose bei und ihre Expression wird durch Fasten herunterreguliert.¹⁰³ Wir interpretieren die leicht reduzierte Expression daher als Folge der signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel durch erhöhten Verbrauch in den anderen Geweben (in diesem Fall dem Myokard).

Es liegt nun durch die Ergebnisse dieser Arbeit die Schlussfolgerung nahe, dass es bei den TAC-Tieren zu einem erhöhten myokardialen Glucoseverbrauch kommt, der durch die Nahrung nicht ausreichend kompensiert wurde, dadurch die Glykogenreserven verbraucht und so durch die fehlende Verfügbarkeit von Glucose für den Stoffwechsel der peripheren Organe zur kardialen Kachexie und Mortalität führt (s. Abb. 9, S.12). Da diese Arbeit zeigte, dass durch Sucrosefütterung sowohl die Glykogenreserven gefüllt als auch die Mortalität gesenkt werden konnte, ergibt sich hier ein möglicher Therapieansatz.

Um zu verstehen, welche metabolischen Veränderungen zu einer kardialen Kachexie führen, soll im Weiteren genauer auf die Hintergründe eingegangen werden.

4.2 Kardiale Kachexie und Sucrose-Substitution

Kachexie ist definiert als Gewichtsverlust von mind. 5% über einen Zeitraum von max. zwölf Monaten.¹⁰⁴ Vergleichbar mit Stoffwechselveränderungen während des Fastens kommt es auch bei herzinsuffizienten Patienten zur Depletion der Glykogenspeicher der Leber und Muskulatur,^{43,105} wie auch im hier verwendeten Modell nachgewiesen (s. Abb. 10-13, S. 28 f.). Die Veränderungen im myokardialen Stoffwechsel im Rahmen der HI haben in dem hier verwendeten Modell den systemischen Glucosemetabolismus beeinflusst und möglicherweise direkt die Entwicklung der kardialen Kachexie beeinflusst.

Wie auch in verschiedenen Studien bereits beim Menschen nachgewiesen, findet man bei Patienten

mit einer chronischen Herzinsuffizienz um bis zu 20% verringerte Glykogenspeicher, schon bevor eine kardiale Kachexie entsteht.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ So zeigte sich die Leerung der hepatischen Glykogenspeicher in unserem Modell bereits einen Monat nach TAC (s. Abb. 10, S. 28).

Die kardiale Kachexie ist eine Komplikation der chronischen Herzinsuffizienz, die mit einer schlechten Prognose einhergeht, unabhängig vom funktionellen Schweregrad der Erkrankung, dem Alter, Ausmaß der Belastbarkeit und LVEF. Patienten, die davon betroffen sind, leiden unter generalisiertem Verlust an Muskelmasse, fettreichem und -armem Gewebe sowie der Knochenmasse, die zu einer Osteoporose beiträgt. Diese Patienten ermüden schneller und leiden unter einer ausgeprägten Abgeschlagenheit. Dies ist unter anderem auf die reduzierte Muskelmasse und eine beeinträchtigte Muskelqualität zurückzuführen. Dort kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Proteinbiosynthese und deren Abbau.¹⁰⁸⁻¹¹²

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass durch Sucrose ad libitum ein Auffüllen der Glykogenspeicher erzielt werden kann (s. Abb. 11 und 13, S. 28 f.). Darüber hinaus wurde die Mortalität der TAC-Tiere durch Sucrosefütterung reduziert (s. Abb. 9, S. 12).

Von den hier untersuchten Signalwegen tragen vor allem die Regulation der Hexokinase am Myokard sowie von Akt und Hexokinase im Skelettmuskel zur Erklärung des verbesserten Glucosestoffwechsels unter Sucrosefütterung bei.

Denn obwohl die myokardiale Glucoseaufnahme über GLUT1 weiterhin erhöht war, zeigen die verminderte Expression der Hexokinase II am Myokard und die Normalisierung der Hexokinase II am Skelettmuskel an, dass der Glucosebedarf beider Gewebe ausreichend gedeckt war. Die geringere Mortalität in Sucrose-gefütterten TAC-Tieren scheint somit primär nicht durch veränderte myokardiale Glucoseaufnahme oder -Utilisation, sondern aufgrund besserer Glucose-Verfügbarkeit aus dem Serum bedingt. Am Skelettmuskel normalisierte Sucrosefütterung auch die erhöhte Expression von Akt nach TAC, was wir ebenfalls als Ausdruck der verbesserten Energieverfügbarkeit interpretieren, bei der die kompensatorische Akt-Erhöhung zur Gegenregulation einer Muskelatrophie ausbleibt.

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist die Therapie der Kachexie bisher eher unspezifisch, die aktuellen Leitlinien verweisen lediglich auf eine optimale HI-Therapie, körperliches Training und Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren.¹² Spezifische Diättempfehlungen können jedoch bisher nicht ausgesprochen werden, da bisherige Ansätze, insbesondere die Supplementierung von Proteinen oder essentiellen Aminosäuren wenig Erfolg versprechend verliefen.^{12,113-115} Eine achtwöchig gemischte Kalorien-Supplementation konnte z.B. reduzierte Glykogenspeicher nicht wieder füllen.¹¹⁶ Auch die Gabe von Anabolika ist bisher umstritten. Durch die Infusion von Glucose-Insulin-Kalium konnte jedoch bei Patienten mit einer chronisch ischämischen Kardiomyopathie zumindest eine kurzfristige Verbesserung der ventrikulären Funktion erreicht werden.¹¹⁷

Ob und inwieweit eine Sucrose-Substitution in Kombination mit anderen z.B. anti-inflammatorischen Ansätzen zur Therapie der kardialen Kachexie genutzt werden könnte, müsste in klinischen Studien erprobt werden. Zur Verbesserung der Herzinsuffizienz selbst wäre weiterhin die Kombination mit bewährten und/oder neuen HI-Therapien nötig.

4.3 Innovative Therapieansätze der Herzinsuffizienz

Der Hauptansatz der bisher erfolgreichsten Optionen zur Herzinsuffizienz-Therapie (ACE-Hemmer, AT-1-Blocker, Betablocker, Aldosteron-Rezeptorantagonisten und Diuretika) greift nicht primär am Herzen, sondern hemmend in die neurohumoralen Kompensationsmechanismen ein. In den Leitlinien wurde daher als wichtiges neues Ziel zukünftiger Therapieansätze auch die Bedeutung von Komorbiditäten für die Inzidenz und den Verlauf der Herzinsuffizienz aufgenommen.

Durch Ökonomisierung der Herzarbeit bei weiterer Frequenzsenkung mit dem If-Kanal-Inhibitor Ivabradin zeigte die SHIFT-Studie, dass es unter dieser Medikation zu einer reduzierten Rate an Klinikeinweisungen wegen kardialer Dekompensation kam, ebenso wurde die Mortalität infolge einer Herzinsuffizienz signifikant reduziert.¹¹⁸

Therapien, die direkt auf eine Kontraktilitätssteigerung des Myokards zielen, beispielsweise Levosimendan und andere Myosin-Aktivatoren, sind bisher umstritten.¹¹⁹

Eine Verbesserung der Mortalität konnte in der PARADIGM-HF-Studie⁹¹ mit LCZ696 (Sacubitril/Valsartan) im Vergleich zu Enalapril gezeigt werden. Hierbei wurden knapp 8500 Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz verglichen. Sacubitril hemmt das Enzym Neprilysin, eine neutrale Endopeptidase, die verschiedenste endogene vasoaktive Peptide abbaut, wie beispielsweise das natriuretische Peptid, Bradykinin und Adrenomedullin.^{120–122}

Das Ausmaß der BNP-Erhöhung oder das Verhältnis von BNP und NT-pro-BNP kann die Regulierung des Glucosestoffwechsels beeinflussen. Patienten, die in der PARADIGM-HF-Studie⁹¹ mit kombinierter Angiotensin-Rezeptor-Nepilysin-Hemmung (ARNI) behandelt wurden, haben zwar einen höheren BNP-Wert, aber einen niedrigeren NT-pro-BNP-Serumspiegel.¹²³ Zudem zeigte eine Post-Hoc-Analyse von diabetischen Patienten eine verbesserte glykämische Kontrolle mit einer stärkeren langfristigen HbA1c-Reduktion.⁹² Dies wird möglicherweise durch mehrere Peptide vermittelt, die mit ARNI verändert werden und die Insulinempfindlichkeit verbessern, wie ANP und CNP, GLP-1 und Bradykinin. Hier zeigt sich also, dass Hämodynamik, natriuretische Peptide und Glucosestoffwechsel in direkter Interaktion stehen.

Ein weiterer neuer Ansatzpunkt, der in die Modulation des Myokardstoffwechsels eingreift, ist die Reduktion der myokardialen Fettsäureoxidation und Stimulation der Glucoseoxidation durch Trimetazidin.¹²⁴ Diese Substanz hat eine protektive Wirkung auf die Mitochondrien, verringert die Protonenproduktion und fördert die endotheliale Protektion.^{125–128} In einigen Studien wurde

unabhängig von der Ätiologie der HI eine signifikante Verbesserung der funktionellen Fähigkeit, linksventrikulären Funktion und des Remodeling beobachtet.¹²⁹ Dies wäre möglicherweise ein interessanter Therapieansatz, insbesondere in Kombination mit einer zusätzlichen Sucrose-Gabe, um gleichzeitig die Verfügbarkeit und die Effizienz der myokardialen Glucosenutzung zu verbessern. Positive Effekte sind auch durch Perhexilin möglich, das den mitochondrialen Fettsäuretransport über die reversible Hemmung der Carnitin-Palmitoyl- Transferase-1 verringert.¹³⁰ Die in den 70er Jahren eingeführte antianginöse Substanz wurde nicht länger genutzt, nachdem es bei Langsammetabolisierern über eine erhöhte Plasmakonzentration zu Fällen von Leberversagen und Neuropathie gekommen war.¹³¹ Da diese Nebenwirkungen durch Titrierung über Monitoring des Plasmaspiegel vermieden werden können, führte es im Verlauf zur Wiedereinführung bei refraktärer Angina in Australien und Neuseeland, allerdings kommt es in Europa nur beschränkt zum Einsatz.¹³² In einer randomisierten Doppelblind-Studie an 56 optimal medikamentös eingestellten HI Patienten über acht Wochen zeigte Perhexillin eine Verbesserung der Symptomatik, maximale Sauerstoffaufnahmekapazität und eine Verbesserung der LV-Funktion.¹³³ Jedoch sind noch weitere prospektive Studien zur Bestätigung dieser Daten nötig.

Ebenfalls vielversprechend sind die Ergebnisse der Studien zu einer neuen Gruppe Antidiabetika: der selektiven Natrium-Glucose-Kotransport-2-Inhibitoren (SGLT2i). Diese wurden primär zur Therapie des Diabetes entwickelt, zeigten aber eindruckliche kardio- und nephroprotektive Effekte. Empagliflozin führte in der EMPAREG Outcome-Studie zum verminderten Auftreten einer Herzinsuffizienzhospitalisierung bei Diabetikern.^{134–136} Unter Einnahme des Medikaments als Mono- oder Begleittherapie kam es zu einer Reduktion des HbA1c-Levels bei Patienten mit Typ II DM, inklusive der Patienten, die sich im Stadium 2 oder 3 a der chronischen Niereninsuffizienz befanden. Zudem werden Gewichtsabnahme und Reduktion des Blutdrucks ohne Zunahme der Herzfrequenz beschrieben.^{137–144} Es resultierte ein signifikant geringeres Sterberisiko durch kardiovaskuläre Ursachen, zudem zeigte die Empagliflozin-Gruppe ein signifikant geringeres Risiko der Rehospitalisierung durch eine Dekompensation.¹⁴⁵ Auch in den kürzlich publizierten CREDENCE¹⁴⁶ und DAPA-HF-Studien¹⁴⁷ konnte ein zusätzlicher Nutzen für Nierenfunktion und Herzinsuffizienz-Hospitalisierungen belegt werden, wobei in letzterer erstmals auch nicht-diabetische Patienten behandelt wurden. Die Mechanismen hinter den beobachteten Nutzen bleiben spekulativ, möglicherweise stehen in Anbetracht des raschen Wirkungseintritts besonders die hämodynamischen Effekte durch die Diurese und Natriurese sowie die Auswirkung auf den kardialen Sauerstoffbedarf (in Abwesenheit der Aktivierung des sympathischen Nervensystems) im Vordergrund.^{148–150} Relevant im Hinblick auf unsere Arbeit ist jedoch, dass – anders als in unserem Modell – in diesen Studien keine Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz behandelt wurden.

Nicht zuletzt tragen körperliche Betätigung sowie diätetische Maßnahmen zu einer sinnvollen

Herzinsuffizienztherapie bei. Allerdings ist hierbei die Studienlage sehr gering.

Die Auswirkungen von Trainingsmaßnahmen auf das Myokard und das Gefäßsystem sind abhängig von der Häufigkeit, Intensität und Dauer der ausgeführten Übungen. Nach einem längeren Zeitraum (\geq sechs Monate) regelmäßiger intensiver Bewegung bei zuvor untrainierten Personen sind die Ruhe- und submaximalen Trainingsherzfrequenzen typischerweise um fünf bis 20 Schläge niedriger bei gleichzeitigem Anstieg des Schlagvolumens um etwa 20% und einer verbesserten myokardialen Kontraktilität.¹⁵¹

In einer Längsschnittstudie älterer Teilnehmer aus der Framingham-Studie wurde festgestellt, dass eine geringere körperliche Aktivität mit einem vermehrten Auftreten einer HI verbunden ist.¹⁵² Ebenfalls wurde gezeigt, dass es bei übergewichtigen Personen unter kurzzeitiger Belastung zu einer Verbesserung der insulinvermittelten Perfusion des Skelettmuskels und der Glucoselieferung kommt. Im Weiteren führt körperliches Training bei der HI zu einer Reduktion der Insulinresistenz¹⁵³. Dies wird möglicherweise über die Stimulation der insulin-unabhängigen GLUT1-Transporter an der Skelettmuskulatur ausgelöst.^{153,154}

Personen, die ihr Fitnessniveau erhöhten, hatten eine geringere Hospitalisierungsrate aufgrund einer HI.¹⁵⁵ Trotz der vorhandenen Erkenntnisse und Leitlinien¹² für Trainingsprogramme bei HI-Patienten erhielten nur zehn Prozent der berechtigten Patienten nach Entlassung aus dem Krankenhaus eine kardiologische Anschlussheilbehandlung.¹⁵⁶ Dies ist sowohl auf ärztliche Faktoren (geringer wahrgenommener Nutzen, fehlender Nachweis eines geringeren Mortalitätsrisikos, Sicherheitsaspekte) und patientenbezogene Faktoren (höheres Alter, niedrigerer sozioökonomischer Status, logistische Probleme, Versicherungsstatus und Komorbiditäten) zurückzuführen.¹⁵⁷

Weitere Fortschritte im Verständnis der zentralen und peripheren Mechanismen der Trainingsintoleranz während der HI sind entscheidend für die zukünftige Gestaltung von Therapiemodalitäten und eine erfolgreiche Prognose-Verbesserung.¹⁵⁸

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Signalwege an Myokard, Leber und Skelettmuskulatur untersucht, die den Veränderungen des Glucosestoffwechsels im zeitlichen Verlauf bei TAC-induzierter systolischer Herzinsuffizienz zu Grunde liegen können.

Es wurde dafür über eine TAC-Operation am Mausmodell eine Herzinsuffizienz induziert. Erniedrigte Nüchtern-Blutzuckerwerte und ein erhöhter myokardialer Glucoseverbrauch fanden sich als die wesentlichen metabolischen Veränderungen in diesem Mausmodell mit TAC-induzierter Herzinsuffizienz. In Vorarbeiten ergaben die GTTs nach zwei Wochen eine erhöhte Glucoseaufnahme nach TAC, die nicht durch eine verstärkte Insulinsignaltransduktion hervorgerufen wurde, da sich die Insulinkonzentrationen und die Insulinsensitivität zwischen den Gruppen nicht unterschieden. Der Nüchternblutzucker war bei den TAC-operierten Tieren niedriger als bei den Sham-operierten. In der PET-Bildgebung wurde eine erhöhte Glucoseaufnahme im Herzen bei den TAC-Tieren verglichen mit den Sham-operierten Tieren gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun nach einem bzw. sechs Monaten bei den Versuchsgruppen Western Blot Analysen sowie Glykogenassays durchgeführt. Zudem wurde untersucht, wie sich eine zusätzliche Sucrosefütterung über sechs Monate ab OP auswirkt.

Dabei fand sich eine erhöhte Expression des basalen Glucosetransporters GLUT1 am Myokard, passend zur erhöhten basalen Glucoseaufnahme im PET. Die Expression des insulinabhängigen Transporters GLUT4 hingegen war - wie bereits in anderen Arbeiten zu Hypertrophie und Herzinsuffizienz - vermindert.

Der hepatische und muskuläre Glykogengehalt war nach TAC reduziert, wobei die Depletion der hepatischen Speicher bereits nach einem Monat, im Muskel erst nach sechs Monaten signifikant war. Die Regulation der muskulären Glykogenreserven wurde in unserem Modell möglicherweise über Akt und Hexokinase II vermittelt. Einen Monat nach TAC war am Skelettmuskel eine vorübergehende Reduktion der Akt-Phosphorylierung zu verzeichnen, was über Aktivierung der Glykogensynthase zur Aufrechterhaltung der muskulären Glykogenspeicher beitragen kann. Sechs Monate nach TAC-OP war die Akt-Expression im Skelettmuskel dann jedoch verstärkt, was zwar einen Kompensationsmechanismus zur Vermeidung einer Muskel-Atrophie darstellt, jedoch durch Inaktivierung der Glykogensynthase sinkende Glykogenreserven bedingt. Gleichzeitig war eine Steigerung der Expression von Hexokinase II zu beobachten, die durch Bildung von Glucose-6-Phosphat die intrazelluläre Glucoseverfügbarkeit kompensiert.

Bei zusätzlicher Sucrosefütterung über sechs Monate zeigte sich im Muskel der TAC-operierten Tiere keine kompensatorische Steigerung von Akt- und HKII-Expression mehr, und auch die Entleerung der muskulären Glykogenspeicher war vollständig abgefangen. Ebenso wurde die Entleerung der

hepatischen Glykogenvorräte durch Sucrose-Substitution verhindert, was für eine ausreichende Glucoseverfügbarkeit spricht und die Normalisierung der Glucosetoleranz erklärt. Wichtige Regulatoren der Leber-Glykogensynthese, z.B. GLUT2 und HK IV, oder der zellulären Energie-Homöostase, z.B. AMPK, waren hingegen zu keinem Zeitpunkt wesentlich verändert.

Zusammenfassend konnten somit durch eine Sucrosubstitution die bei TAC-induzierter Herzinsuffizienz reduzierten Glykogenspeicher in Muskel und Leber erhalten, der systemische Glucosestoffwechsel normalisiert und eine Reduktion der Mortalität erzielt werden. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich Strategien, die zu einer Wiederherstellung der systemischen Glucoseverfügbarkeit beitragen, möglicherweise positiv auf eine Herzinsuffizienztherapie auswirken könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Nichols, G. A., Hillier, T. A., Erbey, J. R. & Brown, J. B. Congestive Heart Failure in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **24**, 1614 (2001).
2. Johansson, S., Wallander, M.-A., Ruigómez, A. & Rodríguez, L. A. G. Incidence of newly diagnosed heart failure in UK general practice. *European Journal of Heart Failure* **3**, 225–231 (2001).
3. Doehner, W. *et al.* Impaired Insulin Sensitivity as an Independent Risk Factor for Mortality in Patients With Stable Chronic Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* **46**, 1019–1026 (2005).
4. Thrainsdottir, I. S. *et al.* The Association Between Glucose Abnormalities and Heart Failure in the Population-Based Reykjavík Study. *Diabetes Care* **28**, 612 (2005).
5. Bergman, B. C., Tsvetkova, T., Lowes, B. & Wolfel, E. E. Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *The Journal of Physiology* **587**, 2087–2099 (2009).
6. Neubauer, S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *The New England journal of medicine* **356**, 1140–51 (2007).
7. Zugck, C. *et al.* Gesundheitsökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz: Analyse bundesweiter Daten. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **135**, 633–638 (2010).
8. Classen, Diehl, Kochsieck (herausgegeben von M. Böhm, M. Hallek, W. Schmiegel). *Innere Medizin*. (Urban & Fischer Verlag München, 2009), S. 93 ff.
9. Savarese, G. & Lund, L. H. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* **3**, 7–11 (2017).
10. McMurray, J. J. & Stewart, S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* **83**, 596–602 (2000).
11. Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. (Herold, 2012), S. 201 ff.

12. Ponikowski, P. *et al.* 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. *European Heart Journal* **37**, 2129–2200 (2016).
13. W. Siegenthaler, H. E. Blum. *Klinische Pathophysiologie*. (Thieme, 2006), S. 589 ff.
14. Schunkert, Weil. *Rationelle Diagnostik und Therapie bei Herzinsuffizienz*. (Springer, 2005).
15. Grundmann. *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. (Urban & Fischer, 2008) S. 287 ff.
16. Böcker, Denk, Heitz, Höfler, Kreipe, Moch. *Pathologie*. (Urban & Fischer, 2012) S. 172ff.
17. Shao, D. & Tian, R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr Physiol* **6**, 331–351 (2015).
18. B. Ostadal, N. S. Dhalla. *Cardiac Adaptations Molecular Mechanism*. (Springer).
19. B. Stratmann, T. Gawlowski, D. Tschoepe. Diabetic cardiomyopathy—to take a long story serious. *Herz* 161–168 (2010).
20. Stuck, B. J., Lenski, M., Böhm, M. & Laufs, U. Metabolic Switch and Hypertrophy of Cardiomyocytes following Treatment with Angiotensin II Are Prevented by AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **283**, 32562–32569 (2008).
21. Kemppainen, J. *et al.* Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans. *J Physiol* **542**, 403–412 (2002).
22. Collins-Nakai, R. L., Noseworthy, D. & Lopaschuk, G. D. Epinephrine increases ATP production in hearts by preferentially increasing glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **267**, H1862–H1871 (1994).
23. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Each Organ Has a Unique Metabolic Profile. *Biochemistry. 5th edition* (2002).
24. Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews* **85**, 1093–1129 (2005).

25. *Textbook of Biochemistry for Medical Students*. (Jaypee Brothers Medical Publisher, 2013).
26. Allard, M. F. *et al.* Glycogen Metabolism in the Aerobic Hypertrophied Rat Heart. *Circulation* **96**, 676 (1997).
27. Murray, A. J., Anderson, R. E., Watson, G. C., Radda, G. K. & Clarke, K. Uncoupling proteins in human heart. *The Lancet* **364**, 1786–1788 (2004).
28. M. van Bilsen, G. J. van der Vusse, R. S. Reneman. *Transcriptional regulation of metabolic processes: Implications for cardiac metabolism*. (Pflügers Archiv : European journal of physiology 437, 2-14, 1999).
29. Sun, D., Nguyen, N., DeGrado, T. R., Schwaiger, M. & Brosius, F. C. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* **89**, 793 (1994).
30. G. Paternostro, K. Clarke, J. Heath, A. L. Seymour, G. K. Radda. Decreased GLUT-4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in the hypertensive rat heart. **Volume 30**, 205–211 (1995).
31. Aksentijević, D., Bhandari, S. & Seymour, A.-M. L. Insulin resistance and altered glucose transporter 4 expression in experimental uremia. *Kidney international* **75**, 711–718 (2009).
32. Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, S. M., Mi-Mi, L. & Gregorio, C. C. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* **7**, 891–944 (2017).
33. R. H. Ritchie, L. M. Delbridge. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **Volume 33**, 159–166 (2006).
34. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Comprehensive Physiology* 331–351 (2015).
35. Kasahara, M. & Hinkle, P. C. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**, 7384–7390 (1977).
36. Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol*

- Aspects Med* **34**, 121–138 (2013).
37. Fischer, Y. *et al.* Insulin-induced Recruitment of Glucose Transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in Isolated Rat Cardiac Myocytes: EVIDENCE OF THE EXISTENCE OF DIFFERENT INTRACELLULAR GLUT4 VESICLE POPULATIONS. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7085–7092 (1997).
 38. James, D. E., Brown, R., Navarro, J. & Pilch, P. F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**, 183–185 (1988).
 39. Paternostro, G. Insulin resistance in patients with cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* **42**, 246–253 (1999).
 40. Holman, G. D. Chemical biology probes of mammalian GLUT structure and function. *Biochem J* **475**, 3511–3534 (2018).
 41. Roberts, D. J. & Miyamoto, S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ* **22**, 248–257 (2015).
 42. Li, C. & Keaney Jr, J. F. AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology* **10**, 111–115 (2010).
 43. Ashrafian, H., Frenneaux, M. P. & Opie, L. H. Metabolic Mechanisms in Heart Failure. *Circulation* **116**, 434 (2007).
 44. Russell, R. R. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* **114**, 495–503 (2004).
 45. Minokoshi, Y. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339–343 (2002).
 46. Kudo, N. *et al.* Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1301**, 67–75 (1996).

47. Russell, R. R., Bergeron, R., Shulman, G. I. & Young, L. H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **277**, H643–H649 (1999).
48. Nishino, Y. Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection. *Cardiovascular Research* **61**, 610–619 (2004).
49. Matsui, T. *et al.* Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 22896–22901 (2002).
50. B. Stratmann, T. Gawlowski, D. Tschoepe. The Insulin Signaling System. *Herz The Journal of Biological Chemistry*, 1–4 (1994).
51. Cleland, J. G. F. *et al.* The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1539–1549 (2005).
52. Ferrannini, E. *et al.* Metabolic and hemodynamic effects of insulin on human hearts. *Am. J. Physiol.* **264**, E308-315 (1993).
53. Aoyagi, T. & Matsui, T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr Pharm Des* **17**, 1818–1824 (2011).
54. L. Weeks, K., Bernardo, B., Ooi, J., L. Patterson, N. & McMullen, J. The IGF1-PI3K-Akt Signaling Pathway in Mediating Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy and Protection. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1000 187–210 (2017).
55. Perrino, C. *et al.* Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. <https://www.jci.org/articles/view/25397/pdf> (2006) doi:10.1172/JCI25397.
56. Valentine, R. J., Coughlan, K. A., Ruderman, N. B. & Saha, A. K. Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **562**, 62–69 (2014).
57. Taegtmeyer, H. Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications

- applications. *Current Problems in Cardiology* **19**, 61–113 (1994).
58. Carroll, R., Carley, A. N., Dyck, J. R. B. & Severson, D. L. Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **288**, E900–E906 (2005).
59. Gray, S. & Kim, J. K. New Insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 394–403 (2011).
60. Aroor, A. R., Mandavia, C. H. & Sowers, J. R. Insulin Resistance and Heart Failure: Molecular Mechanisms. *Heart Fail Clin* **8**, 609–617 (2012).
61. Eguchi, K. *et al.* Association Between Diabetes Mellitus and Left Ventricular Hypertrophy in a Multiethnic Population. *The American Journal of Cardiology* **101**, 1787–1791 (2008).
62. Giles, T. D. & Sander, G. E. Diabetes mellitus and heart failure: basic mechanisms, clinical features, and therapeutic considerations. *Cardiology Clinics* **22**, 553–568 (2004).
63. Iozzo, P. *et al.* Independent Association of Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease With Myocardial Insulin Resistance. *Diabetes* **51**, 3020–3024 (2002).
64. An, D. & Rodrigues, B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **291**, H1489–H1506 (2006).
65. Finck, B. N. *et al.* A critical role for PPAR -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1226–1231 (2003).
66. How, O.-J. *et al.* Increased Myocardial Oxygen Consumption Reduces Cardiac Efficiency in Diabetic Mice. *Diabetes* **55**, 466–473 (2006).
67. Karamitsos, T. D. *et al.* Early diastolic impairment of diabetic heart: the significance of right ventricle. *Int. J. Cardiol.* **114**, 218–223 (2007).
68. de Simone, G. *et al.* Metabolic syndrome and left ventricular hypertrophy in the prediction of cardiovascular events: The Strong Heart Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular*

- Diseases* **19**, 98–104 (2009).
69. de Simone, G., Gottdiener, J. S., Chinali, M. & Maurer, M. S. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *European Heart Journal* **29**, 741–747 (2008).
70. Berry, C., Brett, M., Stevenson, K., McMurray, J. J. V. & Norrie, J. Nature and prognostic importance of abnormal glucose tolerance and diabetes in acute heart failure. *Heart* **94**, 296–304 (2008).
71. Capes, S. E., Hunt, D., Malmberg, K. & Gerstein, H. C. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *The Lancet* **355**, 773–778 (2000).
72. Held, C. *et al.* Glucose Levels Predict Hospitalization for Congestive Heart Failure in Patients at High Cardiovascular Risk. *Circulation* **115**, 1371–1375 (2007).
73. O’Keefe, J. H. & Bell, D. S. H. Postprandial Hyperglycemia/Hyperlipidemia (Postprandial Dysmetabolism) Is a Cardiovascular Risk Factor. *American Journal of Cardiology* **100**, 899–904 (2007).
74. Paolisso, G. *et al.* Prognostic importance of insulin-mediated glucose uptake in aged patients with congestive heart failure secondary to mitral and/or aortic valve disease. *American Journal of Cardiology* **83**, 1338–1344 (1999).
75. Tenenbaum, A. *et al.* Functional class in patients with heart failure is associated with the development of diabetes. *The American Journal of Medicine* **114**, 271–275 (2003).
76. Utriainen, T. *et al.* Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia* **41**, 555–559 (1998).
77. Jagasia Dinesh, Whiting Jennifer M., Concato John, Pfau Steven & McNulty Patrick H. Effect of Non–Insulin-Dependent Diabetes Mellitus on Myocardial Insulin Responsiveness in Patients With Ischemic Heart Disease. *Circulation* **103**, 1734–1739 (2001).
78. Marshall, J. D. *et al.* New Alström Syndrome Phenotypes Based on the Evaluation of 182

- Cases. *Arch Intern Med* **165**, 675–683 (2005).
79. Swedberg, K. & Kjeksus, J. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *The American Journal of Cardiology* **62**, 60A-66A (1988).
80. Pfeffer, M. A. *et al.* [Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with dysfunction of the left ventricle after myocardial infarction. Results on survival and hypertrophic studies]. *Kardiologia* **33**, 14–23, 3 (1993).
81. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *The New England Journal of Medicine* **9** (1999).
82. Anker, S. D. *et al.* Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: An observational study. *International Journal of STD and AIDS* **361**, 1077–1083 (2003).
83. Wilkins, L. W. & A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees. *Circulation* **90**, 1765–1773 (1994).
84. Sirenko, Y. Effect of Beta - Blockers on Insulin Resistance in Patients with Hypertension and Metabolic Syndrome after 6 Months of Treatment. *Journal of Endocrinology and Diabetes* **4**, 1–11 (2017).
85. Wallhaus, T. R. *et al.* Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure. *Circulation* **103**, 2441–2446 (2001).
86. Al-Hesayen, A. *et al.* Selective versus nonselective β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure: differential effects on myocardial energy substrate utilization. *European Journal of Heart Failure* **7**, 618–623 (2005).
87. Bristow, M. R. *et al.* Cardiac-Resynchronization Therapy with or without an Implantable Defibrillator in Advanced Chronic Heart Failure. *New England Journal of Medicine* **350**, 2140–2150 (2004).

88. Neri, G., Zanco, P., Zanon, F. & Buchberger, R. Effect of biventricular pacing on metabolism and perfusion in patients affected by dilated cardiomyopathy and left bundle branch block: evaluation by positron emission tomography. *Europace* **5**, 111–115 (2003).
89. Nowak, B. *et al.* Cardiac resynchronization therapy homogenizes myocardial glucose metabolism and perfusion in dilated cardiomyopathy and left bundle branch block. *Journal of the American College of Cardiology* **41**, 1523–1528 (2003).
90. Chokshi, A. *et al.* Ventricular Assist Device Implantation Corrects Myocardial Lipotoxicity, Reverses Insulin Resistance and Normalizes Cardiac Metabolism in Patients with Advanced Heart Failure. *Circulation* **125**, 2844–2853 (2012).
91. McMurray, J. J. V. *et al.* Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *New England Journal of Medicine* **371**, 993–1004 (2014).
92. Seferovic, J. P. *et al.* Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* **5**, 333–340 (2017).
93. Jordan, J. *et al.* Improved Insulin Sensitivity With Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Individuals With Obesity and Hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **101**, 254–263 (2017).
94. deAlmeida, A. C., van Oort, R. J. & Wehrens, X. H. T. Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Vis Exp* (2010) doi:10.3791/1729.
95. Sankaralingam, S. & Lopaschuk, G. D. Cardiac energy metabolic alterations in pressure overload–induced left and right heart failure (2013 Grover Conference Series). *Pulm Circ* **5**, 15–28 (2015).
96. Liao, R. *et al.* Cardiac-Specific Overexpression of GLUT1 Prevents the Development of Heart Failure Attributable to Pressure Overload in Mice. *Circulation* **106**, 2125–2131 (2002).
97. Aerni-Flessner, L., Abi-Jaoude, M., Koenig, A., Payne, M. & Hruz, P. GLUT4, GLUT1, and GLUT8 are the dominant GLUT transcripts expressed in the murine left ventricle.

Cardiovascular diabetology **11**, 63 (2012).

98. Pereira, R. O. *et al.* 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**, (2013).
99. Sakaida, M., Watanabe, J., Kanamura, S., Tokunaga, H. & Ogawa, R. Physiological role of skeletal muscle glycogen in starved mice. *The Anatomical Record* **218**, 267–274 (1987).
100. Saitoh, S., Shimomura, Y., Tasaki, Y. & Suzuki, M. Effect of short-term exercise training on muscle glycogen in resting conditions in rats fed a high fat diet. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **64**, 62–67 (1992).
101. Jaiswal, N. *et al.* The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis. *Mol Metab* **28**, 1–13 (2019).
102. Bodine, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* **3**, 1014–1019 (2001).
103. Iynedjian, P. B. *et al.* Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7838–7842 (1989).
104. Evans, W. J. *et al.* Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition* **27**, 793–799 (2008).
105. Gřiva, M. Cardiac cachexia – Up-to-date 2015. *Cor et Vasa* **58**, e431–e438 (2016).
106. Broqvist, M., Dahlström, U., Karlsson, E. & Larsson, J. Muscle energy metabolism in severe chronic congestive heart failure — effect of treatment with enalapril. *Eur Heart J* **13**, 1217–1224 (1992).
107. Clark, A. L., Poole-Wilson, P. A. & Coats, A. J. S. Exercise limitation in chronic heart failure: Central role of the periphery. *Journal of the American College of Cardiology* **28**, 1092–1102 (1996).
108. Mancini, D. M. *et al.* Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* **85**, 1364–1373 (1992).
109. Martinez, P. F. *et al.* Influence of N-Acetylcysteine on Oxidative Stress in Slow-Twitch

- Soleus Muscle of Heart Failure Rats. *CPB* **35**, 148–159 (2015).
110. Anker, S. D. *et al.* Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *The Lancet* **349**, 1050–1053 (1997).
111. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Medical Science Monitor*
<https://www.medscimonit.com/download/index/idArt/881289>.
112. Heart Failure-Induced Diaphragm Myopathy - FullText - Cellular Physiology and Biochemistry 2014, Vol. 34, No. 2 - Karger Publishers.
<https://www.karger.com/Article/FullText/363003>.
113. Virtanen Heli E.K. *et al.* Intake of Different Dietary Proteins and Risk of Heart Failure in Men. *Circulation: Heart Failure* **11**, e004531 (2018).
114. dos Santos, E. M. *et al.* Whey protein supplementation for the preservation of mass and muscular strength of patients with heart failure: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **19**, (2018).
115. Lombardi, C. *et al.* Effects of Oral Amino Acid Supplements on Functional Capacity in Patients with Chronic Heart Failure. *Clin Med Insights Cardiol* **8**, 39–44 (2014).
116. Broqvist, M. *et al.* Nutritional assessment and muscle energy metabolism in severe chronic congestive heart failure—effects of long-term dietary supplementation. *Eur Heart J* **15**, 1641–1650 (1994).
117. Cottin, Y. *et al.* Glucose insulin potassium infusion improves systolic function in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure* **4**, 181–184 (2002).
118. Swedberg, K. *et al.* Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *The Lancet* **376**, 875–885 (2010).
119. Bouchez, S. *et al.* Levosimendan in Acute and Advanced Heart Failure: an Expert Perspective on Posology and Therapeutic Application. *Cardiovasc Drugs Ther* **32**, 617–624 (2018).

120. Cruden Nicholas L.M., Fox Keith A.A., Ludlam Christopher A., Johnston Neil R. & Newby David E. Neutral Endopeptidase Inhibition Augments Vascular Actions of Bradykinin in Patients Treated With Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension* **44**, 913–918 (2004).
121. Rademaker, M. T. *et al.* Neutral Endopeptidase Inhibition: Augmented Atrial and Brain Natriuretic Peptide, Haemodynamic and Natriuretic Responses in Ovine Heart Failure. *Clin Sci* **91**, 283 (1996).
122. Wilkinson, I. B. *et al.* Adrenomedullin (ADM) in the human forearm vascular bed: effect of neutral endopeptidase inhibition and comparison with proadrenomedullin NH₂-terminal 20 peptide (PAMP). *Br J Clin Pharmacol* **52**, 159–164 (2001).
123. Packer Milton *et al.* Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition Compared With Enalapril on the Risk of Clinical Progression in Surviving Patients With Heart Failure. *Circulation* **131**, 54–61 (2015).
124. Tuunanen Helena *et al.* Trimetazidine, a Metabolic Modulator, Has Cardiac and Extracardiac Benefits in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **118**, 1250–1258 (2008).
125. Minners, J. *et al.* Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* **47**, 68–73 (2000).
126. Monti, L. D. *et al.* Metabolic and endothelial effects of trimetazidine on forearm skeletal muscle in patients with type 2 diabetes and ischemic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **290**, E54–E59 (2006).
127. Saeedi, R. *et al.* Trimetazidine Normalizes Postischemic Function of Hypertrophied Rat Hearts. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 446–454 (2005).
128. Monteiro, P., Duarte, A. I., Gonçalves, L. M., Moreno, A. & Providência, L. A. Protective effect of trimetazidine on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia. *European Journal of Pharmacology* **503**, 123–128 (2004).
129. Uuetoa, T. Clinical overview of trimetazidine (Vastarel MR) in patients with heart failure.

130. Ashrafian, H., Horowitz, J. D. & Frenneaux, M. P. Perhexiline. *Cardiovascular Drug Reviews* **25**, 76–97 (2007).
131. Shah, R. R., Oates, N. S., Idle, J. R., Smith, R. L. & Lockhart, J. D. Impaired oxidation of debrisoquine in patients with perhexiline neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**, 295–299 (1982).
132. Killalea, S. M. & Krum, H. Systematic Review of the Efficacy and Safety of Perhexiline in the Treatment of Ischemic Heart Disease. *Am J Cardiovasc Drugs* **1**, 193–204 (2001).
133. Lee Leong *et al.* Metabolic Modulation With Perhexiline in Chronic Heart Failure. *Circulation* **112**, 3280–3288 (2005).
134. Zinman, B. *et al.* Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **373**, 2117–2128 (2015).
135. Gallo, L. A., Wright, E. M. & Vallon, V. Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: Basic physiology and consequences. *Diab Vasc Dis Res* **12**, 78–89 (2015).
136. Grempler, R. *et al.* Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* **14**, 83–90 (2012).
137. Häring, H.-U. *et al.* Empagliflozin as Add-On to Metformin in Patients With Type 2 Diabetes: A 24-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Care* **37**, 1650–1659 (2014).
138. Häring, H.-U. *et al.* Empagliflozin as Add-on to Metformin Plus Sulfonylurea in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **36**, 3396–3404 (2013).
139. Kovacs, C. S. *et al.* Empagliflozin improves glycaemic and weight control as add-on therapy to pioglitazone or pioglitazone plus metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **16**, 147–158 (2014).
140. Roden, M. *et al.* Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in

- patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* **1**, 208–219 (2013).
141. Rosenstock, J. *et al.* Improved Glucose Control With Weight Loss, Lower Insulin Doses, and No Increased Hypoglycemia With Empagliflozin Added to Titrated Multiple Daily Injections of Insulin in Obese Inadequately Controlled Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **37**, 1815–1823 (2014).
 142. Rosenstock, J. *et al.* Impact of empagliflozin added on to basal insulin in type 2 diabetes inadequately controlled on basal insulin: a 78-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* **17**, 936–948 (2015).
 143. Tikkanen, I. *et al.* Empagliflozin Reduces Blood Pressure in Patients With Type 2 Diabetes and Hypertension. *Diabetes Care* **38**, 420–428 (2015).
 144. Zhang, Y.-J. *et al.* Efficacy and safety of empagliflozin for type 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* **97**, e12843 (2018).
 145. Seferović, P. M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure* **20**, 853–872 (2018).
 146. Perkovic, V. *et al.* Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *New England Journal of Medicine* **380**, 2295–2306 (2019).
 147. McMurray, J. J. V. *et al.* Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine* **381**, 1995–2008 (2019).
 148. Inzucchi, S. E. *et al.* SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: Proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diab Vasc Dis Res* **12**, 90–100 (2015).
 149. Cherney, D. Z. *et al.* The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* **13**, 28 (2014).
 150. Cardoso, C. R. L., Ferreira, M. T., Leite, N. C. & Salles, G. F. Prognostic Impact of Aortic Stiffness in High-Risk Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* **36**, 3772–3778 (2013).

151. Wilson, M. G., Ellison, G. M. & Cable, N. T. Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart* **101**, 758–765 (2015).
152. Kraigher-Krainer, E. *et al.* Association of physical activity and heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the elderly: the Framingham Heart Study. *Eur J Heart Fail* **15**, 742–746 (2013).
153. Stolen, K. Q. *et al.* Exercise training improves insulin-stimulated myocardial glucose uptake in patients with dilated cardiomyopathy. *J Nucl Cardiol* **10**, 447–455 (2003).
154. Kemppainen, J. *et al.* Insulin Signalling and Resistance in Patients with Chronic Heart Failure. *The Journal of Physiology* **550**, 305–315 (2003).
155. Pandey, A. *et al.* Changes in Mid-life Fitness Predicts Heart Failure Risk at a Later Age Independent of Interval Development of Cardiac and Non-cardiac Risk Factors: The Cooper Center Longitudinal Study. *Am Heart J* **169**, 290-297.e1 (2015).
156. Doukky, R. *et al.* Impact of Physical Inactivity on Mortality in Patients with Heart Failure. *Am J Cardiol* **117**, 1135–1143 (2016).
157. Cattadori, G., Segurini, C., Picozzi, A., Padeletti, L. & Anzà, C. Exercise and heart failure: an update. *ESC Heart Fail* **5**, 222–232 (2017).
158. Phillips, S. A., Vuckovic, K., Cahalin, L. P. & Baynard, T. Defining the System: Contributors to Exercise Limitations in Heart Failure. *Heart Failure Clinics* **11**, 1–16 (2015).

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Stefan Frantz danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Unterstützung durch die frühe Gewährung wissenschaftlicher Freiräume bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Bettina Kraus unter ihrer Anleitung, mit ihrer Hilfsbereitschaft und Unterstützung der Experimente trug sie einen großen Teil zur Erstellung dieser Arbeit bei. Ebenso danke ich ihr für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben beigetragen haben. Im Besonderen bin ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die stete Förderung dieser Arbeit, aber auch meiner persönlichen Entwicklung, sehr dankbar.

Für die geduldige und kritische Durchsicht dieser Arbeit und ihre konstruktiven Anregungen danke ich meiner Mutter, meinem Adoptivvater, meinem lieben Freund Stefan Zölfel und meinem Mann Moritz sowie Dr. phil. Helga Kaußen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Mutter Dr. phil. Mechthild Pecik, meiner Zwillingsschwester Anjuli Pecik sowie meinem Adoptivvater Manfred Steck, die in vielfältigster Weise durch ihre Unterstützung das Entstehen und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Frau Anja Sauer und Eva Riedel für ihre vielfältige Unterstützung und Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken sowie besonders Herrn Dr. med. Daniel Kraus für die Bereitstellung der statistischen Auswertung.

Schließlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der medizinischen Klinik und Poliklinik I bedanken, die hier nicht namentlich erwähnt sind, die mir aber in verschiedensten Fragen bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben.