

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor. Dr. med. J. Dötsch

**Dynamische Regulierung und funktionelle  
Bedeutung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalübertragung  
bei der metabolischen Programmierung des  
Herzens**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Jonathan Irrgang  
aus Troisdorf

promoviert am 30. Oktober 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2024

Dekan:            Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar

2. Gutachter: Professor Dr. med. M. D. Halbach

## Erklärung

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

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

Herrn Jun. Prof. Dr. med. Dr. nat. med. Miguel Angel Alejandre Alcázar

Frau Dr. med. Nava Mehdiani

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

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Jun. Prof. Dr. med. Dr. nat. med. Miguel Angel Alejandre Alcazar und Frau Dr. med. Nava Mehdiani, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln.

Die Aufzucht und Fütterung der Versuchstiere sowie Präparation und Organentnahme wurden im Rahmen vorausgegangener Projekte durch ausgebildete Tierpfleger des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Köln bzw. Mitglieder der AG Experimentelle Pneumologie und der AG Translationale Neonatologie ausgeführt.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente und ihre statistischen Auswertungen (molekulargenetische Methoden, proteomanalytische Methoden und histo- und immunhistochemische Färbungen) sind nach entsprechender Einarbeitung durch die Biologisch-technische Assistentin der AG für experimentelle Pneumologie, Christina Vohlen, von mir selbst durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 01.12.2022

Unterschrift: .....

Jonathan Irrgang

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, zuallererst meinen Betreuern Miguel A. A. Alcázar und Nava Mehdiani. Vielen Dank für die Vergabe dieses spannenden Themas und die sehr gute, herzliche und immer geduldige Betreuung. Christina Vohlen danke ich für die gründliche Einarbeitung in die Labortechniken und vielen Tipps bei der praktischen Durchführung. Den anderen Forschenden der AG translationale experimentelle Pädiatrie danke ich für die stets sehr gute Atmosphäre im Forschungspavillon und die Hilfe bei Fragen. Außerdem danke ich natürlich meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden für die moralische Unterstützung während der Promotionszeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Die Developmental Origins of Health and Disease - Hypothese</i>	12
2.2 <b>Adipositas</b>	14
2.2.1 <b>Definition, Prävalenz und Ursachen</b>	14
2.2.2 <b>Folgeerkrankungen von Adipositas bei Erwachsenen</b>	16
2.3 <b>Mütterliche Adipositas beim Menschen</b>	17
2.3.1 <b>Prävalenz und Datenerhebung mütterlicher Adipositas</b>	17
2.3.2 <b>Risiken für Mutter und Kind während der Schwangerschaft</b>	18
2.3.3 <b>Folgen mütterlichen Übergewichts für die Nachkommen: Angeborene Fehlbildungen</b>	19
2.3.4 <b>Beeinflussung von Körpergewicht, metabolischem Profil und Mortalität durch mütterliche Adipositas</b>	19
2.3.5 <b>Funktionelle und morphologische Folgen mütterlicher Adipositas auf das Herz der Nachkommen</b>	21
2.4 <b>Mütterliche Adipositas im Tiermodell</b>	22
2.4.1 <b>Einfluss auf Körpergewicht und Körperzusammensetzung</b>	22
2.4.2 <b>Kardiale Folgen mütterlicher Adipositas</b>	24
2.4.3 <b>Beeinflussung anderer Organsysteme durch mütterliche Adipositas</b>	28
2.5 <b>Wirkung einer Hochfettdiät auf das adulte Herz: Hypertrophie und Remodeling</b>	29
2.6 <b>Herzentwicklung und der Wnt-/ <math>\beta</math>-Catenin Signalweg</b>	30
2.6.1 <b>Makroskopische Herzentwicklung</b>	30
2.6.2 <b>Mikroskopische Herzentwicklung und Progenitorzellpopulationen und ihre Marker</b>	32
2.6.3 <b>Übersicht über den Wnt/<math>\beta</math> -Catenin-Signalweg</b>	33
2.6.4 <b>Die Rolle des <math>\beta</math> -Catenin-Signalweg in der Kardiogenese</b>	35
2.6.5 <b>Die Rolle des <math>\beta</math> -Catenin-Signalwegs in postnatalen kardialen Umbauprozessen</b>	38
2.7 <b>Fragestellung der Arbeit</b>	39
2.7.1 <b>Forschungsfrage</b>	39

2.7.2	Zentrale Hypothese:	39
2.7.3	Experimentelle Forschungsfragen	39
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
3.1	Materialien	40
3.1.1	Versuchstiere und Futter	40
3.1.2	Arbeitsmaterialien	40
3.1.3	Geräte	41
3.1.4	Software	42
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien	42
3.1.6	Stammlösungen und Puffer	44
3.1.7	Kits	45
3.1.8	Primer	45
3.1.9	Antikörper	47
3.2	Versuchstiere	48
3.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	48
3.2.2	Das Hochfett-Diät Modell	48
3.2.3	Präparation und Organentnahme	49
3.2.4	Selektion der Entnahmezeitpunkte	49
3.3	Histologische und immunhistologische Untersuchungen	50
3.3.1	Aufarbeitung zur histologischen Untersuchung	50
3.3.2	Picrosirius-Red-Färbung	51
3.3.3	Immunhistochemische Färbungen	52
3.3.4	Färbetechnik	52
3.3.5	Bildauswertung	54
3.4	Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot	56
3.4.1	Herstellung des Proteinisolates aus dem Gewebe	56
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Kit	57
3.4.3	SDS-PAGE und Western Blot	58
3.4.4	Densitometrische Auswertung der Signalintensität	62
3.5	Untersuchung der Genexpression mittels <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	62
3.5.1	mRNA-Isolation mit TriReagent	62
3.5.2	Photometrische Bestimmung des mRNA-Gehaltes	63

3.5.3	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	64
3.5.4	Primerauswahl für die qPCR	65
3.5.5	Durchführung der Real Time PCR	65
3.5.6	Auswertung der q-RT-PCR	67
3.6	Statistische Auswertung	68
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>69</b>
4.1	Zeitstrahl und Untersuchungszeitpunkte	69
4.2	Ergebnisse der Messungen von Körper- und Herzgewicht	70
4.2.1	Verlauf des Körpergewichts	70
4.2.2	Verlauf von Herzgewicht und Herz/Gewichts-Index	70
4.3	Kardialer Umbau durch mütterliche Hochfett-Diät	72
4.3.1	Picrosirius Red-Färbung	73
4.4	Veränderungen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs	75
4.4.1	Gen- und Proteinexpression der Wnt-Liganden	75
4.4.2	Gen- und Proteinexpression des Progenitormarkers Islet-1	77
4.4.3	Gen- und Proteinexpression des Progenitormarkers Nkx2.5	80
4.5	Veränderungen des Proliferationsmarkers Cyclin D <sub>1</sub>	81
4.5.1	Gen- und Proteinexpression	81
4.5.2	Immunfärbung auf Cyclin D <sub>1</sub>	82
4.6	Wnt - Signalweg: Lrp6, GSK-3 $\beta$ , $\beta$ -Catenin	83
4.6.1	Gen- und Proteinexpression des Rezeptors Lrp6	83
4.6.2	Gen- und Proteinexpression von GSK-3 $\beta$	85
4.6.3	Gen- und Proteinexpression von $\beta$ -Catenin:	86
4.6.4	Immunfärbung auf $\beta$ -Catenin	90
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
5.1	Hintergrund der Arbeit	92
5.2	Veränderung von Körper- und Herzgewicht durch mütterliche Hochfett-Diät	93
5.2.1	Veränderung des Körpergewichts	93
5.2.2	Veränderung von Herzgewicht und Herz/Körpergewichtsindex	95



<b>5.3</b>	<b>Kardialer Umbau und Fibrose durch Mütterliche Hochfett-Diät</b>	<b>96</b>
<b>5.4</b>	<b>Dysregulation von Wnt/ <math>\beta</math>-Catenin Signalweg und Progenitorzellmarkern durch mütterliche Hochfett-Diät</b>	<b>98</b>
5.4.1	Wnt-Liganden	98
5.4.2	Progenitormarker Islet-1 und Nkx2.5	100
5.4.3	Lrp6 Rezeptor, GSK-3 $\beta$ , Cyclin D <sub>1</sub> und $\beta$ -Catenin	102
<b>5.5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>5.6</b>	<b>Limitationen der Arbeit</b>	<b>105</b>
<b>5.7</b>	<b>Ausblick in die Zukunft</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>120</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	120
7.3	Tabellenverzeichnis	122

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Akt	Proteinkinase B
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
APC-Protein	Adenomatöse Polyposis coli –Protein
AST	Aspartat-Aminotranferase
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary / copy DNA</i>
CHD	<i>Coronary heart disease</i>
CT-Wert	<i>Cycle Threshold-Wert</i>
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinases</i>
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonate-Wasser
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Desoxynukleotidtriphosphate</i>
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
E1, 2, ... , 15	1.-, 2.-, ..., 15. Tag der Embryonalentwicklung
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FHF	<i>First Heart Field</i>
FRET	Förster-Resonanzenergieübertragung
FS	<i>Fractional Shortening</i>
G1, 2, ... , 16	1., 2., ..., 16. Gestations-/Schwangerschaftstag
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 $\beta$	Glycogensynthase-Kinase-3 $\beta$
GWG	<i>Gestational weight gain</i>
HFD	Hochfett-Diät, <i>High Fat Diet</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
i.v.	Intravenös
Il-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LA	Linker Vorhof, linksatrial
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>

Lrp6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 6</i>
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
m	Meter
Mfn	Mitofusin protein
min	Minute
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NCD	<i>Noncommunicable diseases</i>
OFT	<i>Outflow Tract</i> , Ausflusstrakt
P1, 2, ...	1.- 2.-, ... postnataler Tag
PCP-Signalweg	<i>Planar Cell Polarity-Signalweg</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RA	Rechter Vorhof, rechtsatrial
RIPA	<i>Radio immuno precipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAse	RNA spaltendes Enzym
ROS	<i>reactive oxigen species</i>
rpm	Runden pro Minute
RV	Rechter Ventrikel, rechtsventrikulär
Sca1	<i>stem cell antigen-1</i>
SD	Standard-Diät, <i>Standard Diet</i>
SDS	Natriumlaurylsulphat/Natriumdodecylsulphat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHF	<i>Second Heart Field</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SV	<i>Sinus venosus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Polysorbate 20
Tbx5	<i>T-box transcription factor-5</i>
TCF7	<i>Transcription Factor 7</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wnt	Wingless/Int1

## 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** In den letzten Jahrzehnten kam es weltweit zu einer starken Zunahme der Prävalenz der Adipositas. Mütterliche Adipositas besitzt negative Implikationen für die Gesundheit der Nachkommen im Verlauf, insbesondere eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Veränderte Bedingungen in einem kritischen Zeitfenster der Entwicklung können zu langfristigen Veränderungen von Organstruktur und -funktion führen. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wurde als zentraler Regulator der kardialen Entwicklung beschrieben. **Hypothese:** Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass mütterliche Adipositas über eine Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sowie kardialer Stammzellmarker frühe morphometrische Veränderungen am Herzen induziert. **Modell und Methoden:** Es wurde ein etabliertes Mausmodell genutzt, in dem weibliche Mäuse (C57Bl/6N) eine hochkalorische Hochfett-Diät (HFD) erhielten; die Kontrollmäuse erhielten eine Standard-Diät (SD). Mäuse beider Gruppen wurden nach 7-8 Wochen verpaart und verblieben dann auf ihrer respektiven Diät. Die Nachkommen der HFD- und SD- Muttertiere erhielten ab P21 SD bis P70. Die Organe der Nachkommen wurden intrauterin (G16), früh (P1/P4 und P21) und spät postnatal (P70) entnommen. Es wurde die Protein- und mRNA-Expression des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, sowie von Stammzell-, Proliferations- und Fibrosemarkern analysiert. **Ergebnisse:** Es wurde eine Verminderung des Geburtsgewichtes, eine postnatal akzelerierte Gewichtszunahme sowie eine mögliche frühe Hypertrophie durch HFD beobachtet. Eine dynamische Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg mit einer verstärkte  $\beta$ -Catenin-Aktivität intrauterin an G16 und eine verminderte Aktivität an P1/4 könnte hier ursächlich eine Rolle spielen. Weiterhin lag früh postnatal eine verminderte Expression der Progenitormarker Islet-1 und Nkx2.5 vor. Eine verminderte  $\beta$ -Catenin Aktivität mit konsekutiver verminderter Proliferation könnte möglicherweise zu einem reduzierten Pool der Islet-1 positiven Stammzellen beitragen. Hierdurch könnte es zu einer relativ vermehrten Belastung des Myokards mit konsekutiver myokardialer Hypertrophie kommen, wobei weitere, durch die mütterliche Hochfett-Diät bewirkte Effekte ätiologisch beteiligt sein könnten. **Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen einer mütterlichen HFD und der adversen Beeinflussung kardialer Progenitorzellen aufgezeigt. Die beeinträchtigte Proliferation, welche zu einer möglichen sekundären Hypertrophie führt, bietet einen Erklärungsansatz für die beobachteten Auswirkungen von mütterlicher Adipositas auf das Herz der Nachkommen. Durch ein verbessertes Verständnis der Mechanismen perinataler Programmierung am Herzen würde in der translationalen Anwendung die Entwicklung neuer Strategien und Ziele in Prävention und Therapie ermöglicht werden, um Betroffene frühzeitig zu begleiten.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die *Developmental Origins of Health and Disease* - Hypothese

Aufgrund ihres häufigen Auftretens und ihrer enormen gesundheitlichen Bedeutung spielt die Erforschung von Ätiologie, Pathogenese und Therapie der nichtübertragbaren, chronischen Erkrankungen (*non-communicable diseases*) seit jeher eine große Rolle in der medizinischen Forschung.

Das im Verlauf der letzten Dekaden entwickelte *Developmental Origins of Health and Disease*-Konzept (DOHaD) stellt eine pathogenetische Verbindung zwischen den Umwelteinflüssen in der frühen Phase der Entwicklung und dem Auftreten von Erkrankungen im weiteren Verlauf des Lebens her. Es wird davon ausgegangen, dass adverse Einflüsse während einer kritischen Phase der Organentwicklung zu dauerhaften Veränderungen von Organstruktur und -funktion führen, welche zeitlebens bestehen bleiben und für die spätere Entwicklung von Erkrankungen prädisponieren können. Hierfür wird der Begriff „perinatale Programmierung“ verwendet. Es besteht eine starke Evidenz für die Existenz einer Reihe schädlicher Einflussfaktoren, welche unterschiedliche Organsysteme betreffen können. Schädliche intrauterine Einflüsse sind beispielsweise Malnutrition, plazentare Insuffizienz, Infektionen, Exposition gegenüber Toxinen, aber auch adverse hormonelle und metabolische Einflüsse, wie sie etwa bei einer mütterlichen Adipositas oder diabetischen Stoffwechsellage bestehen [1].

Die Ursprünge des *Developmental Origins of Health and Disease*-Konzeptes gehen auf Studien zurück, welche von David Barker und Nicholas Hales sowie von Günter Dörner durchgeführt wurden. Barker et al befassten sich anfangs mit den Folgen eines niedrigen Geburtsgewichtes. Hierzu untersuchten sie epidemiologische Daten in Geburts- und Sterberegistern. Sie stellten zunächst fest, dass eine Korrelation von Säuglingssterblichkeit und geringem Geburtsgewicht bestand. Des Weiteren konnten sie ein geringeres Geburtsgewicht mit einer erhöhten Mortalität an ischämischer Herzerkrankung im Verlauf assoziieren. Barker postulierte, dass veränderte intrauterine Bedingungen, im Speziellen eine *in utero*-Minderversorgung, für die Effekte verantwortlich seien und neben den klassischen kausalen Faktoren Lebensstil und Genetik als neue Risikofaktoren in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen herangezogen werden sollten. Er verwendete den Begriff „phänotypische Plastizität“, um auszudrücken, dass es bei gleicher vorliegender Geninformation abhängig von der vorherrschenden Umgebung in der frühesten Lebensphase zur Ausbildung verschiedener metabolischer Phänotypen kommen kann [2-5].

Eine besondere Kohorte stellten Personen dar, die zur Zeit des Niederländischen „Hungerwinters“ im Jahr 1944/45 geboren wurden. Diese waren intrauterin und früh postnatal Malnutrition ausgesetzt; im weiteren Verlauf bestand allerdings ein reichhaltiges Nahrungsangebot. Diese Patienten wiesen häufig ein geringes Geburtsgewicht auf, zeigten anschließend jedoch eine akzelerierte Gewichtszunahme. Dies führte zur Entwicklung der Hypothese des „sparsamen Phänotyps“ (*thrifty phenotype*). Gemäß dieser Hypothese führt eine intrauterine Mangelsituation dazu, dass der Körper auf eine postnatale Mangelsituation vorbereitet wird. Liege demgegenüber postnatal ein Überfluss vor, besteht ein „Mismatch“. Durch das erhöhte Nährstoffangebot kommt es durch eine weiterhin auf „Sparsamkeit programmierte“ metabolische Stoffwechsellage zu einem schnellen Aufholwachstum. So konnte gezeigt werden, dass etwa die Proliferation und Perfusion der Betazellen des Pankreas als Folge beeinträchtigt ist, sodass die Insulinsekretion gestört ist. Im weiteren Verlauf ist folglich das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes Typ 2 und von Adipositas erhöht [6].

Während Hales und Barker sich überwiegend mit den Folgen eines geringen Geburtsgewichtes beschäftigten und die *in utero*-Malnutrition als führende Ursache identifizierten, zeigen epidemiologische Daten, dass auch ein erhöhtes Geburtsgewicht mit einer höheren Rate an Adipositas, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist [7]. In den 70er und 80er Jahren untersuchten Dörner et al den Einfluss eines mütterlichen Diabetes mellitus während der Schwangerschaft auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 der Nachkommen. Sie stellten fest, dass ein unkontrollierter mütterliche Diabetes mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus der Nachkommen assoziiert war. Kohorten aus späteren Zeiträumen, in denen eine mütterlichen Hyperglykämie regelhaft therapiert und ein ausgeprägter fetaler Hyperinsulinismus so verhindert wurde, wiesen geringere Raten an Diabetes und eine verbesserte Langzeitprognose auf. Dörner et al brachten den fetalen Hyperinsulinismus mit erhöhten Raten von Adipositas, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung und prägten den Begriff „intrauterine Programmierung“ [8-10]. Mütterliche Überernährung und, im Fall einer gestörten Glukosetoleranz, mütterliche Hyperglykämie führen zu einem erhöhten Nährstofftransfer durch die Plazenta und induzieren einen fetalen Hyperinsulinismus. Dies bewirkt eine fetale Makrosomie und führt bereits beim Fetus zu einer gestörten Insulinsensitivität. Das Risiko für Adipositas ist im Verlauf erhöht. Mütterliche Adipositas bewirkt somit durch die metabolische Programmierung eine nicht-genetische Übertragung von Adipositas und Diabetes auf die nächste Generation [7].

Da die Prozesse der Entwicklung von Organsystemen nicht nur intrauterin, sondern auch postnatal stattfinden und adverse Einflussfaktoren nicht nur *in utero*, sondern auch während der Laktationszeit und darüber hinaus bestehen können, scheint eine scharfe Trennung in Prä- und

Postnatalperiode nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurde der Begriff der fetalen oder intrauterinen Programmierung zur perinatalen Programmierung erweitert. Da die Entwicklung teilweise, etwa im Falle des Immunsystems, bis in die Pubertät andauert, wurde der Begriff *Developmental Origin of Health and Disease* als allgemein gefasster Überbegriff verwendet [11]. Als zugrundeliegende molekulare Prozesse werden heute zudem epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung, microRNAs und Histon-Modifikationen untersucht [12].

Es ist mittlerweile weithin akzeptiert, dass die Basis für die Entwicklung vieler Erkrankungen bereits in der frühesten Phase der Entwicklung gelegt wird. Das Aufdecken der zugrundeliegenden pathophysiologischer Prozesse ist wichtig, um effektive Präventions- und Therapiemaßnahmen planen und begründen zu können.

## **2.2 Adipositas**

### **2.2.1 Definition, Prävalenz und Ursachen**

Die Begriffe Übergewicht und Adipositas bezeichnen einen Zustand erhöhten Körpergewichtes durch pathologisch erhöhte Fettakkumulation, welcher die Gesundheit auf vielfältige Weise beeinträchtigt.

Eine Quantifizierung des Übergewichts erfolgt nach der *World Health Organization* (WHO) mithilfe des *Body Mass Index* (BMI). Der BMI wird durch Bildung des Quotienten von Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern errechnet. Es erfolgt eine Einteilung in mehrere Schweregrade. Übergewicht bezeichnet dabei einen BMI von  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ; ab  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  liegt Adipositas Grad I vor. Ab  $\geq 35 \text{ kg/m}^2$  besteht Grad II; ab  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$  liegt mit Grad III eine Adipositas *permagna* vor [13, 14].

Seit den 1980er Jahren konnte weltweit eine starke Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas beobachtet werden. Dabei liegt in den industrialisierten Ländern insgesamt eine höhere Prävalenz vor. So galten im Jahr 2015 in Deutschland 54% der erwachsenen Bevölkerung als übergewichtig und 18,1% als adipös [15]. Die weltweite Prävalenz liegt insgesamt etwas niedriger: Nach Schätzung der WHO waren im Jahr 2016 etwa 39% der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig und 13% adipös [13]. Während in den Industrieländern seit Mitte der 2000er Jahre jedoch eine Plateaubildung beobachtet werden konnte, stieg die Prävalenz in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen weiterhin stark an [16, 17]. Das Problem von Übergewicht und Adipositas existiert in einigen Ländern teilweise parallel zu Mangelernährung, so dass die Gesellschaften und jeweiligen Gesundheitssysteme die Auswirkungen einer doppelten Krankheitslast zu bewältigen haben [13, 16].

Weltweit nimmt mit steigendem Alter die Prävalenz von Adipositas zu. Das Auftreten weist ferner geschlechtsspezifische Unterschiede auf, welche in Beziehung zum Einkommensniveau des Landes stehen. In Ländern mit hohem Einkommen weisen Männer eine höhere Prävalenz von Übergewicht ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) auf als Frauen. Frauen weisen eine geringere Prävalenz an Übergewicht, jedoch eine erhöhte Prävalenz von Adipositas auf ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). In Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen sind Frauen sowohl von Übergewicht als auch Adipositas vermehrt betroffen [17]. Sozioökonomische Unterschiede spielen bezüglich der Prävalenz ebenfalls eine große Rolle: In entwickelten Ländern sind sozioökonomisch schwächer gestellte Menschen überproportional häufig von Übergewicht und Adipositas betroffen [16]. Insbesondere Frauen in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen stellen somit eine Risikogruppe dar.

Kinder und Jugendliche sind ebenfalls von einem Anstieg der Rate an Übergewicht und Adipositas betroffen. Eine gepoolte Analyse der *NCD Risk Factor Collaboration* der Jahre 1975-2016 zeigte, dass die altersstandardisierte Prävalenz weltweit bei Mädchen von 0,7% auf 5,6% und bei Jungen von 0,9% auf 7,8% stieg. Dabei existieren teilweise erhebliche Unterschiede. Die Bandbreite der Prävalenz von Adipositas reicht von >30% in den pazifischen Inselstaaten bis <1% in einigen südasiatischen und afrikanischen Ländern. Wie bei Erwachsenen ist es in Ländern mit hohem Einkommen in den letzten Jahren zu einer Plateaubildung, jedoch auf relativ hohem Niveau, gekommen [16].

Bezüglich der starken Steigerung der Prävalenz der Adipositas wird veränderten Umwelt-, Lebens-, und Ernährungsgewohnheiten eine Hauptrolle zugeschrieben. Zunehmende Urbanisation, Verfügbarkeit prozessierter energiereicher Nahrung und verminderte physische Aktivität durch passive Mobilität, sessile Arbeitsumgebung und Freizeitgestaltung tragen zum Ansteigen der Prävalenz bei [14, 18]. Diese Umweltfaktoren werden im Begriff „*obesogenic environment*“ zusammengefasst [19]. Darüber hinaus besteht wachsende Evidenz für die Bedeutung der frühen Phase der Entwicklung in der Pathogenese von Adipositas und des metabolischen Syndroms. Sowohl mütterliche Unterernährung als auch mütterliche Adipositas oder eine in der Schwangerschaft vorliegende gestörte Glukosetoleranz sind mit einem erhöhten Risiko assoziiert und können wiederum mütterliche Adipositas und gestörte Glukosetoleranz in einer späteren Schwangerschaft der Nachkommen begünstigen. Der so entstehende *Circulus vitiosus* kann zu einem weiteren Zuwachs der Krankheitslast an Adipositas, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen beitragen [20].



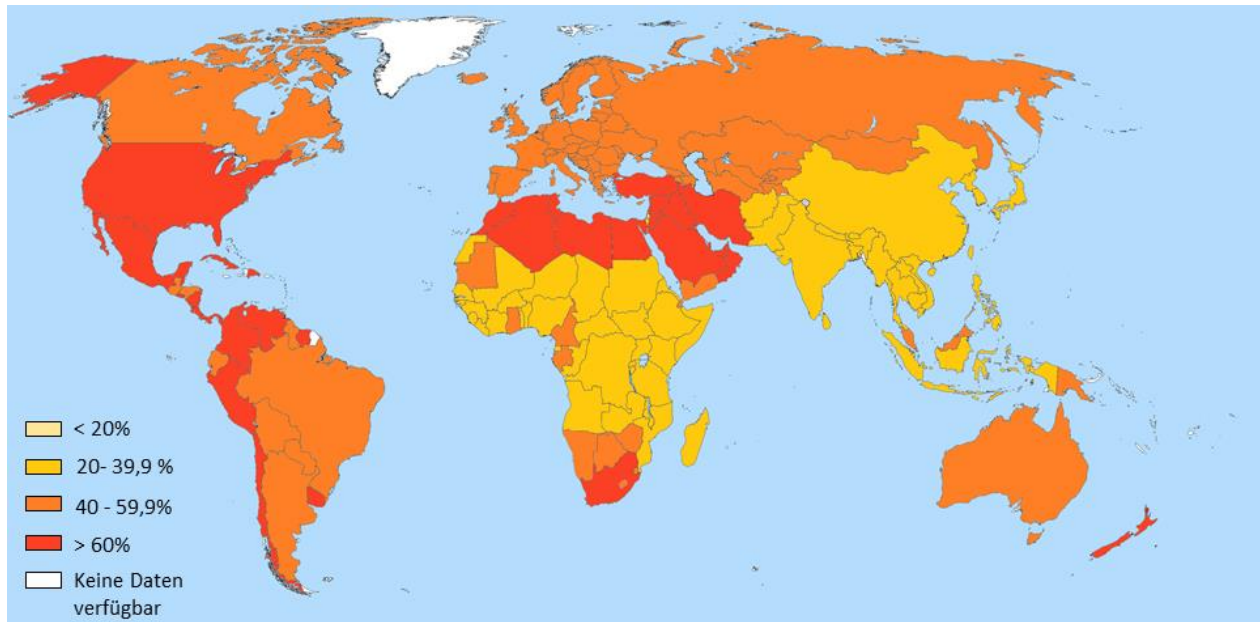


Abb. 1: Prävalenz von Übergewicht (BMI  $\geq$  25) bei erwachsenen Frauen (18+), 2016, altersstandardisierte Schätzung der WHO. Daten der WHO 2017 [21]; Karte editiert von Dlouhý [22].

### 2.2.2 Folgeerkrankungen von Adipositas bei Erwachsenen

Übergewicht und Adipositas sind mit zahlreichen Folgeerkrankungen assoziiert und eine führende Ursache für eine wachsende Krankheitslast nichtübertragbarer, chronischer Krankheiten (*noncommunicable diseases*, NCDs). Diese führen zu einem Verlust an Lebensqualität und Lebensjahren von Millionen Menschen und werden in Zukunft eine zunehmende Belastung für die Gesundheitssysteme weltweit darstellen [14]. Kardiovaskuläre Erkrankungen, Karzinome, chronische Atemwegserkrankungen und Diabetes stellen die vier wichtigsten Gruppen der NCDs dar, welche laut Angaben der WHO 71% der weltweiten Todesfälle sowie 80% der vorzeitigen Todesfälle zwischen 30 und 69 Jahren verursachen. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems stellen dabei weltweit die Haupttodesursache dar. Insgesamt lassen sich 31% aller Sterbeereignisse auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen; dabei machen Myokardinfarkt und Schlaganfall mit 85% den Hauptteil aus [23].

Physische Inaktivität, ungesunde Ernährung sowie der schädliche Gebrauch von Alkohol sind die wichtigsten pathogenetischen Faktoren in der Entwicklung von mit Adipositas assoziierten metabolischen Risikofaktoren. Häufig ist die Ausbildung eines metabolischen Syndroms, das u.a. Adipositas, arterieller Hypertonie, Zucker- und Fettstoffwechselstörungen umfasst, die Folge. Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie stellen wiederum zusätzliche Risikofaktoren dar, welche neben dem schädlichen Tabakgebrauch insbesondere zu einer

verstärkten Atherosklerose und zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. So treten koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Schlaganfall bei Vorliegen von Adipositas signifikant häufiger auf [13].

Des Weiteren besteht bei Menschen mit Adipositas eine erhöhte Inzidenz bestimmter Karzinome, beispielsweise Mamma-, Endometrium-, Niere-, Prostata-, Ösophagus- und Kolorektales Karzinom. Es wird geschätzt, dass Adipositas für etwa 20% der insgesamt auftretenden Karzinome verantwortlich ist. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer typischer Folgeerkrankungen, welche mit Übergewicht und Adipositas assoziiert sind, unter anderem eine reduzierte körperliche Belastbarkeit, muskuloskelettale Beschwerden und Arthrose. Es treten vermehrt psychosoziale Probleme auf, insbesondere Depression. Demenz tritt häufiger auf. Typische gastroenterologische Erkrankungen sind die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und der gastroösophageale Reflux. Des Weiteren kommt es häufiger zu Nierenfunktionseinschränkung, Gicht, polyzystischem Ovarsyndrom, Potenz- und Fertilitätsstörungen. Es kann zum Auftreten eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms kommen; die Inzidenz von Asthma ist erhöht. Darüber hinaus scheint Adipositas sich ebenfalls auf die Funktion des Immunsystems auszuwirken, sodass eine Anfälligkeit gegenüber Infektionen besteht. So treten Pilz-, Haut- und postoperative Infektionen häufiger auf. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Autoimmunerkrankungen, unter anderem Psoriasis, Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis ist erhöht [14, 24]. Insgesamt führt Adipositas zu zahlreichen gesundheitlichen Einschränkungen und ist mit einem erheblichen Verlust an Lebensjahren und Lebensqualität verbunden. Auf gesellschaftlicher Ebene verursachen Adipositas und die damit assoziierten chronischen Folgeerkrankungen enorme Kosten und eine Belastung der Gesundheitssysteme weltweit [25].

## **2.3 Mütterliche Adipositas beim Menschen**

### **2.3.1 Prävalenz und Datenerhebung mütterlicher Adipositas**

Frauen im gebärfähigen Alter sind von der ansteigenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in der Gesamtbevölkerung ebenfalls betroffen. Dies ist von besonderem Interesse, da das Vorliegen von mütterlichem Übergewicht oder mütterlicher Adipositas Folgen für die Schwangerschaft, aber auch für die spätere Entwicklung des Kindes mit sich bringt. Für die Evaluation einer Adipositas während der Schwangerschaft stellt die Berechnung des BMIs jedoch kein adäquates Maß dar. Aus diesem Grund wird in Studien und Statistiken in der Regel das prägestationelle Gewicht verwendet, um den prägestationellen BMI zu errechnen. Dieses kann meist nur anamnestisch erfragt werden, da die Vorstellung der Schwangeren in der Regel erst

nach Eintritt der Schwangerschaft erfolgt. Alternativ wird das beim ersten antenatalen Arztbesuch gemessene Gewicht zur Berechnung des prägestationellen BMIs verwendet, was allerdings zu einer Überschätzung des BMIs führen kann. Neben dem prägestationellen Gewicht wird außerdem als weiterer Vergleichsparameter häufig die Gewichtszunahme während der Schwangerschaft (*gestational weight gain*, GWG) herangezogen [26].

Die Erhebung valider Daten zu mütterlicher Adipositas wird dadurch erschwert, dass statistische Daten zu prägestationellem Gewicht und BMI nicht routinemäßig erhoben werden und nur eingeschränkt verfügbar sind. In Europa lagen hierzu für das Jahr 2015 Daten aus 12 von 31 Ländern vor. Laut Angaben des *European Perinatal Health Report* von 2018 betrug die Prävalenz von Übergewicht oder Adipositas ungefähr 30% bis 50%, von Adipositas etwa 8% bis 26% der schwangeren Frauen. Dabei bestehen erhebliche nationale Unterschiede. In Deutschland waren 38% der schwangeren Frauen übergewichtig oder adipös und annähernd 15% adipös [27].

### **2.3.2 Risiken für Mutter und Kind während der Schwangerschaft**

Mütterliche Adipositas stellt sowohl ein Risiko für die Entwicklung als auch den Verlauf einer Schwangerschaft dar. Zunächst ist Adipositas mit herabgesetzter Fertilität assoziiert. Außerdem ist das Risiko für einen Abort [26] sowie für eine Totgeburt erhöht. Dabei ist ein höherer BMI mit einer erhöhten Rate assoziiert [28]. In einer retrospektiven Kohortenstudie aus den USA von Yao et al waren annähernd 20% der Totgeburten Adipositas-assoziiert [29].

Bei übergewichtigen und adipösen Frauen besteht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Präeklampsie, Gestationsdiabetes, Makrosomie, intrauterine Wachstumsrestriktion und Frühgeburtlichkeit vor der 32. Schwangerschaftswoche [30-32]. Häufig tritt eine verstärkte Gewichtszunahme während der Schwangerschaft auf. Dies beeinflusst das eigene kardiovaskuläre Risikoprofil der Mutter negativ und beeinträchtigt folgende Schwangerschaften. Ein Gestationsdiabetes und dessen Vorstufe, eine mütterliche Insulinresistenz, können eine Makrosomie des Fetus bewirken. Die fetale Makrosomie ist im Wesentlichen auf ein vermehrtes Fettgewebe und einen erhöhten Körperfettanteil des Kindes zurückzuführen [31]. Makrosomie des Kindes kann zu einer verlängerten Dauer des Geburtsvorgangs führen und Geburtskomplikationen verursachen. Aus diesem Grund ist bei übergewichtigen und adipösen Müttern häufiger eine Sectio notwendig. Bei Durchführung einer Sectio besteht ein erhöhtes Risiko an Komplikationen, Blutungen und Infektionen [33, 34]. *Postpartum* weisen adipöse Frauen gegenüber Normalgewichtigen erhöhte Raten an Thrombembolien, Depression und Schwierigkeiten beim Stillen auf [26].

### **2.3.3 Folgen mütterlichen Übergewichts für die Nachkommen: Angeborene Fehlbildungen**

Neben mütterlichen und unmittelbar die Schwangerschaft betreffenden Komplikationen ist mütterliche Adipositas mit negativen kurzfristigen und langfristigen Beeinträchtigungen der Gesundheit der Nachkommen assoziiert. In einer Metaanalyse verschiedener klinischer Studien von Stothard et al wiesen Nachkommen adipöser Mütter ein höheres Risiko für kongenitale Fehlbildungen auf. Es bestand eine erhöhte Rate an Neuralrohrdefekten inklusive Spina bifida, kardiovaskulären Fehlbildungen, Kiefer-Gaumenspalten, anorektalen Atresien, Hydrozephalien sowie an Fehlbildungen der Extremitäten [35]. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse sind die Fehlbildungen des Herzens, die durch verschiedene Studien gut belegt sind. So wurde in mehreren Fall-Kontroll-Studien sowie einer prospektiven Kohortenstudie gezeigt, dass Nachkommen von Müttern mit Adipositas häufiger Herzfehlbildungen aufweisen, auch nach Adjustieren auf Confounder wie z.B. gestörten Glukosemetabolismus [29, 36, 37]. Die Assoziation von Herzfehlern mit Müttern mit Adipositas *permagna* (Grad III; BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) zeigte sich am stärksten ausgeprägt [36-38]. Die größte Assoziation fanden Madsen et al bei links- und rechtsventrikulären Ausflusstraktdefekten [36]. Insgesamt zeigen die Daten der klinischen Studien, dass Adipositas der Mutter ein unabhängiger Risikofaktor für die Ausbildung eines angeborenen Herzfehlers ist und demzufolge die normale makroskopische Entwicklung des Herzens stören kann.

### **2.3.4 Beeinflussung von Körpergewicht, metabolischem Profil und Mortalität durch mütterliche Adipositas**

Neben den angeborenen Fehlbildungen existieren weitere langfristige Konsequenzen und Risiken für die Nachkommen, unter anderem ein verändertes metabolisches Profil. Viele der Effekte werden dabei sowohl mit einem erhöhten prägestationellen BMI als auch mit einer exzessiven Gewichtszunahme der Mutter während der Schwangerschaft in Verbindung gebracht. Studien wiesen auf, dass ein erhöhter mütterlicher prägestationeller BMI mit einer erhöhten Rate an Adipositas in der Kindheit assoziiert ist [39-42]. Eine prospektive Kohortenstudie von Gaillard et al zeigte, dass ein erhöhter prägestationeller BMI und eine Gewichtszunahme während der frühen Schwangerschaft mit einem höheren BMI der Nachkommen und einem erhöhten kardiometabolischen Risikoprofil während Kindheit und Jugend einhergeht [40]. Auch eine Metaanalyse von Yu et al berichtete über ein dreifach erhöhtes Risiko für Adipositas in der Kindheit bei Nachkommen von Müttern mit Adipositas [41]. In einer Kohortenstudie von Hochner et al war ein höherer mütterlicher prägestationeller BMI unabhängig von gestationaler Gewichtszunahme und anderen Confoundern mit zahlreichen adversen Effekten bei

Nachkommen in einem Alter von 32 Jahren assoziiert. So bestand ein signifikant höherer BMI, größerer Taillenumfang, erhöhter systolischer und diastolischer Blutdruck, erhöhte Insulin- und Triglyceridlevel sowie ein geringeres LDL-Level [42]. Das Vorliegen von Gestationsdiabetes stellt einen zusätzlichen Risikofaktor dar, der sich negativ auf die metabolische Gesundheit der Nachkommen auswirkt [26, 43]. Neben prägestationeller mütterlicher Adipositas und exzessiver Gewichtszunahme während der Schwangerschaft gibt es weitere Faktoren, welche mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung kindlicher Adipositas einhergehen. In einer Studie von Robinson et al wurden folgende weitere Risikofaktoren für das Vorliegen einer Adipositas im Alter von 4 und 6 Jahren identifiziert: niedriger mütterlicher Vitamin D-Status (<64 nmol/L), Rauchen während der Schwangerschaft und keine oder sehr kurze Stilldauer von unter einem Monat [39].

Adipositas während der Schwangerschaft ist mit einer erhöhten frühzeitigen Mortalität der Nachkommen assoziiert. Es besteht bei den Nachkommen eine höhere Hospitalisierungsrate, eine höhere spezifische Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen und eine höhere Gesamtmortalität im Erwachsenenalter [44, 45]. Die Helsinki Birth Control Study, welche über 13.000 Männer und Frauen der Geburtsjahrgänge 1934-1944 einschloss, untersuchte die Ereignisse Tod, Auftreten von Karzinomen, koronarer Herzkrankheit, Schlaganfall und Diabetes bei den Nachkommen. Die Risikoabschätzung wurde um die Confounder sozioökonomischer Status im Kindes- und Erwachsenenalter, Einkommen und Bildungsstatus bereinigt, welche stark mit den untersuchten Ereignissen korrelierten. Alle genannten Ereignisse traten bei den Nachkommen von Müttern mit Adipositas häufiger auf, wobei die Ergebnisse nur teilweise signifikant waren. Eine signifikante Assoziation bestand bei Diabetes und Schlaganfall bei Frauen, koronarer Herzkrankheit bei Männern und kardiovaskulären Erkrankungen insgesamt bei beiden Geschlechtern [46].

Asthma in der Kindheit stellt eine weitere häufige Krankheitsentität dar, welche mit mütterlicher Adipositas assoziiert ist. Prägestationelles Übergewicht und Adipositas führten in Metaanalysen zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Asthma in der Kindheit [47]. Eine exzessive Gewichtszunahme in der Schwangerschaft war ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz assoziiert [48]. Des Weiteren wurde die Existenz neurokognitiver Auswirkungen belegt. So war die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Autismus-Spektrum-Störungen, Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom, Entwicklungsverzögerungen und emotionale Regulationsstörungen erhöht [49].

### **2.3.5 Funktionelle und morphologische Folgen mütterlicher Adipositas auf das Herz der Nachkommen**

Kulkarni et al berichteten, dass bei Nachkommen adipöser Mütter bereits während der Fetalzeit funktionelle Veränderungen der myokardialen Funktion und teilweise morphologische Veränderungen vorlagen. Die Autoren bestimmten in einer vergleichenden klinischen Studie myokardiale Funktions- und Strukturparameter von Feten mit einem mittleren Gestationsalter von ca. 25 Wochen mittels fetaler Echokardiographie. Hierbei wiesen Feten von Müttern mit Adipositas oder Gestationsdiabetes abnorme systolische Funktionsparameter auf. Unter Anderem waren der globale longitudinale und zirkumferentielle *Strain*, welcher ein Maß für die systolische Verkürzung des Myokards darstellt, vermindert. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in der Diabetes- und Adipositasgruppe war zwar noch normwertig, jedoch signifikant vermindert. Die Dicke des interventrikulären Septums zeigte sich in der Diabetesgruppe signifikant erhöht, hinweisend auf linksventrikuläre Hypertrophie. Andere Veränderungen der Strukturparameter wurden beobachtet, erreichten jedoch größtenteils keine statistische Signifikanz [50].

Ebenso wurde in einer klinischen Studie von Nyren et al die kardiale Funktion und Struktur von Kindern normalgewichtiger und adipöser Mütter mittels Echokardiografien evaluiert. Auch hier wiesen die Nachkommen von Müttern mit Adipositas bei Geburt und im Alter von 6-8 Wochen eine beeinträchtigte systolische und diastolische Funktion, ein verbreitertes interventrikuläres Septum, einen reduzierten Globalen *Strain* und reduzierte *Strain Rate* sowie eine reduzierte Gewebedopplergeschwindigkeit auf [51]. Es besteht ein großes Interesse daran, Interventionen zu definieren, welche die negativen Folgen mütterlicher Adipositas begrenzen können. Bisher konnte keine effektive Therapie identifiziert werden. Lebensstilinterventionen, welche vermehrte körperliche Aktivität vorsahen, hatten keine Veränderung des Outcomes zufolge. Die Durchführung solcher Interventionsstudien, welche Lebensstilveränderungen vorsehen, wird durch eine unklare Therapieadhärenz erschwert [51, 52].

## **2.4 Mütterliche Adipositas im Tiermodell**

Um die Auswirkungen von Adipositas in der Schwangerschaft näher zu untersuchen und um die zugrundeliegenden kausalen Zusammenhänge aufzudecken, werden tierexperimentelle Studien genutzt. Hierzu werden häufig Mäuse, Ratten und Schafe als Modellorganismus verwendet. Die Nachkommen sind intrauterin sowie während der Laktationszeit den durch die mütterliche Adipositas veränderten metabolischen, inflammatorischen und hormonellen Einflüssen ausgesetzt.

### **2.4.1 Einfluss auf Körpergewicht und Körperzusammensetzung**

Durch mütterliche Adipositas werden der Verlauf des Körpergewichtes, die Körperzusammensetzung und der Metabolismus der Nachkommen verändert. So sind unter anderem der Glukosestoffwechsel sowie der Seruminsulin- und -leptinspiegel verändert [53, 54].

In den verwendeten Tiermodellen wurde den Muttertieren eine energiereiche, obesogene Diät verabreicht. Hierzu wurde oft eine Hochfett-Diät (HFD) mit erhöhtem Anteil an Fett verwendet [53-56]. So wies die von Turdi et al verwendete HFD exemplarisch einen Anteil des Fetts von 45% der Gesamtkalorien auf. Der Fettanteil setzte sich dabei aus 88,7% Schweinefett mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren und 12,3% Sojaöl zusammen [57]. In einigen Studien wurde eine obesogene Diät mit erhöhtem Anteil von einfachen Kohlenhydraten und Fett verwendet (*Western Style Diet*) [58, 59]. Ein weiteres verwendetes Modell mütterlicher Adipositas, welches bei Schafen Anwendung findet, verwendete eine Fütterung von 150% der Menge der empfohlenen Diät [60-62].

Durch die jeweilige obesogene Diät wurde bei den Muttertieren ein Phänotyp mütterlicher Adipositas und eine gestörte Glukosetoleranz induziert. Eine Publikation von Kasper et al unter Verwendung desselben Tiermodells wie des in der Arbeit verwendeten zeigte eine Reduktion des Geburtsgewichts bei den Nachkommen. Postnatal kam es zu einem akzelerierten Aufholwachstum, so dass am 21. postnatalen Tag (P21) in der HFD-Gruppe ein signifikant höheres Körpergewicht erreicht wurde [55]. Entsprechende Ergebnisse wurden auch von Turdi et al berichtet: Mütterliche HFD führte zu initial verringertem Geburtsgewicht der Nachkommen. Während der Laktationszeit kam es zu einem akzelerierten Aufholwachstum der Nachkommen, sodass zum Zeitpunkt des Absetzens an P21 ein erhöhtes Körpergewicht vorlag. Zusätzlich wurde eine Reduktion der Wurfgröße beobachtet [56]. De Jong et al beobachteten keine Unterschiede des Körpergewichts an P1, jedoch ein erhöhtes Körpergewicht mit erhöhter Fettmasse an P10. In einer Studie von Loche et al, welche eine obesogene zucker- und fettreiche mütterliche Diät verwendete, bestand an P2 kein signifikanter Gewichtsunterschied, an P14 und beim Absetzen

vom Muttertier an P21 ein signifikant erhöhtes Körpergewicht. Nach dem Wechsel von HFD auf Standarddiät (SD) beim Absetzen bestand im Alter von 8 Wochen (ca. P56) kein Unterschied des Gewichts im Vergleich zu den Nachkommen von SD-gefütterten Kontrollmuttertieren. Wurde auf eine obesogene Diät gewechselt, führte dies zu erhöhtem Körpergewicht; zu diesem Zeitpunkt ließ sich kein Effekt der mütterlichen Diät mehr beobachten [59]. Demgegenüber zeigte die Studie von Turdi et al einen additiven Effekt der mütterlichen HFD, wenn an P21 auf eine HFD umgestellt wurde [56].

Neben dem erhöhten Körpergewicht war bei den Nachkommen der HFD ernährten Muttertiere auch die Körperzusammensetzung verändert. So ließ sich am Ende der Laktationsphase an P21 eine dreifache Zunahme des epigonadalen weißen Fettgewebes beobachten [55]. Ein in geringerem Ausmaß, jedoch signifikant vermehrtes weißes epigonadales Fettgewebe persistierte auch am 70. postnatalen Tag (P70), nachdem nach Beendigung der Laktationszeit auf reguläre SD umgestellt wurde [55]. Dies zeigt, dass die mütterliche HFD einen langfristigen Einfluss auf die Körperzusammensetzung der Nachkommen nehmen kann. Des Weiteren lagen veränderte hormonelle und metabolische Parameter des Stoffwechsels vor, insbesondere der Leptin- und Insulinstoffwechsel im Serum waren betroffen. So wiesen Nachkommen von adipösen Muttertieren einen verstärkten und verlängerten neonatalen Leptin-Schub auf [58]. An P21 ließ sich ein um das Zweifache erhöhter Leptinspiegel im Serum beobachten und die Leptin mRNA-Expression im weißen Fettgewebe zeigte sich um das 15-fache erhöht. Außerdem lag ein erhöhter Nüchternblutzucker im intraperitonealen Glukosetoleranztest mit einer gestörten Glukosetoleranz vor. Die Insulinkonzentration im Serum war auf das Vierfache erhöht, so dass insgesamt von einer vorliegenden Insulinresistenz ausgegangen werden kann [55]. Die Erhöhung des Serumleptin- und -insulinspiegels war in einigen experimentellen Studien nur transient und nach Umstellung auf Standard-Diät (SD) nicht mehr festzustellen. In anderen persistierte ein erhöhter Leptinspiegel [53]. Bei Loche et al wiesen Nachkommen in einem Alter von 8 Wochen erhöhte Werte für Körperfettmasse, Leptin und Insulin als Folge einer zucker- und fettreiche obesogene Diät auf [59]. Die Ergebnisse zeigen, dass mütterliche HFD während Gestation und Laktation zu langfristigen Veränderungen der Körperzusammensetzung mit einer Vermehrung des Fettgewebes führen kann, welche über die Laktationsperiode hinausgehen [55]. Auch in anderen experimentellen Modellen mit Ratten und Mäusen führte eine durch eine fett- und zuckerreiche Diät induzierte Adipositas der Muttertiere bei den Nachkommen zu Adipositas, Glukoseintoleranz und Hyperinsulinismus [63, 64].



## 2.4.2 Kardiale Folgen mütterlicher Adipositas

Mehrere tierexperimentelle Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss mütterlicher Adipositas auf das Herz der Nachkommen. Aufgrund der Vielzahl der durchgeführten Studien werden diese im Folgenden nach Art des verwendeten Ernährungsmodells zur Induktion der mütterlichen Adipositas geordnet dargestellt.

### 2.4.2.1 Effekte einer HFD

Turdi et al führten eine Studie mit einem Mausmodell mütterlicher Adipositas durch. Hierbei erhielten Muttertiere entweder eine HFD oder eine SD, welche während Gestations- und Laktationszeit fortgeführt wurde. Nach dem Absetzen vom Muttertier an P21 wurden die Nachkommen entweder auf SD oder HFD umgestellt, sodass sich vier Gruppen ergaben. Eine alleinige mütterliche HFD führte bei 4 Monate (ca. P120) alten Nachkommen nicht zu einer signifikanten Veränderung von Parametern für Hypertrophie (linksventrikuläres Gewicht/Tibiallänge, Kardiomyozytenquerschnittsfläche in der Histologie, Flächenanteil einer Fibrose) oder funktionellen Beeinträchtigungen (*Fractional Shortening* (FS) als Maß einer systolischen Kontraktionsstörung, linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESD)). Durch das überkreuzte Studienmodell wurde jedoch ein Vergleich von Nachkommen von mit SD- oder HFD-ernährten Muttertieren möglich. Die Nachkommen erhielten von P21 - P120 SD oder HFD. Das Umsetzen auf HFD von P21 - P120 HFD führte zu einer signifikanten Veränderung aller genannten Parameter, auch bei den Nachkommen der SD-Muttertiere. Waren die Nachkommen jedoch zusätzlich bereits der mütterlichen HFD ausgesetzt, kam es zu einer Exazerbation der kardialen Befunde und nochmaligen signifikanten Veränderung der erhobenen Parameter gegenüber den Nachkommen der SD-Muttertiere. Die Ergebnisse zeigen, dass auch, wenn eine mütterliche HFD nicht zu direkt messbaren Beeinträchtigungen von Struktur und Funktion an P120 führt, sie die Folgen einer späteren HFD im Sinne eines *Double Hit*-Modells deutlich exazerbieren kann. Mechanistisch fanden die Autoren eine erhöhte Generation von *Reactive Oxygen Species* (ROS) in Kardiomyozyten vor, welche ein Maß für oxidativen Stress darstellen [56]. Xue et al untersuchten die Folgen mütterlicher HFD auf das Herz der Nachkommen in einem Rattenmodell. Hier führte mütterliche HFD bei männlichen Nachkommen zu kardialer Hypertrophie. Die systolische und diastolische Funktion war nicht beeinträchtigt, jedoch bestand eine erhöhte Anfälligkeit des Myokards gegenüber einer Ischämie-Reperfusion-Verletzung des Myokards im Alter von 3 Monaten bei männlichen Nachkommen. Molekularbiologisch war die mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern sowie die Expression des Angiotensin Rezeptors 2 vermehrt [65]. Bei De Jong et al führte mütterliche HFD zu einem erhöhtem Herzgewicht und Herz-Körpergewicht-Quotient an P1 und P10. Die Expression der Hypertrophiemarker ANP (*atrial*

*natriuretic peptide*) und BNP (*brain natriuretic peptide*) war erhöht, ebenso die Genexpression von an der Fettsäureoxidation beteiligten Genen [66].

In einer weiteren Studie von Xue et al wiesen die Autoren eine verminderte Proliferation durch mütterliche HFD nach. Die Autoren schlossen daraus, dass mütterliche HFD zu einer frühzeitigen verminderten Proliferation der Kardiomyozyten mit nachfolgender kompensatorischer Hypertrophie führen könne. Des Weiteren konnten die Autoren Anzeichen einer mitochondrialen Dysfunktion nachweisen. Durch Transmissionselektronenmikroskopie konnten sie desorganisierte Myofibrillen und eine Auslöschung der Mitochondriencristae beobachten [67]. Auch Larsen et al fanden Zeichen einer verminderten Proliferation. Sie fanden heraus, dass mütterliche HFD zu einer vermehrten Mitofusin 2 (*Mfn2*)-Genexpression in männlichen und MFN2-Proteinexpression in beiden Geschlechtern führte. MFN2 nimmt verschiedene Rollen im Zellstoffwechsel wahr. Eine Überexpression von MFN2 in Kardiomyozyten wurde mit gestörter Zellproliferation in Verbindung gebracht. Eine gestörte Proliferation der Kardiomyozyten könnte zu sekundärer Hypertrophie und beeinträchtigter systolischen und diastolischen Funktion beitragen [68].

Ein von Siddeek et al verwendetes Rattenmodell umfasste die Ernährung schwangerer Muttertiere ab dem 7. Schwangerschaftstag (G7) mit einer HFD, Umsetzen der Nachkommen auf SD an P21 und Tötung der Nachkommen an P77. Die Autoren konnten an P77 eine Erhöhung der Herz-/Körpergewichts-Ratio sowie eine Erhöhung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche als Zeichen einer Hypertrophie feststellen. Weiterhin konnten sie anhand der Evaluierung von Fibrose in der Masson-Trichom-Färbung zeigen, dass mütterliche HFD zu vermehrter Ablagerung an extrazellulärer Matrix und damit zu vermehrter Fibrose an P77 führte. Hierzu wurde die interstitielle fibrotische Fläche berechnet; zu beachten ist die große Gruppengröße von  $n = 18$  pro Gruppe, was zu höherer statistischer Power führt. Des Weiteren fanden die Autoren Veränderungen der microRNA-Expression, welche sie mit einer Dysregulation des *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) Signalwegs als Mechanismus einer vermehrten Matrixbildung in Verbindung brachten [69].

#### **2.4.2.2 Effekte einer zucker- und fettreichen Diät („Western Style Diet“)**

Loche et al verwendeten eine obesogene zucker- und fettreiche mütterliche Diät und untersuchten Nachkommen in einem Alter von 8 Wochen. Im Sinne eines gekreuzten Studiendesigns wurde eine mütterliche obesogene- oder Kontrolldiät jeweils mit obesogener- oder Kontrolldiät nach dem Absetzen vom Muttertier an P21 kombiniert, sodass vier unterschiedliche Studiengruppen entstanden. Die verwendete obesogene Diät enthielt 10% einfache Zucker, 20% tierisches Fett

und 23% Protein; zusätzlich wurde gesüßte Kondensmilch mit 55% einfachen Zuckern, 8% Fett und 8% Protein verabreicht. Mütterliche obesogene Diät führte zu einem erhöhten absoluten Herzgewicht und einem erhöhten Herz/Körpergewicht-Quotienten. Transversale Schnitte der entnommenen Herzen zeigten, dass die mütterliche obesogene Diät zu einer signifikant erhöhten Dicke des interventrikulären Septums und der linksventrikulären Fläche führte, während die linksventrikuläre Wanddicke nicht signifikant erhöht war. Darüber hinaus zeigte sich die histologisch bestimmte Kardiomyozytenquerschnittsfläche durch die mütterliche obesogene Diät erhöht. Des Weiteren führte die mütterliche obesogene Diät zu einer Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion: So waren die echokardiografisch *in vivo* ermittelte Ejektionsfraktion sowie das *Fractional Shortening*, ein Maß für die relative Verkürzung beim Kontraktionsvorgang, signifikant vermindert. Zudem wurde eine Fibrose mittels Sirius Red Färbung evaluiert. Eine alleinige obesogene Diät der Muttertiere führte nicht zu vermehrter Fibrose an P56. Die Interaktion zwischen mütterlicher obesogener Diät sowie Umstellung auf obesogene Diät an P21 bewirkte jedoch eine vermehrte Fibrose [59]. Eine obesogene zucker- und fettreiche Diät wurde ebenfalls von Fernandez-Twin et al verwendet. Sie beobachteten bis zu einem Alter von 8 Wochen (ca. P56) keinen Effekt der mütterlichen obesogenen Diät auf Körpergewicht und Körperzusammensetzung der Nachkommen, jedoch fanden sie mehrere Hinweise auf das Vorliegen einer kardialen Hypertrophie: Es lag sowohl absolut als auch in Relation zum Körpergewicht und zur Tibialänge ein erhöhtes Herzgewicht vor. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Wanddicke der freien linksventrikulären Wand und Fläche sowie eine erhöhte Kardiomyozytenquerschnittslänge gemessen. Molekularbiologisch brachten sie die Ergebnisse mit Hyperinsulinämie, AKT (Proteinkinase B)-, ERK (*extracellular signal-regulated kinases*)- und mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) -Aktivierung in Verbindung [70].

#### **2.4.2.3 Effekte einer Diät mit 150% der empfohlenen Nahrungsmenge**

Huang et al verwendeten ein Schafmodell mütterlicher Adipositas, bei dem 150% der empfohlenen Diät gefüttert und myokardiales Gewebe der Nachkommen am 75. und 135. Gestationstag untersucht wurde. In der Adipositasgruppe konnten die Autoren mittels Hydroxyprolin-Verfahren einen erhöhten Kollagengehalt feststellen. Molekularbiologisch zeigte sich eine Hochregulation des TGF- $\beta$ -Signalwegs, welcher die Fibrogenese kontrolliert [61]. Dies stellt einen Hinweis auf ein möglicherweise frühzeitig beginnenden fibrotischen Umbau des Herzgewebes dar. Unter Verwendung desselben Schafmodells untersuchten Wang et al die kontraktile Funktion der isolierten fetalen Herzen. Hier zeigte sich unter Normalbedingungen keine Veränderung der kontraktilen Funktion. Jedoch wurde im Belastungstest mit Isoprenalin beobachtet, dass die Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion in der Adipositasgruppe gestört

war. Darüber hinaus lagen molekularbiologisch Zeichen eines gestörten Insulinsignalwegs des kardialen Gewebes vor [62]. Auch Ghnenis et al verwendeten das Schafsmodell mit einer Fütterung von 150% der empfohlenen Kalorien zur Untersuchung der Auswirkungen mütterlicher Adipositas. Sie beobachteten bei 12 Wochen alten Nachkommen einen erhöhten Plasmacortisolspiegel und eine erhöhte Wanddicke des linken und rechten Ventrikels; histologisch zeigte sich vermehrter Kollagengehalt. Molekularbiologisch fanden sie eine erhöhte Expression mehrerer inflammatorischer Zytokine, des Glukokortikoidrezeptors, und von TGF- $\beta$ 1 [60].

#### **2.4.2.4 Effekte eines mütterlichen Diabetes mellitus, hormonelle und epigenetische Mechanismen**

Einige Studien befassten sich gezielt mit Mechanismen, über welche die beobachteten Effekte einer mütterlichen Adipositas oder obesogenen Diät Einfluss auf die Nachkommen nehmen könnten.

So scheint ein zusätzlich vorliegender Diabetes mellitus ein Risikofaktor zu sein, welcher die negativen kardialen Folgen verstärkt. So zeigten Mdaki et al mithilfe eines Rattenmodells, dass mütterliche HFD zwar zu Zeichen mitochondrialer Dysfunktion, aber nicht zu funktioneller Beeinträchtigung führt. Wurde jedoch durch Anwendung von Streptozotocin infolge einer toxischen Schädigung der  $\beta$ -Zellen ein Diabetes mellitus der Mutter ausgelöst, war die systolische und diastolische Funktion beeinträchtigt [71].

Möglicherweise spielt auch ein erhöhter Leptinspiegel in der Vermittlung der beobachteten Effekte eine Rolle. Basierend auf der Beobachtung, dass Nachkommen einen erhöhten Leptinspiegel aufwiesen, wendeten Samuelsson et al ein Modell der experimentell erzeugten Hyperleptinämie an. Am 9.-15. postnatalen Tag wurde gewichtsadaptiert iv. Leptin verabreicht. Die beobachteten Effekte beinhalteten am 30. postnatalen Tag ein erhöhtes Herzgewicht, eine veränderte linksventrikuläre Struktur und eine beeinträchtigte systolische Funktion mit reduzierter Ejektionsfraktion. Diese Effekte persistierten auch in 12 Monate alten adulten Tieren. Darüber hinaus konnte am 30. postnatalen Tag bei den leptinbehandelten Tieren eine arterielle Hypertonie festgestellt werden. Bei 30 Tage alten Tieren war die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten nicht erhöht, jedoch die Anzahl der Kardiomyozyten pro Fläche erhöht [72]. Blin et al untersuchten epigenetische Veränderungen in einem Rattenmodell. Mütterliche HFD führte zu Veränderungen von DNA-Methylierungen. Unter anderem zeigte sich die Proteinexpression von Islet-1 am 77. postnatalen Tag hochreguliert. Insgesamt sind die erhobenen Daten darauf hinweisend, dass

durch epigenetische Veränderungen die Derepression von profibrotischen und prohypertrophischen Genen an den kardialen Folgen einer mütterlichen HFD beteiligt ist [73].

### **2.4.3 Beeinflussung anderer Organsysteme durch mütterliche Adipositas**

Samuelsson et al konnten des Weiteren bei den 6 Monate alten Nachkommen einen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten arteriellen Blutdruck feststellen, wobei lediglich der systolische nächtliche Wert signifikant erhöht war [64]. Elahi et al beobachteten in einem Mausmodell bei den Nachkommen im Alter 36 Wochen nach dem Absetzen einen erhöhten Blutdruck als Folge einer mütterlichen HFD [74]. Sie konnten weiterhin zeigen, dass die Nachkommen von HFD ernährten Muttertieren neben der arteriellen Hypertonie auch eine Prädisposition für Dyslipidämie und Fettleber aufwiesen [74]. Oben et al bestätigten, dass mütterliche diätassozierte Adipositas im Tiermodell neben einem dysmetabolischen Phänotyp mit Insulinresistenz auch zu einem NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*)-Phänotyp mit histologischen und biochemischen Zeichen einer Steatosis führte. Aspartat-Aminotransferase (AST), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) im Serum waren erhöht und es lagen biochemische Zeichen einer hepatischen Insulinresistenz, einer Leberschädigung sowie Aktivierung profibrotischer Signalwege vor [75]. Die postnatal beobachteten hepatischen Effekte wirkten sich in einer australischen klinischen Studie von Ayorinde et al auch auf die hepatische Gesundheit im jungen Erwachsenenalter aus. So wiesen 17-jährige Nachkommen von Müttern mit prägestationeller Adipositas eine höhere Rate an sonografisch diagnostizierter NAFLD auf (Gesamtprävalenz ca. 15%) [76].

Als weiterer Mediator metabolischer Programmierung wird die Beeinflussung zentraler Mechanismen zur Regulierung der Nahrungsaufnahme bei den Nachkommen untersucht, etwa die die hypothalamische Antwort auf Leptin [58]. In einer tierexperimentellen Studie mit Ratten von Kirk et al wiesen die Nachkommen adipöser Muttertiere Veränderungen der hypothalamischen Entwicklung auf. Auch bei normalem Leptinspiegel lagen Hinweise auf eine verminderte leptininduzierte Appetitsuppression vor, etwa eine vermehrte STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*)-Phosphorylierung im Nucleus arcuatus. Nachfolgend kam es zur Ausbildung eines hyperphagen und adipösen Phänotyps der Nachkommen. Die Autoren schlossen daraus, dass zentrale Prozesse zur Regulation der Nahrungsaufnahme verändert waren [58]. Eine mögliche Ursache für die Leptinresistenz wäre der verstärkte und verlängerte neonatale Leptin-Schub, welchen Nachkommen von adipösen Muttertieren aufweisen [58]. Darüber hinaus weist die während der Laktationszeit aufgenommene Muttermilch adipöser Muttertiere einen erhöhte Leptinspiegel auf. Die Aufnahme durch die Muttermilch stellt neben dem Fettgewebe des Neonaten eine weitere Quelle für Leptin dar [75]. Es wird vermutet, dass erhöhte

Insulin- und Leptinkonzentrationen zu einer Resistenz des Appetit-regulatorischen Neuropeptid Y Systems gegenüber inhibierenden Faktoren führen [77]. Eine vermehrte hypothalamische Inflammation könnte pathogenetisch an der Entwicklung der adversen metabolischen Folgen beteiligt sein [78].

Pulmonal konnte ein Asthma-ähnlicher Phänotyp beobachtet werden. In Tiermodellen zeigten sich bei den Nachkommen die Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine, etwa IL-6, sowie die Transkription der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23 im Fettgewebe erhöht [53]. Es wird angenommen, dass durch die mütterliche Adipositas ein niedriggradiger Entzündungszustand der Nachkommen induziert wird, welcher in die pathogenetischen Prozesse involviert ist [79].

Hierbei wird kausal die Beteiligung von mütterlicher Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, veränderten Adipozytokinen wie Leptin, einer vermehrten Lipotoxizität, einer niedriggradigen Inflammation mit erhöhten Konzentrationen zirkulierender proinflammatorischer Zytokine, resultierendem vermehrtem oxidativem Stress und Veränderungen der plazentaren Funktion und plazentaren Transporter diskutiert [26, 79]. Die Zusammenhänge könnten zudem über epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung und Veränderungen des gastrointestinalen Mikrobioms vermittelt werden [80].

## **2.5 Wirkung einer Hochfettdiät auf das adulte Herz: Hypertrophie und Remodeling**

Auch bei adulten Tieren wurde die Auswirkungen einer chronischen HFD auf kardiale Umbauprozesse in tierexperimentelle Studien untersucht. Diese simulieren im Gegensatz zu einem Mausmodell perinataler Programmierung eine erst später einsetzende Adipositas im Erwachsenenalter mit einem Organsystem, dessen Entwicklung abgeschlossen ist. Hier konnte in einem Tiermodell von Zarzoso et al, welche die Auswirkungen einer HFD auf adulte Kaninchen untersuchten, ein ventrikulärer Umbau erfasst werden. Nach einem Zeitraum von 18 Wochen konnte in der HFD-Gruppe ein diabetischer Phänotyp mit erhöhtem Körpergewicht und erhöhten Serumglukosekonzentration beobachtet werden. Echokardiografisch beobachteten die Autoren eine linksventrikuläre Hypertrophie. Des Weiteren schienen die elektrophysiologischen Eigenschaften verändert: Das QTc-Intervall war in der HFD-Gruppe verlängert und in den isolierten Herzen kam es unter Hyperkaliämiebedingungen zu einer erhöhten Inzidenz von Arrhythmien [81]. Wang et al führten weitere tierexperimentelle Studien zu den kardialen Auswirkungen einer HFD bei adulten Tieren durch. Hierzu erhielten adulte, 7 Wochen alte Mäuse für 11 Monate eine HFD *ad libitum*. Es konnte eine myokardiale Hypertrophie mit erhöhter Kardiomyozyten-Querschnittsfläche sowie eine vermehrte Fibrose des myokardialen Gewebes beobachtet werden. Molekularbiologisch führte die HFD zu einer erhöhten mRNA-Expression von

$\beta$ -Catenin. In der immunhistochemischen Analyse wurde außerdem eine verstärkte nukleäre  $\beta$ -Catenin-Lokalisation beobachtet, was eine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs markiert. Des Weiteren gab es molekularbiologische Hinweise für verstärkte Apoptose und Autophagie. Die Ergebnisse zeigen, dass eine HFD bei adulten Tieren zu Hypertrophie und Fibrose führt [82]. Wie die zuvor besprochene Studie von Turdi et al zeigte, können die Auswirkungen einer HFD beim adulten Tier durch vorherige Exposition gegenüber einer mütterlichen HFD deutlich verstärkt werden [56].

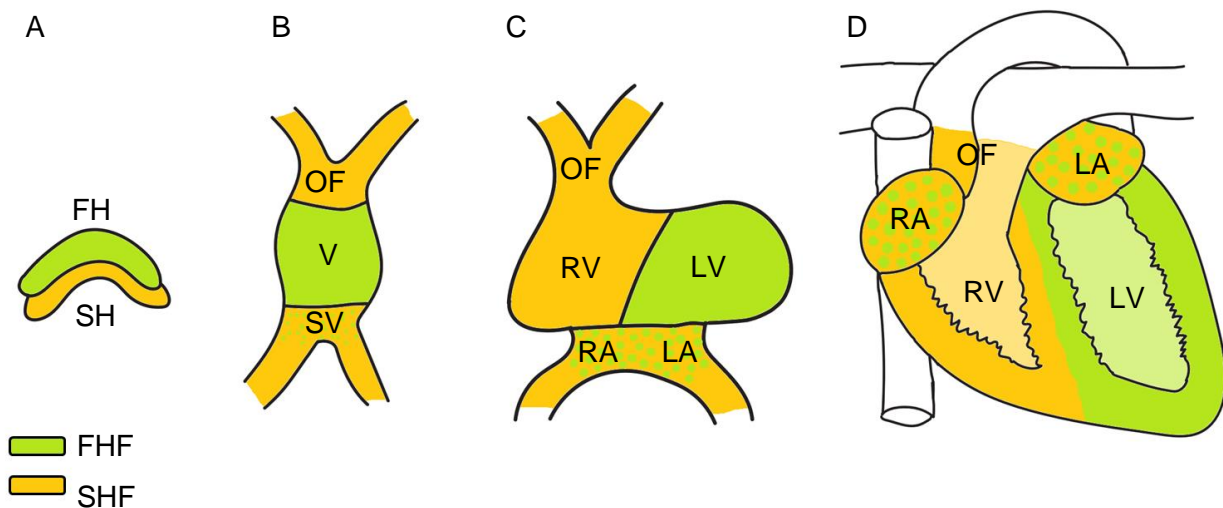
## **2.6 Herzentwicklung und der Wnt-/ $\beta$ -Catenin Signalweg**

### **2.6.1 Makroskopische Herzentwicklung**

Zu Beginn der Entwicklung liegen die embryonalen Zellen als zweiblättrige Keimscheibe vor, welche aus Epiblast und Hypoblast besteht. Bei der Gastrulation kommt es zur Migration und Transformation von Epiblastenzellen, sodass die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm gebildet werden. Beim Menschen geschieht dies während der dritten Entwicklungswoche, bei der Maus ist am 7. Entwicklungstag (E7) ein vergleichbares Stadium erreicht. Das Herzgewebe hat seine embryologischen Ursprünge im Mesoderm. In diesem bildet sich am kranialen Pol des Embryos die halbmondförmige kardiogene Zone. Durch das starke Wachstum des Neuralrohrs und die resultierende kraniokaudale Krümmung wird die kardiogene Zone eingefaltet und befindet sich anschließend auf der ventralen Seite des Embryos. In der kardiogenen Zone befinden sich promyokardiale Progenitorzellen, welche durch das Vorhandensein des Markers Nkx2.5 gekennzeichnet sind [83]. Des Weiteren differenzieren endotheliale Zellen und bilden zunächst paarige Herzsclläuche, welche sich zum primären tubulären Herzscllauch vereinigen. Dieser hat die Form eines Y, wobei die Arme des Y mit den venösen Zuflüssen verbunden sind und der Stamm des Y sich zum späteren Ventrikel entwickelt. Aus dem Endothel gehen im Verlauf Endokard, Blut- und Lymphgefäße hervor. Ebenso kommt es im restlichen Körper zur Ausbildung eines Endothelgeflechtes, welches ein erstes Kreislaufsystem bildet. Ein Herzschlag kann beim Menschen erstmals am 21. Tag *post conceptionem* beobachtet werden [84].

Anschließend erfolgt die weitere kardiale Morphogenese durch Elongation, Rotation und Auffaltung des tubulären Herzscllauches, sodass sich die S-förmige Herzsclleife entwickelt. Das Blut durchfließt weiterhin hintereinander alle Anteile des Herzens, welches sich morphologisch in ein gemeinsames Atrium, einen ventrikulären Anteil und die Ausflussbahn unterteilen lässt. Diese Situation liegt beim Menschen circa am 25. Entwicklungstag, bei der Maus am 11. Entwicklungstag vor. Durch eine Einschnürung werden der atriale vom ventrikulären Anteil

getrennt und der atrioventrikuläre Kanal gebildet. Durch Bildung des *Septum primum* bzw. *sekundum* werden links- und rechtsatrialen Anteile getrennt, wobei bis zur Geburt über das *Foramen secundum* bzw. *ovale* der rechts- links Shunt des fetalen Kreislaufs ermöglicht wird. Im ventrikulären Anteil bildet sich das Myokard und die Trabekulierung des myokardialen Gewebes aus. Durch Einwachsen des *Septum interventrikulare* entsteht die Aufteilung in linken und rechten Ventrikel. Der Ausflusstrakt teilt sich durch ein Septum in *Aorta ascendens* und *Truncus pulmonalis* auf, wobei diese im fetalen Kreislauf über den *Ductus arteriosus* Botalli als Rechts-Links-Shunt verbunden bleiben. Die Zellen des Ausflusstraktes differenzieren hin zu einem arteriellen Phänotyp. Die makroskopische Entwicklung des Herzens nimmt in der embryologischen Entwicklung eine zentrale Stelle ein, da alle weiterführenden Entwicklungsschritte auf das Vorhandensein eines Kreislaufsystems angewiesen sind, welches dem Gewebe Substrat und oxygeniertes Blut zuführt. Eine Fehlbildung des Herz-Kreislaufsystems, welche den fetalen Kreislauf kompromittiert, hat somit in der Regel einen Abort zur Folge. Die angeborenen Herzfehler sind solche, welche den fetalen Kreislauf nicht relevant kompromittieren und erst postnatal unter anderem durch die Umstellung des fetalen auf den adulten Kreislauf und dem Verschluss der Rechts-Links-Shunts symptomatisch werden [84-86].



**Abb. 2: Entwicklung der unterschiedlichen Herzanteile aus dem *First Heart Field* (FHF) und dem *Second Heart Field* (SHF).**

A: E7,5 bei der Maus, E15 beim Menschen. B: E8 bei der Maus, E20 beim Menschen. C: E9-12 bei der Maus, E28-30 beim Menschen. D: E10+ bei der Maus, E32+ beim Menschen. Der linke Ventrikel (LV) sowie Teile des interventrikulären Septums gehen aus dem *FHF* hervor. Die aus dem *SHF* hervorgehenden Zellen bilden den rechten Ventrikel (RV) und tragen zur Bildung des Ausflusstraktes (OFT), des interventrikulären Septums sowie des rechten und linken Atriums (RA und LA) bei. Intermittierend besteht ein gemeinsamer Ventrikel (V) und ein gemeinsamer Sinus venosus (SV). Grafik und Daten modifiziert nach Paige et al [87].



## 2.6.2 Mikroskopische Herzentwicklung und Progenitorzellpopulationen und ihre Marker

Auf zellulärer Ebene entwickelt sich das Herz aus Populationen von Progenitorzellen, welche dem Mesoderm entstammen. Diese unterlaufen Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsprozesse, sodass sie schließlich zu den verschiedenen adulten kardialen Zelltypen differenzieren. Dabei existieren verschiedene Unterpopulationen an Progenitorzellen, die zu jeweils unterschiedlichen Anteilen des Herzens differenzieren. Bereits unmittelbar nach der Gastrulation, in der Kardiogenese der Maus etwa am Entwicklungstag E8, lassen sich zwei distinkte Zelllinien kardialer Progenitorzellen nachweisen. Diese bilden das *First Heart Field* (FHF) und das *Second Heart Field* (SHF) [88]. Die Zellen des FHF schlagen überwiegend eine myokardiale Differenzierung ein und formen im Verlauf den linken Ventrikel. Sie tragen aber, abgesehen von der Ausflusstraktregion, auch zu anderen Anteilen des Herzens bei. Die Zellen des SHF können zu verschiedenartigen Gewebetypen differenzieren und bilden hauptsächlich den rechten Ventrikel, den Ausflusstrakt, die *Atriae* sowie Teile des Septums [88, 89]. Verschiedene Signaturen von Stammzellmarkern können zur genaueren Charakterisierung der Subpopulationen verwendet werden.

Der Marker Nkx2.5 wird von den Progenitorzellen sowohl des FHF als auch des SHF exprimiert und fungiert als übergeordneter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression myokardialer Gene fördert und so eine kardiomyozytäre Differenzierung bewirkt. Er wird bereits frühzeitig bei der Entwicklung der kardiogenen Zone aus dem Mesoderm exprimiert. Nkx2.5 ist für die korrekte kardiale Entwicklung sowohl auf morphologischer als auch auf zellulärer Ebene wichtig und etwa an der Bildung der Herzscheife sowie an der Entwicklung des konduktiven Systems beteiligt [90, 91]. Bei homozygot Nkx2.5-defizienten Mäusen entwickelte sich zwar ein tubuläres Herz; die Ausbildung der S-förmigen Herzscheife blieb jedoch aus und es kam zu Letalität an etwa E10.5 durch die verzögerte Herzentwicklung [92, 93]. Bei Mäusen mit Tamoxifen(-Cre) induzierter Nkx2.5 Defizienz an E12.5 wurden Störungen der *Septum secundum*-Bildung, Kontraktions- sowie Leitungsdefekte und schließlich Letalität an E17.5 beobachtet [94]. Serpooshan et al charakterisierten mittels transgener Koexpression von Nkx2.5 und *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) eine Subpopulation mit der Signatur Nkx2.5+ und eGFP+, welche postnatal zur Ausbildung des Myokards beitrug. Ablation dieser Subpopulation durch *Doxycyclin-suppressible Cre* führte in einem Mausmodell zu ventrikulärer Hypertrophie und Dilation. Dies zeigt, dass Beeinträchtigung von Progenitorzellpopulation zu Umbauvorgängen führen kann [95]. Auch in adulten Herzen wird Nkx2.5 weiterhin exprimiert und ist als Transkriptionsfaktor womöglich an Umbauprozessen beteiligt [90]. In einem felines Tiermodell zeigte sich als Reaktion auf eine vermehrte physikalische Belastung, welche durch Abbinden der A. pulmonalis induziert wurde,

neben einer rechtsventrikulären Hypertrophie eine erhöhte Expression von Nkx2.5 und seiner nachgeschalteten Zielgene [92]. Heterozygote Mutationen von Nkx2.5 sind mit kardialen Anomalien wie Atrium- und Ventrikelseptumdefekten und der Fallot'schen Tetralogie assoziiert [94].

Die Zellen des SHF sind durch Expression des Stammzellmarkers Islet-1 gekennzeichnet [96]. Die Islet-1+ Stammzellen sind multipotente Progenitorzellen, welche nicht nur eine kardiomyozytäre Differenzierungsrichtung einschlagen können, sondern auch die anderen kardialen Gewebe der daraus hervorgehenden Regionen bilden. In *in vivo cell fate mapping*-Studien als auch in *in vitro* Zellkultur konnte gezeigt werden, dass aus diesen kardiovaskulären Progenitorzellen ganz verschiedene Arten von Gewebe hervorgehen können und die Islet-1+ Kardioblasten sowohl zu Kardiomyozyten, Endothelzellen als auch zu glatten Muskelzellen differenzieren können [97, 98]. Genetische Deletion von *Is1* führt bei Mäusen zum Tod des Embryos etwa am 10. Tag der embryonalen Entwicklung (E10), da der rechte Ventrikel, Ausflusstrakt und wesentliche Teile der Atriae, die aus dem SHF hervorgehen, fehlen [99]. Normalerweise wird Islet-1 nicht im linksventrikulären Myokard exprimiert. Ein Knock-out Modell von Nkx2.5 zeigte jedoch, dass bei Abwesenheit von Nkx2.5 Islet-1 und andere Marker des SHF auch im linksventrikulären Myokard exprimiert werden [100, 101].

Bei zunehmender Differenzierung wird Islet-1 herunterreguliert, bleibt aber auch postnatal in kardialen Stammzellen exprimiert [102, 103]. Islet-1+ Progenitorzellen lassen sich auch postnatal an murinen sowie humanen Herzen aus den aus dem SHF hervorgehenden Regionen isolieren und können *in vitro* zu adulten Kardiomyozyten differenziert werden [103, 104]. Die Persistenz von Stammzellen für die Dauer der Entwicklung wirft die Frage auf, inwieweit diese an späten Entwicklungs- und frühen Umbauprozessen beteiligt sein könnten [97, 98]. *T-box transcription factor-5* (Tbx5) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der wie Nkx2.5 bereits in den Zellen der kardiogenen Zone exprimiert wird und für die Aktivierung myokardialer Gene verantwortlich ist [101]. Heterozygote Mutation von *Tbx5* führt zum Holt-Oram-Syndrom, welches durch Herzfehler wie Atriale,- Ventrikelseptumdefekt oder Fallot'schen Tetralogie sowie Malformationen der oberen Extremität gekennzeichnet ist [105].

### **2.6.3 Übersicht über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

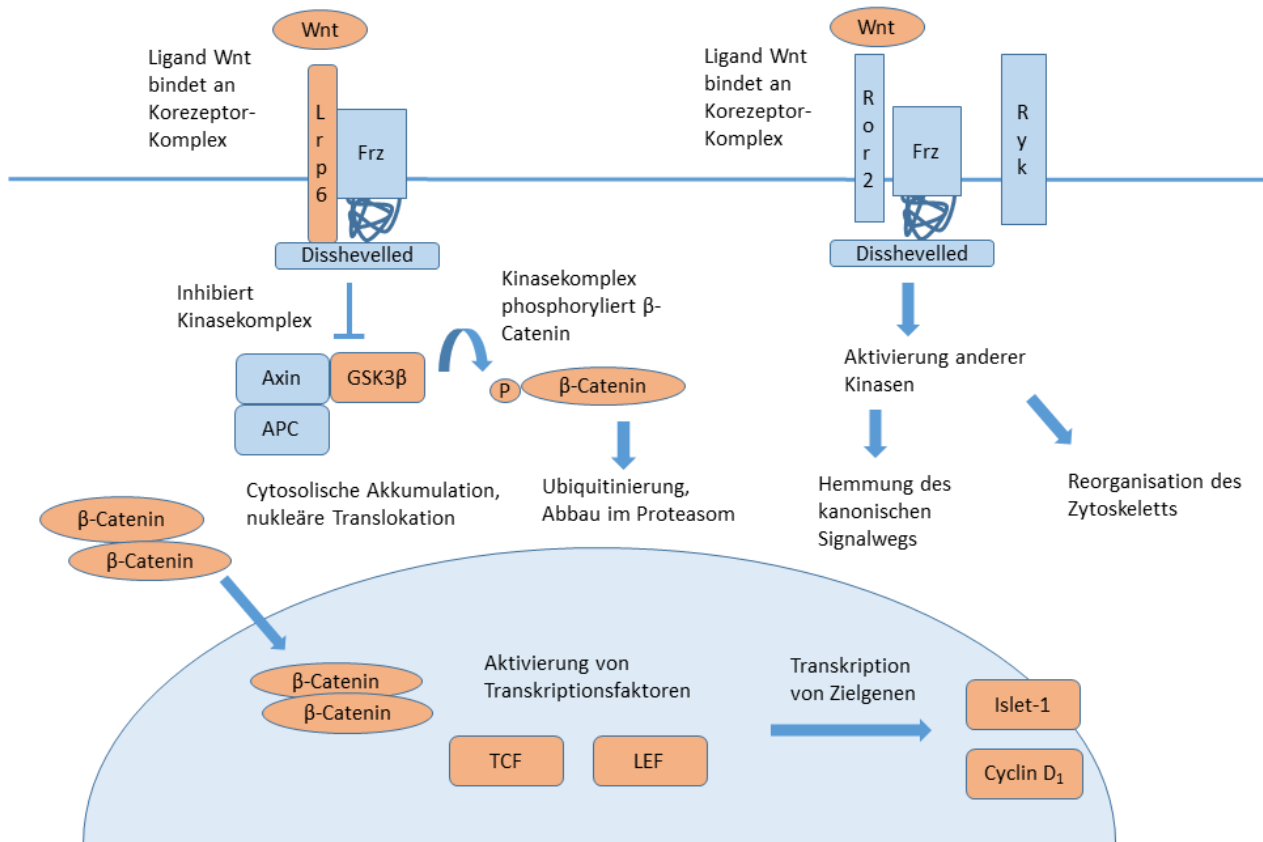
Der Wnt (*Wingless-related integration site*)/ $\beta$ -Catenin Signalweg ist essentiell in der Embryogenese des Herzens, aber auch anderer Organsysteme. Er kontrolliert Proliferation und Differenzierung der embryonalen Zellen und Achsausrichtung bei der Entwicklung. Darüber hinaus ist er in der Homöostase adulter Gewebe und an der Karzinogenese beteiligt und bekannt

etwa durch die APC (*Adenomatöse Polyposis coli*)-Mutation in der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolorektalen Karzinoms oder bei der Familiären Adenomatösen Polyposis. Neben dem kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg existieren auch nichtkanonische Wnt-Signalwege, etwa der Wnt/JNK (c-Jun N-terminale Kinase) Signalweg (auch Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweg) sowie der Calcium abhängige Wnt/Ca Signalweg [106, 107]. Im Folgenden wird der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg beschrieben.

Wnts sind kleine Proteine und stellen die Liganden des Signalwegs dar, welche parakrin sezerniert werden. Bei Säugetieren existieren etwa 20 verschiedene Wnt-Proteine, die in 12 konservierte Unterfamilien eingeteilt werden können [106]. Die Wnt Liganden (zum Beispiel Wnt2b, Wnt3a, Wnt11) binden an den Transmembranrezeptor *Frizzled receptor*, welcher mit dem Corezeptor *Low-density lipoprotein receptor-related protein 6* (Lrp6) assoziiert. Der gebildete Frizzled/Lrp-Komplex bewirkt anschließend eine Aktivierung des intrazellulären Proteins *Disshevelled*. *Disshevelled* inhibiert einen Kinasekomplex, welcher aus der Glycogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), und den Proteinen APC und Axin-1 gebildet wird. Dieser Kinasekomplex reguliert die Aktivität von freiem zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin durch Beeinflussung von dessen Stabilität [106]. Ist dieser Kinasekomplex aktiv, bewirkt er eine Phosphorylierung von zytosolisch vorliegendem  $\beta$ -Catenin. Das phosphorylierte  $\beta$ -Catenin wird durch diesen Vorgang für Ubiquitinierung und den darauffolgenden Abbau im Proteasom markiert. Insgesamt führt die Aktivität des Liganden Wnt im kanonischen Weg somit zu einer Inhibition des Abbaus von  $\beta$ -Catenin und zu mehr  $\beta$ -Catenin-Aktivität. Durch verminderte Degradation des  $\beta$ -Catenin kann dieses zytosolisch akkumulieren. Es wird nach nukleär transloziert, wo es sich auf die Transkription verschiedener Zielgene auswirkt [108]. Eine wichtige Rolle spielt dabei die *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) - Familie, welche embryonales, postnatales und onkogenes Wachstum in vielen Gewebetypen reguliert [109]. Neben seiner Rolle im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist  $\beta$ -Catenin des Weiteren an der Ausbildung von interzellulären Adhärenzkontakten beteiligt und fungiert als intrazellulärer Bindungspartner z.B. von E-Cadherin. Das hierbei gebundene  $\beta$ -Catenin ist jedoch stabil und nicht am Wnt-Signalweg beteiligt [106].

Die Familie der Cycline sind Proteine, welche eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen, indem sie abhängige Kinasen (*Cyclin Dependent Kinases*, CDKs) binden und aktivieren. Die D-Cycline bewirken eine Progression des Zellzyklus von der G1 in die S-Phase [110]. Cyclin D<sub>1</sub> ist dabei über eine LEF-1-Bindungsstelle am Cyclin D<sub>1</sub>-Promoter ein Zielgen des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs [111]. Cyclin D<sub>1</sub> als Regulator des Zellzyklus kann als Proliferationsmarker dienen [112]. Jedoch wird es nicht nur von Kardiomyozyten, sondern auch von anderen Zellen im Herzgewebe exprimiert, wie etwa Fibroblasten. Des Weiteren kann es auch im Rahmen einer

Polynukleation und Polyploidisation zu einer vermehrten Cyclin D<sub>1</sub>-Expression kommen [112]. Die Aktivität von Cyclin D<sub>1</sub> wird auch durch GSK-3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierung reguliert. GSK-3 $\beta$ -Knockout führte zu Akkumulation von Cyclin D<sub>1</sub> im Nucleus und Hyperproliferation der Kardiomyozyten am Gestationstag 15 [113, 114].



**Abb. 3: kanonischer und nichtkanonischer  $\beta$ -Catenin-Signalweg**

Links ist der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg schematisch dargestellt. Im Rahmen der Forschungsprojektes untersuchte Komponenten sind orangefarbig markiert. Rechts ist schematisch der nichtkanonische Signalweg repräsentiert. Hierbei sind andere Korezeptoren sowie andere nachgeschaltete Moleküle beteiligt (nicht im Einzelnen dargestellt).

### 2.6.4 Die Rolle des $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Kardiogenese

Die exakten Mechanismen des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs in der Herzentwicklung sind nicht bekannt, da die Untersuchung aufgrund der Komplexität und Beteiligung mehrerer Wnt-Signalwege, der dreidimensionalen morphologischen Vorgänge und der zeitlichen Komponente schwierig ist [107]. Bestimmte Teilaspekte der Funktion des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs konnten jedoch bereits aufgedeckt werden [107].

Die korrekte Regulation ist Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs ist für die normale Entwicklung des Herzens unerlässlich. Sowohl *gain of function* als auch *loss of function*-Mutationen von  $\beta$ -Catenin haben im Mausmodell zwischen Tag E5.5 und Tag E10.5 der Embryonalzeit Letalität zur Folge [115]. Zur Erforschung der Rolle des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs wurden verschiedene konditionale Mutantenmodelle generiert, bei denen sowohl *loss of function* als auch *gain of function* von  $\beta$ -Catenin zu einem späteren Zeitpunkt induziert werden kann [116, 117]. Obwohl 90% des  $\beta$ -Catenin membrangebunden vorliegen, hat *loss of function* keinen Phänotyp defekter Zell-Zell-Kontakte zur Folge, da in dieser Hinsicht durch Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) eine funktionelle Redundanz vorliegt. Daher betreffen Veränderungen des  $\beta$ -Catenin-Levels vor allem die durch das freie zytosolische  $\beta$ -Catenin- beeinflusste Transkription der Zielgene des Signalwegs [118].

Des Weiteren ergibt sich die Frage nach der unterschiedlichen Funktion verschiedener Wnt-Liganden. Wnt3a wird in der Literatur in der Regel als Ligand des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs angesehen. Die meisten Daten bestehen hinsichtlich der Bedeutung zu Beginn der kardialen Entwicklung bei der Umwandlung mesenchymalen Gewebes zu kardialen Progenitorzellen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitpunkte sind an einem späteren Zeitpunkt der Herzentwicklung einzuordnen. Die Rolle der verschiedenen Wnt-Liganden und Signalwege an Prozessen, welche an der Differenzierung kardialer Progenitorzellen zu adulten Kardiomyozyten beteiligt sind, sind noch wenig verstanden.

Während Wnt3a den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert, wird Wnt11 mit dem nichtkanonischen Signalweg in Verbindung gebracht [119]. Forschungsergebnisse deuten auf eine gegensätzliche Wirkung von nichtkanonischem und kanonischem Signalweg in der Differenzierung hin. Wnt11 soll neben der Aktivierung des nichtkanonischen Signalwegs auch zu einer Hemmung des kanonischen Signalwegs beitragen [120, 121]. So beobachteten Abdul-Ghani et al, dass Wnt11 zur Differenzierung von Kardiomyozyten beitrug. Gleichzeitig war die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin vermindert, hinweisend auf eine geringere Aktivität des kanonischen Signalwegs [121]. Während die Zuordnung von Wnt3a zum kanonischen und von Wnt11 zum nichtkanonischen Signalweg mit Daten gestützt werden kann, besteht bei der Zuordnung der Isoform Wnt2b weniger Klarheit. In Versuchen mit embryonalen Stammzellen besaß der Verlust von Wnt2b ähnliche Auswirkungen wie Wnt3a auf die Expression kardialer Gene, was von einigen Autoren als eine antagonistische Rolle im kanonischen Signalweg gewertet wird [122, 123]. Andernorts, etwa in Karzinomstammzellen, wurde Wnt2b eher mit dem kanonischen Signalweg in Verbindung gebracht [124].

Die Expression von Wnt3a oder  $\beta$ -Catenin ist notwendig für die korrekte Gastrulation, da ein Wnt3a- oder  $\beta$ -Catenin-Knockout zu einer fehlerhaften Gastrulation führt und Letalität zur Folge hat [107, 125, 126]. Studien ergaben, dass der Ligand Wnt3a, welcher den kanonischen  $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert, während der Gastrulation zu Beginn der kardialen Entwicklung eine inhibierende Wirkung auf die Entwicklung mesenchymaler Zellen zu kardialen Progenitorzellen besitzt und die Expression kardialer Gene inhibiert [107]. Durch Disinhibition und Einwirken weiterer Signalwege wie des *fibroblast growth factor* (FGF)- und *bone morphogenic protein* (BMP)-Signalwegs wird die Differenzierung der Mesenchymzellen zu kardialen Progenitorzellen eingeleitet, welche durch Expression von Nkx2.5 sowie von Genen der GATA-Familie gekennzeichnet sind [126, 127]. Der Name der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren leitet sich aus ihrer Eigenschaft ab, an die DNA-Sequenz (T/A)GATA(A/G) zu binden [128]. Neben dem kanonischen Signalweg sind auch alternative Wnt Signalwege an der Herzentwicklung beteiligt. Einige Autoren schließen, dass vor allem der nichtkanonische Signalweg zur Differenzierung kardialer Progenitorzellen beiträgt. So trägt der Ligand Wnt11, über den Wnt/Ca und Wnt/JNK Signalweg zur Aktivierung kardialer Gene bei [107, 127, 129-132]. Die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist dabei nicht einheitlich, da die kardialen Progenitorzellen ihre Antwort auf die  $\beta$ -Catenin-Regulation im Laufe der Herzentwicklung verändern können. Während der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibierend wirken kann, bestehen konträr hierzu auch Hinweise dafür, dass er die Differenzierung aktivieren kann. So wurde in Zellkulturstudien mit frühen embryonalen Stammzellen nachgewiesen, dass diese bei Zugabe des den Signalweg aktivierenden Liganden Wnt3a eine gestiegene Neigung besaßen, eine myokardiale Differenzierung einzuschlagen [133, 134]. Darüber hinaus scheint auch die zeitliche Komponente eine große Bedeutung zu besitzen, womöglich durch die Beteiligung weiterer Signalwege und Kofaktoren. Insgesamt legen die Daten nahe, dass der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg eine biphasische Wirkung hat und zunächst in mesenchymalen Stammzellen die Expression kardialer Gene fördert, anschließend die kardiale Differenzierung unterdrückt [133, 135, 136]. Der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg ist außerdem an der Regulation der Proliferation kardialer Progenitorzellen beteiligt. Die Islet-1+ Progenitorzellen im SHF sind ein direktes Ziel der Regulation durch  $\beta$ -Catenin, welches den Pool an Islet-1+ Stammzellen amplifiziert [137]. Genetisch konstitutive Aktivierung durch eine stabilisierte Form von  $\beta$ -Catenin bewirkte eine verstärkte Proliferation von Islet-1+ SHF-Progenitorzellen, die im Ausflusstrakt und rechten Ventrikel akkumulierten [134, 138-140]. Negative Regulation hingegen scheint zur Differenzierung der Islet-1+ kardialen Progenitorzellen beizutragen [139]. Insgesamt stellt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine wichtige molekulare Steuerungsstruktur für Proliferation und Differenzierung in der Organogenese des Herzens dar. Seine Rolle ist jedoch nicht einheitlich; es wird vermutet, dass die Beteiligung weiterer Signalwege und Cofaktoren eine Rolle spielt [107].

### 2.6.5 Die Rolle des $\beta$ -Catenin-Signalwegs in postnatalen kardialen Umbauprozessen

Der  $\beta$ -Catenin-Signalweg besitzt nicht nur eine bedeutende Rolle in der embryonalen Herzentwicklung, sondern ist auch im adulten Herzen an Umbauprozessen beteiligt. An konditionalen *gain*- und *loss of function*-Modellen wurde untersucht, ob Veränderungen bezüglich des postnatalen Umbaus als Reaktion auf verschiedene Belastungssituationen bestehen. Hierzu gehörten Druckbelastung, chronische Stimulation durch Angiotensin II sowie Infarzierung durch Ligatur eines linksventrikulären Koronargefäßastes. Dabei zeigte sich unter anderem, dass Depletion von  $\beta$ -Catenin zu einer Verminderung des Umbaus und zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führte. Im Infarktmodell war die Infarktzone verkleinert und die Mortalität verringert. Hingegen führte *gain of function* zu erhöhter Mortalität und einem Phänotyp dilatativer Kardiomyopathie. Dies legt eine postnatale Rolle von  $\beta$ -Catenin in adversen Umbauprozessen nahe [116, 117]. Durch *soluble frizzled related proteins* (sFRP) kann die Wnt-vermittelte Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs abgeschwächt werden, indem sie mit Wnt um die Bindung am Lrp6-Frizzled Protein-Corezeptorkomplex konkurrieren. Mechanistisch kommt es durch eine geringere Inhibierung des GSK-3 $\beta$ -APC-Axin1-Kinasekomplexes zu verstärkter Degradation von  $\beta$ -Catenin und die nukleäre Transkription von Zielgenen wird herabgesetzt. Werden im Infarktmodell sFRP infarktnah gespritzt, kommt es zu vergleichbaren Effekten wie durch die oben beschriebene *loss of function*-Mutation von  $\beta$ -Catenin, mit Reduzierung der Infarktzone und vermindertem adversen Umbau [141, 142]. Ein ebenfalls ähnliches Ergebnis ergab die konstitutive Aktivierung von sFRP-1 im transgenen Mausmodell [141]. Aufgrund der wichtigen Rolle in der Poliferation und Differenzierung kardialer Progenitorzellen wurde des Weiteren die Beteiligung postnatal vorhandener kardialer Stammzellen untersucht. Im oben beschriebenen *loss of function*-Modell der Infarzierung wurde subendokardial und subepikardial eine Schicht kleiner Kardiomyozyten identifiziert, unter denen sich auch Tbx5+ kardiale Progenitorzellen befanden. Zelarayan et al schlossen daher, dass die Depletion von  $\beta$ -Catenin eine verstärkte Differenzierung kardialer Stammzellen ermöglicht, was zum verbessertem Resultat beitragen könnte [117]. Insgesamt wird eine verminderte Aktivierung des Signalwegs mit abgeschwächten adversen Umbauprozessen assoziiert.

## 2.7 Fragestellung der Arbeit

### 2.7.1 Forschungsfrage

Mütterliche Adipositas bzw. mütterliche HFD führen zu einer erhöhten Inzidenz angeborener Fehlbildungen, unter anderem des kardiovaskulären Systems, sowie zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen. Die *Developmental Origins of Health and Disease*-Hypothese stellt eine ätiologische Verknüpfung zwischen beiden Faktoren her. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist maßgeblich an der Herzentwicklung beteiligt und kontrolliert unter anderem die Proliferation und Differenzierung kardialer Stammzellen. Vor dem Hintergrund der bestehenden klinischen und experimentellen Daten stellt sich die Frage, ob eine Programmierung durch mütterliche Adipositas/HFD auch im Herz stattfindet und so zu den beobachteten Folgen beiträgt. Über eine Dysregulation der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen im fetalen Herzen könnte HFD zu einer verschlechterten Organfunktion führen.

Aus diesem Grund wurden folgende zentrale Hypothese und folgende experimentelle Forschungsfragen formuliert:

### 2.7.2 Zentrale Hypothese:

Mütterliche Adipositas beeinflusst über eine Dysregulation des Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs kardiale Stammzellen, induziert morphometrische Veränderungen am Herzen und prädisponiert so für Herzerkrankungen

### 2.7.3 Experimentelle Forschungsfragen

Zur Untersuchung der zentralen Hypothese wurden in drei Schritten folgende spezifische Ziele im murinen Model der metabolischen Programmierung verfolgt:

1. Wird durch die mütterliche HFD die Genexpression kardialer Stammzell- und Proliferationsmarker sowie der am  $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligten Komponenten dysreguliert?
2. Welche Auswirkungen bestehen auf die Menge und Aktivität der Proteine der Stammzell- und Proliferationsmarker, des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs sowie von Kardiomyozyten- und Fibrosemarkern?
3. Wie wirkt sich die mütterliche HFD auf den morphometrischen Phänotyp des Herzens der Nachkommen aus?



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Versuchstiere und Futter

Name	Hersteller
Mäuse C57/BL/6N	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
Standard-Diät ssniff® R/M-H	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Hochfett-Diät C1057, modifiziert, 35% Rohfett	Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland

**Tabelle 1: Versuchstiere und Futter**

##### 3.1.2 Arbeitsmaterialien

Name	Hersteller
96 Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Becherglas 1l, 1,5l	Duran, Mainz, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Skalpell	Pfm Medical AG, Köln, Deutschland
Enbettkassetten, klein	Medite, Burgdorf, Deutschland
Eppendorf Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flacons 15 ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glasobjektträger, Thermo Scientific Superfrost, 76 x 26 mm	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kamm 16 Zähne, 1,0mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kamm 20 Zähne, 1,0 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kapillarspitzen 200µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Mikrotomklingen Paraffin R35	Pfm Medical AG, Köln, Deutschland
Minipistill für 1,5 ml Tubes	WLB Laborbedarf, Möckmühl, Deutschland
Nitrozellulosemembran Protran BA 85 0,45µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nunc™ 96 Well Plate für Proteinbestimmung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträgerkasten	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Parafilm "M" laboratory film	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 20µl, 200µl, 1000µl, nicht gestopft	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 20-300µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 1ml, 0,5ml, 0,2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tissue-Tek Einbettungskassetten, groß	Sakura Finetek, Alphen aan de Rijn, Niederlande
Well plates und Cover für RT-PCR	4titude® Ltd., Berlin, Deutschland
Whatman Paper Zellulosefilterpapier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 2: Arbeitsmaterialien**

### 3.1.3 Geräte

Name	Hersteller
CPA-Analysewaage 2245-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat ASP 300S	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte für Paraffinblöcke Leica EG 1150C	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte für Paraffinblöcke Medite COP 30	Medite, Burgdorf, Deutschland
Medite Tissue Flotation Bath TFB55	Medite, Burgdorf, Deutschland
Badthermostat	Medite, Burgdorf, Deutschland
Mikroskop Olympus BX43	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Mikrotom, JungBiocut 2035	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Paraffinausgießstation EG1150H	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Warmhalteplatte zum Trocknen der Schnitte	Bartscher, Salzkotten, Deutschland
Wärme- und Trockenschrank UN30	Memmert, Schwabach, Deutschland
Dampfgerat-Apparat	Severin Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Photometer, Multimode Microplate Reader Infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Rotina 420R Micro centrifuge Model SD	Hettich, Tuttingen, Deutschland
Sanyo-MDF-U54V Ultra-low temperature freezer	Sanyo, Moriguchi, Japan
Vortexer K-1 plus	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
gekühlte Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Homogenisator Sonoplus SH 70 G	Bandelin, Berlin, Deutschland
Microplaterreader Nano Quant Infinite M200 Pro (Software I-Control 1.7)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
HLC TKC-23 Blockthermostat für 0,5ml Tubes	HLC Bio Tech, Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Cast-It Gelgießstand M für 14x16cm Gele; S für 10x10cm Gele	PeqLab, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Doppelgel-Elektrophorese-System PerfectBlue™ Twin M	PeqLab, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Semi Dry Electrobloetter PerfectBlue™	PeqLab, VWR International, Darmstadt, Deutschland
PEQLAB Power Supply EV231	PeqLab, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Schüttler, kreisend, Typ 3005	Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland
Taumel-Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<i>Imager</i> ChemiDoc XRS (Software Image Lab)	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Folienschweißgerät Severin Folio	Severin Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Mikrotestplatten <i>Thermo-Shaker</i>	Elmi, Riga, Litauen
Thermozykler 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA
MicroAmp® Optical 96-Well <i>Reaction Plate</i>	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA
Micro Amp® Adhesive Film <i>applicator</i>	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA

**Tabelle 3: Geräte**

### 3.1.4 Software

Name	Verwendungszweck	Hersteller
Adobe Illustrator CC 2021 (25.2.3)	Erstellung Grafik Herzentwicklung	Adobe, San José, CA, USA
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 7500 Software v 2.0.5	qPCR	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA
Biorender.com	Grafikerstellung Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg	BioRender, Toronto, ON, Kanada
Endnote X9	Zitierprogramm	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
Graph Pad Prism 7.03	Statistische Analyse	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
i-control-Software für infinite Microplate Reader	Bedienung des Tecan Plate Readers	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Image Lab 4.01	Western Blot Auswertung	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
ImageJ 1.50i	Bildverarbeitungsprogramm	Wayne Rasband (Entwickler), National Institutes of Health, USA
ImageScope Version 12.3.2.8013	Ansichtssoftware für digitale Objektträger	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Paint Version 20H2	Erstellung Grafiken	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Primer Express 3.0	Primersuche	Applied Biosystems, Forster City, Ca, USA

**Tabelle 4: verwendete Software**

### 3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid Mix Gel 30 (Rotiphorese)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblauatrium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dako Antibody Diluent DCS Nr.120R100	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dako Target Retrieval Solution pH6	Agilent, Santa Clara, CA, USA
DEPC-Wasser, RNasefrei	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNase-I-Pufferlösung 10x konzentriert	Promega, Madison, WI, USA
dNTP-Mix (10mM)	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol absolut zur RNA-Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Stop Solution 25mM	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin, Elphograde	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxin nach Gill II	
Harnstoff-Wasserstoffperoxid-Tablette (Nr A7641.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HPLC-Wasser für qPCR	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HRP-One step Polyper	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin 1mg/ml	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Liquid Blocker Stift	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MMLV (reverse Transkriptase inkl. Puffer, 200U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
MMLV-Puffer 5x konzentriert	Promega, Madison, WI, USA
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) 200mM	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge, mind. 32%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neoclear (Ersatz für Xylol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neomount	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligo dT Primer (5'TTTTTTTTTTTTTTTT3', 0,5µg/µl)	MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehydlösung 4% Histofix, phosphatgeuffert, säurefrei pH7	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS Pulver pH 7,4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A in Methanol	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH7,4 10x konzentriert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce™ SEA BLOCK™ Blockierungspuffer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA /Oberhausen, Deutschland
Platinum Taq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ponceaurot S Lösung zur Proteinfärbung	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Randomprimer (1:4, 0,5µg/µl)	Roche Life Science, Penzberg, Deutschland
RNAseZAP	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RNAsin Ribonuklease Inhibitor, (40U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
RQ1 RNase-freier DNase-I	Promega, Madison, WI, USA
Salzsäure 1N (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 32% (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spectra™ Multicolor High Range Page Ruler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
TRIS-Buffered-Saline (TBS)00	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween20 (Polyethylensorbitmonolaurat)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien**

### 3.1.6 Stammlösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
Blockierlösung 5% BSA in TBST 100ml	Auflösen von 5g BSA in 100ml TBST
Blockierlösung 5% Milchprotein in TBST 250ml	Auflösen von 12,5g Milchprotein in 250ml TBST
Blockierlösung 5% Milchprotein und 2% BSA in TBST 100ml	Auflösen von 5g Milchprotein und 2g BSA in 100ml TBST
DEPC-Wasser	DEPC 13,5 mM
Laufpuffer (Lämmli Puffer) 10x konzentriert	Glycin 1,92M; SDS1%; TRIS 0,25M
PBS Phosphate Buffered Saline	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 268 g/mol; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 136 g/mol; NaCl 58 g/mol
Platinum qPCR Supermix (Invitrogen)	12,5µl Platinum Supermix; 8,5µl Aqua dest.; 0,5µl Primer for (6µM); 0,5µl Primer rev (6µM); 0,5µl Primer taq (2µM)
Probenpuffer 5x konzentriert (50ml)	8,2ml Sammelgelpuffer; 10,3ml 10% SDS; 1,3ml Bromphenolblau; 5ml Glycin 1,92M; 12,5ml 2-Mercaptoethanol
RIPA (Radioimmunoprecipitation assay)-Puffer, pH 7,4	50mM Tris 150mM NaCl; pH 7,4 mit HCL einstellen; 10ml 10% NP-40 (Igepal); Na-Desoxy. 0,25%; 2mM EDTA
RIPA Puffer, modifiziert pH 7,4	Zugabe auf 5ml RIPA Puffer: 1µl Aprotinin 1µg/ml, 3,35µl Pepastatin A in Methanol 1µg/µl, 5µl Leupeptin 1µg/ml, 25µl PMSF 1mM, 25 µl NaF 1mM, und 25µl Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) 1mM
Sammelgel pH 6,8	Acrylamid 4%; APS 0,1%; SDS 0,1%; TEMED 0,004%; TRIS 0,16M
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M TRIS; pH 6,8 mit HCl titrieren
Stripping Buffer	TRIS 0,05M; SDS 2%; vor Gebrauch Zugabe von 70µl 2-Mercaptoethanol auf 10ml Puffer (0,7%)
SYBR® Green qPCR Supermix	12,5µl iQ SYBR® Green Supermix; 5,5µl Aqua dest.; 0,5µl Primer for (10µM); 0,5µl Primer rev (10µM)
TBS 10x pH 7,5	NaCl 1M; TRIS 0,1M
TBST-Waschpuffer	200ml TBST 10x konzentriert; 2 ml TWEEN; mit Aquadest auf 2000ml auffüllen

TBS-Tween (TBST)	TBS 1x; Tween 20 0,01%
Transferpuffer (Towbinpuffer) 1x konzentriert mit 10% Methanol	0,25 M TRIS; 1,92 M Glycin zum Blotten: 10% Methanol in 1x Puffer
Trenngel pH 8,8	Acrylamid 8-12%; APS 0,1%; SDS 0,1%; TEMED 0,004%; TRIS 0,26M
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M TRIS; pH 8,8 mit HCl titrieren
Triton X™-100 0,3% in PBS	Triton X™-100 0,3%; PBS

**Tabelle 6: Stammlösungen und Puffer**

### 3.1.7 Kits

Name	Verwendungszweck	Hersteller
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detektionsreagenz	Western Blot	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland (zuvor GE Healthcare)
GoTaq® qPCR MasterMix	qPCR mit SYBR®-Green Sonden	Promega, Madison, WI, USA
Permanent AEC Kit	Immunhistochemie	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Picro-Sirius-Red Stain Kit for Cardiac Muscle SRC-1-IFU	Picrosirius Red Färbung	ScyTek Laboratories Inc., Logan, UT, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Quantitative Proteinbestimmung	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Platinum™ qPCR SuperMix-UDG mit ROX	qPCR mit TaqMan®-Sonden	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TRI®-Reagent (Sigma-Aldrich)	RNA-Isolation	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 7: verwendete Kits**

### 3.1.8 Primer

Die Primer waren entweder bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden mit der Software Primer Express 3.0 entworfen und von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) hergestellt (for = forward, rev = reverse).

#### 3.1.8.1 TaqMan® Real-Time PCR

Name		Sequenz (5'-3')
Gapdh	for	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	rev	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
	probe	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
Hprt	for	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGCT
	rev	TAGGCTCATAGTGCAAATCAAAGTC
	probe	TTTTTAGAAATGTCAGTTGCTGCGTCCCC
18S	for	AGATCCCAGACTGGTTCCTG
	ref	TTGTTGTCTAGACCGTTGGC
	taq	CAGAACCTGGCTGTACTIONCCATCC
<i>Actb</i> (β-Actin)	for	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
	rev	GCCACCGATCCACACAGAGT
	probe	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC

<i>Ccnd1</i> (Cyclin D <sub>1</sub> )	for	CGCCCTCCGTATCTTACTTCAA
	rev	CTCACAGACCTCCAGCATCCA
	taq	CCATGCGGAAAATCGTGGCCAC
<i>Isl1</i> (Isllet-1)	for	ACAAGAAACGCAGCATCATGAT
	rev	TCCTGTCATCCCCTGGATATTAGT
	taq	CTCCAGCAGCAGCAACCCAACGAC
<i>Tcf7</i>	for	GCCCTCCTCAGGGAAGCA
	rev	CTGGCTTCTTAGCCTCCTTCTCT
	taq	CATATGATAGAAACCTGAAAAC
<i>Lef1</i>	for	CGTCAGATGTCAACTCCAAGCA
	rev	CTGACCTTGCCAGCCAATG
	taq	ACACCCTCCAGCTCCTGAAATCCCC
<i>Ly6a</i> (Sca1)	for	GCAGCAGTTATTGTGGATTCTCA
	rev	CGTTGACCTTAGTACCCAGGATCT
	taq	AGAACAATCTTTGCTTACCCATCTGCCCTC
<i>Tbx5</i>	for	ACCAAGAGGAAAGATGAGGAATGT
	rev	GTAGCCCGAGCGATAGAAGGT
	taq	CCAGCACGGAGCACCCCTATAAGAAGC
<i>Ctnnb1</i> (β-Catenin)	for	GGACGTTCAACAACCGGATTG
	rev	GGACCCCTGCAGCTACTCTTT
	taq	CCATTGTTTGTGCAGTTGCTTTATTCTCCC
<i>Pcna</i>	for	TCTGTGGGACTCCGGACTACA
	rev	CGTACGCCACCAATCTACA
	taq	TGCCCCAGAGATAATCGCTTACCAGCC
<i>Gsk-3β</i>	for	GCGAGACACACCTGCACTCTT
	rev	GAGCATGTGGAGGGATAAGGAT
	taq	ACCACTCAAGAACTGTCAAGTAACCCCCCT
<i>Lrp6</i>	for	GAGCCTCCTCAAGCAGTTCTTC
	rev	CCATGGTATAATGGGATCTTTCTGT
	taq	CACTTACTTCCCTGCAATTTTGAACCCACC

**Tabelle 8: Primer für TaqMan® Real-Time PCR**

### 3.1.8.2 SYBR® Green Real-Time PCR

Name		Sequenz (5'-3')
<i>Wnt 3a</i>	for	CCATCTTTGGCCCTGTTCTG
	rev	CGTGTCAGTGCAGAAAGCTACTC
<i>Wnt 11</i>	for	AGACAGGCAGTGCAACAAGACTT
	rev	GCACCAGTGGTACTTGCAGTGA
<i>Nkx2.5</i>	for	CCTTTAGGAGAAGGGCGATGA
	rev	GGGATGGATCGGAGAAAGGT
<i>Tcf7</i>	for	GCCCTCCTCAGGGAAGCA
	rev	CTGGCTTCTTAGCCTCCTTCTCT

**Tabelle 9: Primer für SYBR® Green Real-Time PCR**

### 3.1.9 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Hersteller	Bestellnummer
Lrp6	1:1000 in BSA	Anti-Mouse 1:2000	Millipore	MABS341
phospho- $\beta$ -Catenin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000	Cell signaling	#9561S
non-phospho- $\beta$ -Catenin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#8814S
$\beta$ -Catenin	1:1000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#8480S
GSK-3 $\beta$	1:2000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#9315
phospho- GSK-3 $\beta$	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#9336
Nkx2.5	1:1000 in BSA	Anti-Goat 1:2000	Abcam	AB106923
Islet-1	1:10000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Novus Biologicals	NBP1-95731
Vimentin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#5741
Wnt2b	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB178418
Wnt3a	1:1000 in BSA P70: 1:500 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000 P70: 1:500 in BSA	Millipore	09-162
Cyclin D <sub>1</sub>	1:5000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB134175
TCF1/7	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000	Cell Signalling	#2206
LEF1	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#2230
GAPDH	1:3000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#2118
HPRT	1:1000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB10479

**Tabelle 10: verwendete Primärantikörper**

Sekundärantikörper, HRP gekoppelt	Antigen	Hersteller	Bestellnr.
ZytoChem Plus HRP one Step Polymer Anti-Rodent	Kaninchen/Maus/Ratte	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	ZUC053
Anti-Rabbit	Kaninchen	Cell Signaling	#7074
Anti-Mouse	Maus	Cell Signaling	#7076
Anti-Goat	Ziege	Santa Cruz	SC2020

**Tabelle 11: verwendete Sekundärantikörper**



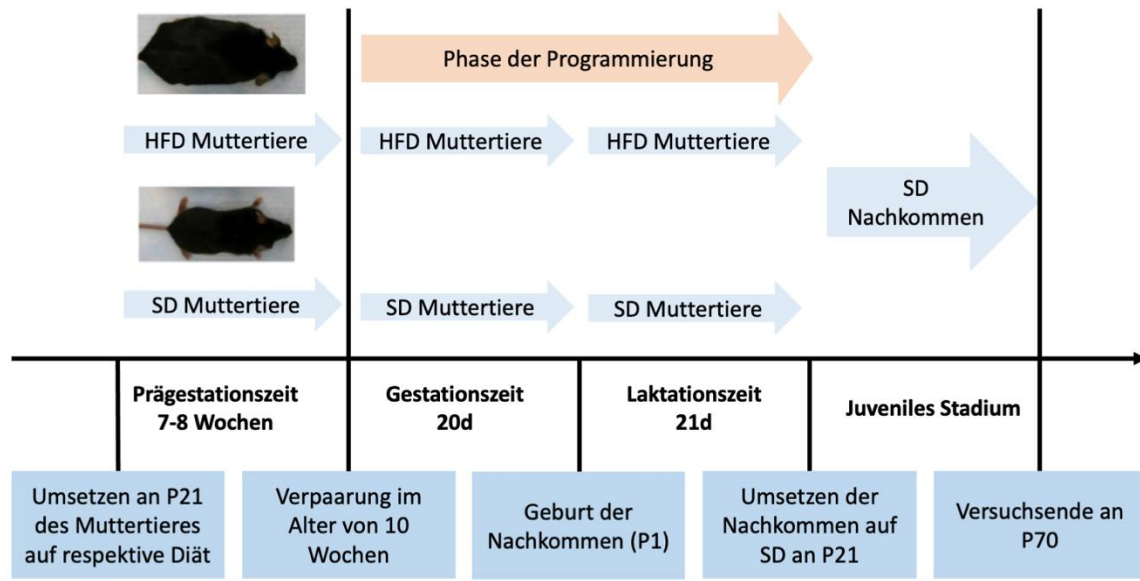
## 3.2 Versuchstiere

### 3.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Aufzucht und Pflege der Versuchstiere sowie die Tötung und Organentnahme wurden bereits im Rahmen vorangegangener Projekte der Arbeitsgruppe durchgeführt. Es wurden Wildtypmäuse vom Typ C57BL/6N verwendet. Die Tierhaltung und Pflege wurde im Tierstall des Instituts für Pharmakologie der Uniklinik Köln (Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Köln, Gleueler Str. 24, 50931 Köln) durch Tierpfleger, Veterinärmediziner und Biologen durchgeführt. Die Haltung erfolgte in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Durch Beleuchtung wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus mit einem Intervall von 12 Stunden simuliert. Die jeweilige Diät war *ad libitum* verfügbar. Alle Tierversuche wurden im Einklang mit den deutschen gesetzlichen Vorschriften und Anforderungen durchgeführt und vom Landesamt für Natur-, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt (AZ: 2012.A424). Für die Auswertung mittels molekularbiologischer und histologischer Techniken wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um geschlechtsabhängige Effekte auszuschließen.

### 3.2.2 Das Hochfett-Diät Modell

Es wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes zweiarmiges Tiermodell verwendet (Abb. 4). Dieses wurde entwickelt, um den Einfluss mütterlicher Adipositas auf Prozesse der metabolischen Programmierung verschiedener Organsysteme untersuchen zu können. Die Muttertiere der Versuchsgruppe erhielten hierzu bereits *pre-conceptionem* ab dem 21. Lebenstag (P21) für 7-8 Wochen eine hochkalorische Hochfett-Diät (*High Fat Diet*, HFD, C1057, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage). Hierdurch wurde ein adipöser Phänotyp induziert. Die Verpaarung (*Mating*) erfolgte in einem Alter von 10 Wochen. Während der Dauer der Schwangerschaft (Gestation) sowie während der Stillzeit (Laktation) verblieben die Muttertiere auf ihrer respektiven Diät. Nach dem Abstillen der Nachkommen (*Weaning*) am 21. postnatalen Tag (P21) erfolgte die weitere Ernährung der Nachkommen mit SD. Diese wurde für die verbleibende Lebensspanne der Tiere fortgeführt. Die Muttertiere der Kontrollgruppe erhielten über die gesamte Lebensdauer hindurch die ausgeglichene Standard-Diät (*Standard Diet*, SD, ssniff® R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), ebenso die Nachkommen im Anschluss an das Abstillen.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Hochfett-Diät -Modells und exemplarische Darstellung des adipösen Phänotyps der Muttertiere (oberes Bild) gegenüber dem normalen Phänotyp (unteres Bild).**

(HFD = Hochfett-Diät; SD = Standard-Diät; P21 = 21. postnataler Tag;; P21 = 21. postnataler Tag; P70 = 70. postnataler Tag.)

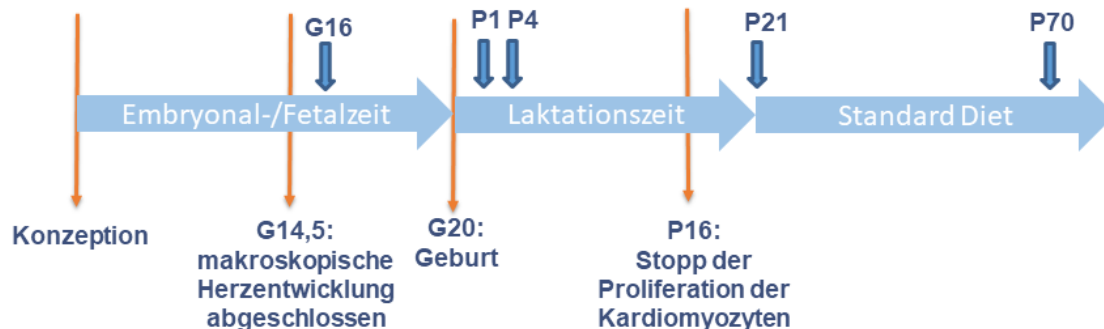
### 3.2.3 Präparation und Organentnahme

Die Präparation und Organentnahme wurden im Rahmen vorangegangener Projekte der Arbeitsgruppe durchgeführt (AZ: 2012.A424). An den zuvor genannten definierten Zeitpunkten wurde die tierschutzgerechte Tötung durch zervikale Dislokation durchgeführt. Um eine stressarme Tötung zu ermöglichen, erfolgte zuvor eine Analgosedierung durch intraperitoneal appliziertes Ketamin (100mg/kg) und Xylazin (10mg/kg). Das Körpergewicht wurde bestimmt und dokumentiert. Nach Freipräparation wurden Herz und weitere Organe (Lunge, Aorta, Leber, Nieren und epigonadales weißes Fettgewebe) entnommen und ihr Gewicht dokumentiert. Anschließend erfolgte das Schockgefrieren und Lagerung bei -80°C. Die gefrorenen Herzen wurden für das vorliegende Projekt verwendet.

### 3.2.4 Selektion der Entnahmezeitpunkte

Die Nachkommen wurden zu definierten Zeitpunkten getötet und Organe entnommen. Dies wurde bereits im Rahmen vorangegangener Projekte durchgeführt (AZ: 2012.A424). Die verschiedenen Zeitpunkte entsprechen Schlüsselzeitpunkten in der Herzentwicklung, um eine dynamische Regulierung abbilden zu können (Abb. 5).

Der 16. Schwangerschaftstag G16 wurde gewählt, um intrauterine Prozesse zu evaluieren. Zu diesem Zeitpunkt sind die Nachkommen den intrauterinen Einflüssen der HFD sowie des durch die HFD beeinflussten mütterlichen Metabolismus ausgesetzt. Bei der Maus ist am Gestationstag 14,5 die makroskopische Herzentwicklung abgeschlossen. Die Geburt erfolgte an Schwangerschaftstag G20. Die 1. und 4 postnatalen Tage (P1 und P4) wurden als frühe Zeitpunkte, zu denen die mikroskopische Herzentwicklung noch nicht abgeschlossen ist, ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt besteht durch die Laktation weiterhin eine Hyperalimentation. Die mikroskopische Herzentwicklung ist im murinen Herzen erst am 16. postpartalen Tag (P16) abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt findet somit weiterhin eine Proliferation von Kardiomyozyten statt. Der 21. postnatale Tag (P21) bildet den Zustand am Ende der Laktationszeit und postnatalen Hyperalimentation ab, entsprechend der Adoleszenz. Es wird zu diesem Zeitpunkt nach morphologischen Unterschieden der Herzen gesucht, welche bereits zu diesem frühen Zeitpunkt bestehen. Der späte Zeitpunkt P70 repräsentiert das junge Erwachsenenalter. Die Nachkommen beider Versuchsgruppen werden nun mit SD ernährt und es liegt keine aktuelle Hyperalimentation vor. Zu diesem Zeitpunkt wird nach weiterhin bestehenden, programmierten molekularen Veränderungen gesucht und der kardiale Phänotyp morphometrisch untersucht.



**Abb. 5: Molekulare Entwicklung des murinen Herzens, Schlüsselzeitpunkte der Entwicklung (orange) und Untersuchungszeitpunkte (blau).**

G16: 16. Gestationstag, P1, 4, 21, 70: 1., 4., 21., 70. postnataler Tag.

### 3.3 Histologische und immunhistologische Untersuchungen

#### 3.3.1 Aufarbeitung zur histologischen Untersuchung

Vorbereitend für die histomorphologischen und immunohistochemischen Untersuchungen wurde das Herzgewebe zunächst fixiert. Dazu wurden die kryokonservierten Herzen zunächst einzeln in Einbettungskassetten eingebracht und anschließend über 24h bei 4°C in 4% (mass/vol) Paraformaldehydlösung (PFA) eingelegt. Anschließend erfolgte für 72h die Immersion in 70%

Isopropanol-Lösung. Dies bewirkt eine Denaturierung und Quervernetzung der Proteine, so dass das Gewebe vor autolytischem Abbau geschützt und die Gewebestruktur bei den folgenden Schritten erhalten wird. Um eine gute Schneidbarkeit des Gewebes zu erreichen, wurde dieses paraffiniert. Zuvor erfolgte eine Entwässerung des Gewebes mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe, da Paraffin nicht wasserlöslich ist. Xylol wird als Intermedium verwendet, welches sowohl Paraffin als auch Alkohol gut löst. Hierzu wurde eine Gewebeeinfiltrationsmaschine (Leica ASP300s) verwendet. Dieser Schritt wurde durch Mitarbeitende des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt. Dabei kam das in Tabelle 12. dargestellte Protokoll zum Einsatz.

Immersionsmedium	Inkubationszeit
70% Ethanol	30 min
99,5% Isopropanol	3 x 30 min
99,5% Isopropanol	45 min
99,5% Isopropanol	3 x 75 min
Xylol	15min
Paraffin (55-65°C)	3 x 120 min

**Tabelle 12: Protokoll der Gewebeeinfiltrationsmaschine**

Die paraffinierten Herzpräparate wurden an der Paraffinausgießstation (Leica EG 1150H) in Paraffinblöcke eingebettet. Diese wurden zum Aushärten auf eine Kühlplatte gebracht (Leica EG 1150C), anschließend erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

Aus auf 4°C gekühlten Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom Leica Jung BioCut 2035 Horizontalschnitte der Dicke 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden für kurze Zeit an die Oberfläche des auf 37-40°C erwärmten Wasserbads (Meditate Tissue Flotation Bath TFB 55) gebracht, um die Schnitte zu strecken und eine homogene Dickenverteilung zu gewährleisten. Anschließend erfolgte das Aufbringen von jeweils 2 Schnitten auf einen Superfrost-beschichteten Objektträger (76 x 26mm, Thermo Scientific Superfrost Plus). Dieser wurde für einige Minuten zunächst auf einer Wärmeplatte bei 35-40°C und anschließend bei 40° im Wärmeschrank (Mettler UN30) über 12h getrocknet, um die Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu verbessern. Bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

### **3.3.2 Picrosirius-Red-Färbung**

Nach Anfertigen und Trocknen der Schnitte wurde für die Proben der Zeitpunkte P21 und P70 eine Picro-Sirius-Red-Färbung angewandt. Hierzu wurde das Picro-Sirius-Red Stain Kit for *Cardiac Muscle* (SRC-1-IFU, ScyTek Laboratories), verwendet. Dieses dient der Sichtbarmachung von Kollagenfasern, welche in lichtmikroskopischer Ansicht rot eingefärbt

werden, während Zytoplasma gelblich eingefärbt wird. Die Färbung wurde nach den Gebrauchsanweisungen des verwendeten Kits durchgeführt. Vorbereitend zur Anwendung der wässrigen Färbelösung wurden die Schnitte deparaffiniert und rehydriert. Zunächst erfolgte die Deparaffinierung in Neo-Clear für 3 x 10 min, anschließend die Hydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe mit einer Konzentration von je 100%, 96%, 80% und 70% für jeweils 1 min bis zu destilliertem Wasser. Anschließend folgte für 1-5 min eine Immersion in 0,2%iger Phosphomolybdänsäurelösung. Dies verringert die Anfärbung des Zytoplasmas, sodass ein stärkerer Kontrast zwischen Kollagen- und Hintergrundfärbung erreicht wird. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurde der Färbeschritt mit Picro-Sirius-Red-Lösung für 60-90 min durchgeführt. Darauf folgte ein zweimaliger kurzer Waschschrift mit 0,5% Essigsäurelösung und ein einmaliges Waschen in reinem Ethanol. Nun wurde der gefärbte Schnitt erneut dehydriert; hierzu erfolgte die Immersion in reinem Ethanol für 2 x 30 Sekunden und in Neo-Clear für 2 x 30 Sekunden. Abschließend wurden die Präparate in synthetischem Harz (Neo-Mount) eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt.

### **3.3.3 Immunhistochemische Färbungen**

#### **3.3.4 Färbetechnik**

Zunächst erfolgt die Deparaffinierung der Schnitte mit Neoclear und absteigender Alkoholreihe wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben. Anschließend erfolgt die Antigendemaskierung nach dem Prinzip des *Heat Mediated Antigen Retrieval*. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mithilfe eines Dampfgeräts für 25 min erwärmt. Der pH-Wert wurde dabei mit Zitratpuffer bei pH6 eingestellt. Anschließend erfolgte ein Abkühlen für 20 min. Dies bewirkt eine partielle Restauration der durch Formaldehyd bewirkten Quervernetzung der Proteine, sodass Epitope der verwendeten Antikörper erkannt werden können. Mit Liquidblocker-Stift wurde das Präparat auf dem Objektträger eingegrenzt, um beim Auftragen wässriger Lösungen deren Ausbreitung auf den Bereich des Präparates zu begrenzen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen folgte eine 10-minütige Inkubation mit einer 3% Wasserstoffperoxidlösung. Diese wurde durch Lösen einer Harnstoff-Wasserstoffperoxid-Tablette (FA Roth Nr. A7641.1) in 5ml destilliertem Wasser hergestellt. Es folgte das Auftragen von phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered Saline, PBS) als Waschschrift. Um die Zellmembran für die verwendeten Antikörper durchlässig zu machen, wurde eine Lösung von Triton™ X-100 0,3% in PBS für 10 min aufgetragen. Nachfolgend wurde für 1 Stunde mit Pierce™ SEA BLOCK™ Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert, indem jeweils 100µl der

Antikörperlösung aufgetragen wurden. Dieser richtete sich gegen die Epitope Cyclin D<sub>1</sub>, β-Catenin und Islet-1. Der Primärantikörper Cyclin D<sub>1</sub> wurde im Verhältnis 1:500 in *Antibody Diluent* (Agilent) verdünnt. Der Primärantikörper β-Catenin wurde im Verhältnis 1:100 in *Antibody Diluent* verdünnt. Für den Primärantikörper Islet-1 wurden verschiedene Konzentrationen ausgetestet, jedoch konnte keine Darstellung erfolgen. Als Negativkontrolle wurde bei einigen Proben anstatt der Inkubation mit dem Primärantikörper reiner *Antibody Diluent* verwendet. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu lösen, wurde 1x 10 min und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion des Primärantikörpers wird ein Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) -gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (ZytoChem Plus HRP *one Step Polymer anti rodent*). Dieser wird auf die Präparate aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS für 3 x 5 min, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu lösen. Zur Detektion des Sekundärantikörpers wurde das Permanent AEC Kit (Zytomed Systems) verwendet und die Substratlösung entsprechend den Gebrauchsanweisungen hergestellt. Diese enthält Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol). Nach Auftragen der Substratlösung auf das Präparat katalysiert die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase die Spaltung von Wasserstoffperoxid. Dabei wird AEC oxidiert und ein wasserunlösliches Reaktionsprodukt gebildet, welches am Ort des Antigens präzipitiert und lichtmikroskopisch sichtbar ist. Die Inkubation mit der AEC Permanent Lösung erfolgte für die Cyclin D<sub>1</sub>-Immunfärbung für 10 Minuten; für die β-Catenin-Immunfärbung für 13 min. Die restliche AEC Permanent Lösung wurde durch Auftragen von destilliertem Wasser für 1 Minute mit einer Pasteurpipette abgespült.

Für die Cyclin D<sub>1</sub>-Immunfärbung wurde eine Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxin nach Gill II durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte durch Eintauchen in die Färbelösung mit einer Dauer von 2 min gefärbt, anschließend für 1 Minute mit destilliertem Wasser abgewaschen und für 10 min in Leitungswasser gebläut, welches über einen kontinuierlichen Zulauf in Bewegung gehalten wurde. Anschließend erfolgte die Dehydratation mit einer aufsteigenden Alkoholreihe durch Eintauchen der Schnitte in eine Ethanollösung mit je 70%, 80%, 96% für jeweils 1 Minute, eine 100%-ige Lösung für 2 Minuten und Neo-Clear für 2 x 30 Sekunden. Anschließend wurde das Präparat in synthetisches Kunstharz (NeoMount) eingedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach Trocknen des Kunstharzes wurden Reste des Harzes mit einer Rasierklinge entfernt.

Für die β-Catenin-Färbung wurde mit 1:16 verdünnter Tartrazinlösung gegengefärbt, um eine leichte gelbe Hintergrundfärbung zu erzielen. Hierzu wurden die Schnitte für 2 min in verdünnter (auf 1:16 mit destilliertem Wasser) Tartrazin-Lösung (Scy Tek Laboratories) eingetaucht.

Da Tartrazin durch Wasser schnell ausgewaschen wird, erfolgte eine schnelle Dehydrierung durch 2 x 10-maliges Eintauchen in 100 % Alkohol und 2 x 30 Sekunden Neo-Clear. Anschließend wurde das Präparat in Neomount eingedeckt und mit einem Deckglas geschützt wie zuvor beschrieben.

### **3.3.5 Bildauswertung**

Zur mikroskopischen Betrachtung der gewonnenen Präparate wurde das Mikroskop BX43 Olympus verwendet. Die Präparate wurden in Brightfield-Technik evaluiert. Digitale Bilddateien wurden in 40x Vergrößerung mit dem Leica Slidescanner akquiriert. Zur Betrachtung wurde das Programm Aperio ImageView (Leica Mikrosysteme) verwendet.

#### **3.3.5.1 Cyclin D1-Immunfärbung**

Für die Cyclin D<sub>1</sub>-Immunfärbung standen zum Zeitpunkt P1 n=6 Proben in der SD- und n=7 in der HFD-Gruppe zur Verfügung. Im Programm Aperio ImageView wurden pro Probe 4 Sichtfelder der Größe 840 x 640 aus dem Bereich des mittleren Myokards akquiriert. Hierzu wurde das „extract image“ Tool verwendet und der Ausschnitt komprimierungsfrei im .tif Dateiformat gespeichert. Die erhaltenen Bilder wurden im Programm ImageJ geöffnet und die positiv eingefärbten Nuclei mit dem Count Tool manuell ausgezählt. Für jede Probe wurde der Mittelwert der 4 Sichtfelder gebildet. Für die SD-Kontrollgruppe wurde der Mittelwert aller Proben gebildet. Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism durchgeführt. Es wurde der ungepaarte nichtparametrische Mann-Whitney-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde \*p < 0,5 angenommen.

#### **3.3.5.2 Picrosirius Red-Färbung**

Die Auswertung der Sirius Red Färbung erfolgte in Anlehnung an Hadi et al [143]. Die Anzahl der Proben betrug den postnatalen Zeitpunkt P21 n=5 in der SD- und n=6 in der HFD-Gruppe. Für den postnatalen Zeitpunkt P70 betrug sie n=6 in der SD- und n=5 in der HFD-Gruppe. Unter Verwendung des Programms Aperio image viewer wurden pro Probe jeweils fünf repräsentative Sichtfelder der Größe 1240 x 670 aus dem mittleren linksventrikulären sowie zwei Sichtfelder aus dem rechtsventrikulären Myokard aufgenommen. Hierzu wurde das „extract image“ Tool verwendet und der Ausschnitt komprimierungsfrei im .tif Dateiformat gespeichert. Analog wurden jeweils zwei Sichtfelder aus dem rechtsventrikulären Myokard aufgenommen. Hierbei wurden Sichtfelder ausgeschlossen, welche mit zahlreichem Bindegewebe einhergehende Gefäße beinhalteten. Anschließend erfolgte die Bildauswertung im Programm ImageJ mit dem Ziel, eine Maßzahl für die Relation von kollagenreichen Bindegewebe zu myokardialem Gewebe und damit für myokardiale Fibrose zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein Farbschwellenwert definiert,

welcher die durch die Färbung rot eingefärbten Kollagenfasern identifiziert. Zunächst wurde das RGB-Originalbild (Red, Green, Blue) in einen HSB-Stack umgewandelt (*Hue*, *Saturation*, *Brightness*). Ein Schwellenwert der Sättigung wurde definiert, um nur schwach gefärbte Pixel nicht als Kollagenfaser zu definieren. Es wurden die Werte Farbwert (*Hue*) 230-255 und 0-5, Sättigung (*Saturation*) 45-255 und Helligkeit (*Brightness*) 0-210 verwendet. Pixel, welche innerhalb des definierten Schwellenbereiches liegen wurden als Kollagenfaser identifiziert und das Bild entsprechend in ein 8-bit schwarz/weiß Bild mit binärer Zuordnung eines einzelnen Pixels umgewandelt. Anhand dieses Bildes konnte der Flächenanteil der innerhalb der Schwellenwerte liegenden Pixel berechnet werden. Dieser wurde anschließend als Prozentwert angegeben. Analog hierzu wurde ein Schwellenwert definiert, welcher einen Pixel als Myokardgewebe definiert. Hierzu wurde das Bild in ein 8-bit Grayscale Bild umgewandelt und ein Schwellenwert von 0-203 angenommen, um einen Pixel als Myokard zu definieren. Das Bild wurde in ein Schwarzweißbild umgewandelt und anschließend der Anteil des Myokards bestimmt. Division der beiden Werte ergibt die Kollagen/Myokard Ratio, welche als Maßzahl für das vorhandene Kollagen und eine Fibrose dient. Um die Auswertung zu automatisieren und eine einfache Wiederholbarkeit mit verschiedenen Schwellenwerten zu ermöglichen, wurde ein Makro verwendet, welches innerhalb des Programms mit der „Record Macro“ Funktion erstellt und teilweise editiert wurde. Die Auswertung erfolgte zunächst mit dem Programm Microsoft Excel. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte der Proben gebildet. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 7 durchgeführt. Hierzu wurde ein ungepaarter, nichtparametrischer Mann-Whitney Test verwendet.

### **3.3.5.3 $\beta$ -Catenin-Immunfärbung**

Für die  $\beta$ -Catenin Immunfärbung wurden 7 Proben der SD- und 6 Proben der HFD-Gruppe verwendet. Die Auswertung des  $\beta$ -Catenin Immunfärbung erfolgte ebenfalls mit dem Programm ImageJ durch die Verwendung eines Farbschwellenwert, um zwischen  $\beta$ -Catenin und Hintergrundfärbung zu differenzieren. Als Schwellenwert für Beta-Catenin wurde ein Bereich der Sättigung von 100-255 angenommen. Dadurch konnte zwischen der intensiven Anfärbung des Permanent AEC Farbstoff am Ort des  $\beta$ -Catenins und der Hintergrundfärbung, welche ein ähnliches Farbspektrum aufwies, sich aber deutlich schwächer ausgeprägt zeigte, differenziert werden.

Zur automatischen Durchführung und einfachen Wiederholbarkeit wurde ein Makro erstellt. Das Originalbild wurde mit Hilfe eines Makros in einen HSB-Stack umgewandelt wie zuvor beschrieben und im Fenster Saturation ein Schwellenwert von 110-255 festgelegt. Der vom Schwellenwert



erfasste Bereich wurde in ein schwarzweißes Bild mit binärer Zuordnung der Pixel umgewandelt. Auf diese Weise kann er grafisch dargestellt und quantifiziert werden. Um die sich ergebene Maßzahl ins Verhältnis zum vorhandenen Myokard zu setzen, wurde analog zur Auswertung der Sirius Red Färbung der Anteil des Myokards am Bild bestimmt. Hierzu wurde das Bild in ein Grayscale Bild umgewandelt und ein Schwellenwert von 0-220 angenommen, um den Bereich als Myokardgewebe zu definieren. Über Umwandlung in ein Schwarzweißbild wurde die von Myokardgewebe eingenommene Fläche berechnet. Das ausgegebene Messergebnis für die  $\beta$ -Catenin- und die Myokard-Fraktion wurde in einer Tabelle ausgegeben und konnte so für die statistische Auswertung in Excel übertragen werden. Hier wurde durch Division der beiden Werte der  $\beta$ -Catenin/Myokard Quotient als Maßzahl berechnet, welche das Verhältnis der von  $\beta$ -Catenin eingenommenen Fläche im Verhältnis zum Myokard angibt. Es wurde jeweils der Mittelwert einer Probe gebildet und diese mit dem ungepaarten, nichtparametrischen Mann-Whitney-Test ausgewertet.

### **3.4 Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot**

Um die Proteinexpression von Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs, Proliferations-, Stammzell- und Fibrosemarkern an verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde aus Herzen der HFD- und der SD-Gruppe zunächst Protein isoliert. Dieses wurde anschließend quantifiziert. Mit einer Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE) wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine wurden durch Inkubation mit Primärantikörper, der sich gegen das zu untersuchende Epitop richtete, und anschließende Detektion des Primär mit einem Sekundärantikörpers markiert. Durch Verwendung einer Chemolumineszenz-basierten Detektionslösung kann der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden und so ein Western Blot-Bild erstellt werden. Es schließt sich die densitometrische Auswertung an, mit welcher die Proteinexpression quantifiziert werden kann. Zum Vergleich dienen Ladungskontroll-Proteine, deren Expression unabhängig von den Versuchsbedingungen nahezu konstant ist.

#### **3.4.1 Herstellung des Proteinisolates aus dem Gewebe**

Vorbereitend wurden 5 ml modifizierter Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer hergestellt. Hierzu wurden zu 5ml RIPA-Puffer 1 $\mu$ l Aprotinin, 3,35 $\mu$ l Pepastatin A in Methanol, 5 $\mu$ l Leupeptin, 25 $\mu$ l PMSF, 25  $\mu$ l NaF und 25 $\mu$ l Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) zugegeben. Der RIPA-Puffer führt zur Lyse der Zellmembran, wodurch intrazelluläre Proteine freigesetzt werden und in Lösung übergehen. Es wurde ein modifizierter RIPA-Puffer verwendet, dem Proteaseinhibitoren

und Phosphataseinhibitoren beigefügt wurden, um den Abbau des Proteins durch Proteasen und Phosphatasen zu verhindern. Herzen der HFD- und SD-Gruppe wurden zunächst längs halbiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. 150 µl des modifizierten RIPA-Puffers wurden hinzugefügt. Es folgte die mechanische Zerkleinerung zunächst durch Zerdrücken mit einem Minipistill für Eppendorf Tubes anschließend durch Sonifizieren mit dem Sonifiziergerät. Hierbei wurden die Einstellungen 50% Energie, 3x10% Zyklus, Dauer 20s gewählt. Nach jeder Probe erfolgte die Reinigung der Sonde mit Ethanol und destilliertem Wasser. Anschließend wurde für 1h auf Eis inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Lyse der Zellen und intrazelluläre Bestandteile werden freigesetzt. Zur Trennung der einzelnen Phasen der Lösung wurde für 5 Minuten mit 14.000 Umdrehungen/Minute bei einer Temperatur von 4°C in einer kühlbaren Zentrifuge (Hermle Z16 MK) zentrifugiert. Zelltrümmer und unlösliche Reste bleiben dabei am Boden des Reaktionsgefäßes zurück. Der Überstand enthält das gelöste Protein und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, durchmischt und in Aliquots aufgeteilt; hierbei wurden 2 x 50 µl und 1 x 40 µl gewonnen. Die Lagerung bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei -80°C.

### **3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Kit**

Vorbereitend zu weiteren experimentellen Schritten wurde die Konzentration des vorliegenden Proteins bestimmt. Hierzu wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es wurde zunächst das Arbeitsreagenz (*Working Reagent*) hergestellt, indem die enthaltenen *Reagent A* und *Reagent B* nach Gebrauchsanweisung im Verhältnis 50:1 angesetzt wurden. Mit der enthaltenen Bovines Serum Albumin (BSA)-Lösung bekannter Konzentration von 2mg/ml in 0,9% NaCl wurde eine Standardreihe mit sich jeweils halbierender Konzentration erstellt. Hierzu wurden 6 x 0,5 ml *Tubes* vorbereitet. In das erste *Tube* wurden 60µl BSA vorgelegt; in die *Tubes* 2-6 wurden 30µl modifizierter RIPA-Puffer vorgelegt. Durch Übertragen von 30µl auf das folgende *Tube*, 10-maliges Mischen mit der Pipette und erneutes Übertragen von 30µl auf das folgende *Tube* entstand eine Standardreihe mit sich jeweils halbierender BSA-Konzentration. (BSA pur, 1/2, 1/4, 1/16, 1/32). In das 7. *Tube* wurden 30 µl reiner modifizierter RIPA-Puffer gegeben; dieses diente als *Blanking*. Die Probelösungen mit dem isolierten kardialen Protein wurden im Verhältnis 1:10 und 1:20 mit modifiziertem RIPA-Puffer angesetzt. Anschließend wurden auf eine 96-well ELISA-Platte je 10µl aus den *Tubes* 1-6 der Standardreihe sowie des reinen modifiziertem RIPA-Puffers und 10 µl der jeweiligen Probelösung in ein *Well* pipettiert. Dabei wurde eine vorher festgelegte Zuordnung eingehalten. Die Zugabe von jeweils 200µl *Working Reagent* erfolgte mit der Mehrkanalpipette (Eppendorf). Die Platte wurde im Tecan Microplate Reader für 30 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit läuft folgende Reaktion ab: In einer Redoxreaktion reduzieren Peptinbindungen im Protein das in der BCA-Lösung enthaltende

zweiwertige Kupfer  $\text{Cu}^{2+}$  (II) Sulfat Pentahydrat zu einwertigem Kupfer  $\text{Cu}^+$ .  $\text{Cu}^+$  bildet mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure über eine Chelatbindung einen Komplex, welcher eine purpurviolette Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist. Die Menge des entstandenen Komplexes ist proportional zur Menge an  $\text{Cu}^+$ ; diese ist proportional zur Menge an anwesendem Protein. Es wurden nach Auswahl eines entsprechenden Protokolls im Steuerungsprogramm *Tecan Infinite Nano Quant i control 25* Lichtblitze bei 562 nm mit einer Bandbreite von 9 nm ausgesandt. Es wurde in 2 Messungen die Extinktion bei 562 nm gemessen und der Extinktionswert für jedes *Well* in Microsoft Excel ausgegeben. Es wurde jeweils der Mittelwert der Extinktionswerte beider Messungen eines *Wells* gebildet und für die weitere Berechnung verwendet. Der mittlere Extinktionswert des *Blanking-Wells* welches nur modifizierten RIPA-Puffers ohne Zugabe von Protein enthält, stellt den Nullwert da und wurde von den jeweiligen Extinktionswerten der Standardreihe und den Probelösungen subtrahiert (= *Blanking*). Mit den Extinktionswerten der Standardreihe wurde in Microsoft Excel eine lineare Funktion der Form  $f(x) = mx + b$  erstellt, welche den Extinktionswert in Abhängigkeit der Proteinkonzentration darstellt. Anhand dieser Funktion konnten ausgehend vom Extinktionswert die Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe errechnet werden.

### 3.4.3 SDS-PAGE und Western Blot

Um die Proteine innerhalb eines Acrylamidgels entsprechend ihres molekularen Gewichtes nach aufzutrennen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurden die Verfahren SDS-PAGE und Western Blot angewandt.

Zunächst wurden im Gelgießstand Sammel- und Trenngel nach im Labor vorhandenen Protokollen gegossen. Je nach Größe des Gels und gewünschter Matrixstruktur kamen verschiedene Volumina der Inhaltsstoffe Polyacrylamidlösung, 10% Ammoniumpersulfat (APS), 10% Natriumlaurylsulfat (SDS) und TEMED zum Einsatz. Hierbei wurden für das Trenngel je nach Größe der in dem jeweiligen Blot zu untersuchenden Proteine verschiedene Konzentrationen von 8-12% Polyacrylamidlösung angewendet. Durch Einlage eines Plastikammes beim Gießen des Sammelgels wurden Taschen geschaffen, in welche das Protein platziert werden konnte. Um eine gleichmäßige Linie beim Übergang des Trenn- in das Sammelgel zu erzielen, wurde dieses während des Erhärtens von einer Schicht destillierten Wassers bedeckt. Bis zur Verwendung wurde das Gel über Nacht mit feuchten Tüchern bedeckt bei 4°C gelagert. Zu Beginn der Gelelektrophorese wurden zunächst die Proteinproben vorbereitet. Hierzu wurden anhand der errechneten Proteinkonzentration der Probelösungen mit kardialem Protein das jeweilige Volume, welches 20µg Protein enthielt, errechnet, entnommen, in 0,5ml *Tubes* überführt und mit

destilliertem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Anschließend wurde jede Probe mit 3µl 5x konzentriertem Probenpuffer (5 x PP) versetzt und im Heizblock für 10 min bei 70°C erhitzt. Das enthaltene SDS (Natriumlaurylsulfat) und die Temperatur bewirken eine Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins; das enthaltene β-Mercaptoethanol bewirkt des Weiteren eine Spaltung von Disulfidbrücken. Dies ermöglicht die Anlagerung des Moleküls SDS an die Aminosäuren, wodurch das Protein eine negative Ladung proportional zur Anzahl der Aminosäuren erhält. Der Gelgießstand wurde in den Elektrophoreseapparat eingebaut und Lämmli-Puffer 1x konzentriert zur Immersion des Gels verwendet. Die Beladung der Taschen erfolgte mit jeweils 20µg Protein. Als Marker wurde je 5µl *SDS Page Ruler* und *Spectra High Range Page Ruler* verwendet, welche in die erste und letzte respektive zweite Tasche eingebracht wurden. Das molekulare Gewicht dieser Proteine ist bekannt, wodurch deren Banden als Referenz bei der Identifikation der Proteingröße dienen. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Proteine zur Anode hin und werden dabei durch die Matrixstruktur des Polyacrylamids entsprechend ihres molekularen Gewichts aufgetrennt. Zunächst wird zum Durchlaufen des Sammelgels eine Spannung von 80V für 20 min angelegt. Anschließend wird eine Spannung von 120V für ca. 2 Stunden genutzt. In der Polyacrylamidmatrix des Trenngels findet eine Auftrennung der Proteine statt. Eine visuelle Kontrolle des Fortschritts erfolgte durch die blau eingefärbte Lauffront, welche stets innerhalb des Gels verblieb. Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der nach Größe angeordneten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA 85 0,45µm, Roth) in einer Blotkammer (*PerfectBlue Semi Dry Electroblotter*, PeqLab). Die Nitrozellulosemembran wird vorbereitend zum Blotting mit je zwei Filterpapieren auf jeder Seite umgeben und für 30 min in Transferpuffer getränkt, um die Membran zu aktivieren und die Filterpapiere zu durchtränken. Als Transferpuffer wurde 1x konzentrierter Towbin-Puffer mit einem Gehalt von 10% Methanol als Transferpuffer verwendet. Dieser wurde aus 20ml 10x konzentriertem Towbinpuffer und 20ml Methanol hergestellt, welcher mit destilliertem Wasser auf 200ml aufgefüllt wurde. Anschließend wurden in der Blotkammer zwei durchtränkte Filterpapiere, die aktivierte Membran, das die Proteine enthaltene Trenngel und darüber erneut zwei Filterpapiere angeordnet. Die Filterpapiere auf beiden Seiten sorgen für elektrische Leitfähigkeit und schützen die Blotkammer vor übertretenden Proteinen. Das Blotting wurde für 2 Stunden mit 1,3mA/cm<sup>2</sup> durchgeführt; in der Regel bei zwei Gelen der Größe 7cm x 9cm entsprach die Spannung 164mA. Durch das Anlegen der elektrischen Spannung in radialer Ausrichtung werden die Proteine durch ihre Wanderung zur Anode hin auf die darunterliegende Membran übertragen. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran entnommen und zur Evaluierung des Transfererfolges für 2 min in Ponceaurot gefärbt. Anschließend überschüssiges Ponceaurot durch zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser ausgewaschen, sodass selektiv

die Proteinbanden angefärbt wurden. Zur Dokumentation wurde unter Verwendung der Kamera und des Programms Image Lab eine Aufnahme angefertigt. Anhand der Referenzmarkerbanden wurden die Proteinbanden von Interesse auf der Membran identifiziert und diese so zugeschnitten, dass auf einem Membranabschnitt jeweils nur ein zu untersuchendes Protein lokalisiert war, welches gut voneinander abgrenzbar war. Um bei der folgenden Verwendung des Primärantikörpers unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranteile für 90 Minuten in eine Lösung aus 5% Milchprotein und 2% Bovines Serumalbumin (BSA) in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit dem Tensid Tween20 (*Tris-buffered saline with Tween20*, TBST) gegeben. Durch Platzierung auf eine rotierende Schüttelplatte in langsamer Einstellung wurde die Lösung kontinuierlich in Bewegung gehalten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Teilstücke mit dem entsprechenden Primärantikörper, welcher sich gegen ein Epitop des zu bestimmenden Proteins richtete. Hierzu wurden die Membranstücke in kleine Tüten aus Plastikfolie eingeschweißt, welche mit dem Laminiergerät hergestellt und je nach Größe mit 3-7,5 ml der Primärantikörperlösung gefüllt und luftfrei verschlossen wurden. Die Inkubationsdauer betrug zunächst 30 min bei Raumtemperatur; anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Es wurden monoklonale Primärantikörper der Spezies Maus, Kaninchen und Ziege verwendet. Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper aufgelistet (Tabelle 13).

Antikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Hersteller	Bestellnummer
Lrp6	1:1000 in BSA	Anti-Mouse 1:2000	Millipore	MABS341
phospho- $\beta$ -Catenin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000	Cell signaling	#9561S
non-phospho- $\beta$ -Catenin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#8814S
$\beta$ -Catenin	1:1000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#8480S
GSK-3 $\beta$	1:2000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#9315
phospho- GSK-3 $\beta$	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#9336
Nkx2.5	1:1000 in BSA	Anti-Goat 1:2000	Abcam	AB106923
Islet-1	1:10000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Novus Biologicals	NBP1-95731
Vimentin	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#5741
Wnt2b	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB178418
Wnt3a	1:1000 in BSA P70: 1:500 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000 P70: 1:500 in BSA	Millipore	09-162

Cyclin D <sub>1</sub>	1:5000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB134175
TCF1/7	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:1000	Cell Signalling	#2206
LEF1	1:1000 in BSA	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#2230
GAPDH	1:3000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Cell signaling	#2118
HPRT	1:1000 in Milch	Anti-Rabbit 1:2000	Abcam	AB10479

**Tabelle 13: Liste der verwendeten Primärantikörper**

Sekundärantikörper, HRP gekoppelt	Antigen	Hersteller	Bestellnr.
ZytoChem Plus HRP one Step Polymer Anti-Rodent	Kaninchen/Maus/Ratte	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	ZUC053
Anti-Rabbit	Kaninchen	Cell Signaling	#7074
Anti-Mouse	Maus	Cell Signaling	#7076
Anti-Goat	Ziege	Santa Cruz	SC2020

**Tabelle 14: verwendete Sekundärantikörper**

Zum Lösen unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers wurde im Anschluss 3x 10 min mit TBST-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Meerrettichperoxidase gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Entsprechend der Spezies des Primärantikörpers wurde ein polyklonaler *anti-rabbit*-, *anti-mouse*- oder *anti-goat*- Antikörper verwendet, welcher sich gegen das F<sub>c</sub>-Segment des verwendeten Primärantikörpers richtete. Zum Lösen unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurde anschließend erneut 3x 10 min mit TBST auf dem Rüttler gewaschen. Anschließend folgte die Detektion des Sekundärantikörpers. Hierzu wurde das Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detektionsreagenz (Fisher Scientific) verwendet. In einem 1,5 ml *Tube* wurden je 100µl, bei großen Membranstücken je 200µl der beiden Reagenzien Peroxidlösung und *Luminol Enhancer Solution* im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Blotmembran aufgebracht und für jeweils 1 min inkubiert. Das Programm ImageLab wurde verwendet, um abhängig vom verwendeten Antikörper ein Imaging-Protokoll zu erstellen. Die Detektion basiert auf der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid, welche von der mit dem Sekundärantikörper konjugierten Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Dabei kommt es durch Chemilumineszenz zur Lichtemission. Diese wurde mit der Kamera sichtbar gemacht und in ihrem zeitlichen Verlauf kumulativ dargestellt. Für die meisten Epitope wurden in einem Zeitraum von 10-100 Sekunden alle 10 Sekunden eine Aufnahme angefertigt; für die stark vorhandenen Ladungskontroll-Proteine

wurden kürzere Zeiten und Intervalle verwendet. Um weitere antikörpergestützte Detektionen von Proteinen auf dem gleichen Membranabschnitt durchführen zu können, wurden die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt (= *Stripping*). Hierzu wurde der Membranabschnitt zusammen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem (70  $\mu$ l pro 10 m) *Stripping*puffer für 15 min im Wasserbad bei 56°C erwärmt. Dies löste die Bindung der Primär- und Sekundärantikörper. Es folgte ein Waschvorgang mit TBST-Puffer für 3x10 Minuten. Anschließend konnten erneut die Schritte des Blockierens unspezifischer Bindungen und Inkubation mit Primärantikörpern erfolgen. Das *Stripping* wurde in der Regel 2-mal, in wenigen Fällen 3-mal durchgeführt.

#### **3.4.4 Densitometrische Auswertung der Signalintensität**

Zur Auswertung wurde das Programm ImageLab verwendet. Für die Auswertung wurde die zeitlich späteste Aufnahme mit der stärksten Intensität gewählt, bei der es noch nicht zur Übersättigung gekommen war. Es wurde ein Auswertungsbereich festgelegt und die Intensität des Chemilumineszenzsignals densitometrisch ausgewertet. Der Zahlenwert der densitometrischen Auswertung wurde in Microsoft Excel ausgegeben. Es wurde eine Normierungstabelle angelegt, in dem der Messwert einer Probe zunächst durch den Messwert des Ladungskontroll-Proteins dividiert und so auf das Ladungskontroll-Protein normiert wurde. Anschließend wurde der Mittelwert der normierten Werte der Kontrollgruppe gebildet und die normierten Messwerte durch diesen dividiert wurde. Als Ergebnis konnten alle Messwerte als Vielfaches von 1 angegeben werden. Die weitere statistische Auswertung und grafische Aufarbeitung erfolgten mit dem Programm Graph Pad Prism®.

### **3.5 Untersuchung der Genexpression mittels *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction***

Um die Auswirkungen der mütterlichen HFD auf die Genexpression von Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs, Stammzell- und Proliferationsmarkern zu evaluieren, wurde aus Herzen der HFD und Herzen der SD-Gruppe RNA isoliert und diese anschließend quantifiziert. Die enthaltenen Messengers RNA (mRNA) wurde anschließend spezifisch in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit einer quantitativen Real Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) konnte anschließend die Genexpression untersucht werden.

#### **3.5.1 mRNA-Isolation mit TriReagent**

Zur Isolation von mRNA aus dem Herzgewebe wurde TRI®-Reagent (Sigma-Aldrich) verwendet. Bei allen Vorgängen wurde auf besonders hygienisches und sauberes Arbeiten geachtet, um eine Kontamination mit fremder RNA oder mit RNA spaltenden Enzymen (RNAsen) zu verhindern. Die

bei -80° gelagerten nativen Herzen wurden auf Trockeneis gelagert. Mit dem Skalpell wurde ein Stück Gewebe aus dem Bereich der Herzspitze abgetrennt und in ein vorbereitetes 2 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. 500 µl TRI®-Reagent wurden zugegeben, um die Zellen zu lysieren und intrazelluläre Bestandteile, vor Allem Proteine, DNA und mRNA, freizusetzen. Unter Verwendung einer Metallkugel wurde das Gewebe in einer Gewebemühle für 20 Sekunden bei 30 Hz mechanisch homogenisiert. Anschließend wurde die homogenisierte Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100µl Chloroform wurden zugegeben und für 15 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt, um eine Bindung der RNA an die Chloroformmoleküle zu erreichen. Es folgte eine Inkubation von 2-3 min bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugieren für 15 min bei 12 000 Umdrehungen/min wurde eine Auftrennung in drei Phasen erreicht. Die RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase, die DNA in der Interphase und Proteine in der unteren Phase. Die obere Phase wurde mit einer 200µl-Pipette abgenommen und in ein neues *Tube* überführt, wobei die sich weiß darstellenden Zellreste und Membranen im Gefäß verblieben. Es ließen sich stets >200µl entnehmen, in der Regel 250µl. Zum abgenommenen Überstand wurde 250µl Isopropanol zugegeben, um die RNA auszufällen. Um eine Durchmischung und eine ausreichende Reaktionszeit zu gewährleisten, wurde das Eppendorf-Gefäß für 10 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt und bei 4° für 20 min inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 15 000 U/min zentrifugiert, wodurch die Bildung eines *Pellets* aus ausgefallter RNA am Boden des Tubes erzielt werden konnte. Anschließend wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen und Flüssigkeitsreste durch behutsames Klopfen auf ein Tuch entfernt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit Ethanol. Hierzu wurden 250µl der 75%-igen Ethanolölösung hinzugefügt und 3-4x geschwenkt. Im Anschluss wurde für 5 min bei 15 000 U/min und 4° zentrifugiert und das Ethanol abgegossen. Das RNA-Pellet verblieb jeweils am Boden des Eppendorf-Gefäßes. Um das restliche Ethanol zu entfernen, wurde das Pellet im *Tube* für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Um die getrocknete RNA in Lösung zu überführen, wurden pro Probe 30µl RNase freies Wasser (Diethylcarbonat-, DEPC-Wasser) zugegeben und 10 x mit der Pipette durchmischt, um eine homogene Lösung zu erzielen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### **3.5.2 Photometrische Bestimmung des mRNA-Gehaltes**

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurden Konzentration und Reinheit der isolierten RNA bestimmt. Dazu wurde der Tecan Microplate Reader verwendet. In der Steuerungssoftware *Tecan i control* wurde die Applikation *Nukleinsäuren quantifizieren* und der Typ *RNA* ausgewählt. RNA weist ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf und kann daher photometrisch bestimmt werden. Zunächst erfolgte das *Blanking* mit RNase freiem Wasser. Anschließend wurden je 2µl der zu



bestimmenden Probelösung pro *Well* auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und durch Messen der Absorption die Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  bestimmt. Des Weiteren wurde als weiterer Wert eine Maßzahl für die Reinheit der RNA bestimmt. Anhand der errechneten Konzentrationen wurden durch Entnahme einer Menge Probelösung und Zugabe einer berechneten Menge RNase freien (DEPC-)Wassers in allen Proben dieselbe Konzentration erzielt.

### 3.5.3 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Um eine spätere Quantifizierung mittels Real Time Polymerase Chain Reaction durchführen zu können, musste die erhaltene fragile mRNA durch reverse Transkription in copyDNA (cDNA) umgeschrieben werden. Es wurden drei Lösungen vorbereitet, eine DNase-Verdau-Lösung, der Mastermix A, welcher Randomprimer sowie Oligo dt-Primer enthält, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA binden, sowie der Mastermix B, welcher die Reverse Transkriptase sowie dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) als Bausteine der cDNA enthält. Die DNase-Verdau-Lösung wurde pro Probe und Ansatz aus  $1\mu\text{l}$  10x konzentriertem DNase-I-Pufferlösung sowie  $1\mu\text{l}$  RNase-freier DNase-I-Lösung (RQ1/Promega) hergestellt. Der Mastermix A wurde pro Probe und Ansatz aus je  $0,6\mu\text{l}$  Randomprimer ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und  $0,4\mu\text{l}$  Oligo dt-Primer ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) sowie  $4\mu\text{l}$  DEPC-Wasser hergestellt. Für die Herstellung des Mastermix B wurden pro Probe und Ansatz  $5\mu\text{l}$  MMLV-Puffer 5x konzentriert,  $1,25\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10mM),  $0,5\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ ),  $1\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase (MMLV, Promega,  $200\text{U}/\mu\text{l}$ ) und  $2,25\mu\text{l}$  DEPC-Wasser verwendet. Die Probenzahl betrug für den postnatalen Zeitpunkt P1  $n=16$ . Für jede Probe wurden 4 Ansätze vorbereitet, welche zunächst gemeinsam vorbereitet wurden. Hierzu wurde für jeden der Ansätze  $1\mu\text{g}$  RNA benötigt. Es wurde das jeweilige Volumen an RNA-Lösung entnommen, welches  $4\mu\text{g}$  RNA enthielt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von  $32\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zunächst wurde in der Lösung vorhandene genomische DNA eliminiert. Hierzu wurde pro Probe für alle Ansätze gemeinsam  $8\mu\text{l}$  DNase-Verdau-Lösung zugefügt, welche in der Probelösung vorhandene DNA durch enzymatischen Abbau entfernt. Es wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Aktivität der DNase-I irreversibel zu blockieren und einen Abbau der späteren cDNA zu verhindern, wurde anschließend  $4\mu\text{l}$  25mM EDTA Stop-Solution zugefügt. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bindet Magnesium- und Calciumionen, welche notwendige Kofaktoren der DNase sind. Mit dem Vortexer wurde die Lösung kurz durchmischt und mit der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Tubes zu sammeln. Zur thermischen Inaktivierung des Enzyms wurde für 15 Minuten auf  $65^\circ\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurde  $5\mu\text{l}$  pro Ansatz =  $20\mu\text{l}$  Mastermix A zu jeder Probe hinzugefügt. Es wurde für 5 Minuten auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt. Bei dieser Temperatur kommt es zum *Annealing* der Primer an die komplementären Basenpaare. Um die Proben zu kühlen, wurden die Proben anschließend 1 Minute auf Eis gelegt.

Anschließend wurden 10µl pro Ansatz = 40µl Mastermix B hinzugefügt. Dieser enthält die Reverse Transkriptase (MMLV) und Nukleotidbausteine (dNTP-Mix). Es wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert; bei dieser Temperatur weist die verwendete Reverse Transkriptase die höchste Aktivität auf. In dieser Zeit kommt es durch die Aktivität der Reversen Transkriptase ausgehend von den angelagerten Primern zum Anbau komplementärer Basenpaare und zur Synthese der cDNA. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem die Proben für 1 min auf Eis gelegt wurden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20°C.

### 3.5.4 Primerauswahl für die qPCR

Um die Genexpression untersuchen zu können, werden für die quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (q-RT-PCR) jeweils genspezifische Primer benötigt, damit die Amplifikation und Quantifizierung der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA durchgeführt werden kann. Es werden jeweils ein *forward* (for) und ein *reverse* (rev)-Primer benötigt, damit die Nukleotidsequenz amplifiziert werden kann. Des Weiteren wird zur Quantifizierung eine fluoreszenzmarkierte Sonde (*probe*) benötigt, welche sich ebenfalls an die genspezifische Nukleotidsequenz anlagert und über welche der Ablauf der Amplifikation durch photometrische Messung nachempfunden werden kann. Die verwendeten Primer und Sonden waren zum Teil im Labor bereits vorhanden, zum Teil wurden sie ausgewählt und neu bestellt. Zur Auswahl neuer Primer wurde in der Genomdatenbank USC *Genome Browser* das entsprechende Gen im Organismus Maus ausgewählt und die Sequenz der cDNA angezeigt. Anschließend wurde mit der Software Primer Express 3.0 passende Primer für die TaqMan®-Quantifikation gesucht. Hierbei wurde folgende Parameter verwendet: Primer Länge 17-26 Nukleotide; Taq-Sondenlänge 20-30 Nukleotide und Amplikonlänge 80-150 Nukleotide. Es wurden Primer ausgewählt, deren korrespondierende Gensequenz keine *Hairpins* aufwies, die *Junctions* möglichst mit der Taqman®-Sonde korrespondierten, und die eine möglichst niedrige *Penalty* aufwiesen. Mit Pubmed Blast wurde kontrolliert, ob Primer sowie Sondensequenz sich auf dem entsprechenden Chromosom befinden. Bei der TaqMan®-qPCR wurde für den *forward* und *reverse* Primer eine Konzentration von 6µM verwendet, für die Taqman®-Sonden wurde eine Konzentration von 2µM verwendet. Für die SYBR®-qPCR wurde für die *forward* und *reverse* Primer eine Konzentration von 10µM verwendet.

### 3.5.5 Durchführung der Real Time PCR

Mithilfe des Verfahrens der q-RT-PCR kann cDNA vervielfältigt und gleichzeitig quantifiziert werden. Die PCR wird mit einem Thermocycler durchgeführt. Sie erfolgt in drei Schritten: 1) Die Erhöhung der Temperatur bewirkt die thermische Denaturierung des DNA-Doppelstranges und Aufspaltung in zwei Einzelstränge. 2) Nun erfolgt bei einer geringeren Temperatur die Anlagerung

(Hybridisierung) der jeweils spezifischen Primer an die komplementären Sequenzen des jeweiligen Genabschnitts. 3) In einem dritten Schritt erfolgt die Verlängerung (Elongation) des DNA-Tochterstranges durch das thermostabile Enzym Taq-Polymerase. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt; insgesamt werden 40 Zyklen durchlaufen. Der DNA-Gehalt steigt zunächst exponentiell, bevor sich durch das abnehmende Angebot an Primern und Nukleotiden eine Sättigung und Plateaukurve einstellt.

Um die Zunahme der cDNA während der exponentiellen Phase der Amplifikation zu quantifizieren, werden fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. Deren Fluoreszenz kann photometrisch gemessen werden. Es wurden sowohl TaqMan®-Sonden als auch der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet. Der SYBR®-Green-Farbstoff bindet an DNA-Stränge und absorbiert sowie emittiert Licht einer jeweilig spezifischen Wellenlänge, welches photometrisch gemessen werden kann. Die Zunahme des PCR-Produkts kann über die Zunahme der Fluoreszenz quantifiziert werden. Die TaqMan®-Sonde besteht aus einer Kette aus zum jeweilig cDNA-Strang komplementären Oligonukleotiden, welche am 5' Ende einen fluoreszierendes Reportermolekül (FAM) und am 3'-Ende ein Quencher-Molekül (TAMRA) trägt. Durch die räumliche Nähe von *Reporter* und *Quencher* wird durch den Effekt der Förster-Resonanzenergieübertragung (FRET) das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt, indem die Energie auf den *Quencher* übertragen wird. Die FRET ist sehr distanzabhängig und findet bei Zunahme der räumlichen Distanz nicht mehr statt. Bei Polymerisation des Tochterstranges wird durch die Taq-Polymerase die TaqMan®-Sonde durch die die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch wird die räumliche Nähe von *Reporter* und *Quencher* aufgehoben und bei Exzitation gibt das Reportermolekül ein Fluoreszenzsignal ab, welches photometrisch gemessen werden kann. Bei der Amplifikation der DNA-Stränge werden immer mehr TaqMan®-Sonden gespalten, wodurch die Fluoreszenz zunimmt, bis es zur Ausbildung eines Plateaus kommt.

Für die TaqMan®-qPCR wurde ein Mastermix hergestellt, wobei pro Probe 12,5µl Platinum™ qPCR SuperMix-UDG mit ROX (Thermo Fisher Scientific), 8,5µl destilliertes Wasser, 0,5µl Taq-Sonde (2µM), 0,5µl *forward* Primer (6µM) und 0,5µl *reverse* Primer (6µM) verwendet wurden. Der Supermix enthält Taq-Polymerase, dNTP, Mg<sup>2+</sup>, Puffer und ROX, welches als Referenz bei der photometrischen Fluoreszenzmessung dient. Bei einer Probenzahl von n=16 zum Zeitpunkt P1 und einer Negativkontrolle wurde die 20-fache Menge der obenstehenden Angaben verwendet. Pro 96-Well-Platte konnten maximal 4 Gene gleichzeitig getestet werden, für die 4 Mastermixe mit den entsprechenden Primern und Sonden hergestellt wurden. 22,5µl Mastermix wurden in die 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 2,5µl cDNA-Lösung (*template*) hinzugegeben;

hierzu wurden DNase freie Pipettenspitzen verwendet. Für jedes Gen wurde eine gesonderte Negativkontrolle durchgeführt, bei dem statt der Probelösung 2,5µl destilliertes-Wasser ins Well hinzugegeben wurde. Der Mastermix für die SYBR®-qPCR wurde aus 10µl GoTaq® qPCR MasterMix (Promega), 8µl destilliertes-Wasser, 0,5µl *forward* Primer (10µM) und 0,5µl *reverse* Primer (10µM) pro Probe hergestellt. Der GoTaq® qPCR MasterMix enthält die Taq-Polymerase, die benötigten dNTPs und den SYBR®-Green Farbstoff. Inklusiv der Negativkontrolle wurde daher die 20-fache Menge vorbereitet. Es wurden 19µl des jeweiligen Mastermixes in der 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurde 1µl der Probelösung mit DNase-freien Pipettenspitzen zugefügt. Bei der Negativkontrolle wurde stattdessen 1µl destilliertes Wasser zugefügt. Die Wellplatte wurde mit Folie verschlossen. Vor dem Start des Thermocycler wurde für 3 min bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Wells zu sammeln. Das Bedienprogramm Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System Software wurde verwendet und das gewünschte Protokoll ausgewählt. Die Plattenbelegung wurde mit den Namen der zu untersuchenden Gene eingetragen. Bei der TaqMan®-qPCR wurde als *Reporter* FAM und als *Quencher* TAMRA ausgewählt sowie ein Reaktionsvolumen von 25µl ausgewählt. Für die SYBR®-qPCR wurde der *Reporter* SYBR® und *Quencher none* ausgewählt; das Reaktionsvolumen betrug hier 20µl. Bei der SYBR®-qPCR wurde nach den 40 Zyklen zusätzlich die Schmelzkurve ermittelt, welche Auskunft über die Spezifität der Primer gibt. Neben den zu untersuchenden Genen wurde die mRNA-Expression des konstant exprimierten Referenzgen (*Housekeeping Gene*) Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*Gapdh*) bestimmt und als Kontrolle verwendet. Ebenso wurde die Expression von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*),  $\beta$ -Actin (*Actb*) und 18s rRNA als weitere Referenzgene untersucht.

### 3.5.6 Auswertung der q-RT-PCR

Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Office Excel sowie GraphPad Prism® 7 durchgeführt. Als Ergebnis der photometrischen Fluoreszenzdetektion der TaqMan®- oder SYBR®-Green-Sonden werden die *Cycle Threshold* (Ct)-Werte der einzelnen Gene angegeben. Der Ct-Wert stellt einen theoretischen Wert dar und bezeichnet denjenigen Zyklus, bei dem die Fluoreszenz über einen definierten Schwellenwert oberhalb der Hintergrund-Aktivität ansteigt. Mithilfe des Ct-Wertes lässt sich eine relative Quantifizierung durchführen. Hierzu wurde die  $\Delta\Delta$ Ct-Methode verwendet. Zunächst wurde der 1.  $\Delta$ Ct-Werte berechnet, indem für jede Probe n die Differenz des Ct-Wertes des Zielgens zum Ct-Wert des Referenzgens gebildet wurde [ $1. \Delta Ct = Ct$  (Zielgen von n) – Ct (Referenzgen von n)]. Auf diese Weise wird der Ct-Wert auf das konstant exprimierte Referenzgen *Gapdh* normalisiert, um Variationen der Menge an enthaltener cDNA zu begegnen. Anschließend wurde der 2.  $\Delta$ C-Wert berechnet. Hierzu wurden die Proben der

Kontrollgruppe (SD-Gruppe) betrachtet und der Mittelwert der Ct-Werte der Zielgene sowie der Mittelwert der Ct-Werte der Referenzgene gebildet. Der 2.  $\Delta C$ -Wert errechnete sich als die Differenz beider Mittelwerte [ $2. \Delta C_t = MW (Ct \text{ Zielgen; SD-Gruppe}) - MW (Ct \text{ Referenzgen; SD-Gruppe})$ ]. Schlussendlich wurde der  $\Delta\Delta C$ -Wert jeder Probe berechnet, indem die Differenz des 1. sowie des 2.  $\Delta C_t$ -Werts gebildet wird  $\Delta\Delta C_t(n) = 1.\Delta C_t(n) - 2.\Delta C_t = [Ct (Zielgen \text{ von } n) - Ct (Referenzgen \text{ von } n)] - [MW (Ct \text{ Zielgen, SD-Gruppe}) - MW (Ct \text{ Referenzgen, SD-Gruppe})]$ . Es besteht eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an cDNA und dem Ct-Wert. Aus diesem Grund wurde anschließend für jede Probe der Wert  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  berechnet. Die entstehende Zahl ist ein Maß für die n-fache Expression des Zielgens und wurde für die weitere statistische Analyse in GraphPad Prism® überführt.

### **3.6 Statistische Auswertung**

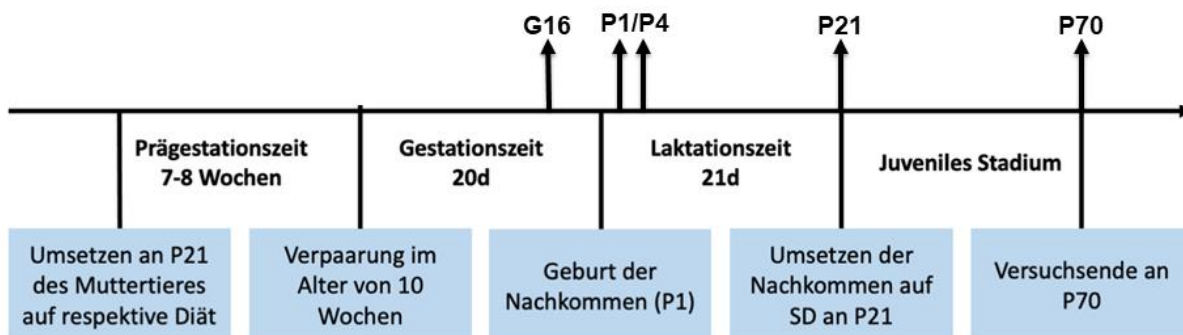
Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurde der Mann-Whitney Test als ungepaarter nichtparametrischer t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Hierbei wurde ein p-Wert von  $*p < 0,05$  als statistisch signifikant angenommen. Das Programm Graph Pad Prism® 7.03 wurde für die Durchführung der statistischen Tests sowie für die grafische Aufarbeitung verwendet. Die Darstellung der erfolgte jeweils als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zeitstrahl und Untersuchungszeitpunkte

Die Organentnahmen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden zu bestimmten Schlüsselzeitpunkten der Herzentwicklung der Maus durchgeführt. Diese sind G16 als intrauteriner Zeitpunkt, P1 und P4 als früh postnatale Zeitpunkte, P21 entsprechend der Adoleszenz sowie P70 entsprechend dem jungen Erwachsenenalter. Die Abb. 6 stellt die Untersuchungszeitpunkte in Relation zum Versuchsprotokoll dar.

Aufgrund von limitiertem Material konnte nicht jede molekulare Komponente zu jedem Zeitpunkt untersucht werden. Insbesondere zum frühen, intrauterinen Zeitpunkt G16 lag aufgrund der geringen Organgröße der Herzen zu diesem Zeitpunkt wenig aufzubereitendes Gewebe vor, sodass hier nur die wichtigsten molekularen Marker wie z.B. Islet-1 bestimmt wurden. Zudem sind aus Platzgründen nicht alle Untersuchungsergebnisse graphisch dargestellt, wie etwa der Phosphorylierungsstatus für  $\beta$ -Catenin zu den weiteren Zeitpunkten. Die graphisch nicht dargestellten Untersuchungsergebnisse werden jedoch im Text erwähnt und wiesen keine Signifikanz auf. Es ist exemplarisch ein Zeitpunkt dargestellt.



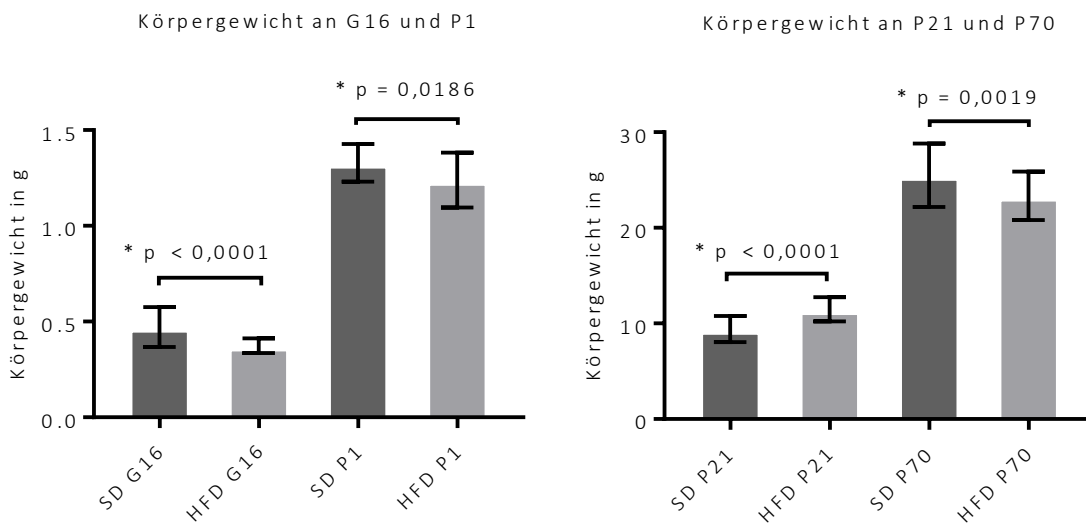
**Abb. 6: Untersuchungszeitpunkte und Schlüsselzeitpunkte des Versuchsprotokolls**

G16: 16. Gestationstag, P1, 4, 21, 70: 1., 4., 21., 70. postnataler Tag.

## 4.2 Ergebnisse der Messungen von Körper- und Herzgewicht

### 4.2.1 Verlauf des Körpergewichts

Die mütterliche HFD führte zu einem signifikant verringertem intrauterinem Gewicht an G16 als auch zu einem geringeren Gewicht an P1. Während der Laktationszeit kam es zu einem akzelerierten Aufholwachstum in der HFD-Gruppe, sodass an P21 das Körpergewicht der Nachkommen an P21 signifikant erhöht war. Im weiteren Verlauf kam es zur erneuten Relativierung der Unterschiede, so dass zum Zeitpunkt P70 die Nachkommen der SD-Gruppe ein höheres Körpergewicht erreichten (Abb. 7).

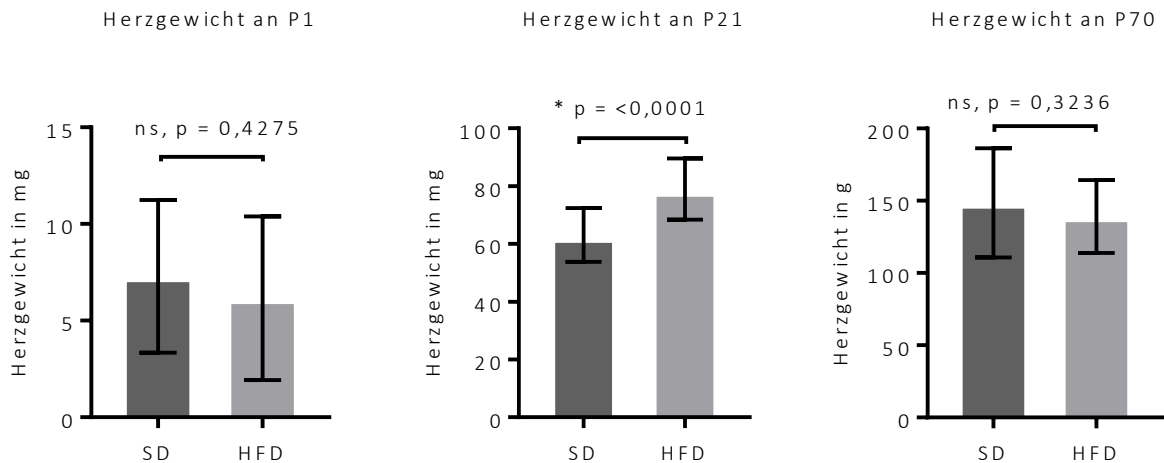


### Abb. 7: Verlauf des Körpergewichts der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe

G16 = 16. Gestationstag; P1 = 1. postnataler Tag; P21 = 21. postnataler Tag; P70 = 70. postnataler Tag. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; Werte dargestellt als MW  $\pm$  SD. G16: SD (n= 31), HFD (n = 44); P1: SD (n = 21), HFD (n = 34); P21: SD (n = 24), HFD (n = 20); P70: SD (n = 64), HFD (n = 33). Signifikanzniveau \* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant

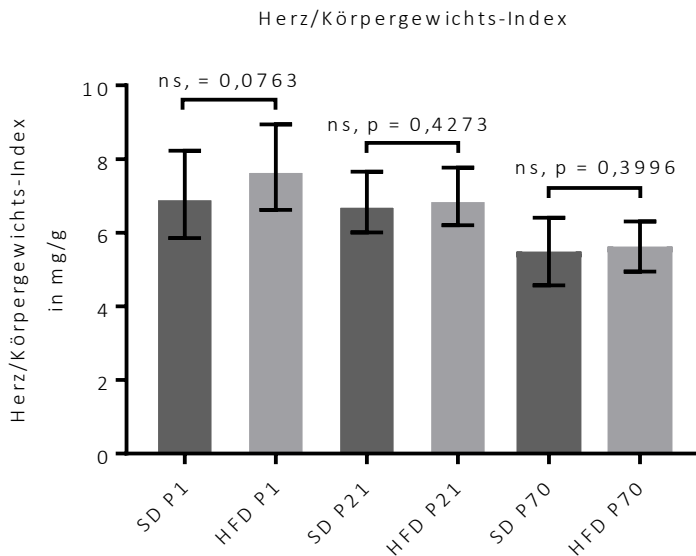
### 4.2.2 Verlauf von Herzgewicht und Herz/Gewichts-Index

Mütterliche HFD führte im Vergleich zu SD zu einem signifikant erhöhten Herzgewicht an P21 am Ende der Laktationszeit (Abb. 8). Der Herz-Gewichts-Index bezeichnet den Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht. Postnatal bestand ein Trend zu einem erhöhten Herz-Gewichts-Index in der HFD-Gruppe. Im Verlauf kam es zur Nivellierung beider Werte (Abb. 9).



**Abb. 8: Verlauf des Herzgewichts der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe**

G16 = 16. Gestationstag; P1 = 1. postnataler Tag; P21 = 21. postnataler Tag; P70 = 70. postnataler Tag. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; Werte dargestellt als MW  $\pm$  SD. P1: SD (n = 19), HFD (n = 25); P21: SD (n = 21), HFD (n = 15); P70: SD (n = 41), HFD (n = 21). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant



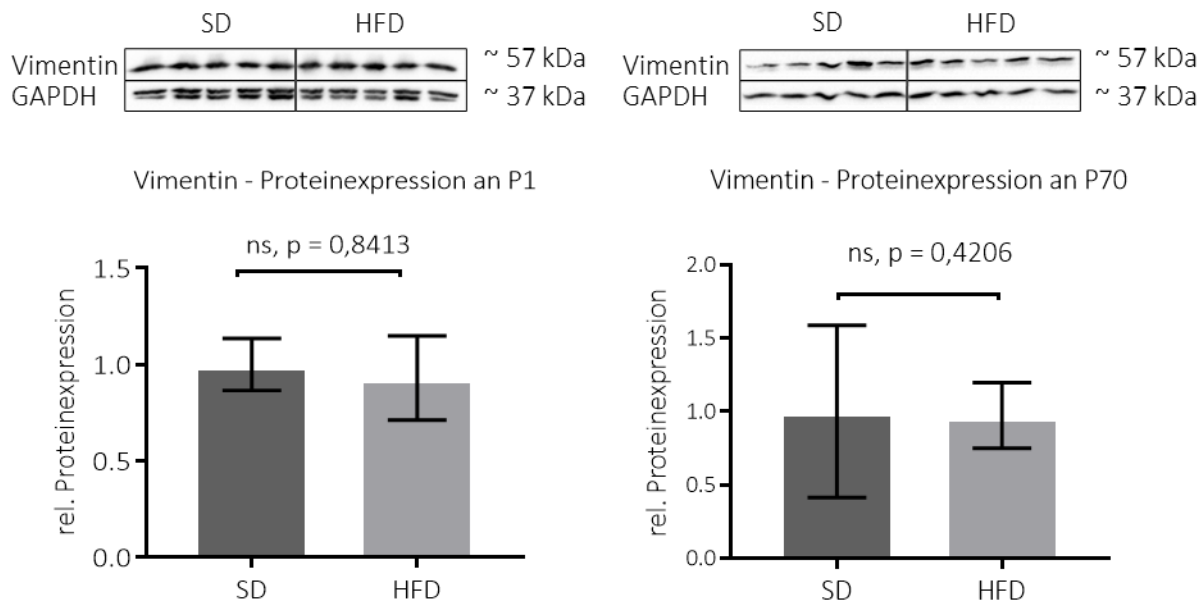
**Abb. 9: Verlauf von Herz/Gewichts Index der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe**

P1 = 1. postnataler Tag; P21 = 21. postnataler Tag; P70 = 70. postnataler Tag. Auswertung mittels Mann-Whitney-Test; Werte dargestellt als MW  $\pm$  SD. P1: SD (n = 13), HFD (n = 14); P21: SD (n = 21), HFD (n = 15); P70: SD (n = 41), HFD (n = 21). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant



### 4.3 Kardialer Umbau durch mütterliche Hochfett-Diät

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mütterliche HFD möglicherweise zu einer beginnenden kardialen Fibrose mit einer Vermehrung des kollagenen Bindegewebes führt. Um die Hypothese einer Vermehrung von kollagenem Gewebe infolge einer Aktivierung von mesenchymalen Zellen im Myokard durch mütterliche HFD zu untersuchen, wurde mittels Western Blot die Expression von Vimentin bestimmt. Vimentin ist ein Intermediärfilament des Zytoskeletts und wird von Mesenchymzellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten sowie im endothelialen und glattmuskulären vaskulären Gewebe exprimiert. In Kardiomyozyten findet keine Expression statt [144]. Daher kann Vimentin als Marker für das vermehrte Vorhandensein von mesenchymalen Zellen verwendet werden. Es wurden die Zeitpunkte P1, P4 sowie P70 evaluiert, um einerseits eine sehr frühes und andererseits anhaltendes fibrotisches Profil zu erfassen. In den durchgeführten Western Blots zeigte sich jedoch keine erhöhte Proteinexpression von Vimentin (Abb. 10, nur P1 und P70 dargestellt).

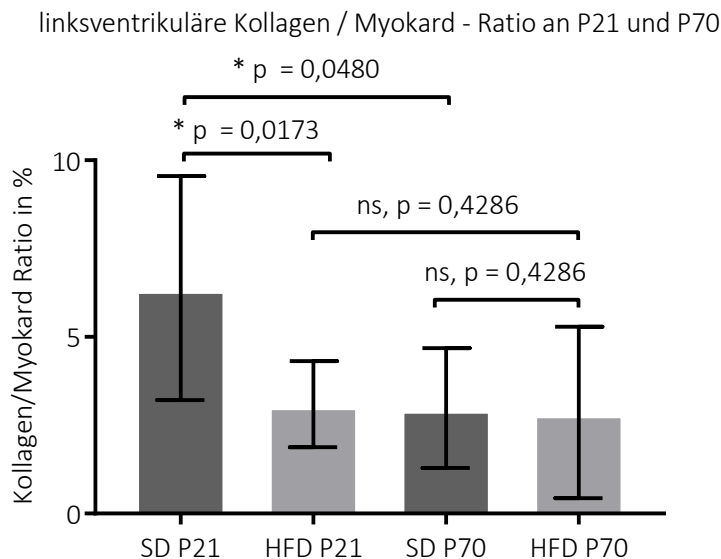


**Abb. 10: Kardiale Proteinexpression des mesenchymalen Markers Vimentin am 1. und 70. postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.**

Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 5), HFD (n = 5); P70: SD (n = 5), HFD (n = 5). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

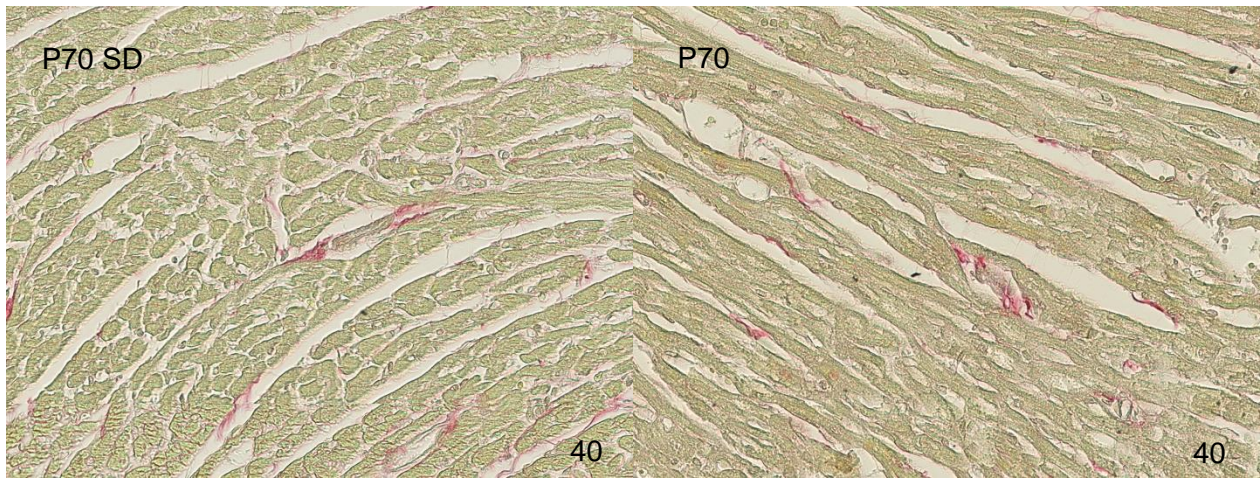
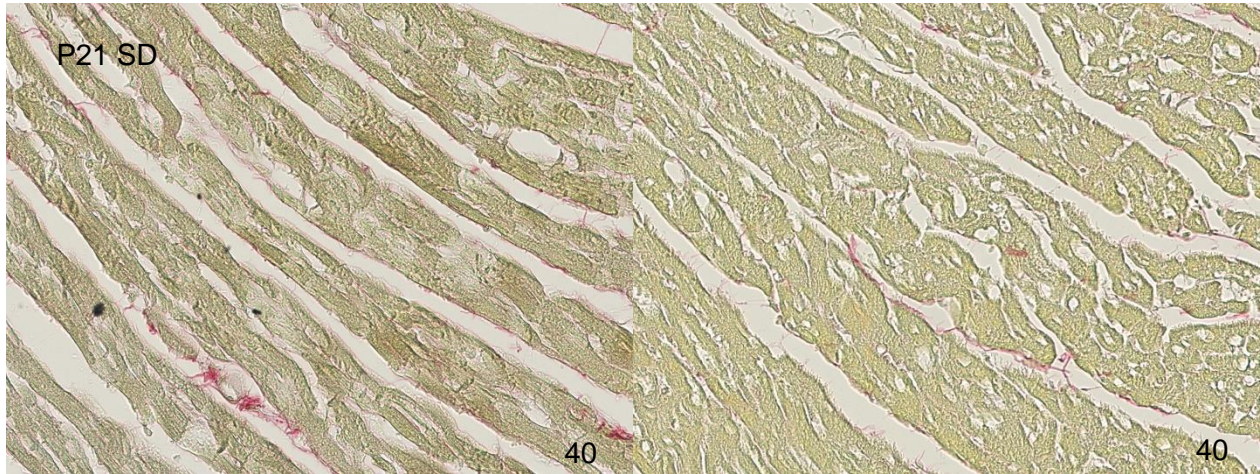
### 4.3.1 Picrosirius Red-Färbung

Zur weiteren Evaluation der histologischen Morphologie und zur Evaluierung einer möglichen myokardialen Fibrose wurden Paraffinschnitte mit der Picrosirius Red-Färbung gefärbt. Kollagenfasern wurden hierdurch violett dargestellt, während Zytoplasma und Zellkerne blassgelb eingefärbt wurden. Durch Bildauswertung mittels Farbschwellenwerten wurde der Quotient aus kollagenem und myokardialem Anteil bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass bei den Nachkommen der HFD-Gruppe am 21. postnatalen Tag ein verminderter Kollagen/Myokard-Quotient vorlag als bei den Nachkommen der SD-Gruppe. Bei einer vermehrten Fibrose wäre jedoch ein erhöhter Quotient zu erwarten. Am 70. postnatalen Tag bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen. Interessanterweise bestand innerhalb der HFD-Gruppe kein Unterschied zwischen dem 21. und 70. postnatalen Tag, während es in der SD-Gruppe zu einer Abnahme des Kollagen/Myokard-Quotienten kam. Die These, dass mütterliche HFD zu einer vermehrten Fibrose als früher struktureller Veränderung führt, kann anhand dieser Daten nicht bestätigt werden. Die Abnahme des Quotienten in der SD-Gruppe ist am ehesten auf die physiologische Hypertrophie der Kardiomyozyten in diesem Zeitraum zurückzuführen. Daher könnte das Ergebnis hinweisend auf eine verfrühte myokardiale Hypertrophie in der HFD-Gruppe sein.



**Abb. 11: Kollagen/Myokard Ratio im mittleren linksventrikulären Myokard der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 21. und 70. postnatalen Tag.**

Picrosirius Red Färbung des linksventrikulären Myokards; Digitale Bildaufnahme von 5 Sichtfeldern/Probe in 40x Vergrößerung und Anwendung von Farbschwellenwerten für Kollagen und Myokard P21: SD (n=5); HFD (n=6). P70: SD (n=6); HFD (n=5). Mann-Whitney-Test. Daten werden gezeigt als Mittelwert mit Standardabweichung. Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

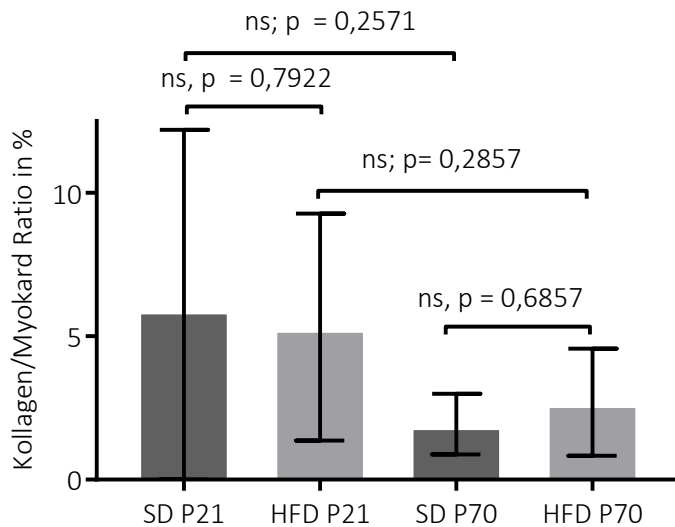


**Abb. 12: Sirius Red Färbung des linksventrikulären Myokards am 21. und 70. postnatalen Tag**

Repräsentative Darstellung jeweils eines Bildausschnitts pro Gruppe; 40x Vergrößerung. SD = Standard-Diät; HFD = Hochfett-Diät. Kollagene Fasern wurden rotviolett vor blassgelber Hintergrundfärbung eingefärbt.

Analog wurde eine Auswertung des rechtsventrikulären Myokards durchgeführt. Es scheint prinzipiell ein ähnliches Bild vorzuliegen, jedoch ließen sich, womöglich aufgrund der geringeren Zahl an geeigneten Proben, keine signifikanten Unterschiede des Kollagen/Myokard-Quotienten beobachten. Aufgrund der eingeschränkten Größe des spezifischen Bereiches konnten nur zwei Sichtfelder pro Probe zur Auswertung verwendet werden.

rechtsventrikuläre Kollagen / Myokard - Ratio an P21 und P70



**Abb. 13: Kollagen/Myokard Ratio im rechtsventrikulären Myokard der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 21. und 70. postnatalen Tag.**

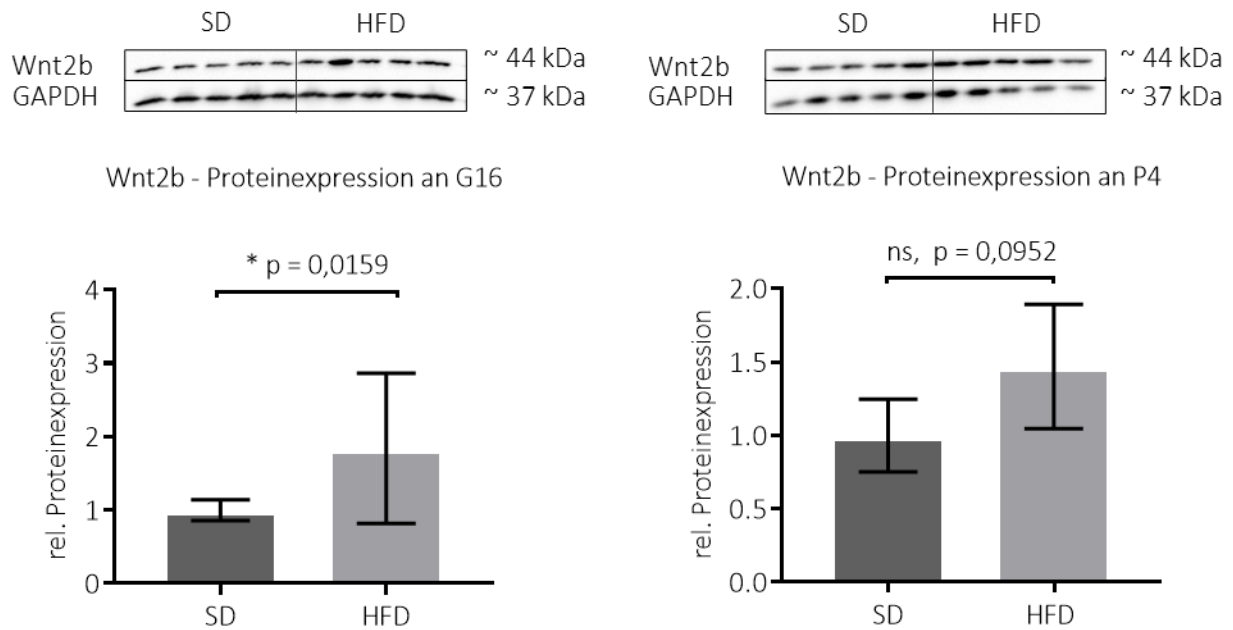
Picosirius Red Färbung des rechtsventrikulären Myokards; Digitale Bildaufnahme von 1- 2 Sichtfeldern/Probe in 40x Vergrößerung und Anwendung von Farbschwellenwerten für Kollagen und Myokard P21: SD(n=4); HFD(n=6). P70: SD(n=4); HFD(n=3). Mann-Whitney-Test. Daten werden gezeigt als Mittelwert mit Standardabweichung. Signifikanzniveau \*p < 0,05, ns = nicht signifikant.

#### 4.4 Veränderungen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs

##### 4.4.1 Gen- und Proteinexpression der Wnt-Liganden

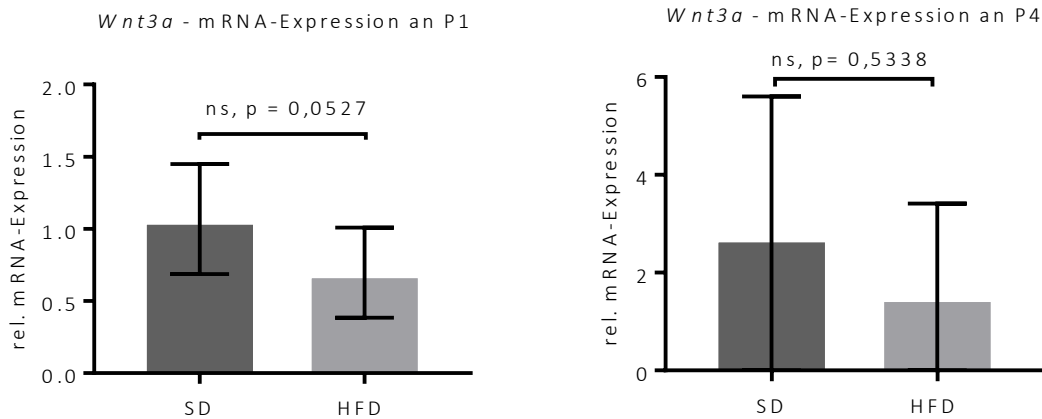
Die Wnt-Proteine stellen die Liganden des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs als auch weiterer nichtkanonischer Wnt-Signalwege wie des Wnt/JNK-Signalwegs dar. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoformen Wnt3a, Wnt2b sowie Wnt11 untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass bestimmte Isoformen, wie Wnt3a, auf den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg wirken, während andere, etwa Wnt11, dem nichtkanonischen Wnt/JNK Signalwege zugeordnet werden [107, 119]. Wnt11 wird mit dem nichtkanonischen Wnt/JNK Signalweg assoziiert und trägt zur Aktivierung myokardialer Gene und Differenzierung von Kardiomyozyten bei [107, 120, 121]. Die Ergebnisse zeigen, dass mütterliche HFD zur Dysregulation der untersuchten Wnt-Liganden führte. Dabei wurden verschiedenen Wnt-Isoformen in verschiedener Weise und teils gegensätzlich beeinflusst. Die Proteinexpression des Liganden Wnt2b zeigte sich in der HFD-Gruppe zum intrauterinen Zeitpunkt G16 signifikant und zum frühen postnatalen Zeitpunkt P4 trendweise erhöht (Abb. 14). Des Weiteren wurde die Proteinexpression an P70 untersucht. Hier

zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (nicht abgebildet). Es wurde ebenso die Genexpression von *Wnt3a* und *Wnt11* untersucht. Die *Wnt3a*-Genexpression war an P1 trendmäßig vermindert, während an P4 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand (Abb. 15). Aufgrund des limitierten Materials an G16 wurde für diesen Zeitpunkt keine Untersuchung der Genexpression von *Wnt3a* durchgeführt. Darüber hinaus bestand eine verminderte Genexpression von *Wnt11*, welche an P1 statistische Signifikanz erreichte und an P4 einen Trend zeigte (Abb. 16). Eine niedrigere *Wnt11*-Genexpression könnte zu einem abgeschwächten nichtkanonischen Wnt-Signalweg mit einer resultierenden gestörten Differenzierung der Kardiomyozyten beitragen. Der Nachweis der Proteinexpression von *Wnt3a* und *Wnt11* an P1, P4 und P70 war nicht erfolgreich.



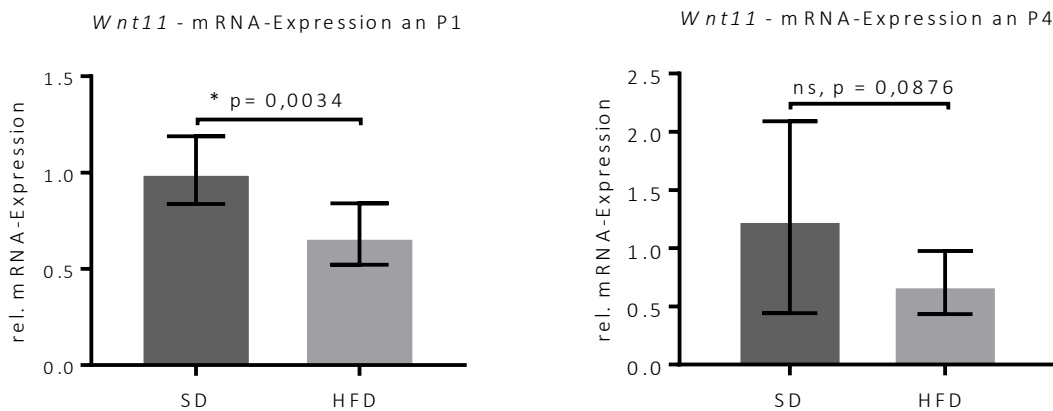
**Abb. 14: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Proteinexpression des Rezeptors Wnt2b am 16. Gestationstag (G16) und 4. postnatalen Tag der Nachkommen der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.**

Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5); P4: SD (n = 5), HFD (n = 5). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.



**Abb. 15: Kardiale mRNA-Expression des Liganden *Wnt3a* der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant



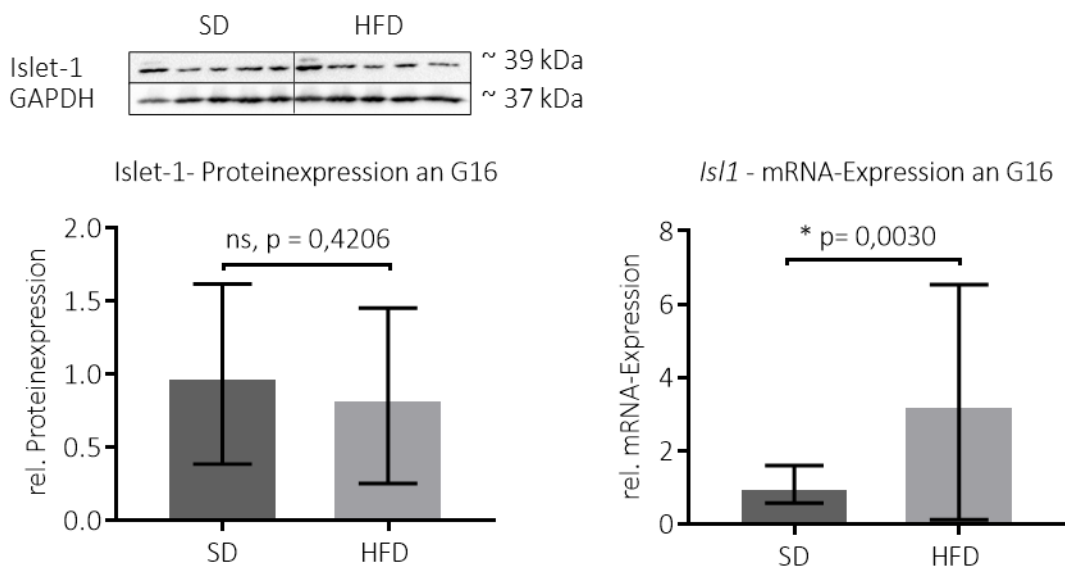
**Abb. 16: Kardiale mRNA-Expression des Liganden *Wnt11* der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

#### 4.4.2 Gen- und Proteinexpression des Progenitormarkers Islet-1

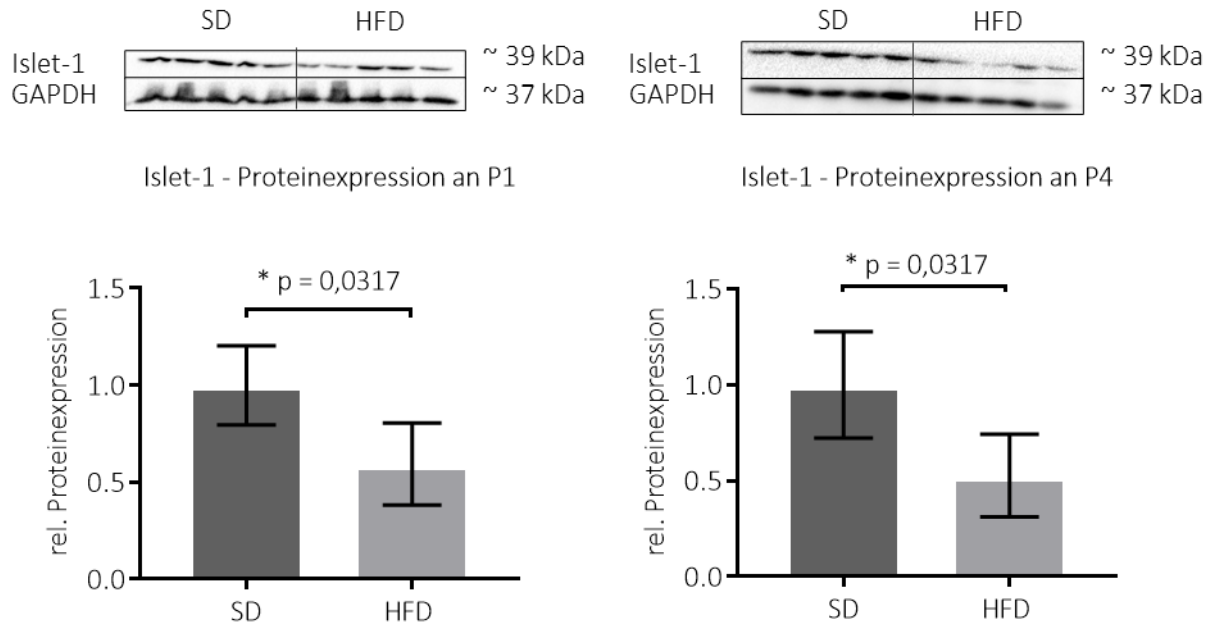
Um die Auswirkungen mütterlicher HFD auf kardiale Progenitorzellen zu untersuchen, wurde der Verlauf der Expression der Marker Islet-1 und Nkx2.5 untersucht. Islet-1 wird in kardialen Progenitorzellen des SHF exprimiert und geht mit zunehmender Differenzierung der Zellen verloren [99]. Am 16. Gestationstag erbrachte die q-RT-PCR das Ergebnis einer signifikant verstärkten Genexpression des Stammzellmarkers *Isl-1* (Abb. 17). Dieser stellt ein Zielgen des  $\beta$ -Catenin-Pathways dar. In Kombination mit der trendweise vermehrten Genexpression des

Weiteren Zielgens Cyclin D<sub>1</sub> zu diesem Zeitpunkt (siehe 3.5.1) kann dieses Ergebnis auf eine mögliche Aktivierung des Pathways zum Zeitpunkt G16 hinweisen. In der Proteinquantifizierung von Islet-1 zeigte sich an G16 kein signifikantes Ergebnis (Abb. 17). An P1 und P4 zeigte sich die Proteinexpression des kardialen Progenitormarkers Islet-1 durch die mütterliche HFD signifikant vermindert (Abb. 18). Eine verminderte Expression von Islet-1 könnte somit auf einen geringeren Pool von Progenitorzellen des Second Heart Fields hinweisen. Bezüglich der mRNA-Expression konnte aufgrund großer interindividueller Unterschiede sowohl zwischen als auch innerhalb der Gruppen keine statistische Signifikanz beobachtet werden (Abb. 19). Mit fortschreitendem Alter der Tiere nahmen diese Unterschiede weiter zu. Zum Zeitpunkt P21 ließ sich für drei Proben der HFD-Gruppe kein CT-Wert ermitteln; an P70 nur noch in einzelnen Proben, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war (Ergebnisse nicht gezeigt). Dem liegt möglicherweise ein zu geringer oder fehlender mRNA-Gehalt zugrunde, da *Isl-1* mit zunehmender Differenzierung nicht mehr exprimiert wird.



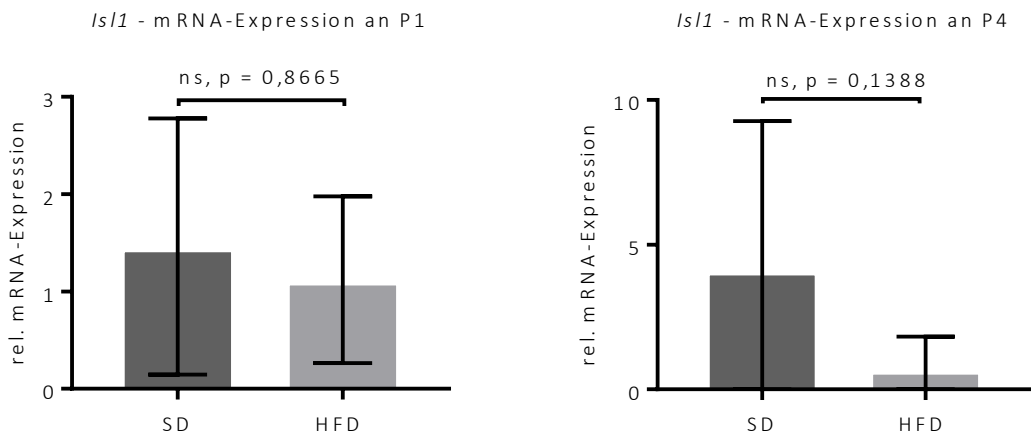
**Abb. 17: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Protein- und mRNA-Expression des Stammzellmarkers Islet-1//*Isl-1* im Herz am 16. Gestationstag der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.**

Proteinexpression Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). mRNA-Expression: Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*. Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. Protein: SD (n = 5), HFD (n = 5); mRNA: SD (n = 8), HFD (n = 8) ; Signifikanzniveau \* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant.



**Abb. 18: Kardiale Proteinexpression des Progenitormarkers Islet-1 am 1. und 4. postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.**

Relative Quantifikation gegenüber den Referenzproteinen GAPDH (P1) oder HPRT (P4) durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 5), HFD (n = 5); P4: SD (n = 5), HFD (n = 5). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.



**Abb. 19: Kardiale mRNA-Expression des Progenitormarkers *Isl-1* der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

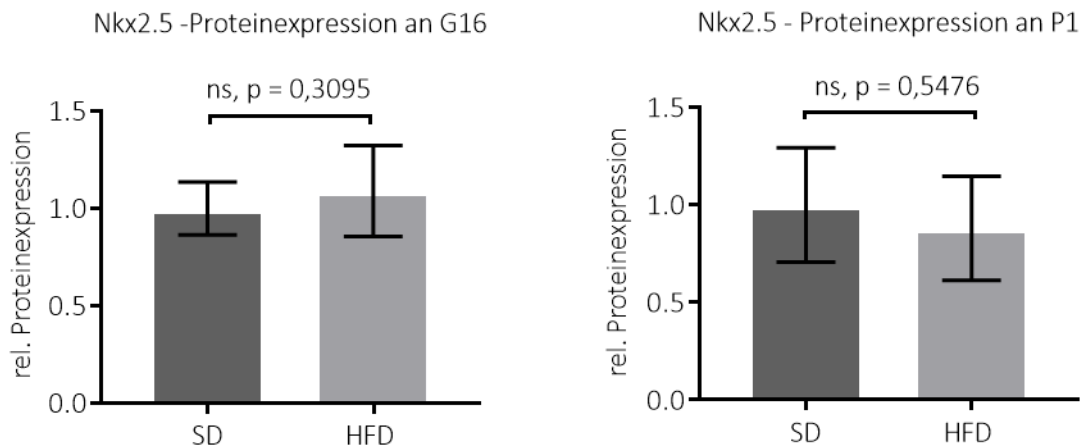
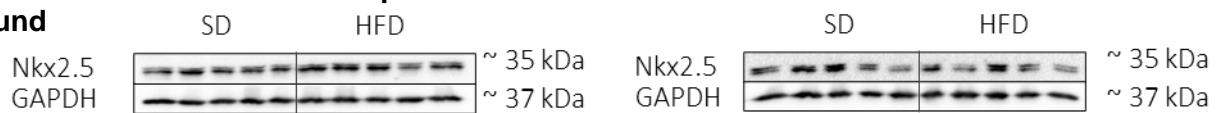


#### 4.4.3 Gen- und Proteinexpression des Progenitormarkers Nkx2.5

Nkx2.5 wird zu Beginn der Entwicklung sowohl von Zellen des FHF als auch von den Zellen des SHF gemeinsam mit Islet-1 exprimiert und fungiert als übergeordneter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression myokardialer Gene fördert [90].

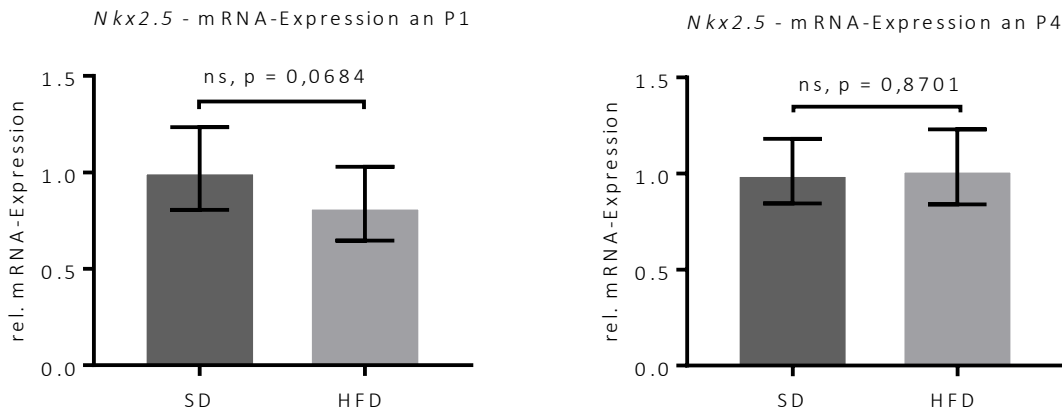
Die Western Blot-Analyse der Proteinexpression des Progenitormarkers Nkx 2.5 an G16 und P1 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der SD und der HFD-Gruppe (Abb. 20). Die Genexpression von *Nkx2.5* zeigte an P1 einen Trend zur Verminderung (Abb. 21). Die verminderte Genexpression von *Nkx2.5* zum Zeitpunkt P1 könnte mit der geringeren Wnt11-Expression zu diesem Zeitpunkt zusammenhängen, da der Ligand Wnt11 die Expression von Nkx2.5 über den nichtkanonischen  $\beta$ -Catenin-Signalweg fördert [145]. Die mRNA-Expression von *Nkx2.5* sowie die Proteinexpression von Nkx2.5 zu den Zeitpunkten P21 und P70 wurde ebenfalls bestimmt und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (nicht abgebildet). Darüber hinaus wurde ergänzend die mRNA-Expression der Progenitormarker *Ly6a*, welches für *stem cell antigen-1* (*Sca1*) kodiert und *Tbx5* am 1. und 4. postnatalen Tag untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der HFD-Gruppe (nicht abgebildet).

**Abb. 20: Kardiale Proteinexpression des Stammzellmarkers Nkx2.5 am 16. Gestationstag und**



#### Postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.

Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5); P1: SD (n = 5), HFD (n = 5); Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.



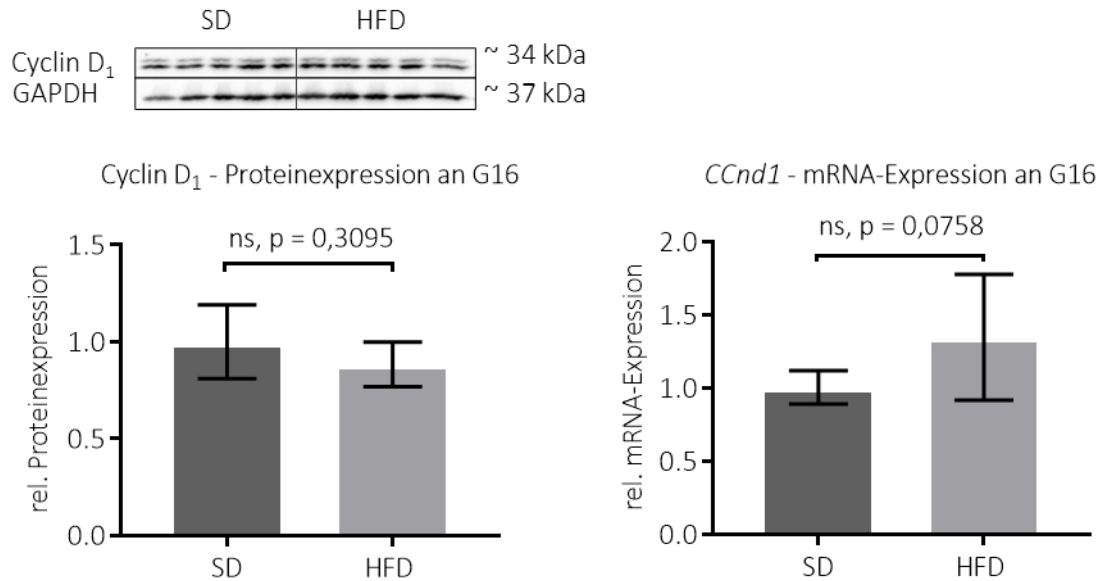
**Abb. 21: mRNA-Expression des kardialen Progenitormarkers *Nkx2.5* in kardialem Gewebe der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

## 4.5 Veränderungen des Proliferationsmarkers Cyclin D<sub>1</sub>

### 4.5.1 Gen- und Proteinexpression

Cyclin D<sub>1</sub> stellt ein Zielgen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs dar [111]. Die D-Cycline spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus und bewirken eine Progression von der G1 in die S-Phase [110]. Cyclin D<sub>1</sub> kann auch als Proliferationsmarker verwendet werden [112]. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression von *Ccnd1* und die Proteinexpression von Cyclin D<sub>1</sub> analysiert. Außerdem wurde an P1 eine immunhistochemische Färbung auf Cyclin D<sub>1</sub> mit Auswertung der positiven Zellkerne pro Sichtfeld im mittleren linksventrikulären Myokard durchgeführt (siehe 3.5.2). Intrauterin zeigte sich an G16 ein Trend zu erhöhter mRNA-Expression von *Ccnd1* bei den Nachkommen der HFD-Gruppe (Abb. 22). Da *Ccnd1* -wie *Isl-1*- ein Zielgen des  $\beta$ -Catenin Signalwegs darstellt, kann dieses Ergebnis in Verbindung mit der ebenfalls erhöhten *Isl-1*-Expression (siehe 3.4.2) zu diesem Zeitpunkt auf eine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin Signalwegs an G16 hinweisen. Zu den späteren Zeitpunkten P1, P4 und P21 war kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von *Ccnd1* zu beobachten (nicht dargestellt). In der Proteinquantifikation von Cyclin D<sub>1</sub> mittels Western Blot zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen SD und HFD-Gruppe. Exemplarisch ist die Western Blot Analyse an G16 dargestellt (Abb. 22).

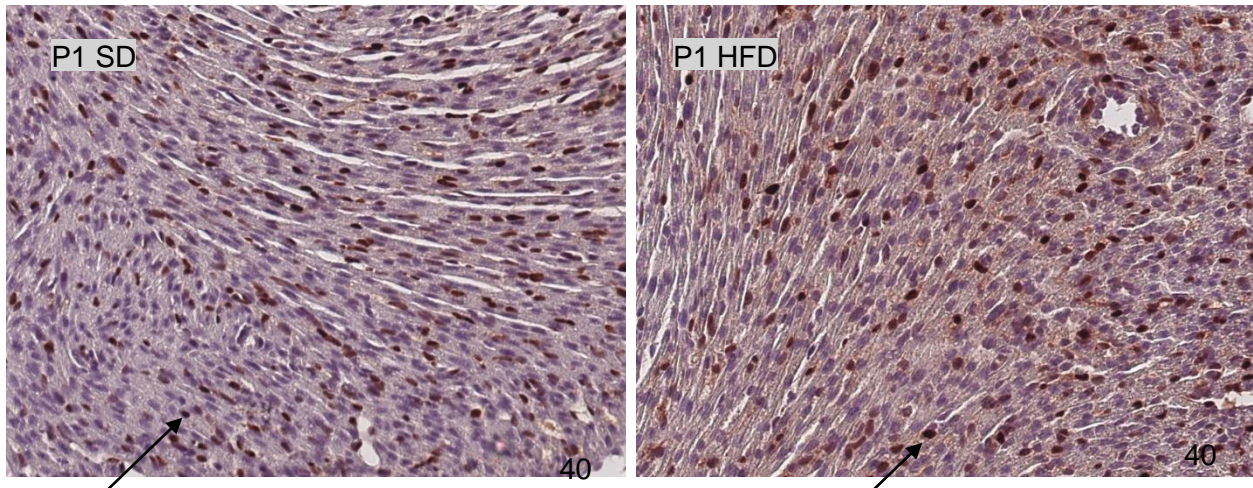


**Abb. 22: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Protein-expression von Cyclin D<sub>1</sub> sowie der mRNA-Expression von *Ccnd1* in kardialem Gewebe der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 16. Gestationstag.**

Proteinexpression: Relative Quantifizierung gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5). mRNA-Expression: Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. G16: Protein: SD (n = 8), HFD (n = 8); mRNA: SD (n = 8), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

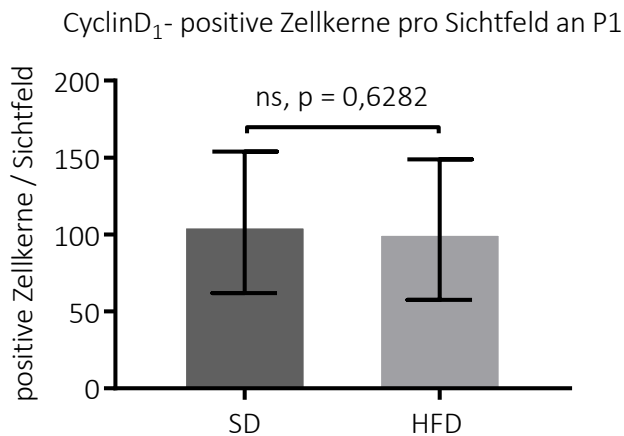
#### 4.5.2 Immunfärbung auf Cyclin D<sub>1</sub>

Um die Effekte der mütterlichen HFD auf die Proliferationsaktivität des Myokardgewebes zu beurteilen, wurde mit Herzen an P1 eine immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker und Effektor des  $\beta$ -Catenin-Signalweges Cyclin D<sub>1</sub> durchgeführt und im mittleren linksventrikulären Myokard die Anzahl positiv gefärbter Zellkerne pro Sichtfeld bestimmt (Abb. 23). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl positiv gefärbter Zellkerne (Abb. 24).



**Abb. 23: Cyclin D<sub>1</sub>-Immunfärbung des linksventrikulären Myokards am 1. postnatalen Tag P1**

Repräsentative Darstellung jeweils eines Bildausschnitts pro Gruppe; 40x Vergrößerung. SD = Standard-Diät; HFD = Hochfett-Diät. Das Antigen wird durch das rotbraune Präzipitat lokalisiert; Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin. Positiv gefärbte Zellkerne beispielhaft mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.



**Abb. 24: Cyclin D<sub>1</sub>-positiv gefärbte Nuclei /Sichtfeld im mittleren linksventrikulären Myokard am 1. postnatalen Tag.**

SD = Standard-Diät; HFD = Hochfett-Diät. Digitale Bildaufnahme in 40x Vergrößerung von 4 Sichtfeldern/Probe; P1: SD (n=6); HFD (n=7) Ungepaarter nichtparametrischer Mann-Whitney-Test. Daten werden gezeigt als Mittelwert mit Standardabweichung; ns = nicht signifikant.

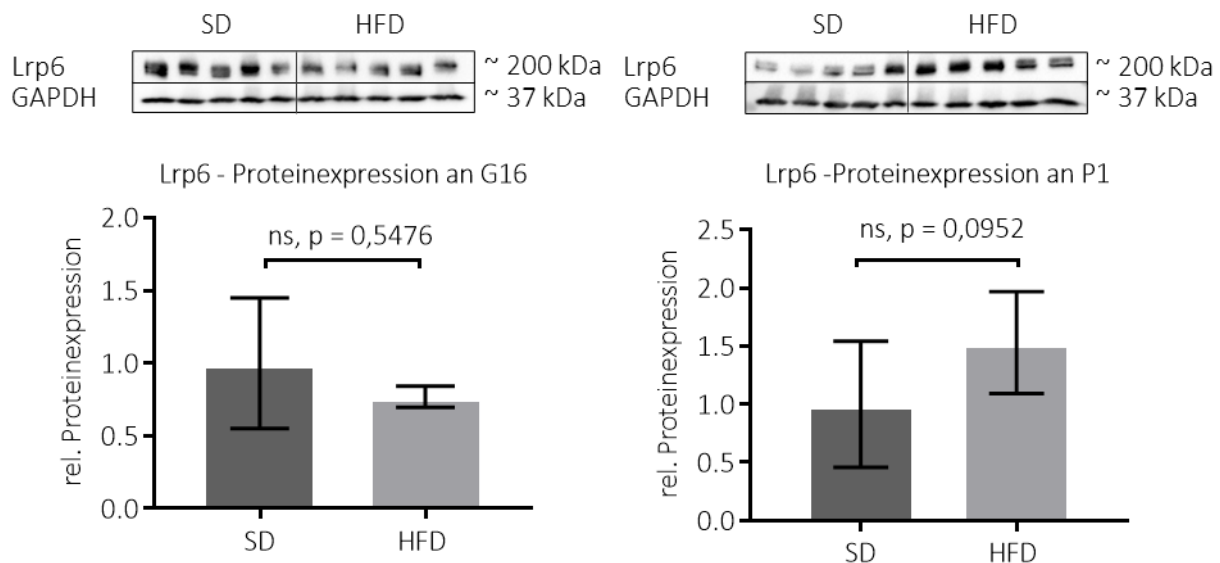
## 4.6 Wnt - Signalweg: Lrp6, GSK-3 $\beta$ , $\beta$ -Catenin

### 4.6.1 Gen- und Proteinexpression des Rezeptors Lrp6

Zur Evaluation des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg wurden neben den Wnt-Liganden und den Zielgenen Islet-1 und Cyclin D<sub>1</sub> auch die mRNA-Expression, Proteinexpression und teilweise der Phosphorylierungsstatus von weiteren am Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg beteiligten molekularen

Komponenten bestimmt, um nähere Informationen über eine mögliche Dysregulation des Signalwegs zu gewinnen. Es wurden der Rezeptor Lrp6,  $\beta$ -Catenin selbst sowie das Protein GSK-3 $\beta$ , welches am Kinase komplex beteiligt ist,  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, für dessen nachfolgende Degradation markiert und so Stabilität und Aktivität von  $\beta$ -Catenin reguliert.

Hinsichtlich des Rezeptors Lrp6 scheint eine dynamische und an G16 und P1 jeweils gegensätzliche Regulation durch mütterliche HFD vorzuliegen. An G16 bestand ein Trend zu verminderter Proteinexpression von Lrp6 im Herz der Nachkommen, während an P1 ein Trend zu erhöhter Proteinexpression bestand (Abb. 25). Vor dem Hintergrund der Funktion von Lrp6 als Rezeptor liegt möglicherweise eine jeweils kompensatorische Gegenregulation vor. Zu den ebenfalls untersuchten späteren Zeitpunkten P4 und P70 war die Proteinexpression von Lrp6 nicht signifikant verändert (nicht dargestellt). Die mRNA-Expression von *Lrp6* wurde zu den Zeitpunkten P1, P4, P21 und P70 untersucht; hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expression (nicht dargestellt).

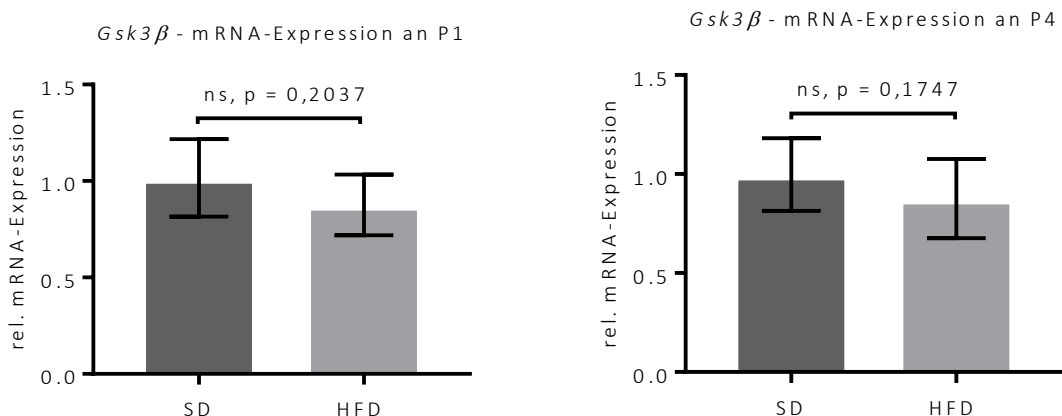


**Abb. 25: Western Blot Analyse und kardiale Proteinexpression des Rezeptors Lrp6 am 16. Gestationstag G16 und 1. Postnatalem Tag P1 der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.**

Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5); P1: SD (n = 5), HFD (n = 5); Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

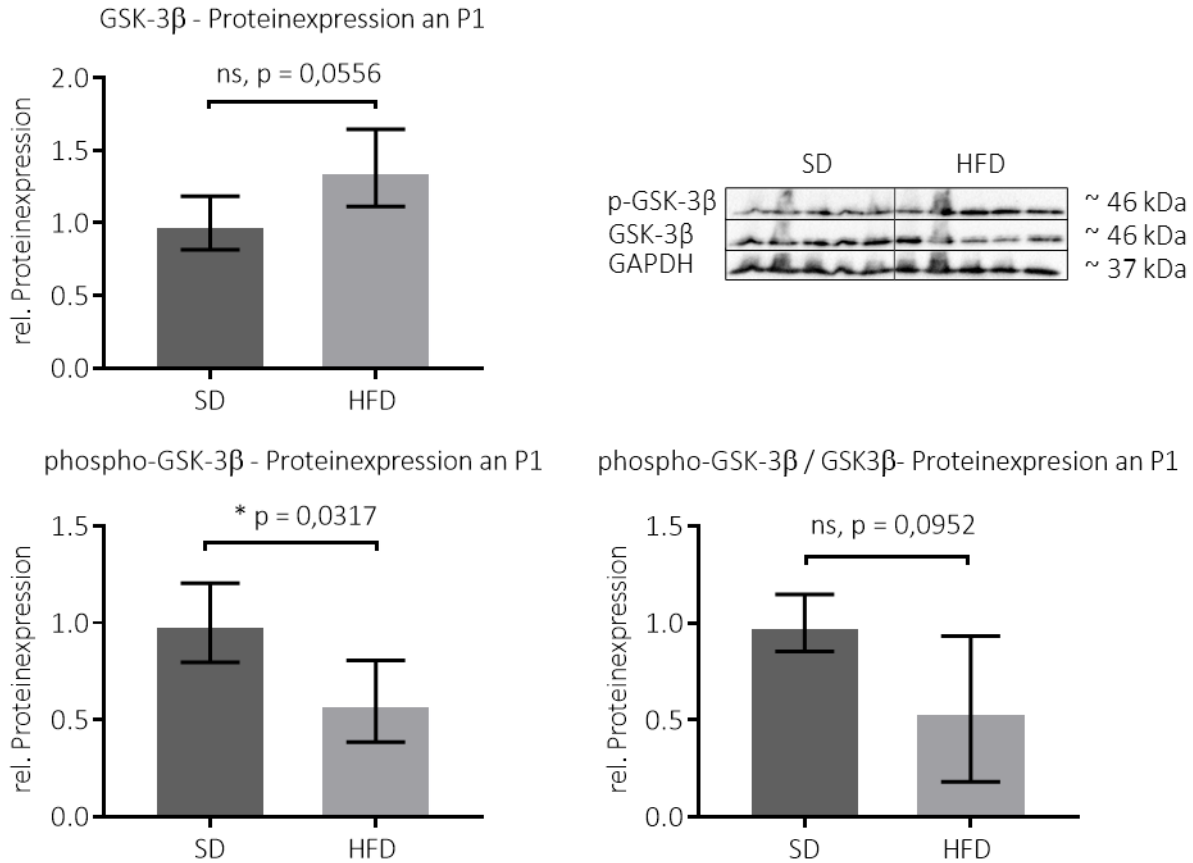
#### 4.6.2 Gen- und Proteinexpression von GSK-3 $\beta$

GSK-3 $\beta$  bildet zusammen mit Axin und APC den Kinasekomplex, welcher die Aktivität von  $\beta$ -Catenin durch Markierung für den folgenden Abbau reguliert. Die Untersuchung der kardialen mRNA-Expression von *Gsk-3 $\beta$*  zu den Zeitpunkten P1 - P70 ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der SD und der HFD-Gruppe (Abb. 26, nur P1 und P4 dargestellt). Es wurde außerdem die Proteinexpression mittels Western Blot sowie der Phosphorylierungsstatus an Ser9 untersucht. Die nicht-phosphorylierte Form der GSK-3 $\beta$  gilt als aktiv und bewirkt eine verstärkte Degradation von  $\beta$ -Catenin, indem es dieses phosphoryliert und für Ubiquitinierung und Abbau markiert. Die Western Blot-Ergebnisse an P1 weisen auf eine verstärkte Aktivierung von GSK-3 $\beta$  hin: Die Proteinexpression von GSK-3 $\beta$  war in der HFD-Gruppe nur leicht, aber nicht signifikant erhöht. Der Quotient von phospho-GSK-3 $\beta$  zu Gesamt-GSK-3 $\beta$  wies ebenfalls eine Tendenz zur Verminderung auf. Die Verminderung von phospho-GSK-3 $\beta$  zur Ladungskontrolle erreichte statistische Signifikanz (Abb. 27). Eine verminderte Phosphorylierung und so verstärkte Aktivierung von GSK-3 $\beta$  würde einen verstärkten Abbau von  $\beta$ -Catenin fördern und könnte zu einer verminderten Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs beitragen.



**Abb. 26: Kardiale mRNA-Expression von *Gsk-3 $\beta$*  der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.



**Abb. 27: Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von GSK-3β im Herz am 1. postnatalen Tag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe.**

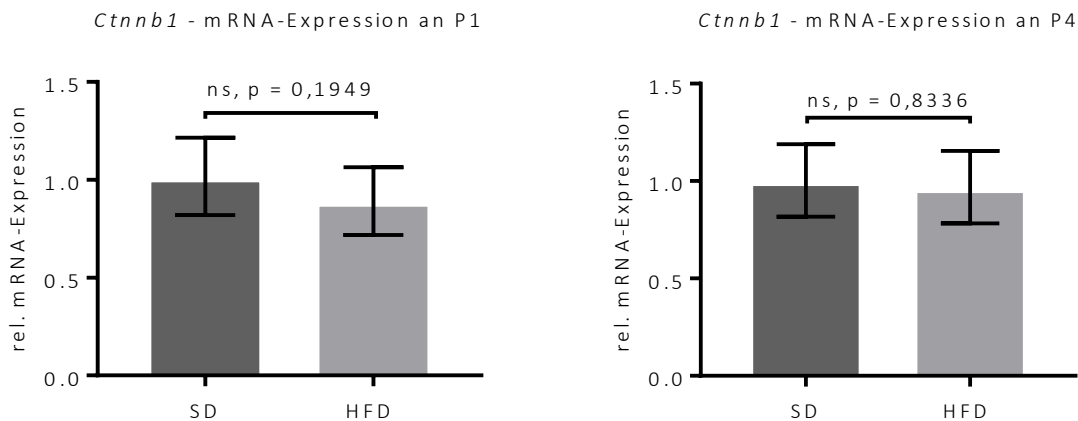
p = phosphoryliert. Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G1: SD (n = 5), HFD (n = 5); Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

#### 4.6.3 Gen- und Proteinexpression von β-Catenin:

Um die Aktivität des β-Catenin-Pathways zu evaluieren, wurde eine Untersuchung der kardialen mRNA-Expression und Proteinexpression durchgeführt. Durch Verwendung entsprechender Antikörper wurde der Phosphorylierungsstatus durch Analyse der Proteinexpression des phosphorylierten-, des nicht-phosphorylierten- sowie des gesamten β-Catenins quantifiziert.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von *Ctnnb1*, welches für β-Catenin kodiert, in kardialem Gewebe an P1, P4 und P21 postnatalen Tage erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen der SD und der HFD (P1 und P4 in Abb. 28, P21 nicht gezeigt).

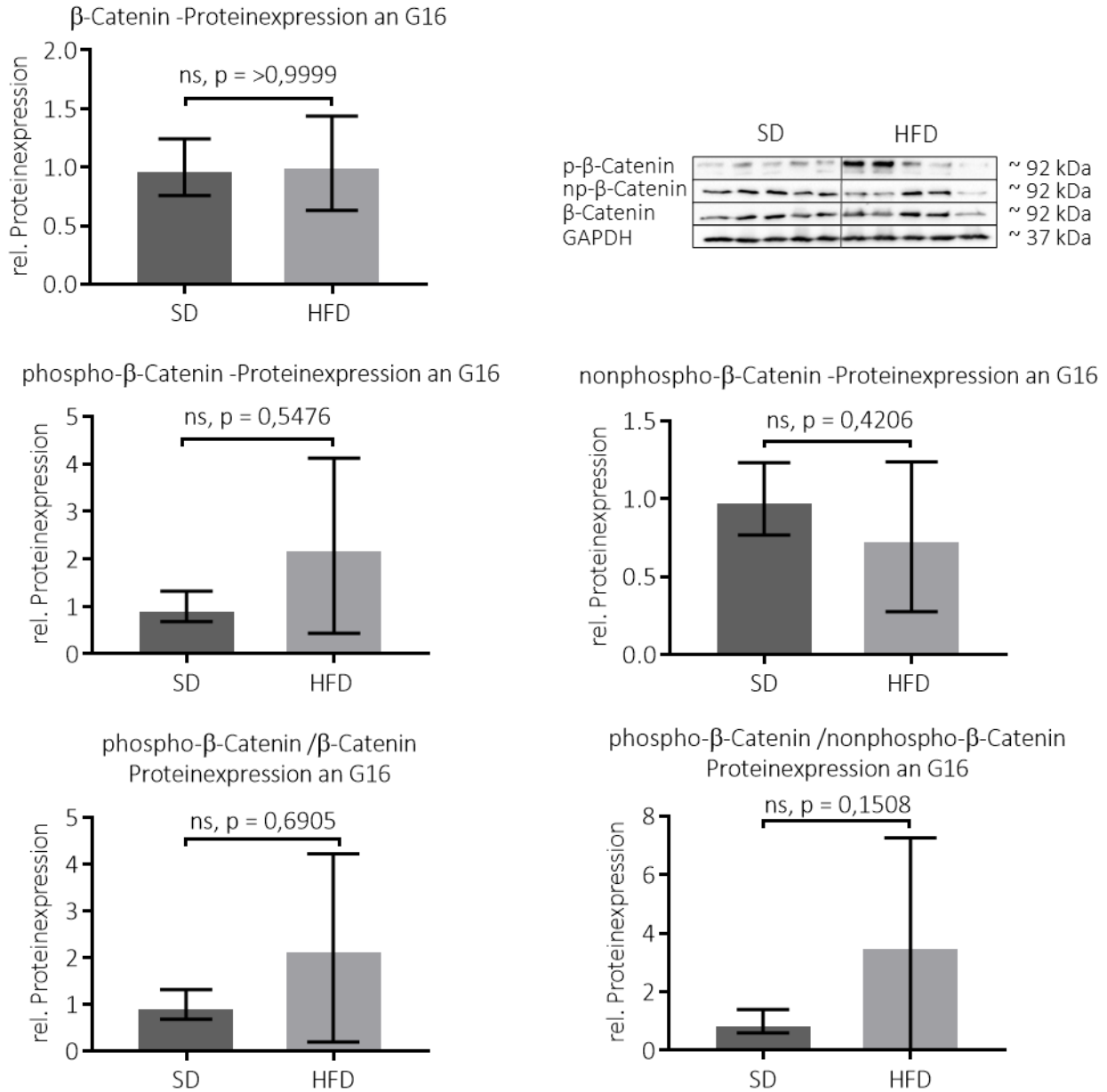
Mithilfe entsprechender Antikörper wurde die kardiale Proteinexpression des gesamten  $\beta$ -Catenin sowie der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Anteils an G16, P1, P4 und P70 untersucht. In der statistischen Analyse konnten zu keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen der SD und der HFD-Gruppe beobachtet werden; exemplarisch werden die beiden Zeitpunkte G16 (Abb. 29) und P1 (Abb. 30) gezeigt. Analog zu G16 und P1 wurde der Phosphorylierungsstatus ebenso an P4 und P70 ausgewertet; auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (nicht dargestellt). Es zeigten sich hohe interindividuelle Schwankungen der Proteinexpression. Ein möglicher Grund hinsichtlich des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins könnte dessen schnelle Abbau im Proteasom sein sowie die Präparationsdauer der Organe. Darüber hinaus wurde an P1 eine immunhistochemische Färbung auf  $\beta$ -Catenin durchgeführt (Abb. 31; siehe 3.6.4). Insgesamt ergab sich hierbei kein wegweisendes Ergebnis., da keines der Untersuchungsergebnisse statistische Signifikanz erreichte.



**Abb. 28: Kardiale mRNA-Expression von *Ctnnb1* der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.**

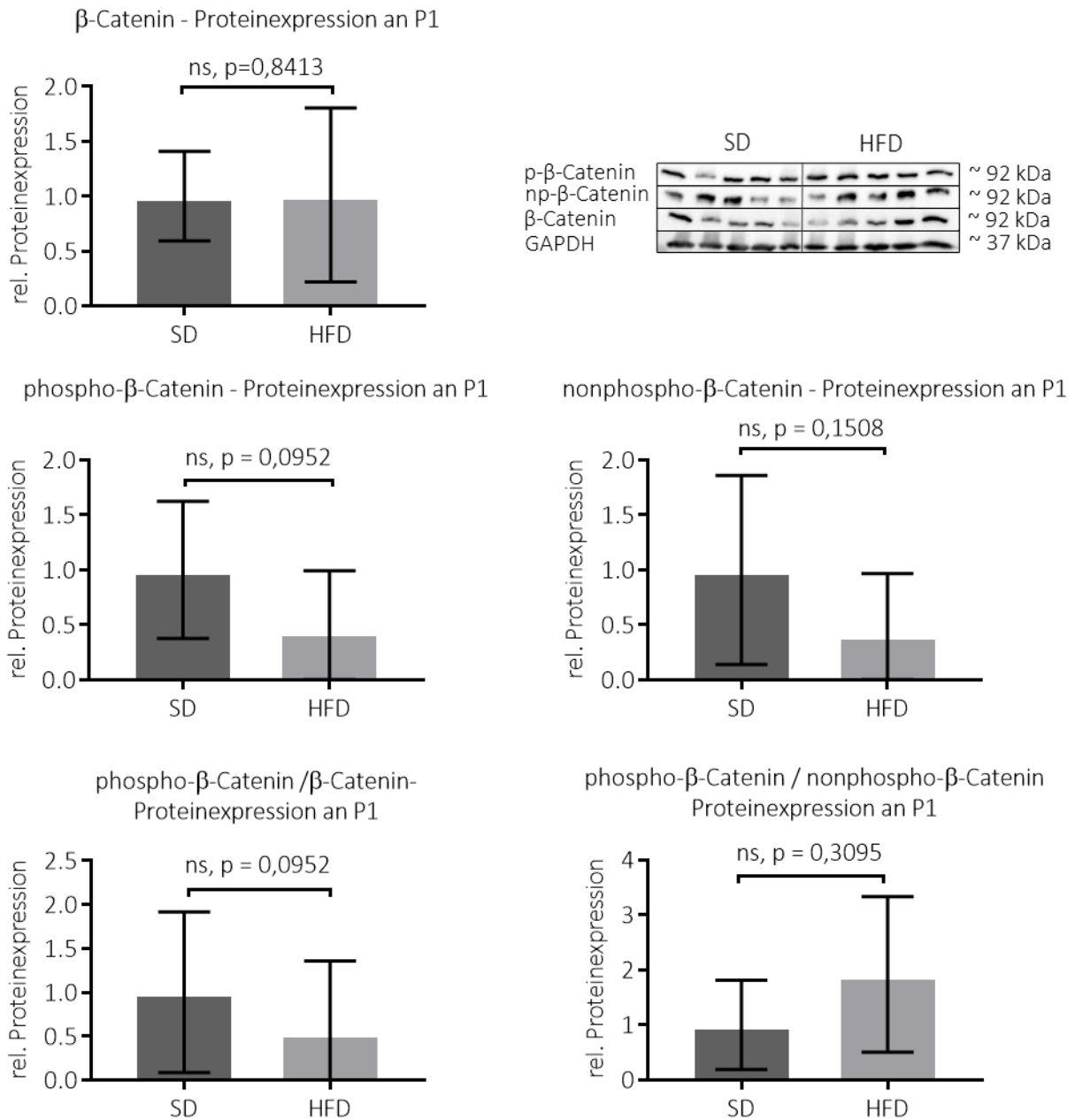
Relative Quantifikation mittels qRT-PCR gegenüber dem Referenzgen *Gapdh*, normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. P1: SD (n = 8), HFD (n = 8); P4: SD (n = 9), HFD (n = 8). Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.





**Abb. 29: Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von β-Catenin im Herz am 16. Gestationstag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe.**

p = phosphoryliert; np = nicht phosphoryliert. Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert ± SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5); Signifikanzniveau \* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant.

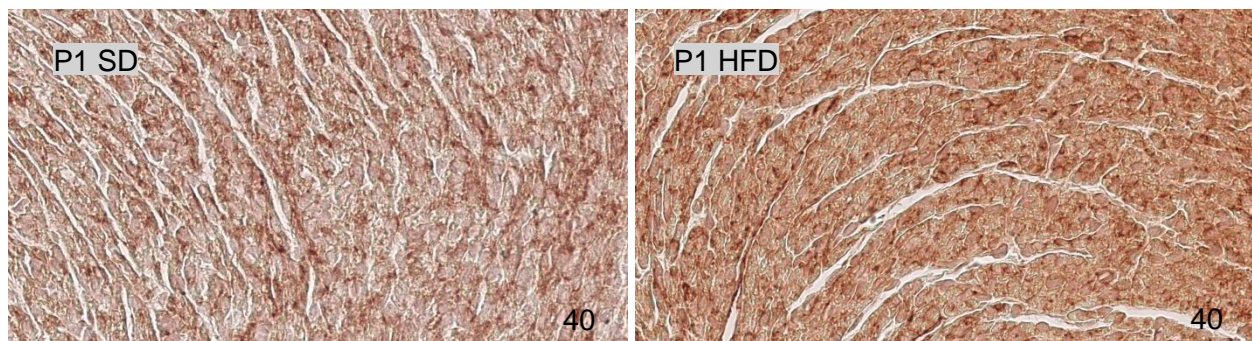


**Abb. 30: Gesamtmenge und Phosphorylierungsstatus von  $\beta$ -Catenin im Herz am 1. postnatalen Tag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe.**

p = phosphoryliert;- np = nicht phosphoryliert. Relative Quantifikation gegenüber dem Referenzprotein GAPDH durch densitometrische Bandenanalyse und Normierung auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (= 1). Mann-Whitney-Test, Mittelwert  $\pm$  SD. G16: SD (n = 5), HFD (n = 5); Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

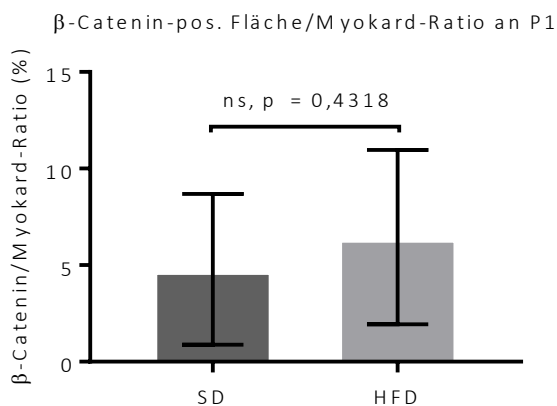
#### 4.6.4 Immunfärbung auf $\beta$ -Catenin

Zur immunhistochemischen Evaluierung des  $\beta$ -Catenin-Quantität wurde eine immunhistologische Färbung für  $\beta$ -Catenin von Schnitten der Herzen an P1 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Anwendung von Farbschwellenwerten für  $\beta$ -Catenin und Myokard und Berechnung der Ratio der jeweiligen positiven Fläche. Hierbei führte die mütterliche HFD nicht zu einem signifikanten Unterschied der  $\beta$ -Catenin/Myokard-Ratio an P1 (Abb. 32). Dabei zeigte sich eine hohe Variabilität der Werte innerhalb der Gruppen. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass 90% des gesamten  $\beta$ -Catenins membrangebunden vorliegen und lediglich freies cytosolisches  $\beta$ -Catenin, welches für die Transkription von Zielgenen bedeutsam ist, reguliert wird [106]. Weitere Zeitpunkte sollten in Folgestudien untersucht werden.



**Abb. 31:  $\beta$ -Catenin-Immunfärbung der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. postnatalen Tag.**

Repräsentative Darstellung jeweils eines Bildausschnitts pro Gruppe; 40x Vergrößerung. SD = Standard-Diät; HFD = Hochfett-Diät. Rotbraunes Präzipitat zeigt die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin; Hintergrundfärbung mit Tartrazin.



**Abb. 32:  $\beta$ -Catenin/Myokard-Ratio der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. postnatalen Tag.**

Digitale Bildaufnahme in 40x Vergrößerung von 5 Sichtfeldern/Probe; Anwendung von Farbschwellenwerten und Definition positiver Flächenbereiche für Kollagen und Myokard; P1: SD

(n=7); HFD (n=6) Mann-Whitney-Test; Mittelwert  $\pm$  SD. Signifikanzniveau \*p < 0,05; ns = nicht signifikant.

## 5. Diskussion

### 5.1 Hintergrund der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten kam es in fast allen Ländern der Welt zu einer starken Zunahme der Prävalenz der Adipositas. Sie stellt, mit den mit ihr assoziierten metabolischen Erkrankungen, einen der wichtigsten Faktoren dar, der für das verstärkte Auftreten chronischer, nicht-übertragbare Krankheiten (*noncommunicable diseases*) verantwortlich ist. Als besondere Gruppe sind ebenfalls Frauen im gebärfähigen Alter von einer vermehrten Prävalenz der Adipositas betroffen. Laut Angaben des *European Perinatal Health Report* von 2018 wiesen etwa im Jahr 2015 ungefähr 30% bis 50% der schwangeren Frauen vor der Schwangerschaft Übergewicht oder Adipositas auf (BMI > 25m/kg<sup>2</sup>); etwa 8% bis 26% der Frauen waren adipös (BMI > 30m/kg<sup>2</sup>). Dabei bestehen erhebliche nationale Unterschiede. In Deutschland waren 38% übergewichtig oder adipös und annähernd 15% adipös [27]. Mütterliche Adipositas birgt einerseits eine Reihe den Verlauf der Schwangerschaft unmittelbar betreffende Risiken, wie eine erhöhte Inzidenz von Gestationsdiabetes, Aborten und angeborenen Fehlbildungen, unter anderem des kardiovaskulären Systems [26, 30-32, 35]. Außerdem besteht langfristig bei den Nachkommen eine erhöhte Prävalenz kardiometabolischer Erkrankungen [40, 42, 44-46]. Die Gesamtmortalität sowie die Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen sind erhöht. Die DOHaD-These stellt eine kausale Verknüpfung zwischen der Exposition gegenüber einer adversen intrauterinen und frühkindlichen Umgebung mit einer Suszeptibilität für kardiale und kardiovaskuläre Erkrankungen im weiteren Lebensverlauf her. Die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen einer solchen intrauterinen Programmierung ist von großer Wichtigkeit, um effektive präventive Maßnahmen zu identifizieren, begründen und implementieren zu können.

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt eine große Rolle in der embryonalen Entwicklung und kontrolliert unter anderem die Proliferation und Differenzierung kardialer Stammzellen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine mütterliche Adipositas infolge einer HFD zu Veränderungen der Genexpression kardialer Stammzell- und Proliferationsmarker und molekularen Bestandteilen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg führt. Ebenso sollte die Proteinexpression der oben genannten Komponenten sowie von Markern für eine etwaige vermehrte Fibrose untersucht werden. Als letztes Ziel sollte evaluiert werden, ob die mütterliche Adipositas zu morphometrisch fassbaren Veränderungen des kardialen Phänotyps der Nachkommen führt und so zu einer Prädisposition für kardiale Erkrankungen beiträgt.

Hierzu wurde ein etabliertes Mausmodell der metabolischen Programmierung durch Gabe einer hochkalorischen HFD verwendet. In der HFD-Gruppe wurde die Fütterung der Muttertiere mit HFD

ab P21 für 7- 8 Wochen begonnen und während der anschließenden Verpaarung, der Gestations- sowie der Laktationszeit der Nachkommen fortgeführt. Die Nachkommen waren hierdurch während der Gestationszeit den intrauterinen sowie während der Laktationszeit durch die Aufnahme der Muttermilch den metabolischen, inflammatorischen und hormonellen Folgen der mütterlichen HFD ausgesetzt. Nach dem Absetzen vom Muttertier an P21 erfolgte die Ernährung der Nachkommen mit SD. Die Organentnahme erfolgte zu mehreren Schlüsselzeitpunkten. Am 16. Gestationstag (G16) zur Repräsentation des intrauterinen Status, am frühen postnatalen Zeitpunkt P1/P4, an P21 als Repräsentation der Adoleszenz und an P70 als jungem Erwachsenenalter.

Die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit war, dass mütterliche HFD über eine Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg kardiale Progenitorzellen beeinflusst. Dies führe zu frühen Veränderungen am Herzen, welche zu einer Disposition für kardiale Erkrankungen beitragen könnte.

Die Arbeitshypothese konnten im Rahmen der Arbeit teilweise bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass mütterliche HFD zu Veränderungen der Gen- und Proteinexpression von Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führte. Des Weiteren zeigte sich eine veränderte Expression von molekularen Markern von Progenitorzellen (z.B. Islet-1), hinweisend auf eine mögliche Beeinträchtigung der kardialen Entwicklung. Die These einer frühen Fibrose konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Dies kann durch die Gewebequalität, -präparation sowie durch die Topographie bedingt sein. Teilweise werfen die Ergebnisse weitere Fragen auf, welche bisher unzureichend geklärt werden konnten und in nachfolgenden Studien adressiert werden müssen.

## **5.2 Veränderung von Körper- und Herzgewicht durch mütterliche Hochfett-Diät**

### **5.2.1 Veränderung des Körpergewichts**

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die mütterliche HFD zu einem verringerten intrauterinen Gewicht der Nachkommen an G16 sowie verringertem Körpergewicht an P1 führte. Während der Laktationszeit kam es zu einer akzelerierten Zunahme des Körpergewichtes, sodass am Ende der Laktationszeit an P21 die Nachkommen der HFD-Gruppe ein signifikant erhöhtes Körpergewicht aufwiesen. Während der Laktationszeit kam es folglich zu einer Überkompensation des initial verringerten Gewichts. An P70 entsprechend dem jungen Erwachsenenalter, zeigte sich das Körpergewicht in der SD gegenüber der HFD-Gruppe leicht vermindert. Die beobachteten Ergebnisse decken sich mit anderen Publikationen der Arbeitsgruppe [55]. Die bestätigen im

Wesentlichen den in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Phänotyp von Nachkommen von mit HFD ernährter Muttertiere, wobei in unterschiedlichen Publikationen teilweise Abweichungen vorlagen. Turdi et al beobachteten ebenfalls ein initial verringertes Geburtsgewicht der Nachkommen als Folge einer HFD. Während der Laktationszeit kam es zu einem akzelerierten Aufholwachstum der Nachkommen, sodass zum Zeitpunkt des Absetzens an P21 ein erhöhtes Körpergewicht vorlag [56]. Ein vermindertes Geburtsgewichtes wurde ebenso von Mdaki et al beobachtet [71]. Andere Autorengruppen beobachteten keine signifikante Veränderung des Geburtsgewichts, so De Jong et al [66] oder Samuelsson et al [64]. Beim Menschen bewirkt mütterliche Adipositas sowohl eine erhöhte Inzidenz für intrauterine Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit vor der 32. Schwangerschaftswoche, jedoch auch ein erhöhtes Risiko für fetale Makrosomie [30-32]. Die fetale Makrosomie wird im Wesentlichen durch ein vermehrtes Fettgewebe und einen erhöhten Körperfettanteils des Kindes verursacht. Als wesentlicher Vorgang wird eine Hyperinsulinämie des Feten angesehen, welche durch eine mütterliche Insulinresistenz verursacht wird [31]. Da ein erhöhtes Geburtsgewicht im Tiermodell nicht beobachtet wurde, könnte hier ein Unterschied hinsichtlich der Auswirkungen mütterlicher HFD auf das Geburtsgewicht vorliegen. Eine mögliche Ursache könnte im Überwiegen adverser plazentarer oder inflammatorischer Einflüsse liegen [26, 79]. So zeigte eine Publikation von Kretschmer et al, dass eine mütterliche HFD in der Plazenta molekulare und Strukturparameter beeinträchtigte. Diese weisen auf placentare Dysfunktion, gestörte Trophoblastendifferenzierung und Störung von Basalmembran und Adhäsionskontakten hin [146]. Eine erhöhte postnatale Gewichtszunahme während der Laktationszeit wurde in tierexperimentellen Studien zu mütterlicher Adipositas fast immer beobachtet [53, 56, 59, 66]. Die Auswertung des Körpergewichtsverlaufs zeigte an P70 eine leichte Verminderung des Körpergewichtes bei den Nachkommen der HFD-Gruppe. Demgegenüber bestand in vielen tierexperimentellen Studien auch nach dem Absetzen vom Muttertier an P21 und Umstellen auf SD weiterhin eine Adipositas und metabolische Störungen [56]. Jedoch konnte eine Publikation unserer Arbeitsgruppe von Litzenburger et al zeigen, dass die Körperzusammensetzung hin zu einem dysmetabolischen Phänotyp verändert war, trotz Verminderung des absoluten Körpergewichtes. Bei männlichen Nachkommen an P70 war der Anteil an Fett an der Gesamtmasse signifikant erhöht [54]. Dies wird auch von anderen Autoren bestätigt [56]. Eine mögliche Ursache für das verringerte Gewicht könnte in einer Reduktion der Muskelmasse bestehen, wie von Loche et al als Folge einer mütterlichen Adipositas durch eine zucker- und fettreichen obesogenen Diät beschrieben [64]. In Beobachtungsstudien am Menschen stellte ein erhöhter BMI vor der Schwangerschaft oder eine exzessive Gewichtszunahme der Mutter während der Schwangerschaft einen der Hauptrisikofaktoren für Adipositas in der Kindheit dar [39-42].

### 5.2.2 Veränderung von Herzgewicht und Herz/Körpergewichtsindex

Um die Auswirkungen einer mütterlichen HFD auf das Herz zu untersuchen, wurde das Herzgewicht bestimmt und der Herz/Körpergewichtsindex ermittelt. Beide können als Surrogatparameter für eine myokardiale Hypertrophie dienen. An P1 bestand hinsichtlich des absoluten Herzgewichtes kein signifikanter Unterschied. Jedoch bestand zu diesem Zeitpunkt ein Trend zu einem erhöhten Herz/Körpergewichtsindex, bei geringerem Körpergewicht in der HFD-Gruppe. Dies könnte auf eine mögliche frühe myokardiale Hypertrophie hinweisen. An P21 bestand ein signifikant erhöhtes Herzgewicht. Der Herz/Körpergewichtsindex war aufgrund des signifikant erhöhten Körpergewichts nicht signifikant verändert. Dies könnte ebenso auf eine mögliche kardiale Hypertrophie zu diesem Zeitpunkt hinweisen. Diese Resultate decken sich mit Ergebnissen in der wissenschaftlichen Literatur. Hier wurde in vielen der durchgeführten tierexperimentellen Studien eine myokardiale Hypertrophie beobachtet. Diese wurde in verschiedenen Studien in mehreren, zum Teil unterschiedlichen Messparametern wiedergegeben. De Jong et al beobachteten ein erhöhtes Herzgewicht und einen erhöhten Herz-Körpergewicht-Quotienten an P1 und P10 [66]. Bei Xue et al führte mütterliche HFD in einem Rattenmodell in männlichen Nachkommen zu kardialer Hypertrophie, hinweisend auf eine möglicherweise geschlechtsspezifisch unterschiedliche Ausprägung der Effekte [65]. In unserer Studie wurden nur männliche Nachkommen untersucht, um die Effekte möglicher geschlechtsspezifischer Dimorphismen auszuschließen. Jedoch kann hierdurch keine Aussage über geschlechtsspezifische Effekte nach mütterlicher HFD getroffen werden. Molekularbiologisch führte eine HFD in mehreren Studien zu einer erhöhten Expression von Hypertrophie markern des Myokards, etwa GATA4 [56], BNP, ANP bzw. *Nppa* [66] und *Myh7* [66, 67]. Während Siddeek et al auch an P77 eine Erhöhung der Herz-/Körpergewichts-Ratio sowie eine Erhöhung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche als Zeichen einer Hypertrophie nach einer mütterlichen HFD beobachteten, ließ sich anhand der in diesem Projekt erhobenen Daten an P70 keine signifikante Veränderung des Herzgewichtes oder des Herz/Körpergewichtsindex bei den Nachkommen der HFD-Gruppe beobachten. Insgesamt weisen die Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur darauf hin, dass mütterliche HFD zu einer frühen myokardialen Hypertrophie führt. Der Unterschied zwischen HFD und SD scheint am Ende der Laktationszeit besonders ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung wäre neben einer reaktiven Hypertrophie auf physikalische, metabolische und hormonelle Reize eine beeinträchtigte Proliferation und Differenzierung von Stammzellen. Dies könnte zu einem weniger funktionsfähigem Myokard führen und reaktiv zu einer Induktion einer Hypertrophie führen. Eine verstärkte mechanische Belastung, etwa durch eine arterielle Hypertonie, wie von Samuelsson et al und Elahi et al beobachtet, könnte additiv zu der Entwicklung einer Hypertrophie beitragen [64, 74].



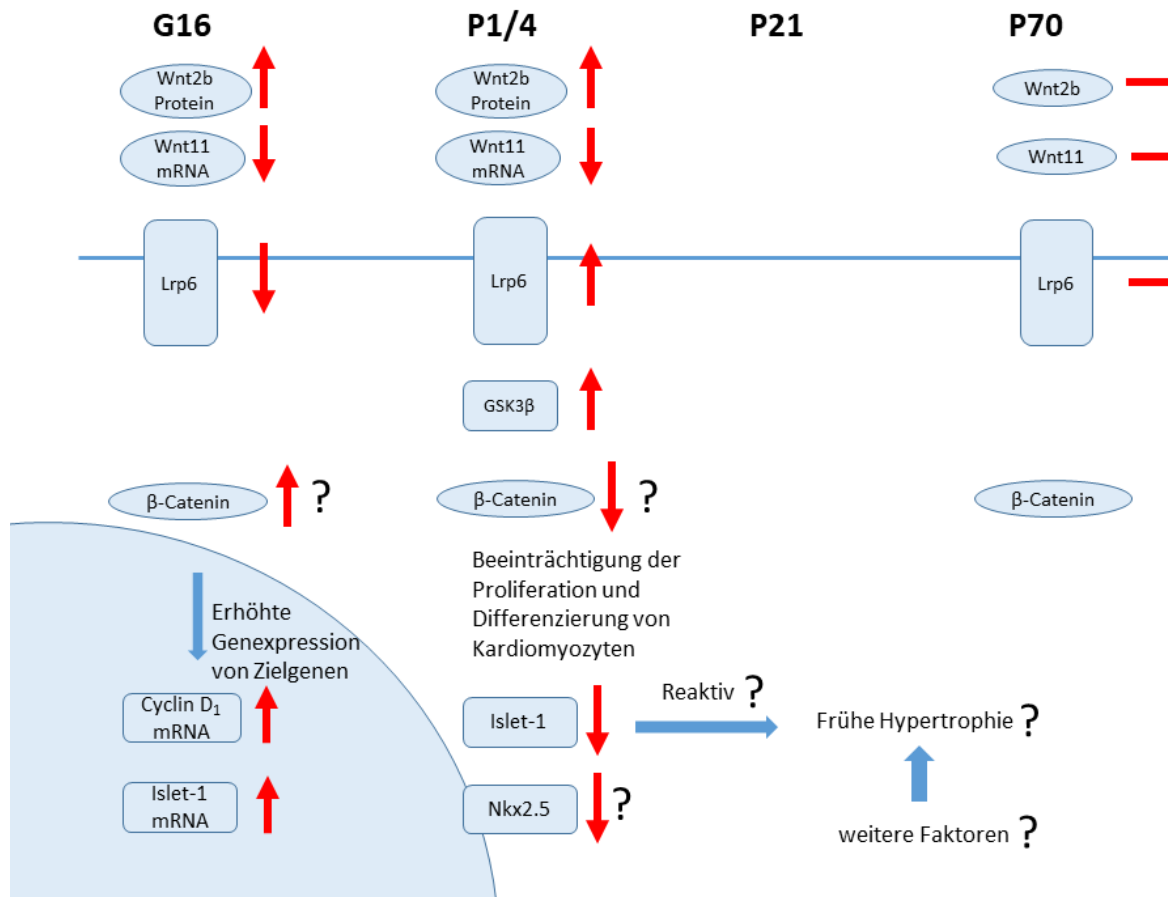
### 5.3 Kardialer Umbau und Fibrose durch Mütterliche Hochfett-Diät

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die mütterliche HFD möglicherweise zu einer beginnenden kardialen Fibrose mit einer Vermehrung des kollagenen Bindegewebes führt. Eine Fibrose würde einen möglichen Erklärungsansatz für eine eingeschränkte Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit darstellen, welche in tierexperimentellen und humanen Studien beobachtet wurde [50, 51, 62, 65, 68]. Um die Hypothese einer Vermehrung von kollagenem Gewebe im Myokard durch mütterliche HFD zu untersuchen, wurden initial mittels Western Blot die Expression von Vimentin bestimmt. Vimentin ist ein Intermediärfilament des Zytoskeletts und wird von Mesenchymzellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten sowie im endothelialen und glattmuskulären vaskulären Gewebe exprimiert. In Kardiomyozyten findet keine Expression statt [144]. Daher kann Vimentin als Marker für das vermehrte Vorhandensein von mesenchymalen Zellen verwendet werden. In den durchgeführten Western Blots zeigte sich jedoch keine erhöhte Proteinexpression von Vimentin.

Zur weiteren Evaluation der histologischen Morphologie und zur Evaluierung einer möglichen myokardialen Fibrose wurden Paraffinschnitte mit der Picrosirius Red-Färbung gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass bei den Nachkommen der HFD-Gruppe gegenüber den Nachkommen der SD-Gruppe an P21 ein verminderter Kollagen/Myokard-Quotient vorlag. An P70 bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen. Interessanterweise zeigte sich innerhalb der HFD-Gruppe kein Unterschied zwischen P21 und P70. Demgegenüber kam es während dieses Zeitraumes bei der SD-Gruppe zu einer Abnahme des Kollagen/Myokard-Quotienten. Die These, dass mütterliche HFD zu einer vermehrten Fibrose als früher struktureller Veränderung führt, kann anhand dieser Daten nicht bestätigt werden. In der Literatur lassen sich jedoch auch Nachweise über das Vorliegen einer Fibrose nach mütterlicher HFD finden, wobei teilweise abweichende Ergebnisse vorliegen. Turdi et al. evaluierten bei 4 Monaten alten Tieren (ca. P120) Schnitte mittels *Masson Trichome*-Färbung und fanden keine vermehrte Fibrose als Folge einer alleinigen mütterlichen HFD. Erfolgte die Umstellung an P21 auf HFD, konnte bei den Nachkommen der SD-Muttertiere eine Fibrose an P120 beobachtet werden. Diese war bei den HFD-Nachkommen nochmal signifikant verstärkt, sodass von einer additiven Wirkung ausgegangen werden kann. Wie in 1.4.2.1 besprochen, traf das auch für weitere kardiale Struktur- und Funktionsparameter (linksventrikuläres Gewicht/Tibiallänge, Kardiomyozytenquerschnittsfläche, LVESD sowie *Fractional Shortening*) zu [56]. Ähnliche Ergebnisse berichteten Loche et al., welche jedoch eine obesogene zucker- und fettreiche Diät verwendeten. Auch hier führte lediglich die Interaktion zwischen obesogener Diät der Muttertiere sowie der Nachkommen ab P21 zu vermehrter Fibrose in der *Sirius Red*-Färbung an P56 (n=6/Gruppe) [59]. Demgegenüber beobachteten Siddeek et al.,

dass mütterliche HFD bei den Nachkommen an P77 zu einer vermehrten Ablagerung an extrazellulärer Matrix in einer *Masson Trichrome*-Färbung und damit zu vermehrter Fibrose führte. Das verwendete Rattenmodell umfasste die Ernährung schwangerer Muttertiere ab dem 7. Schwangerschaftstag (G7) mit einer 60% HFD und Umsetzen der Nachkommen auf SD an P21. Es wurde die interstitielle fibrotische Fläche berechnet; zu beachten ist die große Gruppengröße von  $n = 18$  pro Gruppe, was zu höherer statistischer Power führt. Des Weiteren fanden die Autoren Veränderungen der microRNA-Expression, welche sie mit einer Dysregulation des *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) Signalwegs, was einen Mechanismus einer vermehrten Matrixbildung darstellen könnte, in Verbindung brachten [69]. Es ist daher möglich, dass aufgrund einer großen Variabilität und relativ kleinen Anzahl von 5 bzw. 6 beobachteten Tieren eine bestehende Fibrose statistisch nicht erfasst wurde. Weitere mögliche Limitationen werden in 4.6 dargestellt. Auch Huang et al beschreiben ein Remodeling mit vermehrter Fibrose des myokardialen Gewebes durch mütterliche Adipositas. Die Autoren verwendeten ein Schafmodell mütterlicher Adipositas, bei dem 150% der empfohlenen Diät gefüttert und mittels Hydroxyprolin-Assay von kardialem Gewebe der Nachkommen am 75. und 135. Gestationstag ein erhöhter Kollagengehalt nachgewiesen wurde [61]. Ausgehend von den in diesem Projekt erhobenen Daten liegen jedoch keine Hinweise für eine vermehrte Fibrose vor. Jedoch wäre es möglich, dass etwa eine vermehrte perivaskuläre Fibrose vorliegt, welche aufgrund der Kaliberschwankungen der Gefäße und der Wahl eines zufälligen Bildausschnittes schwierig zu evaluieren ist.

Die in diesem Projekt erhobenen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die mütterliche HFD zu einer verfrühten Hypertrophie der Kardiomyozyten während der Gestations- und Laktationszeit führt. Bei dem Kollagen/Myokard-Quotienten handelt es sich um einen relativen Wert, bei dem das Verhältnis der Fläche interzellulärer kollagener Fasern in Relation zur Fläche des Myokardgewebes eines Bildausschnittes ermittelt wird. Eine Hypertrophie von Kardiomyozyten würde so zu einem verminderten Wert führen. Folglich deuten die Ergebnisse insgesamt möglicherweise darauf hin, dass die mütterliche HFD eine verfrühte Hypertrophie der Kardiomyozyten auslöst. Dies wird auch durch die Messungen des Herzgewichts sowie die wissenschaftliche Literatur gestützt, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt. Als neuer pathogenetischer Mechanismus könnte dies mit einer Beeinträchtigung der normalen kardialen Proliferation und Differenzierung zusammenhängen.



**Abb. 33: Schematische Darstellung der wesentlichen Erkenntnisse der Studie als möglicher Mechanismus für die Hypertrophie der Herzmuskelzellen und der Programmierung von Herzerkrankungen nach mütterlicher Adipositas.**

## 5.4 Dysregulation von Wnt/ β-Catenin Signalweg und Progenitorzellmarkern durch mütterliche Hochfett-Diät

Bei der Maus ist die mikroskopische Herzentwicklung erst etwa ab P20 abgeschlossen. Die Kardiomyozyten des murinen Herzens befinden sich dabei zum intrauterinen Zeitpunkt G16 und an P1 weiterhin in einem Zustand der Proliferation [147]. Die Regulation von Proliferation und Differenzierung Islet-1 positiver kardialer Progenitorzellen wird maßgeblich durch den Wnt/β-Catenin Signalweg reguliert [137, 138].

### 5.4.1 Wnt-Liganden

Die Wnt-Proteine stellen die Liganden des kanonischen Wnt/β-Catenin Signalwegs als auch weiterer nichtkanonischer Wnt-Signalwege wie des Wnt/JNK-Signalwegs dar. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoformen Wnt3a, Wnt2b sowie Wnt11 untersucht. Es dabei wird davon ausgegangen, dass bestimmte Isoformen, wie Wnt3a, auf den kanonischen Wnt/β-Catenin

Signalweg wirken, während andere, etwa Wnt11, dem nichtkanonischen Wnt/JNK Signalwege zugeordnet werden [107, 119]. Grundsätzlich geht man davon aus, dass zu Beginn der kardialen Entwicklung vor allem der kanonische Wnt Signalweg aktiv ist. Dieser bewirkt, dass die Progenitorzellen ihren proliferativen und undifferenzierten Zustand beibehalten. Im Verlauf kommt es zur Herunterregulation des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs, während Wnt11 über den nichtkanonischen Signalweg zur Aktivierung myokardialer Gene beiträgt, was zu einer myokardialen Differenzierung der Zellen führt [107, 120, 121].

Die Ergebnisse zeigen, dass mütterliche HFD zur Dysregulation der untersuchten Wnt-Liganden führt. Die verschiedenen Wnt-Isoformen werden dabei in differentiell und teils gegensätzlich beeinflusst. Intrauterin (G16) zeigte sich die Proteinexpression von Wnt2b erhöht. Wnt2b wird in der Regel eine antagonistische Rolle im kanonischen Signalweg zugeschrieben [122, 123]. Eine vermehrte Wnt2b Proteinexpression an G16 würde somit gegen eine verstärkte  $\beta$ -Catenin-Aktivität an G16 sprechen, wenn eine kausale Beteiligung von Wnt2b angenommen wird. Aufgrund der nicht ganz geklärten mechanistischen Rolle von Wnt2b sollten die Ergebnisse jedoch nur im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen ausgewertet werden. Hierbei scheint die Bewertung der  $\beta$ -Catenin-Aktivität über andere Komponenten sowie die Zielgene, deren Transkription reguliert wird, aussagekräftiger. Früh postnatal (P1/P4) hingegen sind die Ergebnisse gut mit einer verminderten  $\beta$ -Catenin-Aktivität vereinbar. Zu diesem Zeitpunkt passt vor dem Hintergrund einer antagonistischen Rolle von Wnt2b im kanonischen Signalweg das Ergebnis einer trendweise vermehrten Proteinexpression von Wnt2b an P4 zu einer Inhibierung des kanonischen Signalwegs und einer verminderten  $\beta$ -Catenin-Aktivität, wie zu diesem Zeitpunkt postuliert. Es wurde ebenso die Genexpression von *Wnt3a* und *Wnt11* untersucht. Die *Wnt3a* Genexpression war an P1 trendweise vermindert, was kausal zu einer geringeren Stimulation des kanonischen Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalwegs beitragen könnte. Interessant ist darüber hinaus die früh postnatale Verminderung der *Wnt11*-Genexpression an P1/4 (an P1 signifikant, an P4 trendweise erniedrigt). Eine reduzierte Wnt11 Expression könnte zu einem abgeschwächten nichtkanonischen Wnt-Signalweg mit einer resultierenden gestörten Differenzierung der Kardiomyozyten beitragen. Da in dieser Arbeit der nichtkanonische Wnt-Signalweg nicht näher evaluiert wurde, kann über diesen Mechanismus jedoch nur spekuliert werden. Zu den späteren Zeitpunkten P21 und P70 scheint keine wesentliche Veränderung des Signalwegs vorzuliegen. Dies korreliert mit Literaturergebnissen, die zeigen, dass nach Abschluss der kardialen Entwicklung der  $\beta$ -Catenin-Signalweg im Wesentlichen inaktiv ist, jedoch als Reaktion auf eine Schädigung von Herz oder Gefäßen reaktiviert wird [122].

Bei der Entwicklung des fetalen Herzens handelt es sich um einen sowohl zeitlich als auch räumlich komplexen Vorgang, bei dem räumlich differenziert verschiedene Prozesse parallel ablaufen. Aus diesem Grund könnten räumlich eng begrenzte Prozesse relevant verändert sein, welche mit der Untersuchung des gesamten Herzgewebes nicht fassbar sind [107]. Die zeitliche Komponente spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Expression und Aktivierung verschiedener Wnt-Liganden und assoziierter Wnt-Signalwege während der kardialen Entwicklung. Allerdings bestehen zur Bedeutung zu diesem vergleichsweise späten Zeitpunkt der mikroskopischen Herzentwicklung wenige Daten, da die meisten Experimente zur Wirkung verschiedener Wnt-Liganden meist an embryonalen Stammzellen durchgeführt wurden. Über die Aktivität des nichtkanonischen Signalwegs lässt sich keine genaue Aussage treffen, da in dieser Arbeit der kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin untersucht wurde.

Zurzeit ist nicht genug über die Hintergründe und die jeweilige Funktion der Wnt-Liganden bekannt, um die Bedeutung und etwaige Auswirkungen abschließend zu bewerten. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die mütterliche HFD zu einer dynamischen Dysregulation der für die kardiale Entwicklung sehr wichtigen Wnt-Liganden im Herz der Nachkommen führt. Die Regulation von Proliferation und Differenzierung der kardialen Zellen benötigt ein abgestimmtes Zusammenspiel von kanonischem und nichtkanonischem Wnt Signalweg.

#### **5.4.2 Progenitormarker Islet-1 und Nkx2.5**

Die weiteren beteiligten Komponenten sowie Zielgene des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs liefern weitere Hinweise über eine Dysregulation des Wnt  $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch mütterliche HFD. Die Zielgene des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs werden durch das freie nicht-phosphorylierte  $\beta$ -Catenin reguliert, welches nach nukleär transloziert wird und dort u.a. über die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF die Transkription von Zielgenen beeinflusst [106]. Zu den Zielgenen zählen der Proliferationsmarker Cyclin D<sub>1</sub> sowie Islet-1, welches in kardialen Progenitorzellen des SHF exprimiert wird und mit zunehmender Differenzierung der Zellen verloren geht [99].

An G16 erbrachte die q-RT-PCR das Ergebnis einer signifikant verstärkten Genexpression von Islet-1 und einer trendweise verstärkten Genexpression von *Ccnd1*, welches das Protein Cyclin D<sub>1</sub> kodiert. Die vermehrte Genexpression dieser Zielgene kann auf eine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweg zum intrauterinen Zeitpunkt G16 hinweisen. Demgegenüber liegt in der frühen postnatalen Phase zu den Zeitpunkten P1 und P4 eine signifikant verminderte Proteinexpression von Islet-1 vor. Zunächst unterstützt die gegensätzlich veränderte Expression an G16 und an P1/4 die These einer dynamischen Regulierung. Die verminderte Expression von Islet-1 an P1/4 könnte

auf einen geringeren Pool von Progenitorzellen des SHF hinweisen. Ursächlich könnte eine Störung der Proliferation oder verfrühte Differenzierung sein.

Die Proliferation von Stammzellen des SHF wird durch die Aktivität des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs kontrolliert. Dieser erhält dabei den proliferativen, undifferenzierten Zustand der Zellen, während die Differenzierung unterdrückt wird [107, 148, 149]. Eine geringere  $\beta$ -Catenin-Aktivität führte auch in experimentellen Studien zu einer beeinträchtigten Proliferation der Zellen des SHF. So untersuchten Klaus et al mithilfe einer von Islet-1-Cre die Folgen eines selektiven Knockouts von  $\beta$ -Catenin in den Islet-1 positiven Zellen. Es zeigte sich eine reduzierte Zellzahl innerhalb des SHF sowie eine Beeinträchtigung der Entwicklung der daraus hervorgehenden Strukturen wie des Ausflusstrakts und des rechten Ventrikels [148]. Eine verminderte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch mütterliche HFD könnte somit die korrekte Proliferation und Differenzierung dieser Zellen stören [148]. So würde eine Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs etwa bei Überschreitung einer kritischen Schwelle möglicherweise auch einen Erklärungsansatz für die beobachtete Rate an Herzfehlbildungen liefern.

Neben Islet-1 wurde auch der Marker Nkx2.5 untersucht, welcher von den Zellen des SHF gemeinsam mit Islet-1 exprimiert wird. Die Genexpression des Markers Nkx2.5 zeigte einen Trend zur Verminderung, während die Proteinexpression nicht signifikant verändert war. Die verminderte Genexpression von Nkx2.5 zum Zeitpunkt P1 könnte mit der gemessenen geringeren Wnt11-Expression zusammenhängen. So wurde in Studien gezeigt, dass der Wnt-Ligand Wnt11 die Expression von Nkx2.5 fördert [145].

In der kardialen Entwicklung leitet eine erhöhte Wnt11-Expression und Aktivierung des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs in Verbindung mit einer reduzierten Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die kardiale Differenzierung ein [107]. Als Reaktion, etwa auf eine vermehrte Belastung, könnte eine beeinträchtigte Proliferation den korrekten Ablauf der Bildung des myokardialen Gewebes stören. Als mögliche Folge könnte eine verminderte Anzahl von Kardiomyozyten oder eine geringere Leistungsfähigkeit postuliert werden, was in einer vermehrten Belastung resultieren würde. Die Folge wäre eine sekundäre kompensatorische Hypertrophie, um der gesteigerten Belastung zu begegnen. Innerhalb dieser Arbeit stützen die Ergebnisse der Bestimmung von Herzgewicht und Herz-Gewichts-Index diese These. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die myokardiale Hypertrophie bieten, auf die unsere Ergebnisse indirekt hinweisen und die in anderen Studien bei den Nachkommen als Folge einer mütterlichen HFD beobachtet wurden [65-69].

Die These, dass eine reduzierte Anzahl von Kardiomyozyten zu sekundärer Hypertrophie und darauffolgend beeinträchtigter systolischer und diastolischer Funktion führen könnte, wird auch von Larsen et al geäußert, welche die Theorie einer beeinträchtigten Zellproliferation über den Ras-Raf-ERK-Signalweg entwickelten [68]. Larsen et al beobachteten in einem Modell mütterlicher Adipositas eine vermehrte kardiale Gen- und Proteinexpression von MFN2, welche ebenfalls mit einer verminderten Proliferation in Verbindung gebracht wird. Zukünftige Forschung könnte womöglich eine Integration weiterer an der Regulation beteiligter Signalwege liefern. Hinweise auf eine verminderte Proliferation ergeben sich auch aus den Untersuchungen von Xue et al. Mütterliche HFD reduziert die S-Phase und steigert die G1-Phase in fetalen und neonatalen Herzzellen [67]. Diese Ergebnisse unterstützen weiterhin die These, dass mütterliche HFD zu einer Beeinträchtigung der Proliferation von Progenitorzellen führt.

Im normalen Verlauf der kardialen Entwicklung kommt es zur Herunterregulation des kanonischen Signalwegs, welcher zuvor den proliferativen und undifferenzierten Zustand der Progenitorzellen erhält. Herunterregulation und Aktivierung des Wnt11-assoziierten nichtkanonischen Signalwegs führt zur endgültigen myokardialen Differenzierung [107, 120, 121]. Insbesondere ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg maßgeblich an der Regulierung der Proliferation und Differenzierung Islet-1 positiver kardialer Progenitorzellen beteiligt [137, 138].

#### **5.4.3 Lrp6 Rezeptor, GSK-3 $\beta$ , Cyclin D<sub>1</sub> und $\beta$ -Catenin**

Auch die Proteinexpression des Rezeptors Lrp6 scheint durch die mütterliche HFD dysreguliert. Dabei liegt eine dynamische Regulierung vor. Wie zuvor genannt, spricht die vermehrte Genexpression der Zielgene *Isl-1* und *CCnd1* zum intrauterinen Zeitpunkt G16 für eine verstärkte  $\beta$ -Catenin-Aktivität, während die Ergebnisse zum frühen postnatalen Zeitpunkt P1/P4 hingegen gut mit einer verminderten  $\beta$ -Catenin-Aktivität vereinbar sind. Die Ergebnisse der Proteinquantifizierung von Lrp6 ergaben einen Trend zu verminderter Lrp6 Proteinexpression an G16, während an P1 ist die Proteinexpression von Lrp6 tendenziell erhöht war. In einer Studie von Song et al hatte eine Lrp6-Defizienz im embryonalen Stadium eine geringere Progenitorzellproliferation und eine reduzierte Expression von Islet-1 und weiterer myokardialer Marker zur Folge [150]. Dieses Ergebnis passt zur proliferationsfördernden Rolle des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zu diesem Zeitpunkt und der Rolle von Lrp6 in der Signaltransduktion bei der Aktivierung des Signalwegs durch die Wnt-Liganden.

Vor dem Hintergrund einer erhöhten *Isl-1* Expression zum Zeitpunkt G16 wäre deswegen eine kompensatorische Herunterregulation von Lrp6 denkbar. Analog hierzu liegt bei einer verminderten Islet-1-Expression zu den frühen postnatalen Zeitpunkten P1 und P4 daher eine

möglicherweise kompensatorische Hochregulation von Lrp6 nahe. Insgesamt passen die Ergebnisse somit in die bisherigen Ergebnisse. Die Proteinexpression des Rezeptors Lrp6 zeigte sich zum Zeitpunkt P1 trendmäßig erhöht. Diese gegensätzliche Veränderung von Lrp6 zum intrauterinen und früh postnatalen Zeitpunkt stützt zusätzlich die These einer dynamischen Regulierung.

Ferner wurden Gen- und Proteinexpression von GSK-3 $\beta$  an P1 untersucht. GSK-3 $\beta$  bildet gemeinsam mit den Proteinen Axin-1 und APC den Kinasekomplex, welcher die Aktivität des freien  $\beta$ -Catenins durch Markierung für den Abbau reguliert [106]. Die Aktivität von GSK-3 $\beta$  wird durch Phosphorylierung an Ser9 reguliert, wodurch zwischen der nichtphosphorylierten, aktiven Form, sowie der phosphorylierten, weniger aktiven Form, unterschieden werden kann. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit relativer sowie absoluter Verminderung von phospho-GSK-3 $\beta$  weisen auf eine vermehrte Aktivität von GSK-3 $\beta$  zum Zeitpunkt P1 hin. Dies würde im vermehrten Abbau und dementsprechend geringeren Aktivität von  $\beta$ -Catenin resultieren und könnte ursächlich zu einer verminderten  $\beta$ -Catenin-Aktivität zum Zeitpunkt P1, wie zuvor postuliert, beitragen.

Auch Cyclin D<sub>1</sub> könnte mechanistisch zu einer verminderten Proliferation beitragen. Die Familie der Cycline sind Proteine, welche eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen, indem sie *Cyclin Dependent Kinases* (CDKs) binden und aktivieren. Die D-Cycline bewirken eine Progression des Zellzyklus von der G1 in die S-Phase [110]. Die Aktivität von Cyclin D<sub>1</sub> wird auch durch GSK-3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierung reguliert. GSK-3 $\beta$ -Knockout führte in Versuchen zu Akkumulation von Cyclin D<sub>1</sub> im Nucleus und Hyperproliferation der fetalen Kardiomyozyten an G15 [113, 114]. Cyclin D<sub>1</sub> ist dabei über eine LEF-1-Bindungsstelle am Cyclin D<sub>1</sub>-Promoter ein Zielgen des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs [111]. Eine vermehrte Aktivität von GSK-3 $\beta$  und verminderte  $\beta$ -Catenin könnten somit auch über eine verminderte Cyclin D<sub>1</sub>-Aktivität zu verminderter Proliferation beitragen.

In der direkten Quantifizierung der Protein- und Genexpression von  $\beta$ -Catenin konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Auch die immunhistochemische Färbung von  $\beta$ -Catenin konnte keine unterstützenden Hinweise liefern. Die Schwierigkeit der Auswertung der Immunfärbung von  $\beta$ -Catenin ist ein in der Literatur bekanntes Problem [107]. Die Ursache besteht darin, dass 90% des gesamten  $\beta$ -Catenins membrangebunden vorliegen. Jedoch ist lediglich freies zytosolisches, nicht-phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin für die Transkription von Zielgenen bedeutsam [106]. Die Differenzierung hinsichtlich des phosphorylierten Anteils von  $\beta$ -Catenin mithilfe eines spezifischen Antikörpers ergab ein inkonsistentes Signal geringer Intensität. Ein



möglicher Grund ist der schnelle Abbau des phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin. Daher könnte es auch zu veränderten Anteilen des aktiven  $\beta$ -Catenin kommen, ohne dass dies experimentell fassbar wäre. Die Gewebepräparation und -fixierung könnte zudem für die Variabilität innerhalb der Versuchsgruppen beitragen.

## 5.5 Zusammenfassung

Unsere vorliegende Studie liefert folgende zentrale Ergebnisse: Mütterliche HFD führte zu Veränderungen des Gewichtsverlaufes: Die Messungen des Körpergewichtes zeigten ein vermindertes postnatales Gewicht bei den Nachkommen mit HFD ernährten Müttern. Während der Laktationszeit bestand ein akzeleriertes Aufholwachstum, sodass an P21 das Körpergewicht erhöht war. Es lag außerdem eine Regulation des Herzgewichtes vor, welche mit einer kardialen Hypertrophie vereinbar ist. Bereits direkt postnatal bestand eine tendenziell erhöhte Herz-/Körpergewichtsratio; an P21 war das Herzgewicht signifikant erhöht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Untersuchungen [55, 56, 65, 66]. Darüber hinaus könnte auch die Auswertung der mittels Sirius Red Färbung gefärbten Herzschnitte auf eine verfrühte myokardiale Hypertrophie hinweisen. Ein reduzierter Kollagen/Myokard-Quotient in der HFD-Gruppe an P21 könnte als relativer Wert auf eine mögliche Steigerung des myokardialen Flächenanteils zurückzuführen sein. Zum späteren Zeitpunkt P70 bestand zwischen dem Kollagen/Myokard-Quotient der HFD-Gruppe und der SD-Gruppe kein Unterschied, ebenso wenig jedoch zur HFD-Gruppe am Tag P21. Dies lässt, in Kombination mit dem erhöhten Herzgewicht in der HFD-Gruppe zu diesem Zeitpunkt, auf eine verfrühte Hypertrophie der Kardiomyozyten während der Laktationszeit schließen.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse darauf hin, dass eine mütterliche HFD zur Dysregulation des für die kardiale Entwicklung sehr wichtigen Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg führen könnte. Bei differenzierter Betrachtung scheint dabei eine dynamische Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs vorzuliegen. Zum intrauterinen Zeitpunkt G16 scheint eine verstärkte  $\beta$ -Catenin-Aktivität vorzuliegen, während die Ergebnisse zum frühen postnatalen Zeitpunkt P1/P4 für eine verminderte  $\beta$ -Catenin-Aktivität sprechen. Zu den späteren Zeitpunkten P21 und P70 scheint keine wesentliche Veränderung des Signalwegs vorzuliegen.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse darauf hin, dass mütterliche HFD zu einer verminderten Expression von Progenitormarkern früh postnatal führte. So lag am frühen postnatalen Zeitpunkt P1/P4 eine verminderte Expression der Marker Islet-1 und Nkx2.5 vor. Die reduzierte Expression dieser Progenitorzellmarker könnte auf einen reduzierten Pool an Progenitorzellen hinweisen. Ursächlich könnte eine verminderte Proliferation oder verfrühte Differenzierung sein. Da die

Proliferation und Differenzierung Islet-1 positiver kardialer Progenitorzellen maßgeblich vom Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg reguliert wird, könnte eine verminderte Aktivität dieses Signalwegs hierzu ursächlich beitragen [137, 138]. Eine geringere  $\beta$ -Catenin-Aktivität in Islet-1 positiven Zellen führte auch in experimentellen Studien zu einer beeinträchtigten Proliferation der Zellen des SHF und Beeinträchtigung der daraus hervorgehenden Strukturen [148]. Ein verminderter Pool an Stammzellen, etwa aufgrund einer verminderten Proliferation, könnte eine verminderte Leistungsfähigkeit des Herzmuskels bewirken. Dies ist gut mit Ergebnissen anderer Studien vereinbar, in denen mütterliche HFD zu funktionellen Beeinträchtigungen des Herzens führte [50, 51, 56, 62, 65, 71]. Hierdurch könnte es zu einer relativ vermehrten Belastung des Myokards mit konsekutiver myokardialer Hypertrophie kommen. Die Ergebnisse von Xue et al und Larsen et al weisen ebenfalls darauf, dass mütterliche HFD zu einer Beeinträchtigung der Proliferation von Progenitorzellen führen und sekundär eine Hypertrophie begünstigen könnte [67, 68]. Auf diese Weise könnte eine mütterliche HFD über eine beeinträchtigte Proliferation zu einer sekundären myokardialen Hypertrophie führen, was auch durch die Ergebnisse von Xue et al und Larsen et al unterstützt wird [67, 68]. [68]

Insgesamt stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die These, dass mütterliche HFD durch Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Proliferation und Differenzierung kardialer Progenitorzellen möglicherweise beeinträchtigt. Hierbei könnten weitere, durch die mütterliche HFD bewirkte Effekte ätiologisch beteiligt sein. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass durch mütterliche HFD bei den Nachkommen ein dysmetabolischer Zustand mit erhöhten Spiegeln von Insulin, Leptin und Adipozytokinen vorliegt [53, 55, 56, 58]. Somit sind weitere in der Literatur beschriebene Folgen einer mütterlichen HFD wie eine arterielle Hypertonie sowie hormonelle Faktoren als zusätzliche ätiologische Faktoren vorstellbar [64, 74]. Die pathophysiologische Relevanz dieser Ergebnisse für spätere Morbidität und Mortalität ist schwer einzuschätzen. Andere Untersuchungen sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen unterstützen die These, dass mütterliche HFD zu kardialer Hypertrophie führt und haben gezeigt, dass bereits in einem frühen Stadium funktionelle Einschränkungen vorliegen [50, 51, 56, 62, 65, 71]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen einer mütterlichen HFD und der adversen Beeinflussung kardialer Progenitorzellen aufgezeigt.

## **5.6 Limitationen der Arbeit**

Das verwendete Tiermodell dient der Induktion einer mütterlichen Adipositas, um die Auswirkungen auf die Nachkommen zu untersuchen. Hierzu wurde eine hochkalorische Diät mit hohem Fettanteil verwendet. Die obesogene „*Western Style* Diät“ ist jedoch nicht nur durch einen

hohen Anteil an Fett, sondern auch durch einen erhöhten Anteil kurzkettiger Kohlenhydrate und Zucker gekennzeichnet [14]. Beim verwendeten Modell handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der Auswirkungen mütterlicher Adipositas auf die Nachkommen, dass auch in anderen Untersuchungen häufig verwendet wurde [53-56]. Wie in der Einleitung dargelegt, führen beide Modelle mütterlicher Adipositas zu einem vergleichbaren Phänotyp der Nachkommen.

Die Organentnahme, Präparation und Gewichtsmessung der Herzen wurden im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierbei wurde eventuell anhaftendes Gewebe oder Blut nicht aufwendig abpräpariert, sodass kleine Mengen anhaftenden Gewebes das Messergebnis der Gewichtsmessung beeinflussen könnten. Dies ist aufgrund der geringeren Masse der Herzen am ehesten zum frühen Zeitpunkt P1 relevant, weniger zu den späteren Zeitpunkten. In zukünftigen Untersuchungen sollten die entnommenen Herzen bei der Organentnahme sorgfältig von umliegendem Gewebe gereinigt werden. Gegebenenfalls sollte außerdem eine Trennung von linkem und rechtem Ventrikel erfolgen. Auf diese Weise ließe sich eruieren, ob eine myokardiale Hypertrophie vor allem auf einer Zunahme des links- oder rechtsventrikulären Gewebes beruht.

Es wurde für jeden Zeitpunkt eine Anzahl von mindestens 5 Tieren der HFD und 5 Tieren der Kontroll- (SD)-gruppe verglichen. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere könnte eine statistisch bestehende Signifikanz verfehlt werden. Mit einer höheren Anzahl Tiere und höherer statistischer Power ließen sich so validere Aussagen gewinnen. Demgegenüber stehen eingeschränkte Ressourcen, sodass dies eine übliche Anzahl darstellt. Insbesondere am frühen, intrauterinen Zeitpunkt G16 war das Untersuchungsmaterial aufgrund der geringen Organgröße quantitativ begrenzt, sodass die molekulare Untersuchung sich zu diesem Zeitpunkt auf die wichtigsten Marker beschränkte. Mit mehr Untersuchungsmaterial wäre eine breitere Untersuchung zu diesem Zeitpunkt möglich gewesen. Es wurden in der Regel ausschließlich männliche Tiere untersucht. Daher stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse auf auch weiblichen Nachkommen übertragbar sind. Zum Teil wurden in der Literatur geschlechtsabhängige Unterschiede bei den Auswirkungen einer mütterlichen HFD beobachtet, welche auf geschlechtsspezifische Mechanismen hinweisen könnten [54, 65, 68]. Die Dauer des Beobachtungszeitraums betrug bis zu P70. Dies entspricht etwa dem jungen Erwachsenenalter. Längerfristige Auswirkungen konnten somit in dieser Arbeit nicht evaluiert werden. Über langfristige Folgen im höheren Alter der Versuchstiere kann anhand dieses Zeitraums daher keine Aussage getroffen werden.

Die verwendeten biochemischen Methoden qRT-PCR und Western Blot stellen etablierte Methoden dar, welche standardmäßig durchgeführt werden. Die Regulation der kardialen Differenzierung ist ein komplexer Vorgang, bei dem verschiedene Prozesse parallel und höchstwahrscheinlich räumlich und zeitlich differenziert ablaufen. Ideal wäre eine spezifische Identifikation relevanter Areale, in dem die Wnt-Signalwege aktiv sind und gezielte Materialentnahme. Des Weiteren ist weitere Forschung notwendig, um zu ermitteln, ob der kanonische und nichtkanonische Wnt-Signalweg auch zu einem späteren Stadium der kardialen Entwicklung zum selben Zeitpunkt, und in welchen Arealen aktiv sind [151]. Hierdurch könnte eine genaue Zuordnung der Regionen und individuelle Untersuchung erfolgen.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob die Expression von Islet-1 geeignet ist, um die Anzahl von Progenitorzellen zu beurteilen. Der Progenitorzellmarker Islet-1 wird in kardialen Progenitorzellen des SHF exprimiert und geht mit zunehmender Differenzierung der Zellen verloren [99]. Aus diesem Grund wird die Islet-1 Proteinexpression bezogen auf das Ladungskontrollprotein als Surrogatparameter für die Anzahl von Progenitorzellen verwendet. Die Islet-1 positiven Zellen tragen hauptsächlich zum rechten Ventrikel, Ausflusstrakt und Teilen der Atriae bei und werden im linken Ventrikel nicht exprimiert [102]. Klinisch wurde in vielen Studien jedoch eine linksventrikuläre Hypertrophie beobachtet. Es muss daher noch weitere Mechanismen geben, welche zur linksventrikulären Hypertrophie beitragen. Denkbar wäre eine Beteiligung anderer Zellpopulationen.

Islet-1 positive Zellen lassen sich postnatal und auch in adulten Herzen nachweisen [103]. Bezogen auf die Gesamtzellzahl machen die Islet-1 positiven Zellen jedoch nur einen geringen Teil der Zellen im fetalen und neonatalen Herz aus. Mit Differenzierung geht der Marker Islet-1 verloren, sodass der überwiegende Anteil der Zellen von fetalen bzw. neonatalen Kardiomyozyten ausgemacht wird [99]. Diese proliferieren postnatal noch für einen gewissen Zeitraum, bis sie ihre Proliferationsfähigkeit schließlich verlieren und Polynukleation und Polyploidisation an die Stelle der Zellteilung treten [147]. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist jedoch weiterhin maßgeblich an der Regulation der Proliferation von Kardiomyozyten beteiligt [152]. Die Ergebnisse zeigen eine früh postnatale Reduktion der Expression von Islet-1. Es ist jedoch nicht sicher, ob hauptsächlich eine Beeinträchtigung der Islet-1 positiven Zellen in einem frühen Stadium kausal zu den beobachteten Effekten beiträgt oder diese lediglich gemeinsam mit einer Beeinträchtigung der Proliferation der fetalen Kardiomyozyten auftritt, jedoch nicht maßgeblich verantwortlich ist.

Bezüglich der Verwendung des Zellzyklusmarkers Cyclin D<sub>1</sub> als Marker zur Evaluation der Proliferation ergeben sich folgende Fragestellungen: Einerseits besteht eine Schwierigkeit darin,

das Signal von Cyclin D<sub>1</sub> einem Kardiomyozyten zuzuordnen, da auch Fibroblasten im kardialen Gewebe vorliegen [112]. Des Weiteren kann schwierig zwischen Proliferation und der ebenfalls in postnatalen Kardiomyozyten auftretenden Polynukleation und Polyploidisation unterschieden werden kann [112, 147].

Zur Evaluierung einer myokardialen Fibrose wurde die Picosirius Red Färbung in dieser Arbeit verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Farbschwellenwerten. Hierbei stellt sich die Frage, ob so eine myokardiale Fibrose adäquat evaluiert werden kann. Insbesondere eine vermehrte perivaskuläre Fibrose würde mit der verwendeten Methode unzureichend erfasst, da entsprechende Areale die Bewertung stark verzerren würden und exkludiert wurden. Die Methode wird jedoch häufig verwendet und lieferte in einer Untersuchung von Hadi et al auch im Vergleich zur Stereologie und Polarisationsmikroskopie valide Ergebnisse [143]. Grundsätzlich ist zu beachten, dass es aufgrund der Präparation und -fixierung zur Beeinträchtigung der Gewebequalität kommen kann. Außerdem ist es möglich, dass aufgrund einer großen Variabilität und relativ kleinen Anzahl von 5 bzw. 6 beobachteten Tieren eine bestehende Fibrose statistisch nicht erfasst wurde. Des Weiteren könnten methodische Limitationen die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse vermindern. Hierzu zählen beispielsweise der Ausschluss perivaskulärer Fibrose. Die Applikation eines Gitternetzsystems und randomisierte Schnittausswahl wie von Loche et al verwendet könnte den Einschluss perivaskulären Bindegewebes ermöglichen, jedoch auch zu hohen Schwankungen der ermittelten Werte führen [59]. Außerdem könnten Unterschiede in der Färbeintensität der *Picosirius Red*-Färbung zwischen den Schnitten bestehen. Da einheitliche Farbschwellenwerte verwendet wurden, könnte dies zu einer Unter- oder Überbewertung des jeweiligen Kollagenanteils führen. Darüber hinaus wurden die Schnitte zwar aus dem linksventrikulären Myokard entnommen; es wäre jedoch möglich, dass unterschiedliche anatomische Bereiche miteinander verglichen wurden. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Untersuchungen eine möglichst standardisierte Schnittebene verwendet werden, etwa auf Höhe der Papillarmuskeln. Dies würde etwa ermöglicht durch eine Einbettung der Herzen entlang der langen Ache und Anfertigung von Schnitten in der Transversalebene. Hierdurch könnten gegebenenfalls auch weitere Maße zur Evaluierung einer Hypertrophie erhoben werden wie die Dicke des interventrikulären Septums und gegebenenfalls die Stärke der freien linksventrikulären oder rechtsventrikulären Wand. Hierzu müsste jedoch die Orientierung und Schnittebene streng sichergestellt werden. Zukünftige Studien sollten auf diese Weise mit höherer Standardisierung durchgeführt werden, um eine Fibrose und Hypertrophie in einer definierten Schnittebene zu evaluieren.

Schlussendlich handelt es sich bei der Entwicklung des fetalen Herzens um einen sowohl zeitlich als auch räumlich komplexen Vorgang, bei dem räumlich differenziert verschiedene Prozesse parallel ablaufen. Aus diesem Grund könnten räumlich eng begrenzte Prozesse relevant verändert sein, welche mit der Untersuchung des gesamten Herzgewebes nicht fassbar sind [107]. Die zeitliche Komponente spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Expression und Aktivierung verschiedener Wnt-Liganden und assoziierter Wnt-Signalwege während der kardialen Entwicklung. Weitere Signalwege und Cofaktoren besitzen eine große Bedeutung in der Regulation der Herzentwicklung. Aus diesem Grund sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um eine Vertiefung und Integration der bestehenden Kenntnisse zu erreichen.

### **5.7 Ausblick in die Zukunft**

Die in dieser Arbeit vorgestellte These bietet einen neuartigen Erklärungsansatz für die beobachteten klinischen Effekte am Herz von Nachkommen von Müttern mit Adipositas. Die These einer beeinträchtigten Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen, welche zu einer verminderten Anzahl oder beeinträchtigten Leistungsfähigkeit von Kardiomyozyten mit folgender sekundärer Hypertrophie und möglicher Beeinträchtigung der kardialen Funktion führt, sollte weiter untersucht werden.

Im nächsten Schritt sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die beobachtete Hypertrophie zu bestätigen und näher zu differenzieren. Mithilfe einer sorgfältigen Präparation und Auftrennung nach linkem und rechtem Ventrikel könnte der Hauptlokus der Hypertrophie näher eingegrenzt werden. Auf histologischer Ebene könnten eine weitere Charakterisierung erfolgen, indem Untersuchungen wie die Bestimmung der Kardiomyocyten *Cross-sectional Area* bzw. Querschnittsfläche durchgeführt werden. Interessant wäre eine Beurteilung der *Cross-sectional Area* im zeitlichen Verlauf. Hierdurch könnte bestätigt werden, dass es durch die mütterliche HFD zum Zeitpunkt P21 zu einer verfrühten myokardialen Hypertrophie kommt. Schlussendlich sollten funktionelle Untersuchungen erfolgen, um am Kollektiv der Versuchstiere funktionelle Veränderungen zu evaluieren. In der Literatur führte mütterliche HFD jedoch nur bei einigen Studien zu manifesten funktionellen Veränderungen, sodass möglichst sensitive Verfahren wie Echokardiographie angewandt werden sollten, um diese zu erfassen.

Die Regulation der Proliferation kardialer Zellen ist ein komplexer Vorgang, an dem noch weitere Signalwege beteiligt sind. Blankesteyn führt neben dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vier weitere an der Proliferationsregulation beteiligte Signalwege an: 1) den Hippo/YAP/TAZ-, 2) p38 Mitogen-activated Proteinkinase (MAPK)-Signalweg, 3) PI3K-Akt-Signalweg und 4) den Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (Jak/Stat)-Signalweg [152]. Um den

zugrundeliegenden Mechanismus weiter zu evaluieren, könnten die Auswirkungen einer mütterlichen HFD auf die Aktivität dieser Signalwege untersucht werden. Zukünftige Forschung könnte zur zunehmenden Integration der Ergebnisse führen. Hürden bestehen in der Komplexität der räumlichen und zeitlichen Dynamik der Vorgänge. Zudem sind die Interaktionen zwischen den beteiligten Signalwegen nicht genau bekannt.

Eine interessante Frage werfen die mechanistischen Zusammenhänge zwischen der Dysregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und weiteren bekannten Folgen mütterlicher Adipositas auf. Mögliche Schnittstellen ergeben sich beispielsweise durch vermehrten oxidativen Stress. So wiesen mehrere Studien Zeichen einer mitochondrialen Dysfunktion der Kardiomyozyten nach [56, 67, 68, 71]. Vermehrter oxidativer Stress könnte einer der beteiligten Mechanismen sein, welcher eng mit mitochondrialer Dysfunktion verknüpft ist [71]. Des Weiteren könnte sich über eine Veränderung des Substratangebotes und der damit zusammenhängenden metabolischen Prozesse der Energiegewinnung Schnittstellen ergeben.

Die Erforschung zugrundeliegender Mechanismen von intrauteriner und postnataler Programmierung stellt ein neues und wichtiges Forschungsgebiet dar. Die errungenen Kenntnisse können helfen, die zugrundeliegenden Mechanismen von Gesundheit und Krankheit besser zu verstehen. Die steigende Prävalenz von Adipositas verleiht dieser Aufgabe zusätzliche Dringlichkeit. Insbesondere benachteiligte Menschengruppen sind von den Folgen mütterlicher Adipositas betroffen [16, 17]. Diese sind unabhängig hiervon bereits in besonderem Maße adversen Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche zu erhöhten Inzidenz chronischer Krankheiten führen [153]. Die Effekte intrauteriner Programmierung von Organfunktionen stellen eine zusätzliche Prädisposition zu erhöhter Morbidität und Mortalität dar, welche gesundheitliche Ungleichheit verstärkt. Aus diesem Grunde müssen effektive Public Health Maßnahmen gefunden werden, um diesem wachsenden Problem zu begegnen. Eine bessere Kenntnis der zugrundeliegenden Zusammenhänge erlaubt es, effektive präventive Maßnahmen zu identifizieren und ihre Umsetzung begründen zu können. Insbesondere sollte das gewonnene Wissen über den Ursprung vieler chronischer Erkrankungen Eingang in die klinische Versorgung von Kindern und schwangeren Frauen finden, um einen stärkeren Fokus auf die Prävention legen zu können, Risikopopulationen frühzeitig zu begleiten und Gesundheit und Lebensqualität von Betroffenen zu verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 61-73.
2. Barker, D.J. and C. Osmond, Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet, 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
3. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet (London, England), 1989. **2**(8663): p. 577-580.
4. Barker, D.J., et al., *Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life*. Lancet, 1993. **341**(8850): p. 938-41.
5. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
6. Hales, C.N. and D.J. Barker, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
7. Dabelea, D. and T. Crume, Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. Diabetes, 2011. **60**(7): p. 1849-1855.
8. Dörner, G., et al., Evidence for decreasing prevalence of diabetes mellitus in childhood apparently produced by prevention of hyperinsulinism in the foetus and newborn. Exp Clin Endocrinol, 1984. **84**(2): p. 134-42.
9. Dörner, G.M., A. Honigmann, G. Singer, P. Padelt, H. , Zur möglichen Bedeutung eines pränatales Hyperinsulinismus für die postnatale Entwicklung eines Diabetes Mellitus. Endokrinologie, 1973. **61**: p. 430-2.
10. Dörner, G. and A. Plagemann, Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. Horm Metab Res, 1994. **26**(5): p. 213-21.
11. Plagemann, A., et al., Fetale Programmierung bei intrauteriner Milieustörung – grundlegende Mechanismen am Beispiel der Körpergewichts- und Stoffwechselregulation. Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau, 2008. **48**: p. 215-224.
12. Agarwal, P., et al., Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. Crit Rev Clin Lab Sci, 2018. **55**(2): p. 71-101.
13. World Health Organization. *Obesity and Overweight Factsheet*. [WHO Factsheet] 2020 [cited 2020 29.09.]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
14. World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894)*. 2000 [cited 2020 02.10.]; Available from: [https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS\\_894/en/](https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/).
15. Anja Schienkiewitz, G.B.M.M., Ronny Kuhnert, Cornelia Lange, , *Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland*. Journal of Health Monitoring, 2017. **2**(2): p. 22-28.
16. Collaboration, N.R.F., Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. Lancet, 2017. **390**(10113): p. 2627-2642.



17. Ng, M., et al., Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England), 2014. **384**(9945): p. 766-781.
18. Meldrum, D.R., M.A. Morris, and J.C. Gambone, *Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?* *Fertil Steril*, 2017. **107**(4): p. 833-839.
19. Swinburn, B., G. Egger, and F. Raza, *Dissecting Obesogenic Environments: The Development and Application of a Framework for Identifying and Prioritizing Environmental Interventions for Obesity*. *Preventive Medicine*, 1999. **29**(6): p. 563-570.
20. Friedman, J.E., *Developmental Programming of Obesity and Diabetes in Mouse, Monkey, and Man in 2018: Where Are We Headed?* *Diabetes*, 2018. **67**(11): p. 2137-2151.
21. Organization, W.H. *Prevalence of overweight\*, ages 18+, 2016 (age standardized estimate) Female*. 2017 [cited 2021 21.01.]; Available from: [https://www.who.int/images/default-source/maps/global\\_overweight\\_2016\\_female.png?sfvrsn=235ae9ad\\_0](https://www.who.int/images/default-source/maps/global_overweight_2016_female.png?sfvrsn=235ae9ad_0).
22. Dlouhý, P., *A large blank world map with oceans marked in blue*. 2019.
23. World Health Organization. *Cardiovascular Diseases Factsheet*. 2017 [cited 2020 12.10.]; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
24. Kinlen, D., D. Cody, and D. O'Shea, *Complications of obesity*. *Qjm*, 2018. **111**(7): p. 437-443.
25. Ananthapavan, J., et al., *Economics of obesity--learning from the past to contribute to a better future*. *International journal of environmental research and public health*, 2014. **11**(4): p. 4007-4025.
26. Catalano, P.M. and K. Shankar, *Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child*. *Bmj*, 2017. **356**: p. j1.
27. EURO-PERISTAT Project. *European perinatal health report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015*. 2018 [cited 2020 22.10]; Available from: [https://www.europeristat.com/images/EPHR2015\\_Euro-Peristat.pdf](https://www.europeristat.com/images/EPHR2015_Euro-Peristat.pdf).
28. Flenady, V., et al., *Major risk factors for stillbirth in high-income countries: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet* (London, England), 2011. **377**(9774): p. 1331-1340.
29. Yao, R., et al., *Obesity and the risk of stillbirth: a population-based cohort study*. *Am J Obstet Gynecol*, 2014. **210**(5): p. 457.e1-9.
30. Lim, C.C. and T. Mahmood, *Obesity in pregnancy*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2015. **29**(3): p. 309-19.
31. Santangeli, L., N. Sattar, and S.S. Huda, *Impact of maternal obesity on perinatal and childhood outcomes*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2015. **29**(3): p. 438-48.
32. Hemond, J., R.B. Robbins, and P.C. Young, *The Effects of Maternal Obesity on Neonates, Infants, Children, Adolescents, and Adults*. *Clin Obstet Gynecol*, 2016. **59**(1): p. 216-27.
33. Heslehurst, N., et al., *The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short-term obstetric resource implications: a meta-analysis*. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2008. **9**(6): p. 635-683.

34. Wloch, C., et al., Risk factors for surgical site infection following caesarean section in England: results from a multicentre cohort study. *Bjog*, 2012. **119**(11): p. 1324-33.
35. Stothard, K.J., et al., Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2009. **301**(6): p. 636-650.
36. Madsen, N.L., et al., Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: a population-based study. *Congenital Heart Disease*, 2013. **8**(2): p. 131-141.
37. Mills, J.L., et al., *Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2010. **91**(6): p. 1543-1549.
38. Brite, J., et al., *Maternal overweight and obesity and risk of congenital heart defects in offspring*. *International Journal of Obesity (2005)*, 2014. **38**(6): p. 878-882.
39. Robinson, S.M., et al., Modifiable early-life risk factors for childhood adiposity and overweight: an analysis of their combined impact and potential for prevention. *Am J Clin Nutr*, 2015. **101**(2): p. 368-75.
40. Gaillard, R., et al., Associations of maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain with cardio-metabolic risk factors in adolescent offspring: a prospective cohort study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 2016. **123**(2): p. 207-216.
41. Yu, Z., et al., Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61627.
42. Hochner, H., et al., Associations of maternal prepregnancy body mass index and gestational weight gain with adult offspring cardiometabolic risk factors: the Jerusalem Perinatal Family Follow-up Study. *Circulation*, 2012. **125**(11): p. 1381-9.
43. Torloni, M.R., et al., *Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis*. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2009. **10**(2): p. 194-203.
44. Reynolds, R.M., et al., Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2013. **347**: p. f4539.
45. Lee, K.K., et al., Maternal Obesity During Pregnancy Associates With Premature Mortality and Major Cardiovascular Events in Later Life. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 2015. **66**(5): p. 938-944.
46. Eriksson, J.G., et al., Long-term consequences of maternal overweight in pregnancy on offspring later health: findings from the Helsinki Birth Cohort Study. *Ann Med*, 2014. **46**(6): p. 434-8.
47. Forno, E., et al., Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma. *Pediatrics*, 2014. **134**(2): p. e535-46.
48. Liu, S., et al., Pre-pregnancy Maternal Weight and Gestational Weight Gain Increase the Risk for Childhood Asthma and Wheeze: An Updated Meta-Analysis. *Front Pediatr*, 2020. **8**: p. 134.
49. O'Reilly, J.R. and R.M. Reynolds, *The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring*. *Clinical Endocrinology*, 2013. **78**(1): p. 9-16.

50. Kulkarni, A., et al., *Fetal myocardial deformation in maternal diabetes mellitus and obesity*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017. **49**(5): p. 630-636.
51. Nyren, S.A., et al., Cardiac function in newborns of obese women and the effect of exercise during pregnancy. A randomized controlled trial. *PLoS One*, 2018. **13**(6): p. e0197334.
52. Ferrari, N., et al., Exercise during pregnancy and its impact on mothers and offspring in humans and mice. *J Dev Orig Health Dis*, 2018. **9**(1): p. 63-76.
53. Dinger, K., et al., Early-onset obesity dysregulates pulmonary adipocytokine/insulin signaling and induces asthma-like disease in mice. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 24168.
54. Litzenburger, T., et al., Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci (Lond)*, 2020. **134**(7): p. 921-939.
55. Kasper, P., et al., Renal Metabolic Programming Is Linked to the Dynamic Regulation of a Leptin-Klf15 Axis and Akt/AMPK $\alpha$  Signaling in Male Offspring of Obese Dams. *Endocrinology*, 2017. **158**(10): p. 3399-3415.
56. Turdi, S., et al., Interaction between maternal and postnatal high fat diet leads to a greater risk of myocardial dysfunction in offspring via enhanced lipotoxicity, IRS-1 serine phosphorylation and mitochondrial defects. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013. **55**: p. 117-129.
57. Research Diets, I. *Die Formula D12451, Rodent Diet With 45 kcal% Fat Product Sheet*. [cited 2021 21.03]; Available from: <https://researchdiets.com/formulas/d12451>.
58. Kirk, S.L., et al., Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5870.
59. Loche, E., et al., Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(10): p. 1372-1384.
60. Ghnenis, A.B., et al., Maternal obesity in the ewe increases cardiac ventricular expression of glucocorticoid receptors, proinflammatory cytokines and fibrosis in adult male offspring. *PLoS ONE*, 2017. **12**(12).
61. Huang, Y., et al., *Maternal obesity induces fibrosis in fetal myocardium of sheep*. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2010. **299**(6): p. E968-975.
62. Wang, J., et al., Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *Faseb j*, 2010. **24**(6): p. 2066-76.
63. Nivoit, P., et al., Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*, 2009. **52**(6): p. 1133-42.
64. Samuelsson, A.M., et al., Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 2008. **51**(2): p. 383-92.
65. Xue, Q., et al., Maternal High-Fat Diet Causes a Sex-Dependent Increase in AGTR2 Expression and Cardiac Dysfunction in Adult Male Rat Offspring. *Biol Reprod*, 2015. **93**(2): p. 49.
66. De Jong, K.A., et al., Maternal high fat diet induces early cardiac hypertrophy and alters cardiac metabolism in Sprague Dawley rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018. **28**(6): p. 600-609.

67. Xue, Q., et al., Maternal high-fat diet alters angiotensin II receptors and causes changes in fetal and neonatal rats†. *Biol Reprod*, 2019. **100**(5): p. 1193-1203.
68. Larsen, T.D., et al., Diabetic Pregnancy and Maternal High-Fat Diet Impair Mitochondrial Dynamism in the Developing Fetal Rat Heart by Sex-Specific Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(12).
69. Siddeek, B., et al., Long-term impact of maternal high-fat diet on offspring cardiac health: role of micro-RNA biogenesis. *Cell Death Discov*, 2019. **5**: p. 71.
70. Fernandez-Twinn, D.S., et al., The programming of cardiac hypertrophy in the offspring by maternal obesity is associated with hyperinsulinemia, AKT, ERK, and mTOR activation. *Endocrinology*, 2012. **153**(12): p. 5961-71.
71. Mdaki, K.S., et al., Maternal high-fat diet impairs cardiac function in offspring of diabetic pregnancy through metabolic stress and mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2016. **310**(6): p. H681-H692.
72. Samuelsson, A.M., et al., Experimental hyperleptinemia in neonatal rats leads to selective leptin responsiveness, hypertension, and altered myocardial function. *Hypertension*, 2013. **62**(3): p. 627-33.
73. Blin, G., et al., Maternal Exposure to High-Fat Diet Induces Long-Term Derepressive Chromatin Marks in the Heart. *Nutrients*, 2020. **12**(1).
74. Elahi, M.M., et al., Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr*, 2009. **102**(4): p. 514-9.
75. Oben, J.A., et al., Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Hepatol*, 2010. **52**(6): p. 913-20.
76. Ayonrinde, O.T., et al., Infant nutrition and maternal obesity influence the risk of non-alcoholic fatty liver disease in adolescents. *J Hepatol*, 2017. **67**(3): p. 568-576.
77. Plagemann, A. and T. Harder, *Hormonal programming in perinatal life: leptin and beyond*. *Br J Nutr*, 2009. **101**(2): p. 151-2.
78. Rother, E., et al., Hypothalamic JNK1 and IKK $\beta$  activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding. *Endocrinology*, 2012. **153**(2): p. 770-81.
79. Segovia, S.A., et al., *Maternal obesity, inflammation, and developmental programming*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 418975.
80. Godfrey, K.M., et al., *Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017. **5**(1): p. 53-64.
81. Zarzoso, M., et al., *Ventricular remodelling in rabbits with sustained high-fat diet*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014. **211**(1): p. 36-47.
82. Wang, Z., et al., *Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice*. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2015. **64**(8): p. 917-925.
83. Lints, T.J., et al., Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*, 1993. **119**(2): p. 419-31.

84. Moorman, A., et al., Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart (British Cardiac Society)*, 2003. **89**(7): p. 806-814.
85. Anderson, R.H., et al., Development of the heart: (2) Septation of the atriums and ventricles. *Heart*, 2003. **89**(8): p. 949-58.
86. Anderson, R.H., et al., Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart (British Cardiac Society)*, 2003. **89**(9): p. 1110-1118.
87. Paige, S.L., et al., *Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation*. *Circ Res*, 2015. **116**(2): p. 341-53.
88. Meilhac, S.M. and M.E. Buckingham, *The deployment of cell lineages that form the mammalian heart*. *Nat Rev Cardiol*, 2018. **15**(11): p. 705-724.
89. Kelly, R.G., M.E. Buckingham, and A.F. Moorman, *Heart fields and cardiac morphogenesis*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2014. **4**(10): p. a015750.
90. Akazawa, H. and I. Komuro, *Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005. **107**(2): p. 252-268.
91. Jay, P.Y., et al., *Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system*. *The Journal of clinical investigation*, 2004. **113**(8): p. 1130-1137.
92. Tanaka, M., et al., The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1269-80.
93. Lyons, I., et al., Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1654-66.
94. Terada, R., et al., Ablation of Nkx2-5 at mid-embryonic stage results in premature lethality and cardiac malformation. *Cardiovasc Res*, 2011. **91**(2): p. 289-99.
95. Serpooshan, V., et al., Nkx2.5+ Cardiomyoblasts Contribute to Cardiomyogenesis in the Neonatal Heart. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 12590.
96. Moore-Morris, T., et al., *Role of Epigenetics in Cardiac Development and Congenital Diseases*. *Physiol Rev*, 2018. **98**(4): p. 2453-2475.
97. Moretti, A., et al., Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*, 2006. **127**(6): p. 1151-1165.
98. Bu, L., et al., Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 113-117.
99. Cai, C.L., et al., Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*, 2003. **5**(6): p. 877-89.
100. Prall, O.W., et al., An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*, 2007. **128**(5): p. 947-59.
101. Watanabe, Y. and M. Buckingham, The formation of the embryonic mouse heart: heart fields and myocardial cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1188**: p. 15-24.
102. Genead, R., et al., Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan: from the embryonic stage to adulthood. *Stem Cells Dev*, 2010. **19**(10): p. 1601-15.

103. Laugwitz, K.-L., et al., Postnatal *Isl1*<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005. **433**(7026): p. 647-653.
104. Pandur, P., et al., *Isl1*-expressing cardiac progenitor cells: a comparison across species. *Development Genes and Evolution*, 2013. **223**(1-2): p. 117-129.
105. Reamon-Buettner, S.M. and J. Borlak, *TBX5* mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat*, 2004. **24**(1): p. 104.
106. Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 469-80.
107. Ruiz-Villalba, A., S. Hoppler, and M.J. van den Hoff, *Wnt signaling in the heart fields: Variations on a common theme*. *Dev Dyn*, 2016. **245**(3): p. 294-306.
108. Dierick, H. and A. Bejsovec, *Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction*. *Current Topics in Developmental Biology*, 1999. **43**: p. 153-190.
109. Brembeck, F.H., M. Rosário, and W. Birchmeier, *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006. **16**(1): p. 51-59.
110. Johnson, D.G. and C.L. Walker, *Cyclins and cell cycle checkpoints*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. **39**: p. 295-312.
111. Shtutman, M., et al., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(10): p. 5522-5527.
112. Leone, M., A. Magadum, and F.B. Engel, *Cardiomyocyte proliferation in cardiac development and regeneration: a guide to methodologies and interpretations*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(8): p. H1237-50.
113. Hotchkiss, A., et al., *Role of D-type cyclins in heart development and disease*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2012. **90**(9): p. 1197-1207.
114. Kerkela, R., et al., *Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(11): p. 3609-18.
115. Grigoryan, T., et al., *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice*. *Genes Dev*, 2008. **22**(17): p. 2308-41.
116. Baurand, A., et al., *β-Catenin Downregulation Is Required for Adaptive Cardiac Remodeling*. *Circulation Research*, 2007. **100**(9): p. 1353-1362.
117. Zelarayán, L.C., et al., *β-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(50): p. 19762-19767.
118. Zhou, J., et al., *Upregulation of γ-catenin compensates for the loss of β-catenin in adult cardiomyocytes*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007. **292**(1): p. H270-H276.
119. Pandur, P., D. Maurus, and M. Kühl, *Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network*. *Bioessays*, 2002. **24**(10): p. 881-4.

120. Bisson, J.A., et al., Wnt5a and Wnt11 inhibit the canonical Wnt pathway and promote cardiac progenitor development via the Caspase-dependent degradation of AKT. *Dev Biol*, 2015. **398**(1): p. 80-96.
121. Abdul-Ghani, M., et al., Wnt11 promotes cardiomyocyte development by caspase-mediated suppression of canonical Wnt signals. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(1): p. 163-78.
122. Foulquier, S., et al., *WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease*. *Pharmacol Rev*, 2018. **70**(1): p. 68-141.
123. Anton, R., H.A. Kestler, and M. Kühl, Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 2007. **581**(27): p. 5247-54.
124. Katoh, M., Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *International journal of oncology*, 2017. **51**(5): p. 1357-1369.
125. Haegel, H., et al., *Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation*. *Development*, 1995. **121**(11): p. 3529-37.
126. Marvin, M.J., et al., Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev*, 2001. **15**(3): p. 316-27.
127. Schneider, V.A. and M. Mercola, *Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis*. *Genes Dev*, 2001. **15**(3): p. 304-15.
128. Tremblay, M., O. Sanchez-Ferras, and M. Bouchard, *GATA transcription factors in development and disease*. *Development*, 2018. **145**(20).
129. Klaus, A., et al., Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(27): p. 10921-6.
130. Pandur, P., et al., Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*, 2002. **418**(6898): p. 636-41.
131. Eisenberg, C.A. and L.M. Eisenberg, *WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm*. *Dev Dyn*, 1999. **216**(1): p. 45-58.
132. Münsterberg, A. and Q. Yue, Cardiac progenitor migration and specification: The dual function of Wnts. *Cell Adh Migr*, 2008. **2**(2): p. 74-6.
133. Ueno, S., et al., *Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(23): p. 9685-9690.
134. Kwon, C., et al., *Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(26): p. 10894-10899.
135. Tzahor, E., Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter. *Developmental Cell*, 2007. **13**(1): p. 10-13.
136. Gessert, S. and M. Kühl, The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circulation Research*, 2010. **107**(2): p. 186-199.

137. Lin, L., et al., Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(22): p. 9313-9318.
138. Cohen, E.D., et al., Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. **117**(7): p. 1794-1804.
139. Qyang, Y., et al., The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(2): p. 165-179.
140. Ai, D., et al., *Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(22): p. 9319-9324.
141. Barandon, L., et al., Reduction of Infarct Size and Prevention of Cardiac Rupture in Transgenic Mice Overexpressing FrzA. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2282-2289.
142. Alfaro, M.P., et al., The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(47): p. 18366-18371.
143. Hadi, A.M., et al., Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011. **34**(4): p. 343-54.
144. Tsikitis, M., et al., *Intermediate filaments in cardiomyopathy*. *Biophysical reviews*, 2018. **10**(4): p. 1007-1031.
145. Afouda, B.A., et al., GATA transcription factors integrate Wnt signalling during heart development. *Development*, 2008. **135**(19): p. 3185-90.
146. Kretschmer, T., et al., Maternal high fat diet-induced obesity affects trophoblast differentiation and placental function in mice†. *Biol Reprod*, 2020. **103**(6): p. 1260-1274.
147. Ikenishi, A., et al., Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev Growth Differ*, 2012. **54**(8): p. 731-8.
148. Klaus, A., et al., Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(47): p. 18531-6.
149. Kwon, C., et al., A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Is1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(8): p. 951-7.
150. Song, L., et al., Cardiac neural crest and outflow tract defects in Lrp6 mutant mice. *Dev Dyn*, 2010. **239**(1): p. 200-10.
151. Mazzotta, S., et al., Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development. *Stem Cell Reports*, 2016. **7**(4): p. 764-776.
152. Blankesteijn, W.M., Interventions in WNT Signaling to Induce Cardiomyocyte Proliferation: Crosstalk with Other Pathways. *Mol Pharmacol*, 2020. **97**(2): p. 90-101.
153. World Health Organization. *Noncommunicable Diseases Factsheet*. 2018 [cited 2020 15.10]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.



## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prävalenz von Übergewicht (BMI $\geq$ 25) bei erwachsenen Frauen (18+), 2016, altersstandardisierte Schätzung der WHO. Daten der WHO 2017 [21]; Karte editiert von Dlouhý [22].	16
Abb. 2: Entwicklung der unterschiedlichen Herzanteile aus dem <i>First Heart Field</i> (FHF) und dem <i>Second Heart Field</i> (SHF).	31
Abb. 3: kanonischer und nichtkanonischer $\beta$ -Catenin-Signalweg.	35
Abb. 4: Schematische Darstellung des Hochfett-Diät -Modells und exemplarische Darstellung des adipösen Phänotyps der Muttertiere (oberes Bild) gegenüber dem normalen Phänotyp (unteres Bild).	49
Abb. 5: Molekulare Entwicklung des murinen Herzens, Schlüsselzeitpunkte der Entwicklung (orange) und Untersuchungszeitpunkte (blau).	50
Abb. 6: Untersuchungszeitpunkte und Schlüsselzeitpunkte des Versuchsprotokolls	69
Abb. 7: Verlauf des Körpergewichts der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe	70
Abb. 8: Verlauf des Herzgewichts der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe	71
Abb. 9: Verlauf von Herz/Gewichts Index der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe	71
Abb. 10: Kardiale Proteinexpression des mesenchymalen Markers Vimentin am 1. und 70. postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.	72
Abb. 11: Kollagen/Myokard Ratio im mittleren linksventrikulären Myokard der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 21. und 70. postnatalen Tag.	73
Abb. 12: Sirius Red Färbung des linksventrikulären Myokards am 21. und 70. postnatalen Tag	74
Abb. 13: Kollagen/Myokard Ratio im rechtsventrikulären Myokard der Nachkommen der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 21. und 70. postnatalen Tag.	75
Abb. 14: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Proteinexpression des Rezeptors <i>Wnt2b</i> am 16. Gestationstag (G16) und 4. postnatalen Tag der Nachkommen der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.	76
Abb. 15: Kardiale mRNA-Expression des Liganden <i>Wnt3a</i> der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.	77
Abb. 16: Kardiale mRNA-Expression des Liganden <i>Wnt11</i> der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.	77
Abb. 17: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Protein- und mRNA-Expression des Stammzellmarkers <i>Islet-1/Is-1</i> im Herz am 16. Gestationstag der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.	78
Abb. 18: Kardiale Proteinexpression des Progenitormarkers <i>Islet-1</i> am 1. und 4. postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.	79
Abb. 19: Kardiale mRNA-Expression des Progenitormarkers <i>Is-1</i> der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.	79
Abb. 20: Kardiale Proteinexpression des Stammzellmarkers <i>Nkx2.5</i> am 16. Gestationstag und 1. Postnatalen Tag in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe.	80
Abb. 21: mRNA-Expression des kardialen Progenitormarkers <i>Nkx2.5</i> in kardialem Gewebe der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag.	81

Abb. 22: Western Blot Analyse und Darstellung der kardialen Protein-expression von Cyclin D <sub>1</sub> sowie der mRNA-Expression von <i>Ccnd1</i> in kardialem Gewebe der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 16. Gestationstag.....	82
Abb. 23: Cyclin D <sub>1</sub> -Immunfärbung des linksventrikulären Myokards am 1. postnatalen Tag P1 .	83
Abb. 24: Cyclin D <sub>1</sub> -positiv gefärbte Nuclei /Sichtfeld im mittleren linksventrikulären Myokard am 1. postnatalen Tag.....	83
Abb. 25: Western Blot Analyse und kardiale Proteinexpression des Rezeptors Lrp6 am 16. Gestationstag G16 und 1. Postnatalem Tag P1 der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe.....	84
Abb. 26: Kardiale mRNA-Expression von <i>Gsk-3β</i> der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag. ....	85
Abb. 27: Gesamtmenge und Phyophorylierungsstatus von GSK-3β im Herz am 1. postnatalen Tag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression in der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe. ....	86
Abb. 28: Kardiale mRNA-Expression von <i>Ctnnb1</i> der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe am 1. und 4. postnatalen Tag. ....	87
Abb. 29: Gesamtmenge und Phyophorylierungsstatus von β-Catenin im Herz am 16. Gestationstag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe.....	88
Abb. 30: Gesamtmenge und Phyophorylierungsstatus von β-Catenin im Herz am 1. postnatalen Tag. Western Blot Analyse und Darstellung der relativen Proteinexpression der Standard-Diät (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)-Gruppe. ....	89
Abb. 31: β-Catenin-Immunfärbung der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. postnatalen Tag.....	90
Abb. 32: β-Catenin/Myokard-Ratio der Standard (SD)- und Hochfett-Diät (HFD)- Gruppe am 1. postnatalen Tag.....	90
Abb. 33: Schematische Darstellung der wesentlichen Erkenntnisse der Studie als möglicher Mechanismus für die Hypertrophie der Herzmuskelzellen und der Programmierung von Herzerkrankungen nach mütterlicher Adipositas.....	98

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere und Futter.....	40
Tabelle 2: Arbeitsmaterialien .....	40
Tabelle 3: Geräte.....	41
Tabelle 4: verwendete Software .....	42
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien .....	44
Tabelle 6: Stammlösungen und Puffer.....	45
Tabelle 7: verwendete Kits .....	45
Tabelle 8: Primer für TaqMan® Real-Time PCR.....	46
Tabelle 9: Primer für SYBR® Green Real-Time PCR .....	46
Tabelle 10: verwendete Primärantikörper .....	47
Tabelle 11: verwendete Sekundärantikörper .....	47
Tabelle 12: Protokoll der Gewebeeinfiltrationsmaschine.....	51
Tabelle 13: Liste der verwendeten Primärantikörper.....	61
Tabelle 14: verwendete Sekundärantikörper .....	61