

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

# **Der Einfluss von Diät-induziertem Übergewicht (DIO) und Sport auf die Asprosin-Expression und -Lokalisation in murinen Herzen**

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

vorgelegt von  
Maximilian Földvary  
aus Detmold

promoviert am 12. Mai 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch  
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle

## 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 Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother und Thorben Hoffmann.

Weitere Personen waren an der Erstellung 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 Aufzucht der Versuchstiere, die Bestimmungen der Gewichte und Laufdistanzen sowie die Glukosetoleranztests, das Töten der Versuchstiere und die Organentnahmen wurden von Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe „Metabolismus und Perinatale Programmierung“ der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln ohne meine Mitarbeit durchgeführt.

Die humanen Kardiomyozyten wurden mir von der Arbeitsgruppe „Experimentelle Pneumologie - Translationale Experimentelle Pädiatrie“ (Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcazar) zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente und statistischen Auswertungen sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother, Herrn Thorben Hoffmann und Frau Christina Vohlen von mir selbst ausgeführt 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 10.11.2024

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Jörg Dötsch und Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in dieser Arbeitsgruppe zu promovieren.

Ebenfalls möchte ich mich bei Thorben Hoffmann bedanken, der mich als erster Ansprechpartner stets unterstützt und große Teile der Vorarbeiten durchgeführt hat.

Auch Christina Vohlen möchte ich besonders für ihre genauen und geduldigen Anleitungen im Labor danken.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe „Experimentelle Pneumologie - Translationale Experimentelle Pädiatrie“ (Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcazar) für das Überlassen der humanen Kardiomyozyten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mit-Doktorandin Janina Droxler für die stetige Motivation und Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich bei dieser Dissertation und in meinem gesamten Leben bedingungslos unterstützt.

*Für meine Familie.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. Noncommunicable Diseases	11
2.2. Das Herz-Kreislaufsystem	12
2.2.1. Aufbau und Funktion	12
2.2.2. Einfluss von Sport auf das Herz	13
2.2.3. Einfluss von Adipositas auf das Herz	13
2.3. Asprosin	14
2.3.1. Asprosin und das Herz-Kreislaufsystem	16
2.3.2. Asprosin und Übergewicht	17
2.3.3. Asprosin und Sport	18
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	19
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1. Geräte und Software	20
3.2. Chemikalien und Enzyme	22
3.3. Stammlösungen, Gele und Puffer	26
3.4. Primer	28
3.5. Antikörper für Western Blot	29
3.6. Tierversuche	29
3.6.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	29
3.7. Histologische Methoden	30
3.7.1. Einbetten und Schneiden	30
3.7.2. Hämatoxylin- & Eosin-Färbung	31
3.7.3. Sirius-Red-Färbung	31
3.7.4. Elastika-van-Gieson-Färbung	32
3.7.5. Immunhistochemiefärbung	32

3.7.6.	Mikroskopische Aufnahmen und Vermessung	33
3.7.7.	Messung des kardialen Kollagengehalts	34
3.8.	qRT-PCR	34
3.8.1.	RNA-Isolation	34
3.8.2.	Bestimmung der Konzentration, Reinheit und Qualität der RNA	34
3.8.3.	cDNA-Synthese	35
3.8.4.	Ablauf der qRT-PCR	35
3.9.	Western Blot	36
3.9.1.	Protein-Isolation	36
3.9.2.	Messung der Konzentration	36
3.9.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.9.4.	Ablauf Western Blot	37
3.10.	Zellkultur und Immunfluoreszenz	38
3.11.	Statistische Auswertung	38
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
4.1.	Vorarbeiten: Tiermodell und Phänotypisierung	39
4.2.	Histologische Analyse der linksventrikulären Struktur und Kollagenakkumulation	41
4.3.	<i>FBN1</i> -Expression bei SD, DIO und RUN	43
4.4.	Asprosin-Expression bei SD, DIO und RUN	44
4.5.	Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe	47
4.6.	Histologische Analyse der Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe im Vergleich mit Fibrillin-1, elastischen Fasern und Kollagen	49
4.6.1.	Histologische Analyse bei SD	50
4.6.2.	Histologische Analyse bei DIO	54
4.6.3.	Histologische Analyse bei RUN	57
4.7.	Asprosin in menschlichen Kardiomyozyten	60
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
5.1.	Tiermodell und Phänotypisierung	61
5.2.	Ventrikuläre Struktur und Kollagenakkumulation	61

<b>5.3.</b>	<b>Kardiale Fibrose</b>	<b>62</b>
<b>5.4.</b>	<b><i>FBN1</i>- und Asprosin-Expression bei SD, DIO und RUN</b>	<b>63</b>
<b>5.5.</b>	<b>Regionsspezifische Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe</b>	<b>64</b>
<b>5.6.</b>	<b>Lokalisierung von Asprosin im Vergleich zu Fibrillin-1, elastischen Fasern und Kollagen</b>	<b>65</b>
<b>5.7.</b>	<b>Asprosin in menschlichen Kardiomyozyten</b>	<b>67</b>
<b>5.8.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>78</b>
<b>7.1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>7.2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AgRP	agouti-related peptide
ANP	Atrial natriuretic peptide
APS	Ammonium Persulfat
BMI	Body-Mass-Index
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DIO	Diät-induzierte Adipositas („Diet-induced obesity“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GTT	Glukosetoleranztest
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
IKK $\beta$	I-kappa-B Kinase
km	Kilometer
LV	Linker Ventrikel
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mA	Milliampere
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NF-κBp65	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKCδ	Proteinkinase-C-Delta
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	pro-opiomelanocortin
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuklease
RUN	Freiwilliges Laufradtraining
SD	Standarddiät
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERCA2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
SGLT2	Sodium-Glucose-Transporter-2
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR4	Toll-like receptor 4
UAP	Instabile Angina pectoris
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
WHO	World Health Organization
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
3'	3' Ende der DNA-Sequenz
5'	5' Ende der DNA-Sequenz

## 1. Zusammenfassung

Asprosin ist ein Fasten-induziertes glukogenes Hormon, welches mit Fettleibigkeit und Diabetes mellitus in Verbindung gebracht wird. Während mehrere Studien auf eine kardioprotektive Wirkung hinweisen, ist wenig darüber bekannt, ob Asprosin im Herzen synthetisiert wird, und falls ja, in welchen Herzregionen es nachgewiesen werden kann. Ebenso ist unbekannt, ob verschiedene Stoffwechselbedingungen die kardiale Expression und Lokalisation von Asprosin beeinflussen. Dieses Grundlagenwissen ist jedoch notwendig, um einen möglichen Einfluss von Asprosin auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen besser zu verstehen. Die vorliegende Arbeit ergründet folglich die Frage, ob Asprosin im Herzen synthetisiert wird, ob seine Expression von der Region abhängt und ob sich die Expressionswerte bei körperlichem Training oder Übergewicht ändern.

In diesem Kontext wurde ein Tiermodell männlicher Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) verwendet, die entweder eine Standarddiät (SD, RUN) oder zur Übergewichtsinduktion eine Western-Style Diät (DIO) erhielten. Die RUN-Gruppe führte zusätzlich ein freiwilliges Laufradtraining durch. Die Herzen der Versuchstiere wurden mithilfe immunhistochemischer Färbungen, qRT-PCR und Western Blot-Analysen untersucht, um die räumliche Verteilung sowie die Gen- und Proteinexpression von Asprosin zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass das Vorkommen von Asprosin im Herzen eine starke Abhängigkeit vom Zelltyp aufweist, mit einem intensiven Vorkommen insbesondere in Endothelzellen und am Endokard und einem schwächeren Vorkommen in und um Kardiomyozyten. Außerdem fand sich Asprosin in einem faserartigen Muster mit einer ausgeprägten Co-Lokalisierung mit Fibrillin-1. Darüber hinaus war eine erhöhte Asprosin-Protein-Expression in den Ventrikeln unter DIO zu beobachten. In einem zellulären Modell konnte zudem bestätigt werden, dass Asprosin von Kardiomyozyten synthetisiert wird.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit somit aufzeigen, dass Asprosin im Herzen in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage synthetisiert wird. Es ist hauptsächlich in Endothelzellen, im Endokard und in einer faser-ähnlichen Struktur in unmittelbarer Nähe zu Fibrillin-1 zu finden. Diese Ergebnisse leisten damit einen Beitrag zum besseren Verständnis von Asprosin und seiner möglichen Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Noncommunicable Diseases

74% der Tode weltweit sind auf „noncommunicable diseases“ zurückzuführen. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass sie auf den vier veränderbaren Hauptrisikofaktoren Tabakkonsum, übermäßigem Alkoholkonsum, ungesunden Ernährungsgewohnheiten und einem Mangel an körperlicher Aktivität beruhen <sup>1,2</sup>. Diese können unter anderem zu Adipositas, arterieller Hypertonie, Hyperglykämie und Hyperlipidämie führen. Den Großteil der daraus hervorgehenden Erkrankungen machen kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs, chronische Lungenerkrankungen und Diabetes aus. Insbesondere die kardiovaskulären Erkrankungen sind von immenser Bedeutung, da sie weltweit für ca. 17,9 Millionen Tode verantwortlich sind <sup>2</sup>. Auch in Deutschland sind Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems die Ursache für 33,3% der Tode und somit die häufigste Todesursache <sup>3</sup> (siehe Abbildung 1).

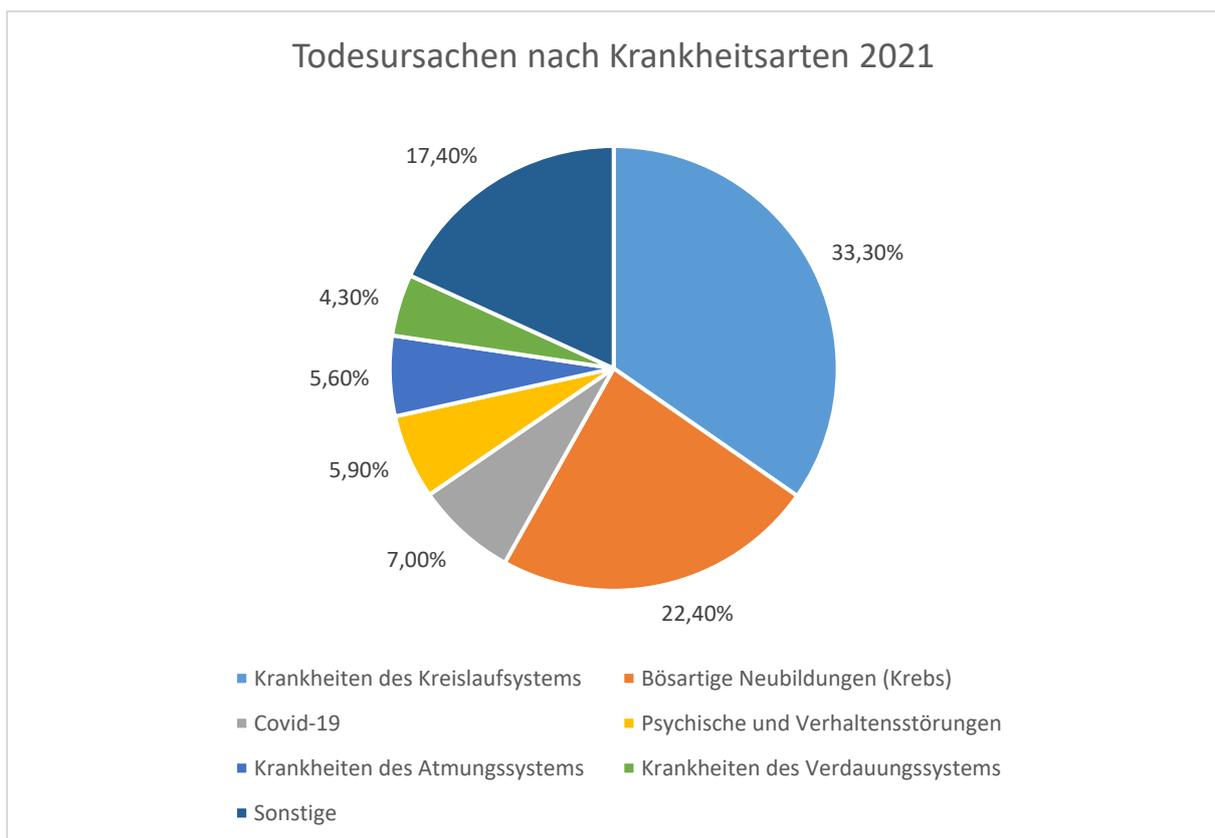


Abbildung 1 Todesursachen nach Krankheitsarten 2021, angelehnt an eine Grafik des Statistischen Bundesamtes: Statistisches Bundesamt. Todesursachen [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/\\_Grafik/\\_Interaktiv/todesursachen-krankheitsarten.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/_Grafik/_Interaktiv/todesursachen-krankheitsarten.html). (Aufgerufen: Aug 21, 2023).

Auch der sozioökonomische Einfluss der „noncommunicable diseases“ ist hoch und das, obwohl viele dieser Erkrankungen und Tode durch eine Modifikation der Risikofaktoren veränderbar wären. Die World Health Organization (WHO) nahm sich des Themas an und gab Empfehlungen zur Prävention dieser Gruppe von Erkrankungen. Leider zeigte ein Progress Monitor, dass viele Länder die anvisierten Ziele nicht erreichen, sodass weiterhin ein großer Verbesserung- und Forschungsbedarf besteht, um Tode durch „noncommunicable diseases“ wirksam zu verhindern <sup>4</sup>.

## **2.2. Das Herzkreislaufsystem**

### **2.2.1. Aufbau und Funktion**

Das Herz ist das zentrale Kreislauforgan des menschlichen Körpers. Es besteht makroskopisch aus vier Herzkammern – den linken und rechten Ventrikeln und Vorhöfen (Atria) <sup>5</sup>. Die rechte und linke Herzhälfte sind durch das interventrikuläre und interatriale Septum getrennt. Das sauerstoffarme Blut wird über den rechten Vorhof und Ventrikel in den Lungenkreislauf gepumpt und dort oxygeniert. Anschließend wird das sauerstoffreiche Blut über den linken Vorhof und den linken, muskelreichen Ventrikel in den Körperkreislauf gepumpt, wobei die Herzklappen zwischen Vorhöfen und Ventrikeln sowie Ventrikeln und Truncus pulmonalis respektive Aorta die Flussrichtung des Blutes vorgeben <sup>6</sup>. Das Herz wird von Perikard umgeben und besteht aus drei Schichten – dem Epikard, einer Schicht aus Bindegewebe und Fettgewebe mit einem Überzug aus Epithel, welche das Herz umgibt – sowie dem Endokard, einer Schicht aus Epithel mit Bindegewebe aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. Zwischen Epikard und Endokard liegt das Myokard, welches aus den Kardiomyozyten, den Herzmuskelzellen, besteht. Dabei handelt es sich um quergestreifte Muskelzellen mit einer Länge von 50 – 120 µm, die miteinander über Glanzstreifen verbunden sind und eine komplexe funktionelle Einheit bilden <sup>7</sup>. Neben der Kontraktion und der damit einhergehenden Aufrechterhaltung des Blutkreislaufs produzieren Kardiomyozyten auch atrial natriuretic peptide (ANP) und brain natriuretic peptide (BNP) <sup>8</sup>. Diese Hormone regulieren den Blutdruck, indem sie den Gefäßtonus herabsetzen und eine höhere Flüssigkeitsausscheidung in der Niere bewirken <sup>9</sup>. Neben diesen systemischen Effekten zeigen diese Peptide eine schützende Wirkung vor einer übermäßigen Fibrose und Hypertrophie des Herzens. Sie wirken somit endokrin und para-/ bzw. autokrin in einer das Herz schützenden Art und Weise <sup>9</sup>.

Insgesamt zeigt sich eine große zelluläre Heterogenität im Herzen, sodass sich die zelluläre Zusammensetzung je nach Region unterscheidet <sup>10</sup>. Die hauptsächlich vorkommenden Zelltypen sind Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Immunzellen <sup>10</sup>. Insbesondere die Fibroblasten sind auch dadurch von großer Bedeutung, dass sie die

kardiale Extrazellulärmatrix (ECM) produzieren. Die kardiale extrazelluläre Matrix ist ein dynamisches System, welches sich als Folge externer Stimuli verändert<sup>11–13</sup>. Sie enthält unter anderem verschiedene Kollagentypen, Fibuline, Fibronectin und Fibrillin<sup>14–21</sup>. Neben ihrer mechanisch-strukturellen Bedeutung für das Herz spielt die ECM eine entscheidende Rolle in der Herzentwicklung und ihr Einfluss auf die Ausprägung (kardialer) Krankheitsentitäten wie Diabetes, Hypertonie und Herzinsuffizienz ist Gegenstand aktueller Diskussionen<sup>22–25</sup>. Fibrillin-1, welches durch das Gen *FBN1* kodiert wird und Mikrofibrillen mit Elastin bildet, ist von besonderer Bedeutung für die Elastizität und bei pathologischen Veränderungen gleichzeitig eine potentielle Ursache für das kardiovaskuläre System stark betreffende Erkrankungen wie das Marfan-Syndrom<sup>21,26–29</sup>.

### **2.2.2. Einfluss von Sport auf das Herz**

Sport und körperliche Betätigung beeinflussen nahezu jedes Organ und wirken unter anderem protektiv gegenüber Übergewicht, Diabetes, Darm- und Brustkrebs sowie kardiovaskulären Erkrankungen<sup>30</sup>. Folglich wird in den „ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice“ für Erwachsene eine Klasse IA Empfehlung für 150 – 300 Minuten aeroben Trainings pro Woche bei moderater Intensität oder 75 – 150 Minuten bei hoher Intensität pro Woche ausgesprochen, um die Gesamtsterblichkeit und die kardiovaskuläre Sterblichkeit zu reduzieren<sup>31–33</sup>. Ein zusätzlich durchgeführtes Krafttraining war mit einer weiteren Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen und der Gesamtsterblichkeit assoziiert<sup>34–37</sup>. Die Mechanismen, über welche die kardiovaskuläre Protektion ausgelöst wird, sind vielschichtig<sup>38</sup>. So konnte gezeigt werden, dass Sport eine Blutdrucksenkung, eine erhöhte Insulinsensitivität und ein verbessertes Lipidprofil bewirken kann<sup>39–41</sup>. Zudem verringerte Sport Inflammation, Apoptose und Fibrose und verstärkte die Angiogenese, die mitochondriale Biogenese sowie den antioxidativen Schutz und verbesserte die Endothelfunktion in verschiedenen kardialen Krankheitszuständen<sup>25,42–51</sup>. Des Weiteren kann körperliches Training zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und durch die veränderte Hämodynamik zu einer symmetrischen Vergrößerung der Herzkammern und der Wanddicke des linken Ventrikels führen<sup>52,53</sup>. Zu differenzieren sind diese physiologischen Adaptionen von den pathologischen strukturellen Veränderungen, die bei Leistungssportlerinnen und Leistungssportlern im Ausdauerbereich auftreten können<sup>54</sup>.

### **2.2.3. Einfluss von Adipositas auf das Herz**

Übergewicht und Adipositas werden anhand des Body-Mass-Index (BMI) definiert. Während ein BMI von 18,6 - 24,9 kg/m<sup>2</sup> dem Normalgewicht entspricht, wird bei einem BMI über 25 kg/m<sup>2</sup> von Übergewicht und bei über 30 kg/m<sup>2</sup> von Adipositas gesprochen<sup>6</sup>.

Im Gegensatz zur protektiven Wirkung von Sport auf das Herz ist eine ungesunde Ernährung mit der Folge von erhöhten Lipiden, arterieller Hypertonie, Diabetes Mellitus Typ 2 und Adipositas ein starker Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>31,55</sup>. Deshalb werden in den „ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice“ eine gesunde, vornehmlich mediterrane Ernährung sowie die Reduktion von Übergewicht empfohlen<sup>31</sup>. Insbesondere die viszerale Fettmasse scheint einen sehr starken Einfluss auf die Entwicklung kardiovaskulärer Pathologien, vor allem der Arteriosklerose zu haben<sup>56</sup>. Die myokardialen Veränderungen, die mit Übergewicht einhergehen, sind immens und können unter dem Begriff der „Obesity cardiomyopathy“ subsummiert werden<sup>57</sup>. Die kardialen Veränderungen bei Übergewicht umfassen Veränderungen der Herzfunktion, ein erhöhtes Herzgewicht mit links- und rechtsventrikulärer Hypertrophie und Dilatation sowie eine vermehrte kardiale Fibrose und Entzündungsaktivität<sup>58–64</sup>. Die Entstehung der „Obesity cardiomyopathy“ ist multifaktoriell. Diskutiert werden unter anderem die hämodynamischen Veränderungen mit erhöhter ventrikulärer Belastung<sup>57,65,66</sup>, metabolische Veränderungen mit einer erhöhten Insulinresistenz<sup>64</sup>, myokardiale Inflammation, eine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit konsekutiv vermehrter Fibrose<sup>57</sup> sowie eine Mikroangiopathie mit endothelialer Dysfunktion<sup>67,68</sup>. Ähnliche Mechanismen werden auch als ursächlich für die „diabetische Kardiomyopathie“, die bei Diabetes auftretenden myokardialen Veränderungen, diskutiert<sup>69</sup>.

### 2.3. Asprosin

Asprosin ist ein Proteinormon, das den Blutzuckerspiegel reguliert und 2016 von Romere et al. an Patienten mit neonatalem Progeroid Syndrom entdeckt wurde, einem Syndrom, das mit einer charakteristischen Lipodystrophie einhergeht<sup>70</sup>. Diese Patienten wiesen euglykämie Blutzuckerspiegel auf, während die Insulinspiegel deutlich erniedrigt waren. Bei der genetischen Analyse der Patienten fanden sich Mutationen des *FBN1*-Gens als ursächlich für die Ausprägung des Syndroms. Der Name Asprosin ist angelehnt an das griechische Wort für „weiß“ und bezieht sich auf das weiße Fettgewebe, welches als Hauptquelle für Asprosin identifiziert werden konnte und die charakteristische Reduktion subkutanen Fettgewebes, welche Patienten mit Asprosinmangel aufwiesen<sup>70</sup>.

Es handelt sich bei Asprosin um das C-terminale Spaltprodukt von Profibrillin-1, welches durch die Protease Furin abgespalten wird<sup>71</sup>. Weißes Fettgewebe ist als primäre Quelle von Asprosin bekannt, aber andere Organe wie beispielsweise das Herz und die Lunge weisen ebenfalls eine hohe Expression des *FBN1*-Gens auf<sup>70</sup>. Die Ausschüttung von Asprosin wird durch Fasten induziert und folgt einer zirkadianen Rhythmik<sup>70</sup>. Nach seiner Ausschüttung entfaltet es an multiplen Organen seine Wirkung. In der Leber bindet Asprosin an den G-Protein-gekoppelten OLF734-Rezeptor und aktiviert so den G-Protein-cAMP-PKA-Signalweg. Dadurch bewirkt

Asprosin die Produktion und Freisetzung von Glukose aus Hepatozyten und erhöht den Blutzuckerspiegel <sup>70,72</sup>. Gleichzeitig scheint Asprosin in der Lage zu sein die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und das zentrale Nervensystem zu beeinflussen. So aktiviert Asprosin im Nucleus Arcuatus im Hypothalamus „agouti-related peptide“ (AgRP) Neuronen, wodurch die Aktivität von „pro-opiomelanocortin“ (POMC) Neuronen gehemmt und Appetit stimuliert wird <sup>73</sup>. Im Skelettmuskel sorgt Asprosin für eine Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums und wirkt pro-inflammatorisch durch die Aktivierung des PKC $\delta$ /SERCA2-Signalwegs. Dies führt zu einer Insulinresistenz im Skelettmuskel <sup>74</sup>. Die Wirkung von Asprosin auf das Pankreas wird über den Toll-like receptor 4 (TLR4) und über den TLR4/JNK-Signalweg vermittelt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Produktion an Radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und entzündungsfördernder Zytokine, was wiederum eine erhöhte Entzündungsaktivität und Apoptoserate bewirkt <sup>75</sup>.

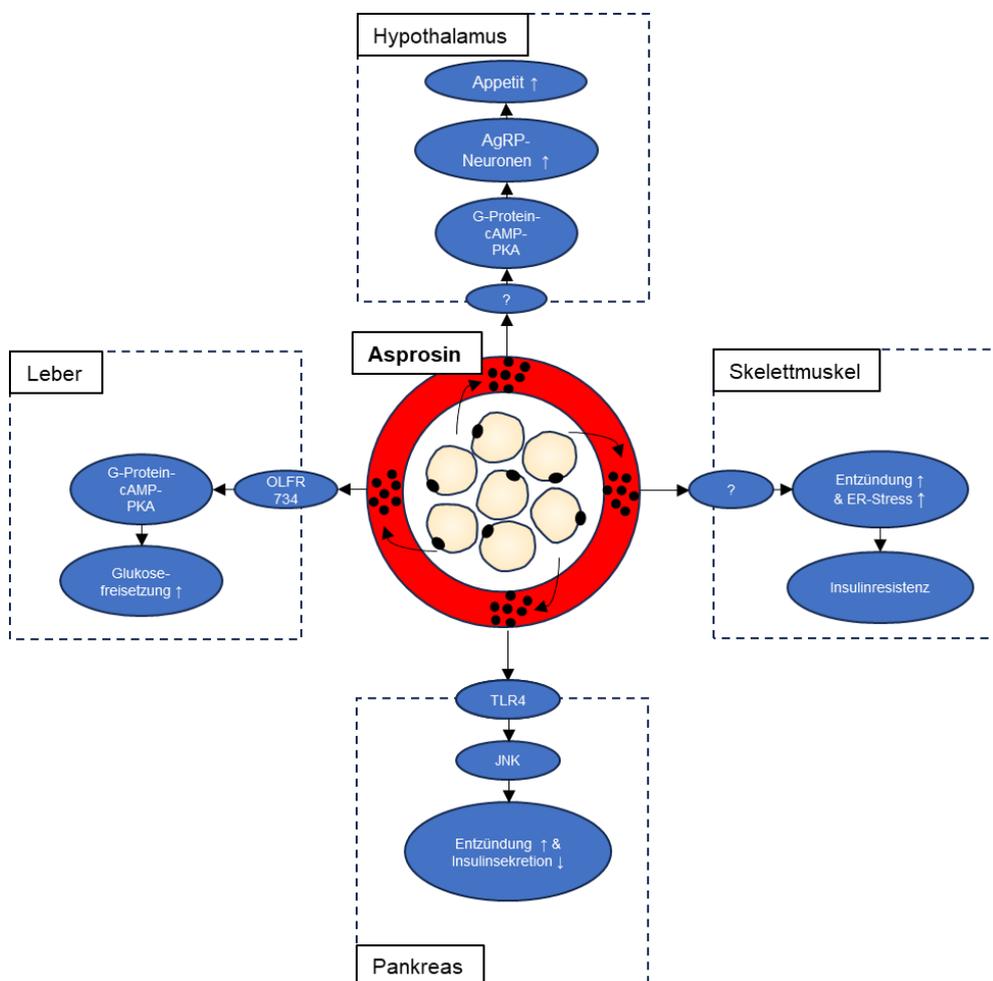


Abbildung 2 Überblick über die Wirkung von Asprosin. Asprosin wird in Adipozyten produziert und erreicht über die Blutbahn zentrale und periphere Organe. Im Hypothalamus stimuliert Asprosin Appetit und Nahrungsaufnahme über eine Aktivierung des G-Protein-cAMP-PKA-Signalwegs und der AgRP-Neuronen. In der Leber bindet Asprosin an den Rezeptor OLFR734 und stimuliert über den G-Protein-cAMP-PKA-Signalweg die Glukosefreisetzung. Im Pankreas bewirkt Asprosin über die Bindung an TLR4 eine Entzündungsreaktion und verminderte Insulinsekretion. Im Skelettmuskel wird durch Bindung an einen bisher unbekanntes Rezeptor eine Entzündungsreaktion und verstärkter endoplasmatischer Stress und somit Insulinresistenz induziert. Adaptiert nach Yuan et al. 2020 und Janoschek et al. 2020.

### 2.3.1. Asprosin und das Herz-Kreislaufsystem

Mehrere klinische und experimentelle Studien weisen auf einen Einfluss von Asprosin auf das Herz und kardiovaskuläre Erkrankungen hin:

Insbesondere das Risiko der Arteriosklerose ist durch Diabetes Mellitus stark erhöht. In einem Patientenkollektiv aus Diabetikern zeigten jene, die arteriosklerotische Plaques in der Arteria Carotis aufwiesen, signifikant höhere Asprosinpiegel als die Kontrollgruppe ohne Plaques <sup>76</sup>. Auch bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK), der Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien, zeigten sich höhere Asprosinpiegel als in der Kontrollgruppe ohne KHK <sup>77</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Asprosinpiegel mit der Zahl der Koronararterien mit Stenosen zunimmt und Asprosin somit für die Diagnose und Abschätzung des Schweregrads der KHK von Nutzen sein kann <sup>78</sup>. Veränderungen des Asprosinpiegels korrelieren außerdem positiv mit dem Syntax-Score, der den Schweregrad einer Gefäßkrankung angiografisch bewertet. Asprosin könnte damit als Marker für den Schweregrad des akuten Koronarsyndroms (ACS) und der instabilen Angina pectoris (UAP) dienen <sup>79,80</sup>. In einem Patientenkollektiv aus Diabetikern mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit zeigten sich ebenfalls erhöhte Asprosinpiegel im Vergleich zu den Kontrollgruppen <sup>81</sup>. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Asprosin über die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs eine Transition von Endothelzellen zu Mesenchymzellen induziert und somit zur endothelialen Dysfunktion beiträgt <sup>81</sup>. Diese pro-inflammatorische Wirkung Asprosin auf Endothelzellen konnte auch in einer weiteren Studie demonstriert werden <sup>82</sup>. In Makrophagen, die als sogenannte Schaumzellen ebenfalls an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind, hemmt Asprosin die Fettakkumulation und scheint somit gegensätzlich zu den Daten der anderen Studien im Rahmen dieses Mechanismus vor arteriosklerotischen Plaques zu schützen <sup>83</sup>. Insgesamt wird deutlich, dass die Entstehung der Arteriosklerose auf komplexen Mechanismen beruht, sodass die genauen Einflüsse von Asprosin auf diese noch nicht vollständig geklärt sind. Dennoch gilt Asprosin als möglicher biochemischer Marker und medikamentöser Therapieansatz in diesem Feld <sup>80-82</sup>.

Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sind erhöhte Asprosinwerte mit einem geringeren Risiko für negative kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert <sup>84</sup>. Darüber hinaus wirkt Asprosin *in vitro* kardioprotektiv: Es verbessert das Überleben von Kardiomyozyten unter diabetischen Bedingungen mit hohem Glukosevorkommen durch die Verringerung der Produktion von Malondialdehyd (MDA) sowie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) <sup>85</sup> und schützt Kardiomyoblasten vor Hypoxie-induziertem Zelltod <sup>84</sup>. Bei mesenchymalen Stromazellen, die zur Behandlung von Herzinfarkten untersucht werden, verbessert die Vorbehandlung mit Asprosin das zelluläre Überleben, indem sie vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Schädigungen schützt <sup>86</sup>.

Asprosin beeinflusst zudem über seine zentrale Wirkung am Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus das Herz, indem es die Aktivität des Sympathikus erhöht und damit eine Steigerung des Blutdrucks und der Herzfrequenz bewirkt <sup>87</sup>.

### **2.3.2. Asprosin und Übergewicht**

Es konnte gezeigt werden, dass Asprosin durch seine Effekte auf den Hypothalamus appetitstimulierend wirkt und die Nahrungsaufnahme steigert <sup>73</sup>. Des Weiteren fanden mehrere Studien erhöhte Asprosin Spiegel bei übergewichtigen Erwachsenen <sup>88,89</sup>. Bei schwer adipösen Patienten, die eine bariatrische Operation erhielten, konnte in zwei Studien eine deutliche Abnahme der Asprosin Spiegel sechs Monate nach der Operation gezeigt werden <sup>89,90</sup>. Bei übergewichtigen Kindern fanden sich widersprüchliche Daten in Bezug auf den Zusammenhang von Asprosin und Übergewicht. Während einige Studien erhöhte Asprosin Spiegel bei übergewichtigen Kindern zeigen konnten <sup>91,92</sup>, fanden andere Studien erniedrigte oder nur geschlechterabhängig erhöhte Asprosin Spiegel <sup>93–95</sup>.

Während in einer tierexperimentellen Studie mit Ratten durch die tägliche Gabe von Asprosin eine Zunahme des Körpergewichts sowie erhöhte Blutzuckerspiegel und Insulinresistenz induziert werden konnten, konnte im Mausmodell durch die Anwendung von Asprosin-spezifischen Antikörpern eine deutliche Gewichtsreduktion und eine verringerte Nahrungsaufnahme gezeigt werden, weshalb Asprosin als möglicher Behandlungsansatz für Adipositas diskutiert wird <sup>73,96</sup>.

Übergewicht und Adipositas sind bedeutende Komponenten bei der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2. In Patientenkollektiven mit Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2 konnten mehrere Studien erhöhte Asprosin Spiegel feststellen <sup>97–100</sup>. Eine weitere Studie konnte bei Patienten mit neu diagnostiziertem Diabetes Mellitus Typ 2 keine erhöhten Asprosin Spiegel nachweisen, hingegen zeigten sich jene bei Patienten mit bereits seit längerem bestehendem Diabetes Mellitus Typ 2 <sup>101</sup>. Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2, die mit Metformin oder dem Natrium-Glucose-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitor Dapagliflozin, der auch für die Behandlung der Herzinsuffizienz von essenzieller Bedeutung ist, therapiert wurden, zeigten eine Reduktion der Asprosin Spiegel <sup>102,103</sup>.

### 2.3.3. Asprosin und Sport

Körperliches Training wirkt als protektiver Faktor gegen Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2.

In übergewichtigen und normalgewichtigen Menschen zeigte eine Studie, dass die Asprosinpiegel im Plasma durch ein akutes aerobes Training reduziert wurden <sup>104</sup>. In einer anderen Studie wurden die Effekte eines akuten anaeroben Trainings bestimmt und es zeigten sich bei Männern keine Effekte des Trainings auf den Asprosinpiegel. Bei Frauen zeigte sich hingegen eine kurzfristige Verringerung und langfristige Erhöhung des Asprosinpiegels <sup>105</sup>. Morcos et al. konnten jedoch in männlichen Athleten nach einer dreißigminütigen Laufeinheit eine erhöhte Asprosinkonzentration nachweisen <sup>106</sup>.

Tierexperimentelle Studien an Ratten konnten zeigen, dass chronische aerobe körperliche Betätigung zu erniedrigten Asprosinpiegeln im Plasma führt <sup>107,108</sup>. Diese Ergebnisse eines langfristigen körperlichen Trainings konnten auch in zwei Kohorten mit menschlichen Probanden bestätigt werden <sup>109,110</sup>.

## 2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in dem Spannungsfeld aus „noncommunicable diseases“ wie kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes sowie dem Hauptrisikofaktor der ungesunden Ernährung mit Adipositas als Folge und dem protektiven Faktor körperlicher Bewegung angesiedelt. Trotz einer Vielzahl an klinischen und laborexperimentellen Studien, die darauf hindeuten, dass Asprosin für die kardiovaskuläre Gesundheit und Krankheit von Bedeutung ist, fehlen wesentliche Erkenntnisse über die lokale Verteilung und seine Veränderungen unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen, um den Einfluss von Asprosin auf das Herz besser zu verstehen. Ein schützender Einfluss unter hypoxischen und hyperglykämischen Bedingungen konnte, wie bereits erwähnt, *in vitro* gezeigt werden. Insbesondere aufgrund der starken Bedeutung der ECM im Herzen, der nachweislich ausgeprägten *FBN1*-Expression und dem Wissen über andere aus dem Herzen ausgeschüttete Hormone, stellt sich die Frage, ob Asprosin im Herzen produziert wird, wo es lokalisiert ist und ob die jeweiligen metabolischen Bedingungen die Asprosin-Expression im Herzen beeinflussen. Folglich lauten die Kernfragen dieser Arbeit:

1. Ist Asprosin im Herzen nachzuweisen?
2. Wo ist Asprosin im Herzen lokalisiert?
3. Gibt es Unterschiede in der Asprosin-Expression in den verschiedenen Regionen des Herzens?
4. Wie verändert sich die Asprosin-Expression im Herzen durch eine Diät-induzierte Adipositas (DIO)?
5. Wie verändert sich die Asprosin-Expression durch eine Intervention mit Laufradtraining (RUN)?
6. Wird Asprosin von Kardiomyozyten produziert?

Asprosin wird als wesentlicher Einflussfaktor für das Herz-Kreislaufsystem diskutiert und könnte perspektivisch beispielsweise als diagnostischer Faktor oder medikamentöser Ansatzpunkt genutzt werden<sup>80</sup>. Die Erkenntnisse dieser Dissertation sollen zum besseren Verständnis der Rolle Asprosin in den Bereichen der kardiovaskulären Gesundheit und der Erkrankungen beitragen sowie der protektiven und schädlichen Einflüsse durch gesunde und ungesunde Lebensstilveränderungen in diesem Kontext.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Geräte und Software

Tabelle 1 Verwendete Geräte und Software

Gerät / Software	Firma, Firmensitz
Leica ASP300S Fully Enclosed Tissue Processor	Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA
Shandon Finesse ME+ Mikrotom	Thermo Fisher, Rockford, IL, USA
Paraffin Streckbad 1052	GFL, Burgwedel, Deutschland
NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Bildauswertungssoftware QuPath v. 0.2.3	
Bildauswertungssoftware ImageJ v. 1.53d	National Institutes of Health, USA
Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX53	Olympus, Hamburg, Deutschland
Software CellSensDimension (V1.8)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Schwingmühle MM 400	Retsch, Haan, Deutschland
NanoDrop-Spektrophotometer Nano Quant infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Software iControl 2.0	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Software 7500 Software v2.0.6	Life Technologies
Homogenisator Sonopuls®	Bandelin, Berlin, Deutschland
Doppelgel-Elektrophorese-System Perfect-Blue™ Twin	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Power Supplies, PEQLAB Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Folienschweißgerät Severin Folio	Severin, Sundern, Deutschland
Software Image Lab v. 4.0.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Software Graphpad Prism (V. 9.0)	

### 3.2. Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme	Firma, Firmensitz
PFA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA
Neo-Clear	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saure Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Neo-Mount	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
van Gieson-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphomolybdänsäure Lösung (0,2%)	ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA
Picro-Sirius-Red Solution	ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA

Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citrat Puffer (Target Retrieval Solution, pH6)	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Sea Block Blocking Puffer	Thermo Fisher, Rockford, IL, USA
Permanent AEC-Kit	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
TRIzol TriReagent	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase-I-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-free DNase	Promega, Mannheim, Deutschland
Oligo-dT-Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
Random Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
M-MLV-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
GoTaq Mastermix	Promega, Mannheim, Deutschland

EDTA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
dNTP-Mix	Thermo Fisher, Rockford, IL, USA
BCA-Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western-Blot-Detection-Reagenz	GE Healthcare, Chicago, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoroshield mit DAPI	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
PBS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
NaF	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Igepal	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
-----------	-------------------------------------------------

### 3.3. Stammlösungen, Gele und Puffer

Tabelle 3 Verwendete Stammlösungen, Gele und Puffer

Stammlösungen, Gele und Puffer	Zusammensetzung
Trenngel 10% für 10 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>- 3,3 ml 30% Acrylamid</li> <li>- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)</li> <li>- 0,1 ml 10% SDS</li> <li>- 0,1 ml 10% APS</li> <li>- 0,004 ml TEMED</li> </ul>
Sammelgel für 10 ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,8 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>- 1,7 ml 30% Acrylamid</li> <li>- 1,3 ml 0,5 M Tris (pH 8,8)</li> <li>- 0,1 ml 10% SDS</li> <li>- 0,1 ml 10% APS</li> <li>- 0,01 ml TEMED</li> </ul>
RIPA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 mM Tris-HCl</li> <li>- 150 mM NaCl</li> <li>- 1% Igepal</li> <li>- 0,25% Natriumdesoxycholat</li> <li>- 1 mM EDTA</li> </ul>

RIPA-Puffer-Modifikator	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leupeptin 1 µg/ml</li> <li>- Aprotinin 1 µg/ml</li> <li>- Pepstatin A 1 µg/ml</li> <li>- 1 mM PMSF</li> <li>- 1 mM NaF</li> <li>- 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></li> </ul>
Towbin-Puffer 10x	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,25 M Tris</li> <li>- 2 M Glycin</li> </ul>
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10% Methanol</li> <li>- 10% 10x Towbin-Puffer</li> <li>- 80% dH<sub>2</sub>O</li> </ul>
Laufpuffer (Lämmli-Puffer) 10x	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,25 M Tris</li> <li>- 2 M Glycin</li> <li>- 1% SDS</li> </ul>
Probenpuffer 5x	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,082 M Sammelgelpuffer</li> <li>- 2,06 % SDS</li> <li>- 0,0026 % Bromphenolblau</li> <li>- 10 % Glycerin</li> <li>- 25 % β-Mercaptoethanol</li> </ul>

TBS-Tween	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NaCl 10 mM</li> <li>- Tris 1 mM</li> <li>- 0,05% Tween-20</li> </ul>
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.4. Primer

Tabelle 4 Verwendete Primer

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')	Firma, Firmensitz
<i>FBN1</i>	Forward	5'-GGTCAATGCAACGATCGAAA-3'	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland
<i>FBN1</i>	Reverse	5'-AGTGTGACAAAGGCAGTAGAAGCTT-3'	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland
<i>ACTB</i>	Forward	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT-3'	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland
<i>ACTB</i>	Reverse	5'-GCCACCGATCCACACAGAGT-3'	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland

### 3.5. Antikörper für Western Blot

Tabelle 5 Verwendete Antikörper für Western Blot

Antikörper	kDa	Verdünnung	Sekundärantikörper mit Verdünnung	Firma, Firmensitz	Bestellnummer
Asprosin	30	1:1000, Kaninchen anti-Human/Maus	Anti-Kaninchen 1:1000	MyBiosource, San Diego, USA	MBS7607159
GAPDH	37	1:5000, Kaninchen	Anti-Kaninchen 1:5000	Cell Signalling, Danvers, Massachusetts, USA	2118
HPRT	24	1:1000, Kaninchen anti-Maus/Human	Anti-Kaninchen 1:2000	abcam, Cambridge, UK	ab10479

### 3.6. Tierversuche

#### 3.6.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Männliche Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) erhielten entweder eine Standarddiät (SD, RUN) oder eine Diät nach westlichem Vorbild, um eine Diät-induzierte Adipositas zu bewirken (DIO). Die genauen Inhaltsstoffe sind in der nachfolgenden Tabelle beschrieben (Tabelle 6). Die Tiere wurden in die Gruppen „Organentnahme“ oder „Glukosetoleranztest (GTT)“ eingeteilt. Bei P42 wurde der RUN-Gruppe ein Laufrad für freiwillige Bewegung zur Verfügung gestellt. Distanz und Zeit wurden dreimal wöchentlich kontrolliert. Bei P56 wurde der GTT-Gruppe sechs Stunden lang der Zugang zu Futter verwehrt, anschließend wurde ein GTT durch intraperitoneale Verabreichung von 2 mg/g Körpergewicht Glukose und Messung des Blutzuckers vor der Verabreichung sowie nach 15, 30, 60 und 120 Minuten durchgeführt. Bei P70 wurden die Mäuse für die Organentnahme geopfert und die Herzen für die histologische Analyse und andere Organe entnommen. Die GTT-Gruppe erhielt erneut für sechs Stunden kein Futter und wurde mit CO<sub>2</sub> eingeschläfert. Dann wurden zum einen die Herzen für die Protein- und RNA-Analyse

sowie zum anderen das Nüchternserum entnommen. Alle Tierversuche entsprachen den ethischen Standards der einschlägigen nationalen Leitfäden für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (AZ81-02.04.2019.A130, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, Deutschland) und wurden vom institutionellen Ausschuss (Universitätsklinikum Köln, Deutschland) genehmigt. Diese Arbeiten wurden von Thorben Hoffmann durchgeführt.

*Tabelle 6 Futterzusammensetzung*

Zusammensetzung	Standarddiät (SD)	Diät-induzierte Adipositas (DIO)
Metabol. Energie [kcal/kg]	3225	5237
Fett [g/kg]	190	220
Protein [g/kg]	33	236
Kohlenhydrate [g/kg]	413	387
Zucker [g/kg]	54	211

### **3.7. Histologische Methoden**

#### **3.7.1. Einbetten und Schneiden**

Nach der Sektion wurden die Herzen für 24 Stunden mit 4 % PFA fixiert. Daraufhin wurden sie für mindestens 24 Stunden und maximal eine Woche in 70%iges Isopropanol gelegt, bevor sie im Leica ASP300S Fully Enclosed Tissue Processor (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) in Paraffin eingebettet wurden. Die paraffinierten Herzen wurden mit einem Shandon Finesse ME+ Mikrotom (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) in 5 µm dicke Schnitte aus dem Apex, der Mitte des Ventrikels und den Vorhöfen geteilt. Die Paraffinschnitte wurden in ein Wasserbad (Paraffin Streckbad 1052, GFL, Burgwedel, Deutschland) überführt und anschließend auf Objektträger geladen. Es wurde insbesondere darauf geachtet, bei jedem Herz für

die Schnitte die gleiche Ebene zu erreichen. Diese Unterscheidung der verschiedenen Herzebenen erfolgte in Anlehnung an Steijns et al. 2018, welche histologisch die Verteilung von Fibrillin-1 in den verschiedenen Ebenen bestimmten <sup>21</sup>.

### **3.7.2. Hämatoxylin- & Eosin-Färbung**

Für die morphologische Untersuchung und die Vermessung der Herzschnitte wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet. Dafür wurden die Herzschnitte dreimal für je fünf Minuten in Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) entparaffiniert. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe stufenweise gewässert. Diese bestand aus einer jeweils einminütigen Inkubation in 100%, 96%, 80% und 70% Ethanol (EtOH). Daraufhin wurden die Schnitte eine Minute in destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit der sauren Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Die Hämalaunlösung dient einer Blaufärbung der basophilen Strukturen, insbesondere der Zellkerne und der darin befindlichen DNA. Es folgte ein dreisekündiger Waschschrift in destilliertem Wasser und das sechsminütige Bläuen in Leitungswasser. Nach einem erneuten Waschschrift in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für drei Minuten in wässrigem Eosin G 0,5% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) unter Zusatz eines Tropfens Eisessig inkubiert, welches eine Färbung der eosinophilen bzw. azidophilen Strukturen wie beispielsweise des glatten endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien bewirkt. Es folgten ein erneuter Waschschrift in dH<sub>2</sub>O für drei Sekunden und die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96% und 100% EtOH für jeweils eine Minute). Zuletzt folgten zwei fünfminütige Inkubationen in Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) und die Eindeckelung der Schnitte mit Neo-Mount (109016, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

### **3.7.3. Sirius-Red-Färbung**

Die Sirius-Red-Färbung dient der Darstellung von Kollagenfasern. Die Herzschnitte wurden zu Beginn dreimal für jeweils zehn Minuten in Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% EtOH, jeweils eine Minute Inkubationszeit) gewässert. Es folgte eine einminütige Hydratisierung der Schnitte in dH<sub>2</sub>O. Daraufhin wurden die Schnitte für drei Minuten in Phosphomolybdänsäure-Lösung (0,2%) (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) und für 90 Minuten in der Picro-Sirius-Red Solution (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) inkubiert. Anschließend folgte eine zweimalige kurze Spülung in Essigsäurelösung (0,5%). Die Schnitte wurden zudem jeweils zweimal für 30 Sekunden in 100% EtOH und Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Neo-Mount (109016, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) eingedeckelt.

### **3.7.4. Elastika-van-Gieson-Färbung**

Die Elastika-van-Gieson-Färbung dient der Darstellung von Elastinfasern. Dafür ist der Farbstoff Resorcin-Fuchsin nach Weigert verantwortlich. Zu Beginn erfolgten die Entparaffinierung der Schnitte mithilfe von Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) für dreimal zehn Minuten und die Wässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% EtOH, jeweils eine Minute Inkubationszeit). Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten mit der Resorcin-Fuchsin-Lösung gefärbt. Nach einer kurzen Spülung mit dH<sub>2</sub>O, einer zehnssekündigen Differenzierung mit 80% EtOH und einem erneuten kurzen Spülen mit dH<sub>2</sub>O erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der elastischen Fasern. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eisenhämatoxylinlösung für drei Minuten inkubiert und mit dH<sub>2</sub>O zur Vermeidung von Hämatein-Niederschlägen gespült. Die Schnitte wurden im Folgenden für zehn Minuten mit fließendem Leitungswasser gebläut und für zwei Minuten mit der van-Gieson-Lösung gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte mit EtOH 70% und EtOH 96% gespült und einmal mit EtOH 96% sowie zweimal mit EtOH 100% entwässert. Zuletzt wurden sie mit Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) jeweils zweimal für fünf Minuten geklärt und mit Neo-Mount (109016, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) eingedeckelt.

### **3.7.5. Immunhistochemiefärbung**

Zur Vorbereitung für die Immunhistochemiefärbung wurden die Schnitte dreimalig für jeweils zehn Minuten in Neo-Clear (109843, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) deparaffiniert sowie in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 80 und 70 % Ethanol) und destilliertem Wasser rehydriert. Die Schnitte wurden daraufhin für 25 Minuten in Citrat Puffer (Target Retrieval Solution, pH6, Dako) gekocht. Nach einer dreißigminütigen Abkühlungsphase wurden sie in destilliertem Wasser gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert und das Gewebe wurde mit PBS/0,3 % Triton-X (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) permeabilisiert. Nach dem Blockieren mit Sea Block Blocking Puffer (37527, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern (1: 100, Kaninchen anti-Mensch/Maus Asprosin Polyklonaler Antikörper, MBS7607159, MyBiosource, San Diego, USA; 1:1000, anti-Mensch/Maus Fibrillin-1 (rf11) Polyklonaler Antikörper, hergestellt im Labor; 1:100 Kaninchen IgG polyklonale Isotypkontrolle, ab37415, abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit (ZUC053-100, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrritten in PBS für jeweils fünf Minuten wurde das Permanent AEC Kit (ZUC054-200s, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) zugegeben und für zwei (Asprosin) bzw. drei Minuten (Fibrillin-1) inkubiert. Zuletzt wurde eine Gegenfärbung mit

Hämatoxylin durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte für fünf Minuten mit einer sauren Hämaunlösung nach Mayer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Im Anschluss erfolgte die einminütige Waschung in destilliertem Wasser und das Bläuen unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten. Die Schnitte wurden daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 % Ethanol) und Neo-Clear dehydriert und anschließend mit Neo-Mount (109016, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) eingebettet.

### 3.7.6. Mikroskopische Aufnahmen und Vermessung

Die gesamten Objektträger der apikalen, ventrikulären und atrialen Schnitte wurden mit dem NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan) der CECAD Imaging Facility gescannt. Beispielhafte Bildausschnitte verschiedener untersuchter Regionen (Myokard, Endokard, Klappen, Gefäße) wurden auf der Grundlage der Histologie ausgewählt, um die Lokalisierung von Asprosin, Fibrillin-1, Kollagen und elastischen Fasern mithilfe der Software QuPath und ImageJ zu bestimmen.

In H&E-gefärbten Schnitten wurden der horizontale und vertikale Durchmesser des linken Ventrikels, die Dicke der freien Wand des linken Ventrikels sowie des intraventrikulären Septums gemessen (Abbildung 3).

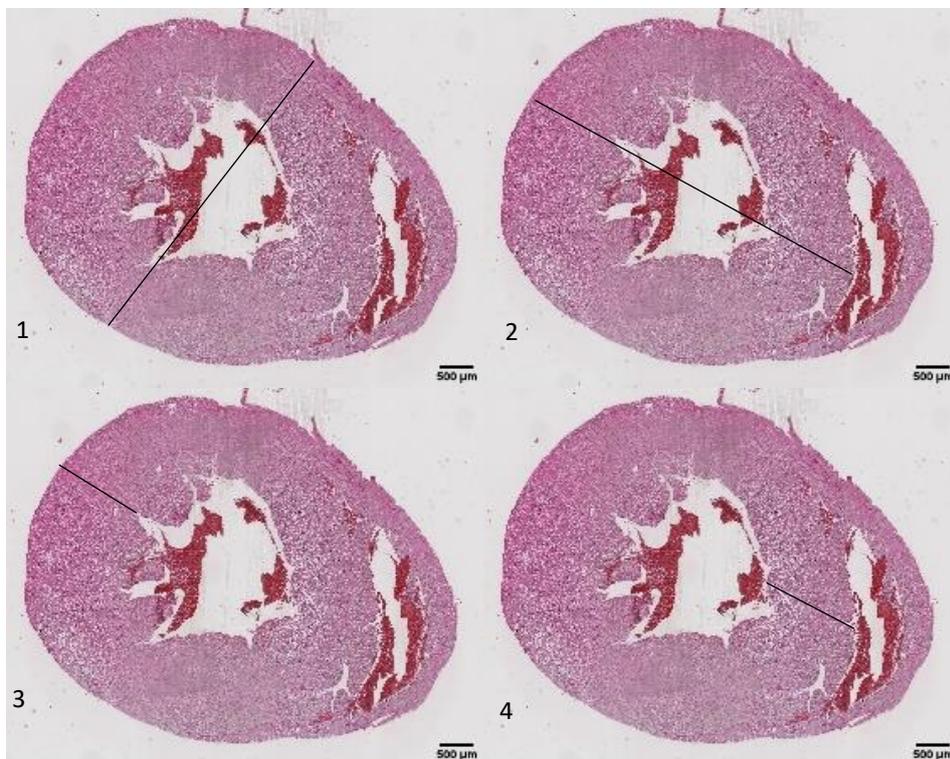


Abbildung 3 H&E-Färbung ventrikulärer Schnitte. Dargestellt sind die durchgeführten Vermessungen des linken Ventrikels. (1) zeigt den linksventrikulären vertikalen Durchmesser, (2) zeigt den linksventrikulären horizontalen Durchmesser, (3) zeigt die Dicke der linksventrikulären freien Wand, (4) zeigt die Dicke des interventrikulären Septums.

### **3.7.7. Messung des kardialen Kollagengehalts**

Die Sirius-Red-Färbung dient der Darstellung von Kollagenfasern. Diese erscheinen in der konventionellen Lichtmikroskopie rot. Die Auswertung kann allerdings auch fluoreszenz-mikroskopisch erfolgen. Lebendige Zellen stellen sich mit einer grünen Autofluoreszenz dar, während Kollagenfasern rot erscheinen. Es wurden drei standardisierte Regionen des linken Ventrikels unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX43F, DP80 dual CCD-Kamera, motorisierter Tisch M-MS-BX-4-2) mit dem Programm CellSensDimension (V1.8) aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte jeweils im grünen GFP-Kanal und im roten CY3-Kanal. Die Auswertung des Kollagengehalts im Verhältnis zu den lebenden Zellen erfolgte in Anlehnung an Vogel et al. (2015) im Programm ImageJ, wobei Bilder mit Gefäßanschnitten aufgrund des hohen perivaskulären Kollagengehaltes exkludiert wurden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten<sup>111</sup>.

## **3.8. qRT-PCR**

### **3.8.1. RNA-Isolation**

Die Herzen wurden in Apex, mittlere Ventrikel und Vorhöfe unterteilt. Die RNA wurde mit TriReagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Gewebeprobe wurde mit jeweils 500 µl TriReagent 20 Sekunden lang homogenisiert (Schwingmühle MM 400, Retsch, Haan, Deutschland) und nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT mit je 100 µl Chloroform versetzt, gemischt und für drei Minuten inkubiert. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben 15 Minuten lang bei 4°C und 12000 U/min zentrifugiert. Dadurch bildeten sich eine wässrige, RNA enthaltende Phase, eine weiße, DNA enthaltende Interphase und eine phenolhaltige Phase, welche Proteine enthielt. Die RNA-haltige, wässrige Phase wurde entnommen und mit 250µl Isopropanol versetzt. Die RNA-Probe wurde nach erneuter Inkubation bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt. Das übrig gebliebene RNA-Pellet wurde zwei Mal mit 75% Ethanol gewaschen. Danach wurde es für 30 Minuten getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst.

### **3.8.2. Bestimmung der Konzentration, Reinheit und Qualität der RNA**

Durch Messung der UV-Absorption mit dem NanoDrop-Spektrophotometer (Nano Quant infinite M200 Pro) und der Software iControl 2.0 wurden Reinheit und Konzentration der isolierten RNA untersucht. Dafür wird sich das unterschiedliche Absorptionsmaximum von RNA (260 nm) und Proteinen (280 nm) zunutze gemacht. Die Konzentration der RNA-Probe wird aus der Absorption des UV-Lichts bei 260 nm berechnet. Der Quotient aus der UV-Absorption bei den genannten Wellenlängen gibt Auskunft über die Reinheit der RNA. Bei einer reinen RNA-Probe

liegt der Quotient der optischen Dichte bei 260 nm zur optischen Dichte bei 280 nm zwischen 1,8 und 2,0.

### **3.8.3. cDNA-Synthese**

Aufgrund der großen Instabilität der isolierten RNA muss aus dieser zur weiteren Analyse mittels PCR die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Von jeder Probe wurde 1 µg RNA mit 1 µl DNase-I-Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland) und 1 µl RNase-free DNase (Promega, Mannheim, Deutschland) versetzt und für 15 Minuten bei RT inkubiert, um eine mögliche DNA-Kontamination zu verhindern. Dieser Vorgang wurde unter Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA beendet, woraufhin die Proben für 15 Minuten bei 65°C inkubiert wurden. Anschließend wurden 0,4 µl Oligo-dT-Primer (Promega, Mannheim, Deutschland) und 0,6 µl Random Primer (Promega, Mannheim, Deutschland) zu den RNA-Proben gegeben und für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden mit 1 µl Reverser Transkriptase (M-MLV, 200 U) (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U) (Promega, Mannheim, Deutschland), 1,25 µl dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid) (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) und 5 µl M-MLV-Puffer gemischt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Das Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert in diesem Schritt die cDNA aus der RNA. Als Startpunkt braucht die Reverse Transkriptase die zugegebenen Oligo-dT-Primer, welche aus mehreren Thyminbasen bestehen und dadurch an den komplementären Poly-A-Schwänzen der RNA binden können. Bei den ebenfalls zugegebenen Random-Primern handelt es sich um zufällige Kombinationen der Basen, welche an verschiedenen Stellen der RNA-Stränge binden können und somit viele Startpunkte für die cDNA-Synthese bilden. Die durch diesen Prozess entstandene cDNA kann nach der Inkubation bei -20°C gelagert werden.

### **3.8.4. Ablauf der qRT-PCR**

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) bietet die Möglichkeit auf Basis der PCR die Expression verschiedener Gene in Echtzeit zu quantifizieren. Es wurde die SYBR-Green Methode verwendet. Dafür wird ein fluoreszierender SYBR-Green-Farbstoff an die doppelsträngige DNA gekoppelt, sodass das Fluoreszenzsignal proportional zur zunehmenden Menge an doppelsträngiger DNA steigt. Der PCR-Zyklus, in dem das detektierte Fluoreszenzsignal signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als Cycle threshold (Ct) angegeben. Der gemessene Ct-Wert wird zusätzlich ins Verhältnis zu stabil exprimierten Housekeeping-Genen gesetzt, sodass die relative Genexpression beurteilt wird. Nach Ablauf der qRT-PCR wird die amplifizierte DNA zu Einzelsträngen aufgeschmolzen, wobei eine Schmelzkurve erstellt wird, anhand derer sich beurteilen lässt, ob die Primer spezifisch an die untersuchten Gene gebunden haben.

Zur Vorbereitung der qRT-PCR wurden 10 µl GoTaq Mastermix (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,5 µl Primer forward (10 µM), 0,5 µl Primer reverse (10 µM), 1 µl der entsprechenden cDNA-Probe und 8 µl destilliertes Wasser auf eine 96-Well-Platte gegeben, welche versiegelt und drei Minuten lang bei 1000 U/min zentrifugiert wird (Zentrifuge Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die qRT-PCR wird im 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit der entsprechenden Software 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies) durchgeführt. Der genaue Ablauf umfasste zwei Minuten bei 50°C, zehn Minuten bei 95°C und 40 Zyklen, bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 60°C.

In dieser Arbeit wurden Primer für das *ACTB*-Gen als Housekeeping-Gen sowie für das *FBN1*-Gen verwendet. Die Sequenzen sind in der Primerliste (Tabelle 4) aufgeführt.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde jeder Ct-Wert mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode auf den Ct-Wert des stabil exprimierten, endogenen Kontroll-Gens *ACTB* normalisiert <sup>112</sup>.

### **3.9. Western Blot**

#### **3.9.1. Protein-Isolation**

Die Herzen wurden in apikale, ventrikuläre und atriale Gewebeproben unterteilt. RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,25% Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA) wurde mit Proteaseinhibitoren (Leupeptin 1 µg/ml, Aprotinin 1 µg/ml, Pepstatin A 1 µg/ml), 1 mM PMSF, 1 mM NaF und 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> modifiziert und zu den Gewebeproben gegeben. Die Proben wurden zerkleinert, homogenisiert und durch Sonifikation (Sonopuls®; Bandelin, Berlin, Deutschland) für 20 Sekunden bei 50% Energie lysiert sowie für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 U/min für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde entnommen, in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben und bei -80°C gelagert.

#### **3.9.2. Messung der Konzentration**

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Dazu wurden eine BSA-Standardreihe angesetzt und die Proteinproben im Verhältnis 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Standardreihe und Proteinproben mit jeweils 200 µl Arbeitsreagenz aus dem BCA-Protein Assay Kit versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die photometrische Messung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des NanoQuant infinite M200 Pro (Tecan, Crailsheim, Deutschland) mit der Software iControl 2.0, indem die Absorption der Proteinprobe bei 562 nm gemessen und in Bezug zur Standardreihe gesetzt wird.

### **3.9.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung der Proteine, die durch die bindenden SDS-Moleküle eine negative Ladung aufweisen, hinsichtlich ihres Molekulargewichts. 20 µg Protein wurden mit 3 µl Probenpuffer, welcher beta-Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine enthält, versetzt und zehn Minuten lang bei 70°C inkubiert sowie denaturiert. Ein 10%iges Acrylamid-Trenngel zur Auftrennung der Proteine und ein Sammelgel für eine gleichmäßige Lauffront wurden vorbereitet. Anschließend wurde das Sammelgel mit den Proben und einem Marker (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) beladen. Die Gel-Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit 1x Laemmli-Puffer zunächst bei 80V für 45 Minuten und anschließend bei 120V für drei Stunden.

### **3.9.4. Ablauf Western Blot**

Nach der SDS-PAGE-Elektrophorese wurden die Proteine in einem halbtrockenen Blotting-System auf eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Blotting Membrane Amersham Protran, GE Healthcare, Chicago, USA) übertragen. Hierbei wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel und zur Membran angelegt, sodass die aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran transferiert und dort fixiert werden. Nachdem die Membran in kaltem entsalztem Wasser aktiviert wurde, wurde sie für 20 Minuten in Transferpuffer (10% Methanol, 10% Towbin-Puffer und 80% dH<sub>2</sub>O) inkubiert. Der Proteintransfer in der Blotting-Kammer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) erfolgte bei 1,3 mA/cm<sup>2</sup> für zwei Stunden. Mithilfe einer Ponceau-S-Färbung wurde der Erfolg des Blotting-Prozesses überprüft. Dafür wurde die Membran mit der Ponceau-S-Lösung (Ponceau S 0,2 %, Trichloressigsäure 3 % in dH<sub>2</sub>O) gefärbt, wodurch die Protein-Banden auf der Membran sichtbar wurden, anhand derer die Membran horizontal geschnitten wurde. Die Färbung wurde nach der Kontrolle mit destilliertem Wasser entfernt. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen auf den Membranen eine Stunde lang mit 5 % Milch und 2 % BSA in TBST geblockt und über Nacht mit den primären Antikörpern in 5 % BSA/TBST bei 4 °C inkubiert. Es wurden primäre Antikörper gegen Asprosin (1:1000, Kaninchen anti-Human/Maus Asprosin Polyklonaler Antikörper, MBS7607159, MyBiosource, San Diego) und als Ladekontrolle GAPDH (1:5000, Kaninchen monoklonal, 2118, Cell Signalling, Danvers, Massachusetts, USA) und HPRT (1:1000, Kaninchen anti-Maus/Human Polyklonal, ab10479, abcam, Cambridge, UK) verwendet. Anschließend wurden die Membranen drei Mal für jeweils zehn Minuten in TBST gewaschen und eine Stunde lang bei RT mit HRP-gebundenen sekundären Antikörpern gegen Kaninchen-IgG (1:1000 für Asprosin, 1:2000 für HPRT und 1:5000 für GAPDH, Antikörper #7074, Cell Signaling, Danvers,

Massachusetts, USA) inkubiert. Die Membranen wurden in TBST gewaschen und anschließend eine Minute lang mit GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western-Blot-Detection-Reagenz (28980926, GE Healthcare, Chicago, USA) inkubiert. Die Blots wurden mit dem ChemiDoc XRS+ System (1708265, Bio-Rad, München, Deutschland) gescannt. Die Quantifizierung wurde mit der Software Image Lab (v. 4.0.1, Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Für den Vergleich der Herzebenen in der SD-Gruppe (Apex, Ventrikel, Vorhöfe) und der Vorhofproben unter verschiedenen Bedingungen (SD, RUN, DIO) wurden aufgrund des geringen Signals unter Standardbedingungen 40 µg Protein und eine PVDF-Membran verwendet.

### **3.10. Zellkultur und Immunfluoreszenz**

Bereits aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte menschliche Kardiomyozyten von der AG Alcazar, Universitätsklinikum Köln, wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM/10% FBS gehalten. Anschließend wurden sie für zehn Minuten in 100% Methanol fixiert. Die Platten wurden mit PBS gewaschen, 30 Minuten lang mit PBS/0,3% Triton permeabilisiert und eine Stunde lang mit Sea-Block blockiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern (1:100 Kaninchen-Antihuman/Maus-Asprosin-Polyklonal-Antikörper, MBS7607159, MyBiosource, San Diego, USA; 1:100 Maus-Antihuman-Herz-Troponin T monoklonaler Antikörper, ab10214, abcam, Cambridge, UK) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit sekundären Antikörpern (1:500, Cy™5 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), AB\_2338013, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA; 1:500, Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), AB\_2338680, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Fluoroshield mit DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) eingebettet. Die Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX53 (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen.

### **3.11. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse und die Erstellung von Grafiken wurden mit der Software Graphpad Prism (V. 9.0) durchgeführt. Datensätze mit  $n \geq 8$  wurden mit dem D'Agostino-Pearson-Test auf eine Gaußsche Verteilung geprüft. Wenn die Datensätze normal verteilt waren, wurden sie je nach Anzahl der Variablen mit einer ein- oder zweifaktoriellen ANOVA analysiert. Wenn die Ergebnisse signifikant waren, wurden die Gruppen auch einzeln für jeden Zeitpunkt mit Student's t-Tests verglichen. Wenn die Datensätze nicht normalverteilt waren oder bei Datensätzen mit  $n < 8$  wurden Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Wenn die Ergebnisse signifikant waren, wurden die Gruppen auch für jeden Zeitpunkt einzeln mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorarbeiten: Tiermodell und Phänotypisierung

Die folgenden Vorarbeiten zum Tiermodell und zur Phänotypisierung wurden von Thorben Hoffmann durchgeführt. Um den Einfluss verschiedener Stoffwechselbedingungen auf die Expression und Lokalisierung von Asprosin zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Versuchstieren mit Standarddiät (SD), eine Gruppe mit westlicher Diät-induzierter Adipositas (DIO) und eine Gruppe mit Standarddiät und Sport (RUN) gebildet. Um Unterschiede in der Nahrungsaufnahme zu ermitteln, wurde die Nahrung dreimal pro Woche gewogen. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Nahrungsaufnahme zwischen den Gruppen, die Versuchstiere der DIO-Gruppe wiesen bei P70 jedoch ein signifikant höheres Körpergewicht auf als die Mäuse der SD-Gruppe. Die Mäuse der RUN-Gruppe legten eine durchschnittliche Laufstrecke von 8,75 km/Tag zurück und wiesen bei P70 ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zur SD-Gruppe auf. Außerdem war die Glukosetoleranz der DIO-Mäuse im Vergleich zu den SD-Mäusen signifikant beeinträchtigt (Tabelle 7).

*Tabelle 7 Klinische Parameter und Glukosetoleranztests bei SD, DIO und RUN. Es zeigten sich signifikant höhere Gewichte der Versuchstiere in der DIO- im Vergleich zur SD-Gruppe. Die Versuchstiere der RUN-Gruppe waren signifikant leichter als die der SD-Gruppe. Die Nahrungsaufnahme zeigte keine Unterschiede im Gruppenvergleich. Die Glukosetoleranztests zeigten eine signifikant beeinträchtigte Glukosetoleranz in der DIO-Gruppe nach 30 und 60 Minuten. Zur statistischen Analyse wurden ein D'Agostino-Pearson-Test und anschließend eine ANOVA sowie Student's t-Tests durchgeführt. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).*

Klinische Parameter	SD (Mittelwert ± Standard-ab- weichung; Min./Max.)	DIO (Mittelwert ± Standard-ab- weichung; Min./Max.)	RUN (Mittelwert ± Standard-ab- weichung; Min./Max.)	Signifikanz SD vs. DIO	Signifikanz SD vs. RUN
Körpergewicht [g]	27,52 ± 1,85 23,7 / 31,47	30,45 ± 1,8 26,9 / 34,14	26,32 ± 1,75 22,91 / 30,2	****	*
Nahrungsaufnahme [kcal]	14,3 ± 2,03 12,07 / 16,82	13,97 ± 1,06 13,13 / 15,49	16,37 ± 247 12,24 / 19,76		
Laufdistanz [km]			8,75 ± 3,07 3,66 / 15,15		

<b>GTT</b>					
Glucose [mg/dl]					
0 Minuten	138,4 ± 21,76 111 / 183	151,6 ± 26,2 112 / 196	135,3 ± 15,83 114 / 166		
15 Minuten	365 ± 49,19 306 / 442	410,8 ± 86,91 292 / 479	324,5 ± 56,92 206 / 380		
30 Minuten	296,2 ± 53,26 203 / 382	409,1 ± 61,18 315 / 517	280,9 ± 59,88 185 / 350	****	
60 Minuten	205,8 ± 70,31 75 / 311	305,1 ± 54,68 237 / 397	189,8 ± 45,34 130 / 247	****	
120 Minuten	153,1 ± 26,51 116 / 190	179,6 ± 35,65 133 / 256	143,6 ± 18,64 118 / 170		

## 4.2. Histologische Analyse der linksventrikulären Struktur und Kollagenakkumulation

Um den Einfluss von DIO und Sport auf die ventrikuläre Struktur und eine eventuell vorliegende Hypertrophie nachzuweisen, wurden in H&E-gefärbten Schnitten der horizontale und vertikale Durchmesser des linken Ventrikels, die Dicke der freien Wand des linken Ventrikels und des intraventrikulären Septums gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in diesen Messungen zwischen den Gruppen (Abb. 4).

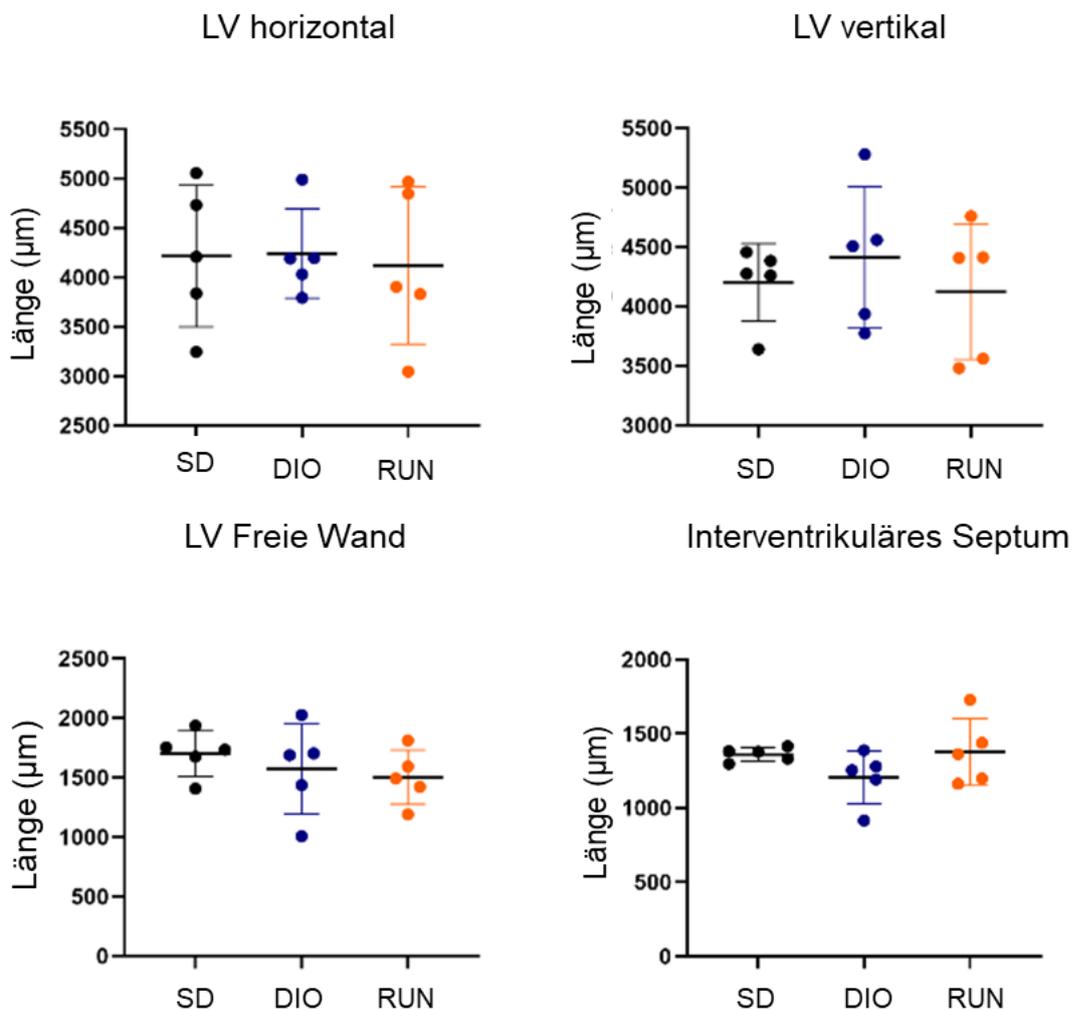


Abbildung 4 Analyse der linksventrikulären Dimensionen in H&E-gefärbten, 5µm dicken Schnitten des Ventrikels von SD-, DIO- und RUN-Versuchstieren (N=5 je Gruppe). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Durchmesser des linken Ventrikels (LV) in horizontaler oder vertikaler Messung. Auch die Dicke der freien Wand des linken Ventrikels und das interventrikuläre Septum wiesen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf. Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und die Messungen mit der Software QuPath durchgeführt. Eine beispielhafte Darstellung der Messungen wird in Abbildung 3 gezeigt. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Eine verstärkte Fibrosierung des Herzens steht wie zuvor erwähnt in Zusammenhang mit der Entität der Adipositas- und Diabetes-assoziierten Kardiomyopathie. Zur Quantifizierung des Kollagengehalts des linksventrikulären Myokards wurden Schnitte mit einer Sirius-Red-Lösung gefärbt und Bilder mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Abbildung 5A). Es wurden keine signifikanten Veränderungen des Kollagengehalts des linken Ventrikels zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 5B).

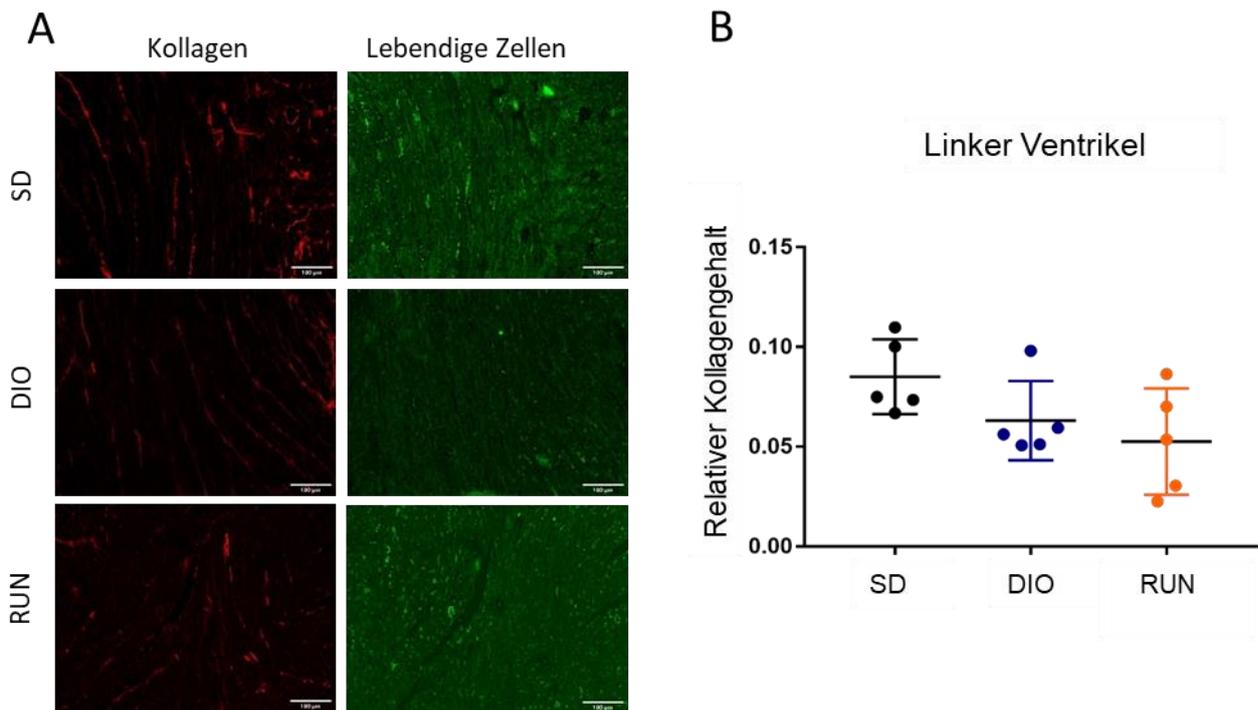


Abbildung 5A Fluoreszenzaufnahmen von Picro-Sirius-Red-gefärbten Schnitten der SD-, DIO- und RUN-Gruppe. Linke Spalte CY3-Aufnahmen (rot), rechte Spalte GFP-Aufnahmen (grün). Kollagenfasern stellen sich rot und Zellen grün dar.

Abbildung 5B Analyse der Picro-Sirius-Red-Fluoreszenzaufnahmen zur Bestimmung des relativen Kollagengehalts in den Gruppen SD, DIO und RUN (pro Gruppe N=5). Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede im relativen Kollagengehalt. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX53 aufgenommen und mithilfe der Software QuPath ausgewertet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 4.3. *FBN1*-Expression bei SD, DIO und RUN

Um die relative Expression des *FBN1*-Gens, welches für Asprosin und Fibrillin-1 kodiert, im Vergleich zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Dieser Vergleich zwischen den verschiedenen metabolischen Bedingungen wurde auf Ebene der Vorhöfe, Ventrikel und Herzspitzen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der lokalisationspezifischen Genexpression aufzudecken.

Es zeigten sich sowohl in den Vorhöfen als auch in den Ventrikeln und Herzspitzen keine signifikanten Veränderungen in der relativen *FBN1*-Expression zwischen SD, DIO und RUN (Abbildung 6).

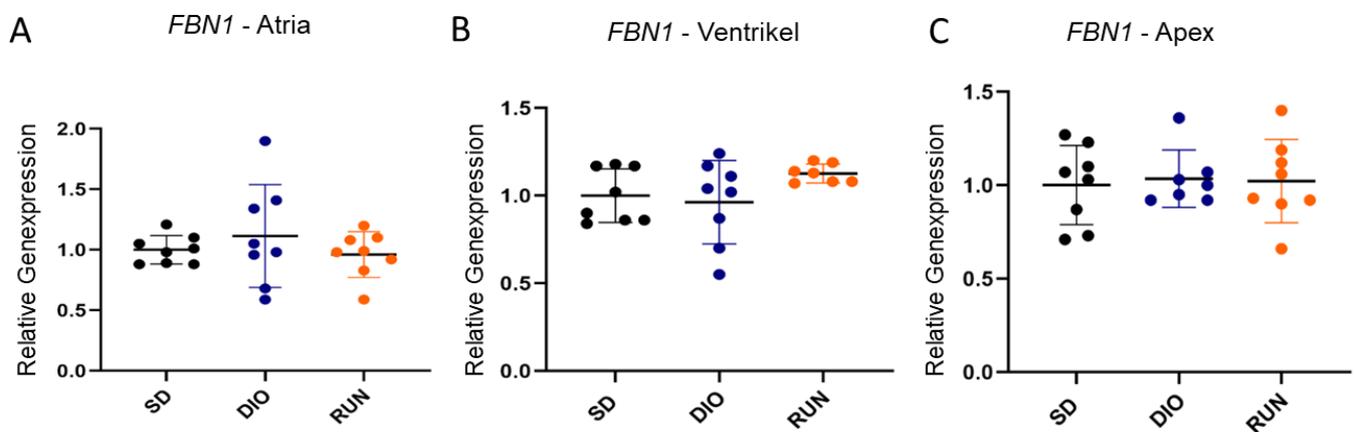


Abbildung 6 qPCR-Untersuchung der relativen mRNA-Expression des *FBN1*-Gens in Vorhöfen (A), Ventrikeln (B) und Herzspitzen (C) unter SD-, DIO- und RUN-Bedingungen (je Gruppe N=8). Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede in den verschiedenen Regionen. Das *ACTB*-Gen wurde als Housekeeping-Gen verwendet. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurden ein D'Agostino-Pearson-Test und eine one-way-ANOVA (Atria) oder ein Kruskal-Wallis-Test (Apex und Ventrikel) durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.4. Asprosin-Expression bei SD, DIO und RUN

Um die relative Asprosin-Expression unter den verschiedenen metabolischen Bedingungen (SD, DIO, RUN) zu quantifizieren und zu vergleichen, wurden Proteine aus Gewebeproben der Vorhöfe, Ventrikel und Herzspitzen isoliert und anschließend Western Blot-Analysen durchgeführt.

In den Gewebeproben der Vorhöfe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Asprosin-Expression zwischen SD-, DIO- und RUN-Gruppe (Abbildung 7).

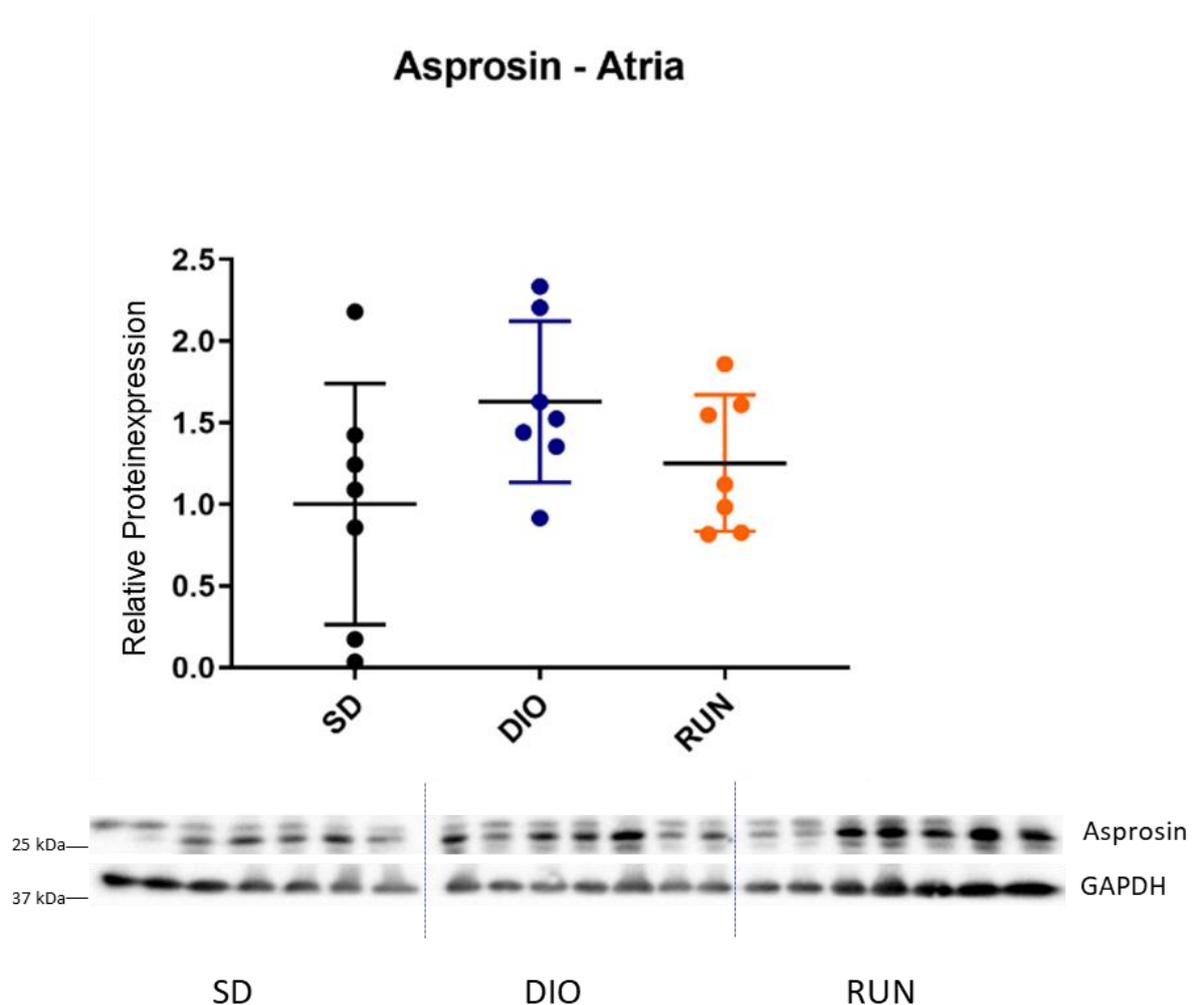


Abbildung 7 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression in den Vorhöfen unter SD-, DIO- und RUN-Bedingungen (N=7 pro Gruppe). Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Auf Ventrikel Ebene war die relative Asprosin-Expression in der DIO-Gruppe gegenüber der Standarddiätgruppe signifikant erhöht. Im Vergleich der RUN-Gruppe mit der Standarddiätgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression (Abbildung 8).

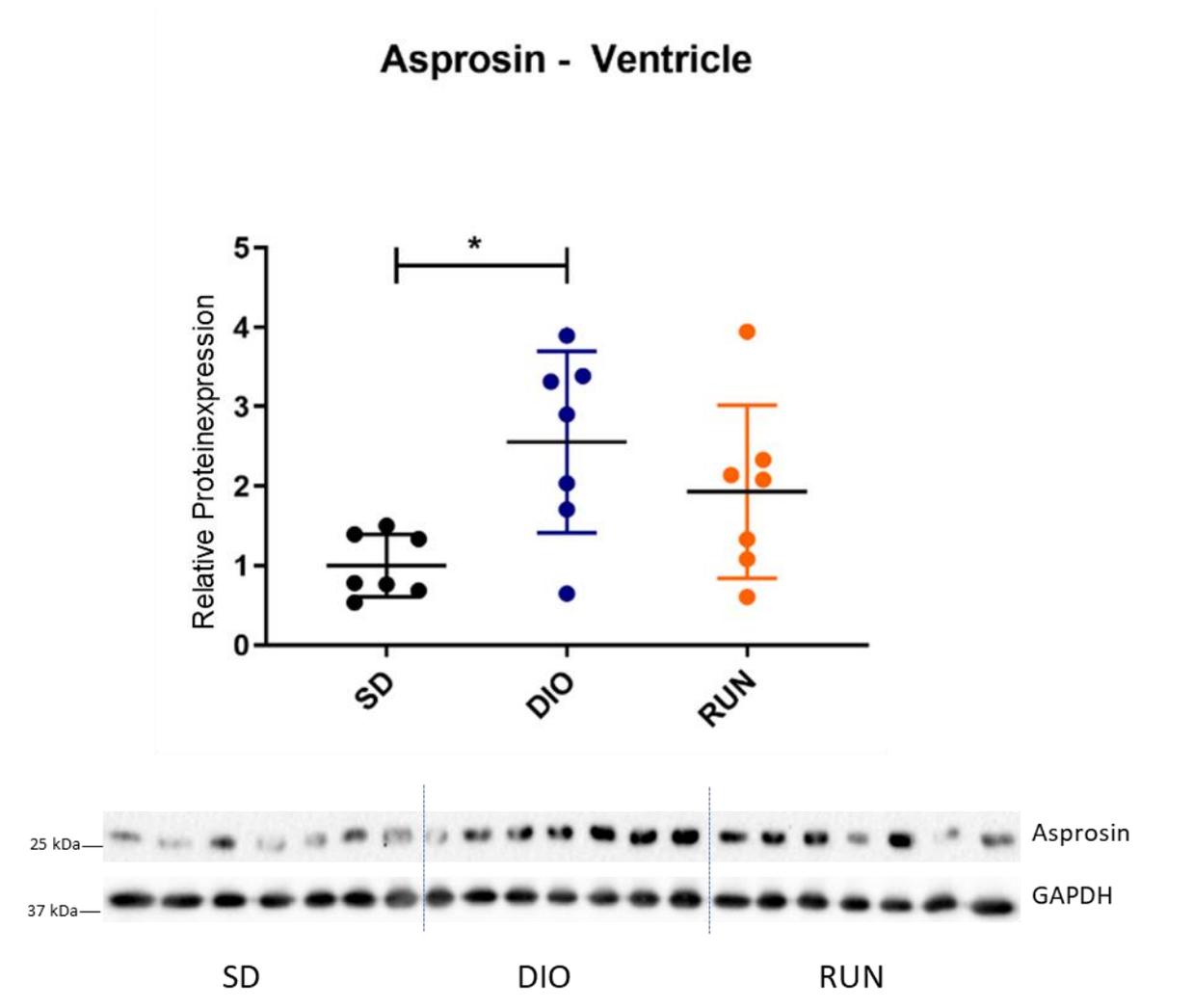


Abbildung 8 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression in den Ventrikeln unter SD-, DIO- und RUN-Bedingungen (N=7 pro Gruppe). Es zeigte sich eine signifikant höhere relative Asprosin-Expression bei DIO im Vergleich zu SD. Zwischen RUN und SD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

In den Herzspitzen zeigten sich im Vergleich der SD-, DIO- und RUN-Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der relativen Asprosin-Expression (Abbildung 9).

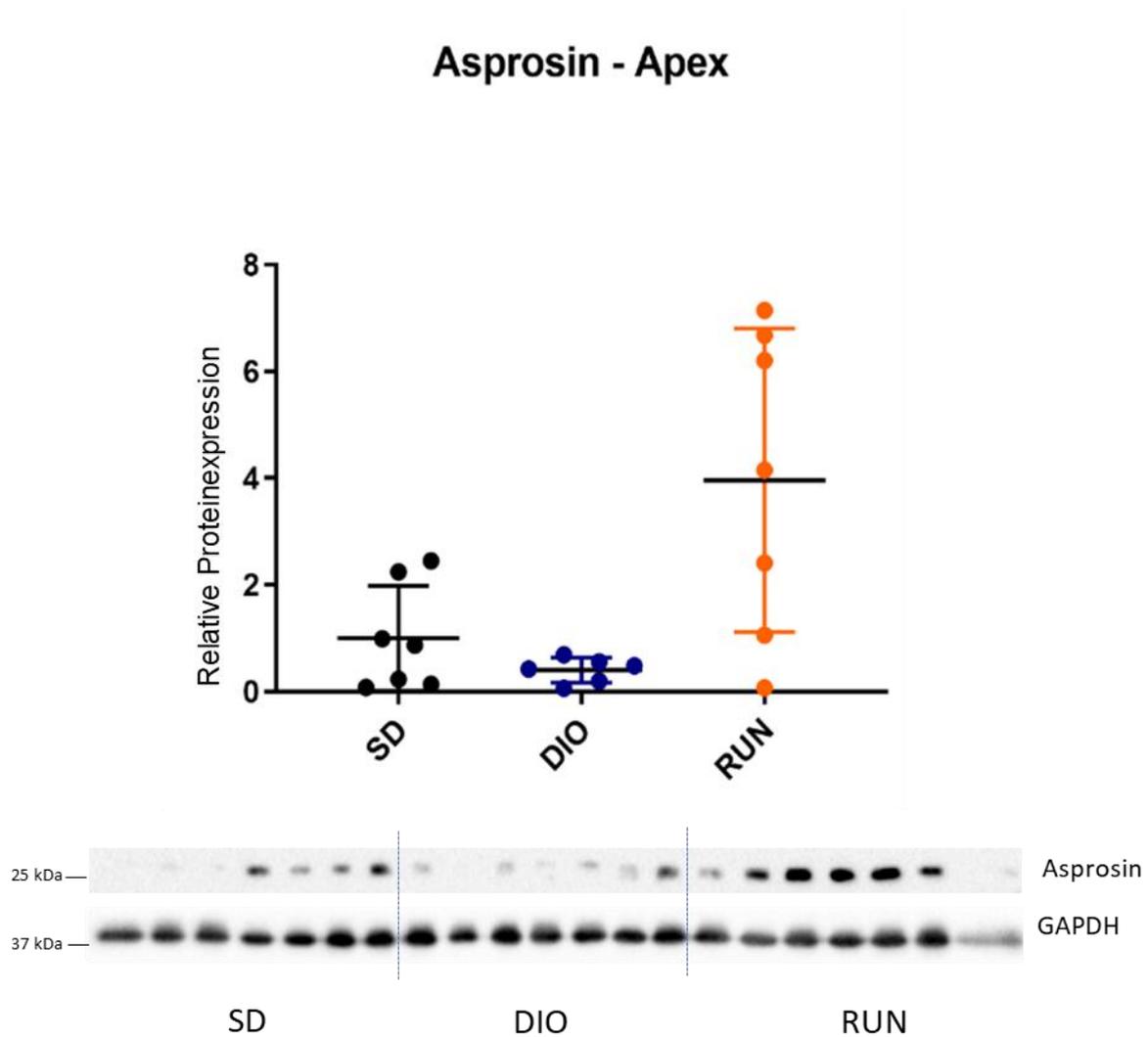


Abbildung 9 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression in den Herzspitzen unter SD-, DIO- und RUN-Bedingungen (N=7 pro Gruppe). Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.5. Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe

Um die Asprosin-Expression in den Vorhöfen, Ventrikeln und der Herzspitze zu quantifizieren und zu vergleichen, wurden die Western Blot-Analysen der unterschiedlichen Regionen innerhalb der jeweiligen Gruppe (SD, DIO und RUN) verglichen.

In den Herzen der Mäuse mit Standarddiät zeigte sich eine signifikant erhöhte relative Asprosin-Expression in den Ventrikeln und der Herzspitze im Vergleich zu den Vorhöfen. Die relative Asprosin-Expression war in der Herzspitze am stärksten ausgeprägt und größer als in den Ventrikeln (Abbildung 10).

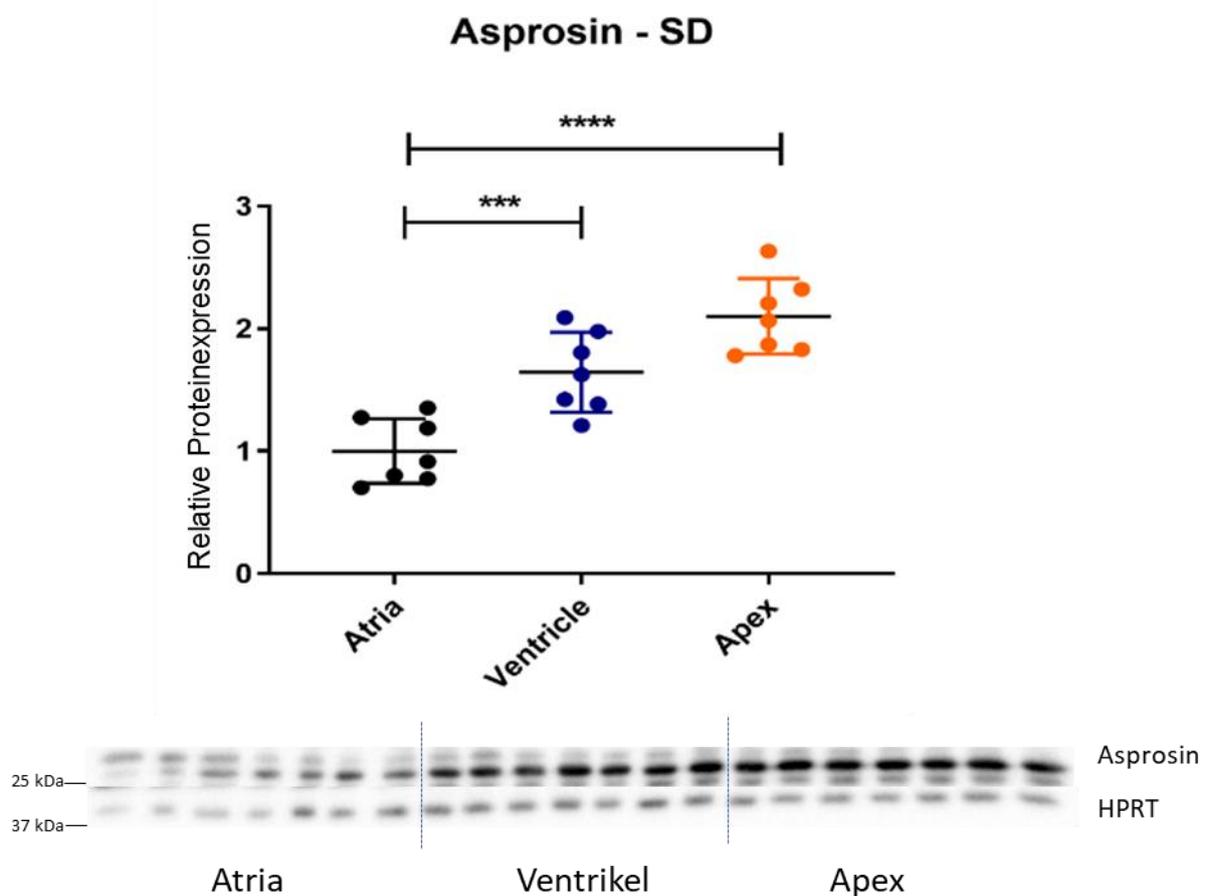


Abbildung 10 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression unter SD-Bedingungen im Vergleich zwischen Vorhöfen, Ventrikeln und Herzspitzen (N=7 pro Gruppe). Es zeigte sich eine signifikant höhere relative Asprosin-Expression in den Ventrikeln und im Apex im Vergleich zu den Atrien. Als Ladekontrolle wurde HPRT verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

In der DIO-Gruppe war die relative Asprosin-Expression in der Herzspitze sowie den Ventrikeln gegenüber den Vorhöfen ebenfalls signifikant erhöht. In dieser Gruppe zeigte sich die stärkste relative Asprosin-Expression jedoch in den Ventrikeln und nicht in der Herzspitze (Abbildung 11).

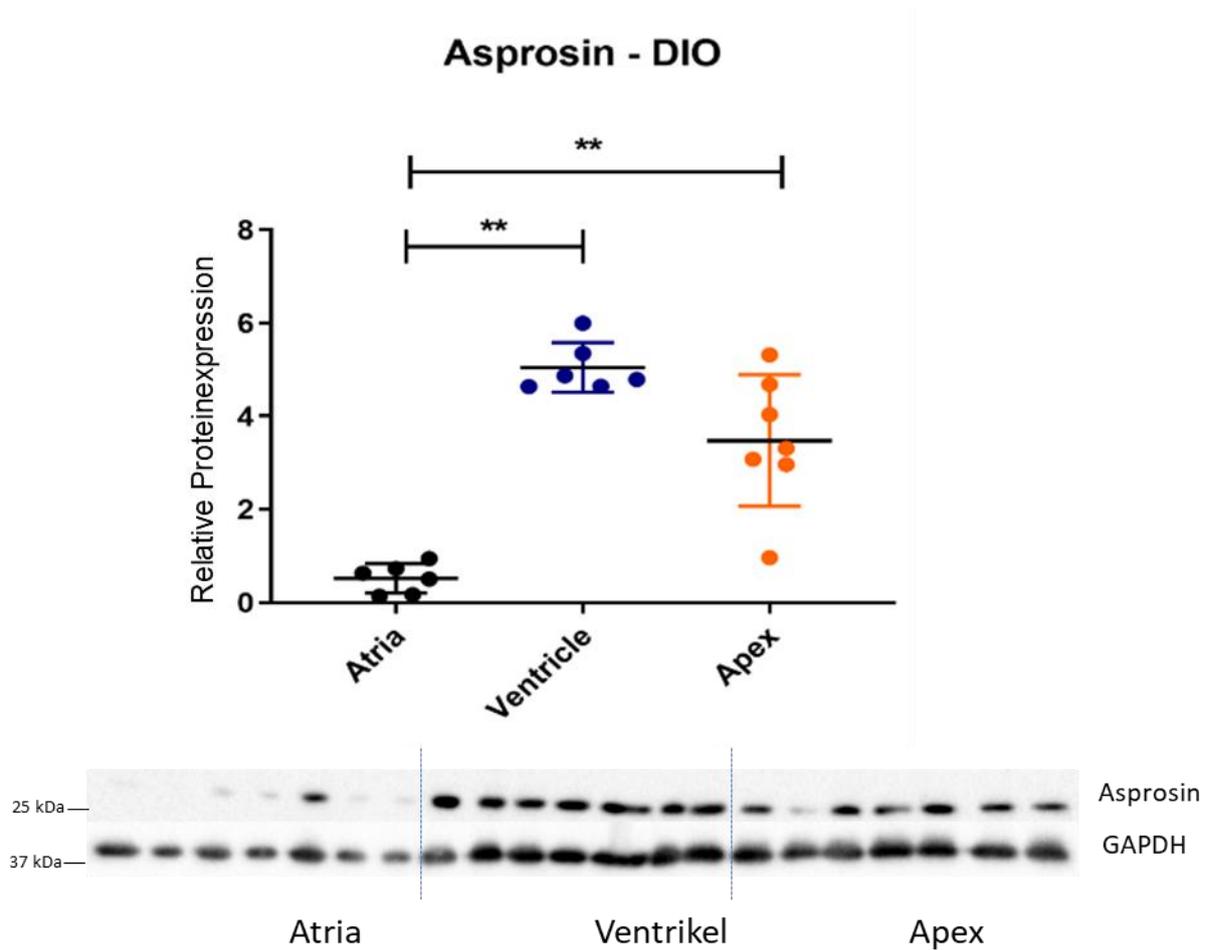


Abbildung 11 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression unter DIO-Bedingungen im Vergleich zwischen Vorhöfen, Ventrikeln und Herzspitzen (N=7 pro Gruppe). Es zeigte sich eine signifikant höhere relative Asprosin-Expression in den Ventrikeln und im Apex im Vergleich zu den Atrien. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Die relative Asprosin-Expression in den Herzen der RUN-Gruppe zeigte die gleiche Tendenz wie in der DIO-Gruppe. Die relative Asprosin-Expression war in den Ventrikeln und in der Herzspitze gegenüber den Vorhöfen signifikant erhöht. Die größte relative Asprosin-Expression zeigte sich in den Ventrikeln (Abbildung 12).

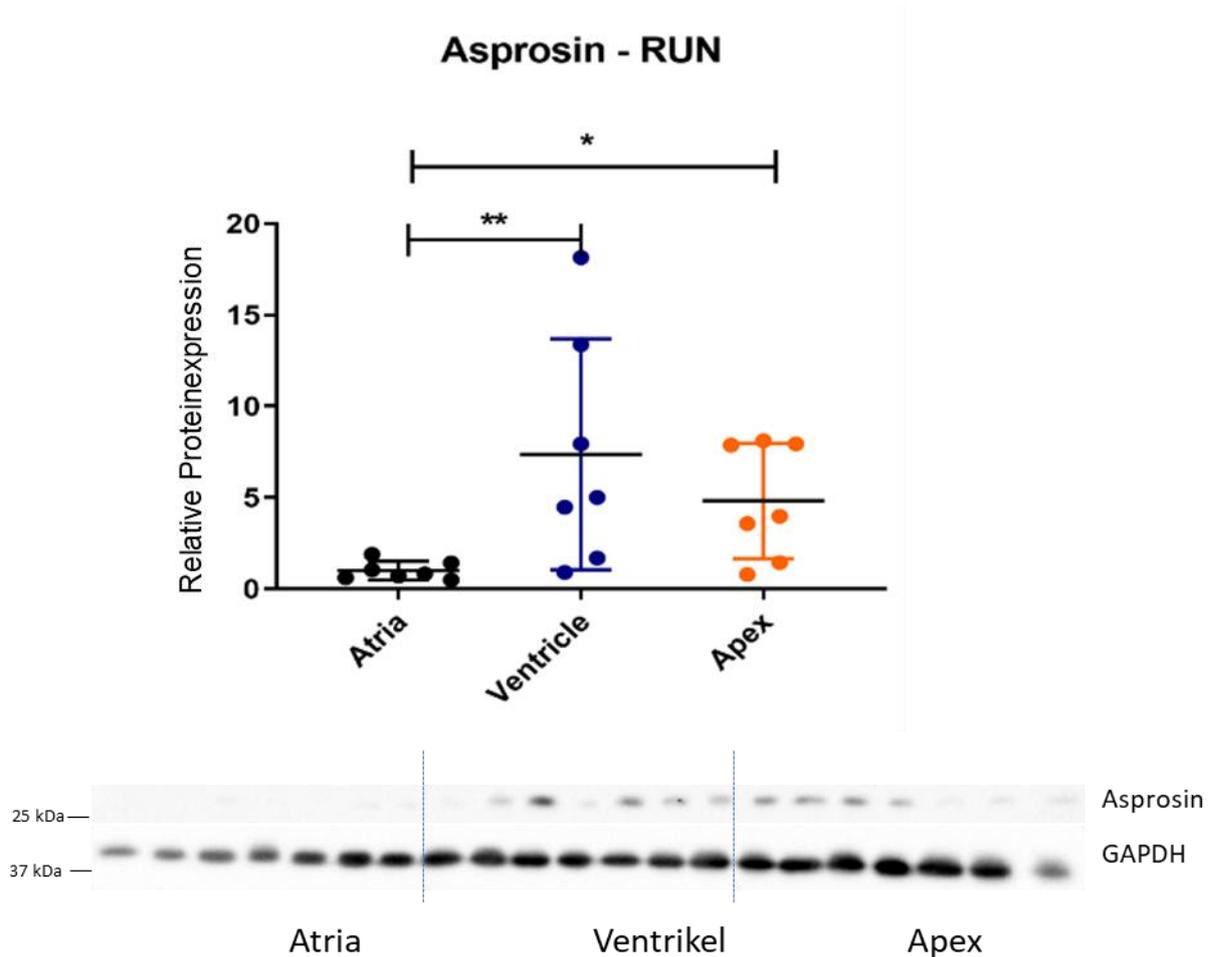


Abbildung 12 Western Blot-Untersuchung der relativen Asprosin-Expression unter RUN-Bedingungen im Vergleich zwischen Vorhöfen, Ventrikeln und Herzspitzen (N=7 pro Gruppe). Es zeigte sich eine signifikant höhere relative Asprosin-Expression in den Ventrikeln und im Apex im Vergleich zu den Atrien. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der Graph zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und zur statistischen Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.6. Histologische Analyse der Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe im Vergleich mit Fibrillin-1, elastischen Fasern und Kollagen

Um die Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe mit der Lokalisierung von Fibrillin-1, elastischen Fasern und Kollagen zu vergleichen, wurden Immunhistochemie-Färbungen, eine Elastika-van-Gieson-Färbung und eine Sirius-Red-Färbung für SD, DIO und RUN durchgeführt.

#### 4.6.1. Histologische Analyse bei SD

In der SD-Gruppe konnte Asprosin intrazellulär im Bereich der Zellkerne beobachtet werden (Abb. 13.1). Außerdem wurde Asprosin im linken Ventrikel in einer extrazellulären, faser-ähnlichen Verteilung angefärbt (Abbildung 13.1). Diese ist vergleichbar mit dem Verteilungsmuster von Fibrillin-1 in Fasern (Abbildung 13.2).

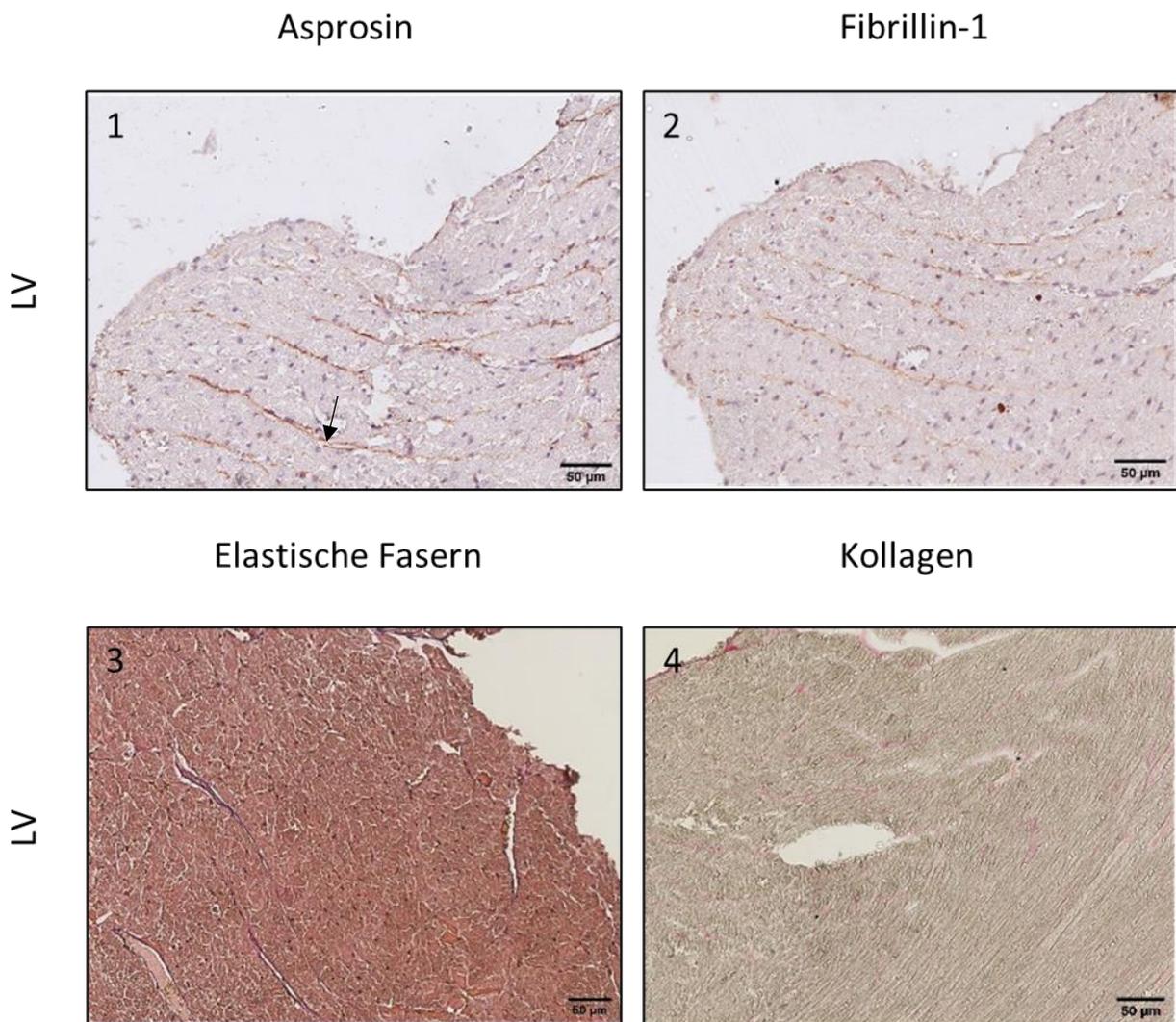


Abbildung 13 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte des linken Ventrikels (LV) von Versuchstieren der SD-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung von Asprosin an den Zellkernen und in Fasern (1). Diese Fasern sind vergleichbar mit den Fibrillin-1-Fasern (2). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

Das Endokard, die Herzklappen sowie der umgebende Anulus fibrosus weisen viele elastische Fasern und Kollagen auf (Abbildung 14.3 & 14.4). Sie zeigten zudem eine Färbung für Asprosin (Abbildung 14.1). Fibrillin-1 wurde vor allem in den äußeren Schichten der Herzklappen beobachtet (Abbildung 14.2).

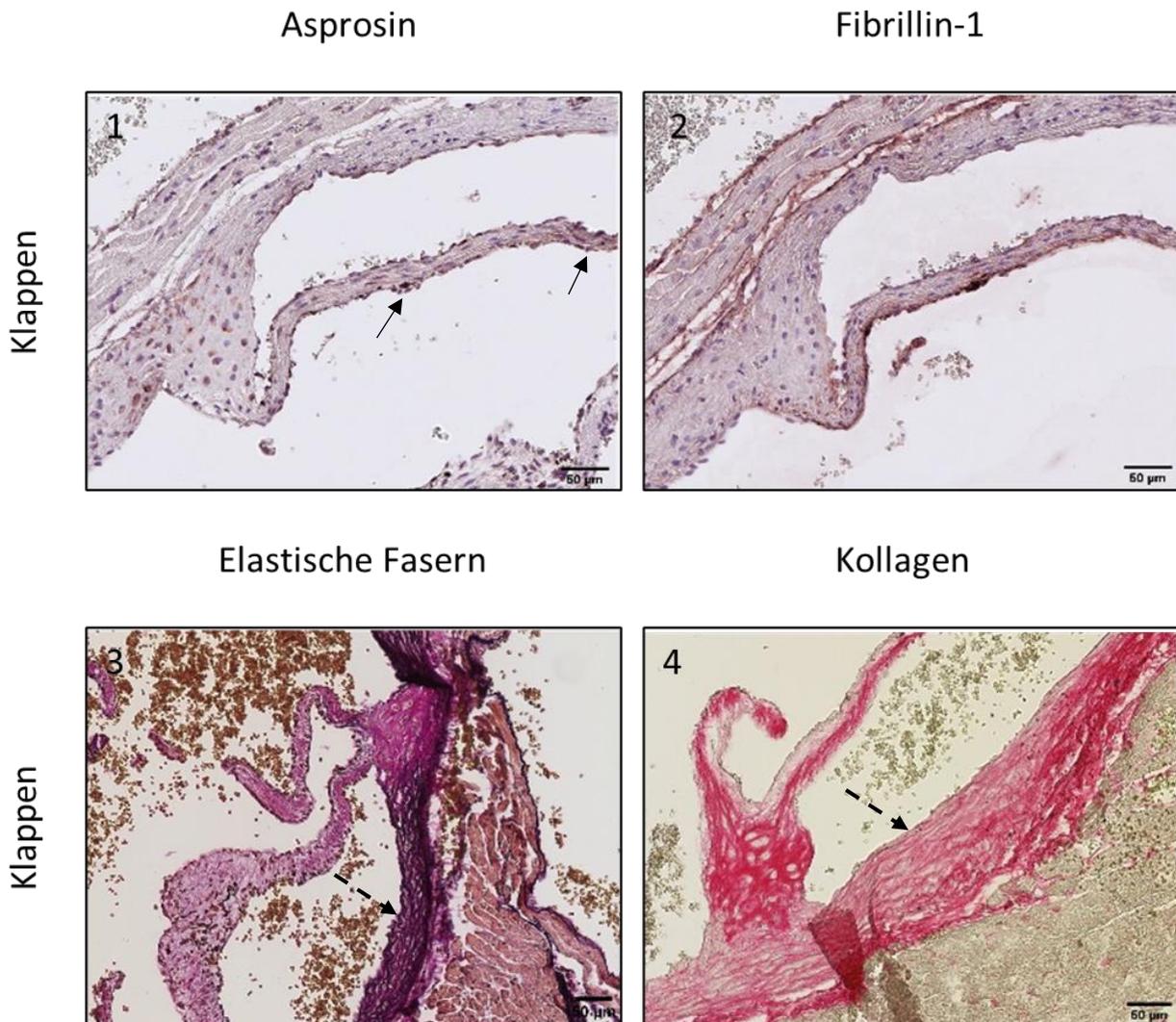


Abbildung 14 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der Herzklappen von Versuchstieren der SD-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung von Asprosin im Bereich der Herzklappen, beispielsweise angezeigt durch die schwarzen Pfeile (1). Fibrillin-1 zeigte sich in den äußeren Schichten der Herzklappen (2). Es zeigen sich des Weiteren viele elastische Fasern und Kollagen in den Herzklappen und dem Anulus fibrosus (3 & 4, gestrichelte Pfeile). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

Blutgefäße wiesen eine Asprosin-Färbung im Endothel auf (Abbildung 15.1) und zeigten im Bereich der Membrana elastica interna und externa sowie im Bereich der Tunica adventitia eine Asprosin-Färbung, die mit dem Ausprägungsmuster elastischer Fasern und des Kollagens vergleichbar war (Abbildung 15.3 & 15.4).

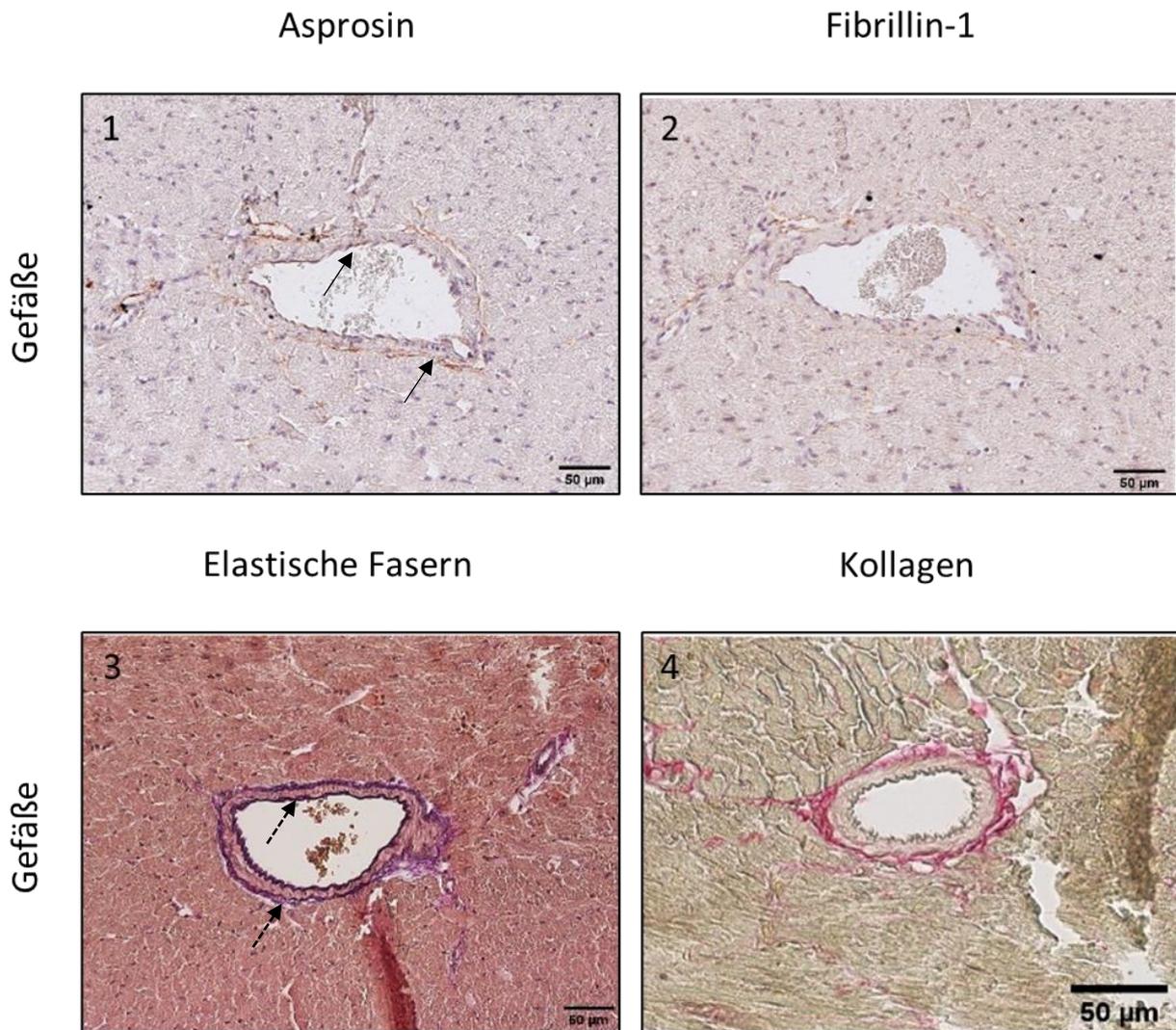


Abbildung 15 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der Blutgefäße von Versuchstieren der SD-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin im Bereich des Endothels sowie im Bereich der Membrana elastica interna und externa und im umgebenden Bindegewebe (1). Die Pfeile zeigen beispielhaft das positive Färbesignal für Asprosin (1). Die gestrichelten Pfeile zeigen die Membrana elastica interna und externa, die reich an elastischen Fasern sind (3). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

Um die Asprosin-Lokalisierung noch genauer darzustellen, wurden Aufnahmen der Immunhistochemiefärbungen der SD-Gruppe in 100-facher Vergrößerung dargestellt. Deutlich zeigte sich die Asprosin-Färbung am endokardialen Überzug des Myokards (Abbildung 16.1). Im Extrazellulärraum des Myokards stellte sich Asprosin in Fasern dar (Abbildung 16.2). Zudem konnte eine Asprosin-Färbung um Kapillaren und größere Blutgefäße beobachtet werden (Abbildung 16.3 & 16.4).

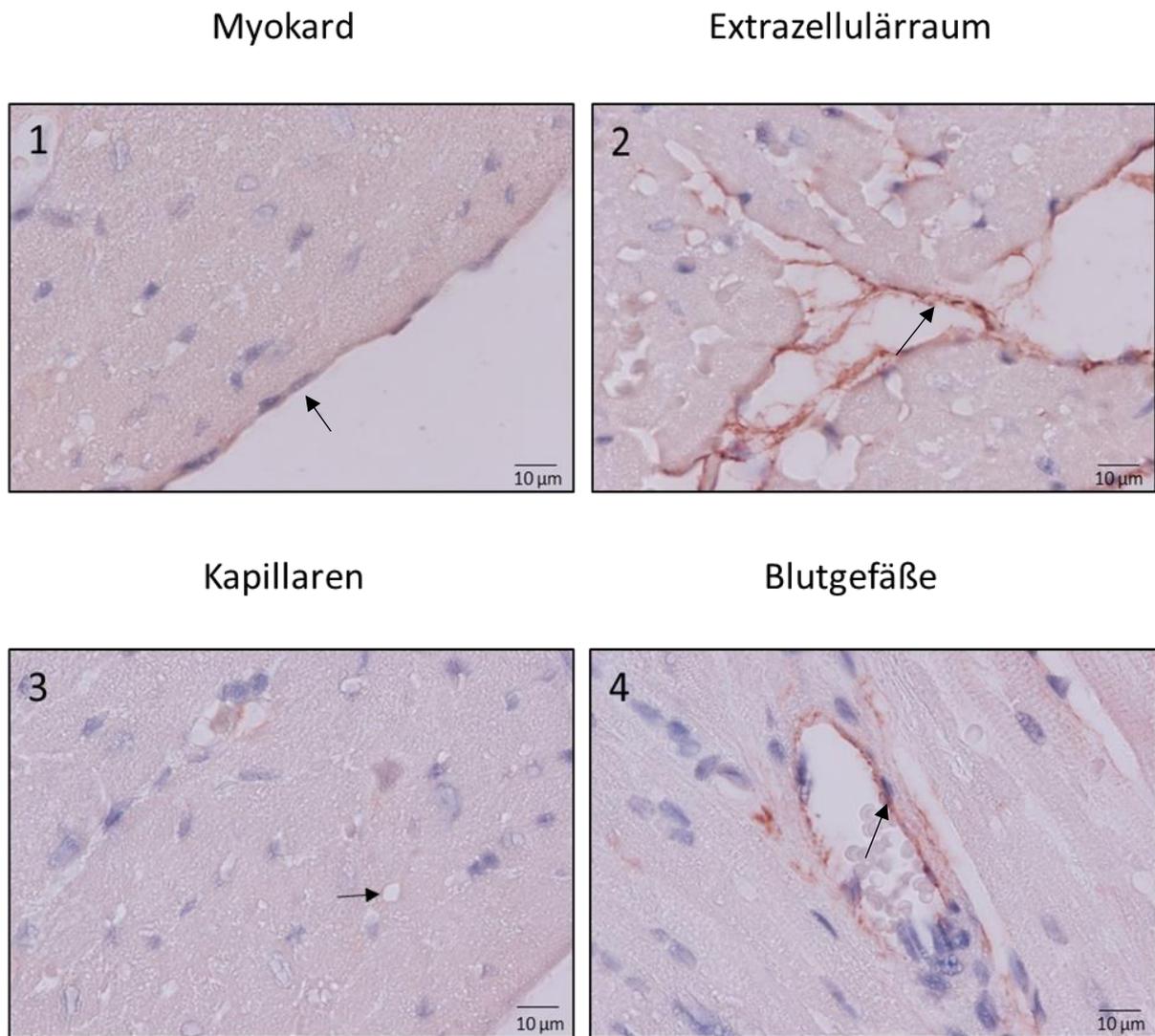


Abbildung 16 Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen Asprosin in 100-facher Vergrößerung. Es handelt sich um 5µm dicke Schnitte des Myokards (1), des Extrazellulärraums (2), der Kapillaren (3) und größerer Blutgefäße von Versuchstieren der SD-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin im Bereich des Endokards (1), in einer faserigen Struktur im Extrazellulärraum des Myokards (2) sowie an Kapillaren (3) und größeren Blutgefäßen (4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15).

#### 4.6.2. Histologische Analyse bei DIO

Um die Lokalisierung von Asprosin im Herzen unter DIO zu analysieren, wurden auch in dieser Gruppe immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

In der DIO-Gruppe fand sich im linken Ventrikel ebenfalls eine Asprosin-Färbung an Zellkernen und am Endokard (Abbildung 17.1). Fibrillin-1 stellte sich in langen Fasern dar (Abbildung 17.2). Elastische Fasern und Kollagen zeigten sich zwischen den Kardiomyozyten (Abbildung 17.3 & 17.4).

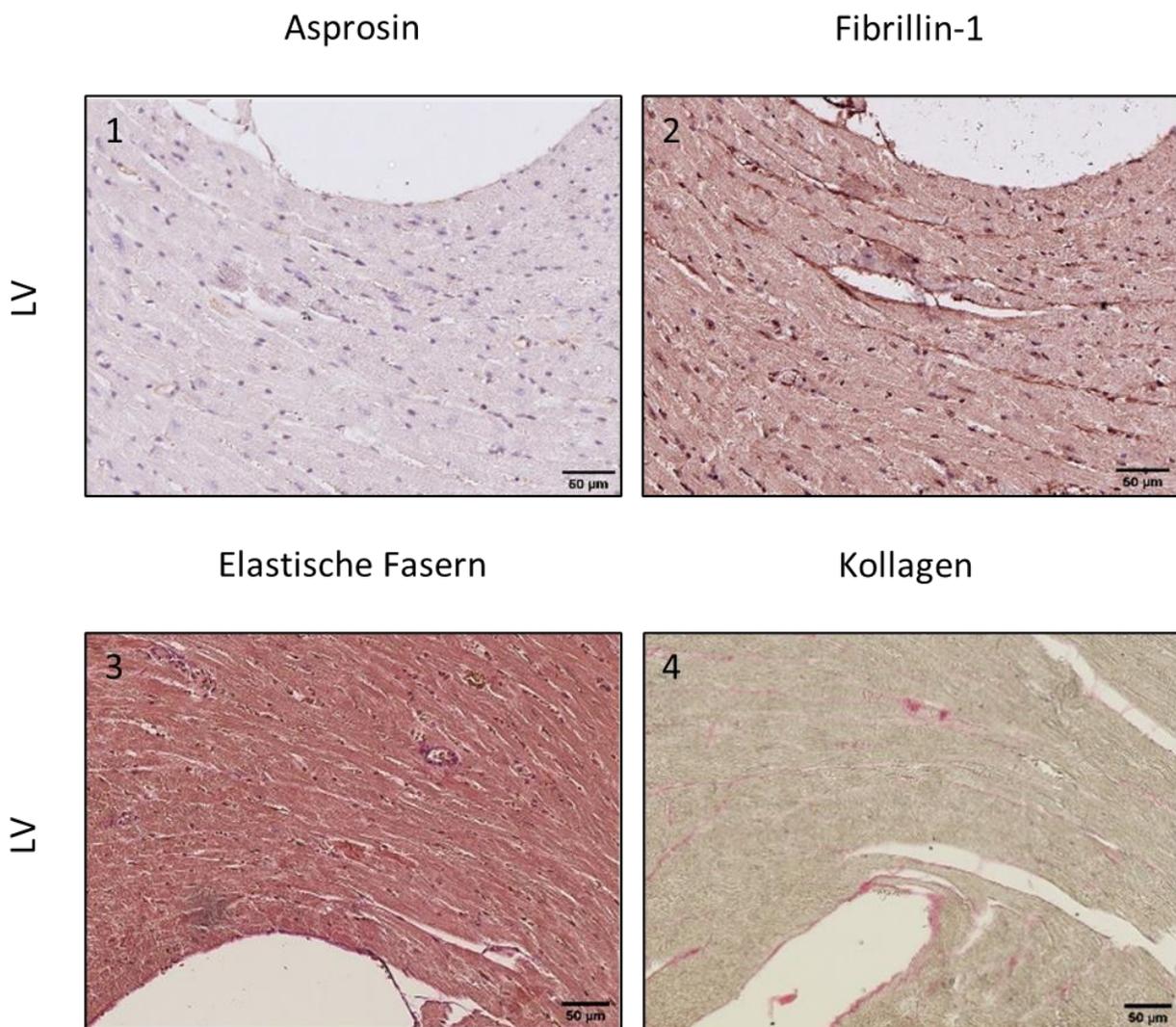


Abbildung 17 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der linken Ventrikel (LV) von Versuchstieren der DIO-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin an einigen Zellkernen und am Endokard (1). Fibrillin-1, elastische Fasern und Kollagen zeigten sich zwischen den Kardiomyozyten (2-4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software Qu-Path beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N = 15 pro Färbung).

An den Herzklappen der DIO-Gruppe zeigte sich ein intensives Färbesignal für Asprosin, insbesondere am Endokard. Eine ähnliche Verteilung zeigte auch Fibrillin-1 (Abbildung 18.1 & 18.2). Elastische Fasern und Kollagen zeigten sich an den Herzklappen zentraler gelegen und in großen Mengen am umgebenden Anulus fibrosus (Abbildung 18.3 & 18.4).

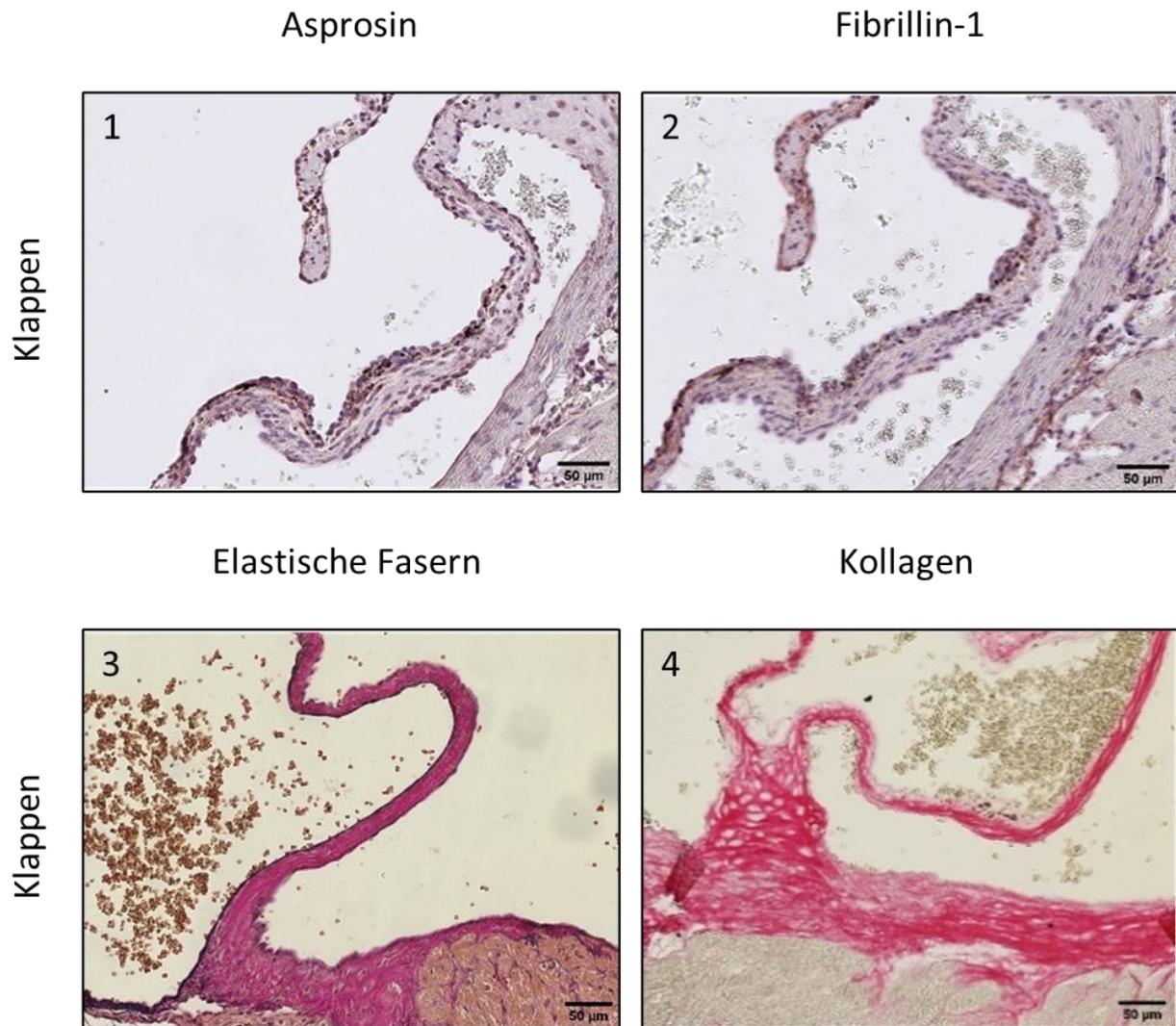


Abbildung 18 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5µm dicke Schnitte der Herzklappen von Versuchstieren der DIO-Gruppe. Asprosin und Fibrillin-1 zeigten sich vor allem an den äußeren Schichten der Herzklappen (1 & 2), während elastische Fasern und Kollagen sich in den Klappen zentraler zeigten und im Anulus fibrosus vorkamen (3 & 4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

An den Blutgefäßen der DIO-Gruppe zeigte sich ein intensives Signal für Asprosin und Fibrillin-1 am Endothel und an der Membrana elastica interna sowie vereinzelt im perivaskulären Bindegewebe (Abbildung 19.1 & 19.2). Auch elastische Fasern und Kollagen konnten an der Membrana elastica interna und im perivaskulären Bindegewebe dargestellt werden (Abbildung 19.3 & 19.4).

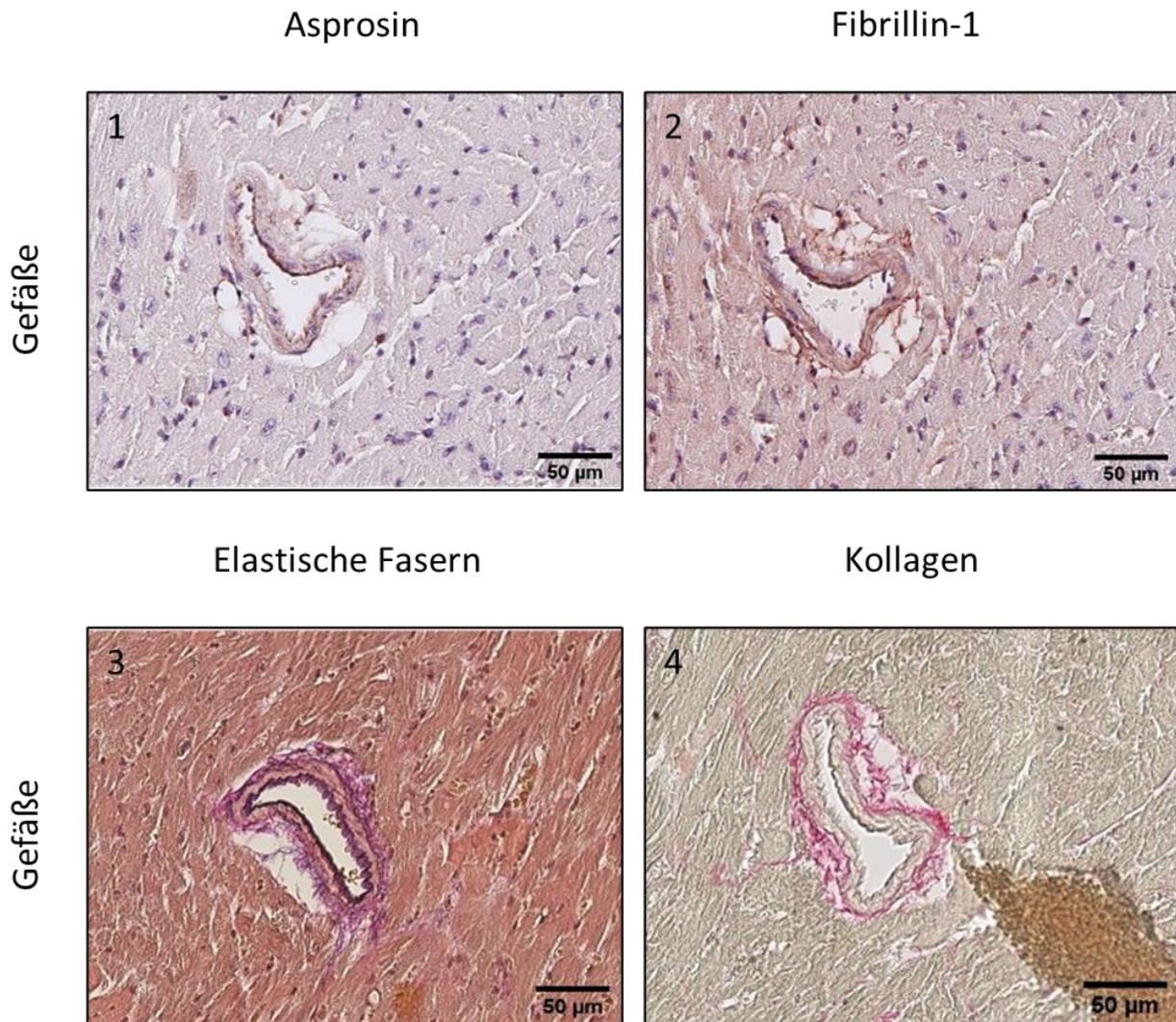


Abbildung 19 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der Blutgefäße von Versuchstieren der DIO-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin und Fibrillin-1 an den Endothelzellen, an der Membrana elastica interna und im perivaskulären Bindegewebe (1 & 2). Elastische Fasern und Kollagen fanden sich ebenfalls in der Membrana elastica interna und im perivaskulären Bindegewebe (3 & 4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

#### 4.6.3. Histologische Analyse bei RUN

Die immunhistochemischen Färbungen wurden ebenfalls in der RUN-Gruppe durchgeführt, um die Lokalisierung unter positiven metabolischen Veränderungen zu untersuchen.

Im Myokard des linken Ventrikels zeigte sich eine Färbung für Asprosin an Zellkernen und in einer faser-ähnlichen Verteilung (Abbildung 20.1). Fibrillin-1, elastische Fasern und Kollagen stellten sich ebenfalls extrazellulär in Fasern dar (Abbildung 20.2 – 20.4).

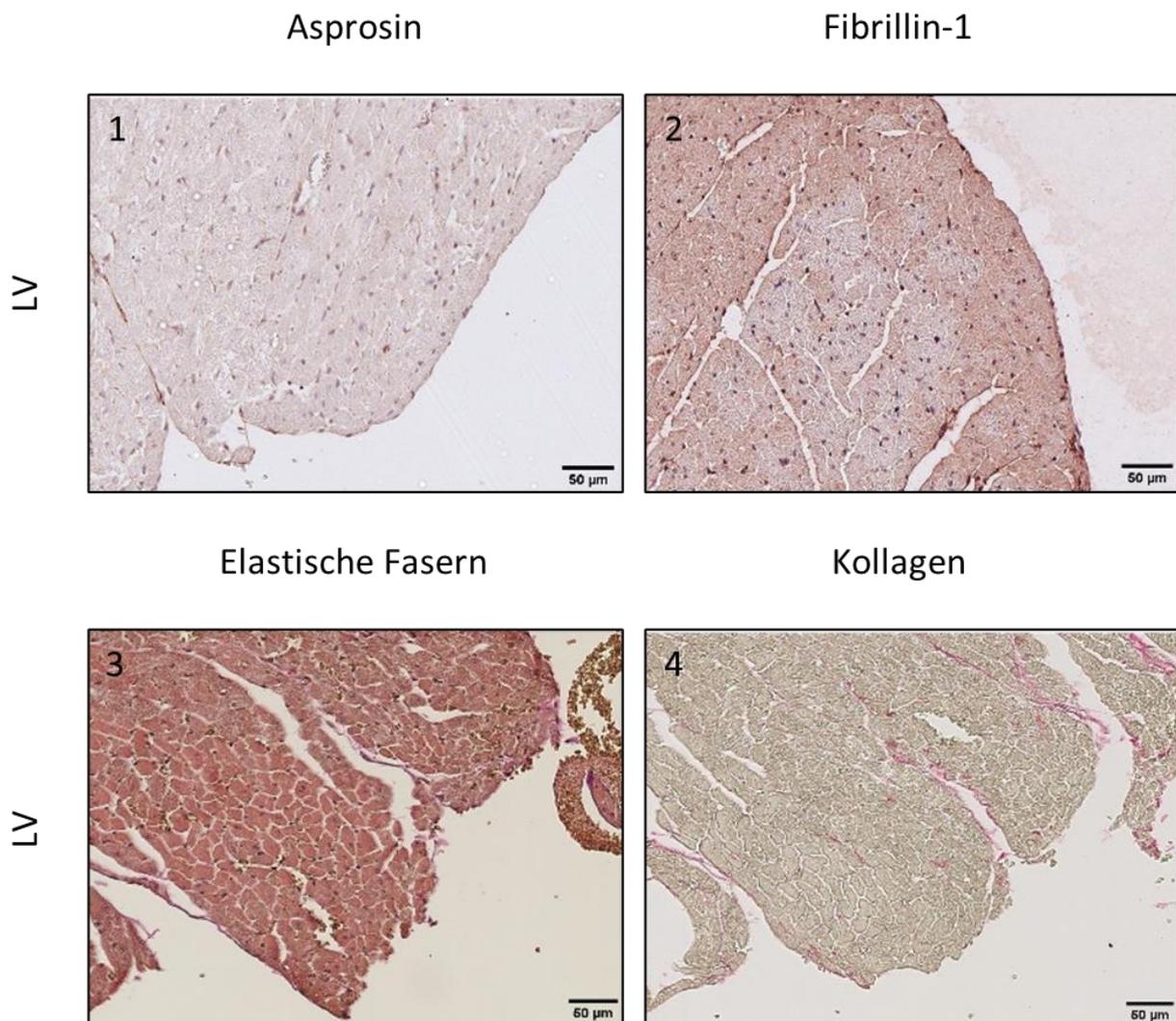


Abbildung 20 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der linken Ventrikel (LV) von Versuchstieren der RUN-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin an Zellkernen sowie in einer faser-ähnlichen Verteilung (1). Fibrillin-1, elastische Fasern und Kollagen zeigten sich in extrazellulären Fasern (2 – 4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

An den Herzklappen der RUN-Gruppe zeigten sich Asprosin und Fibrillin-1 vor allem am Endokard der Klappen (Abbildung 21.1 & 21.2). Elastische Fasern und Kollagen zeigten sich zentraler in den Klappen sowie am umgebenden Anulus fibrosus (Abbildung 21.3 & 21.4).

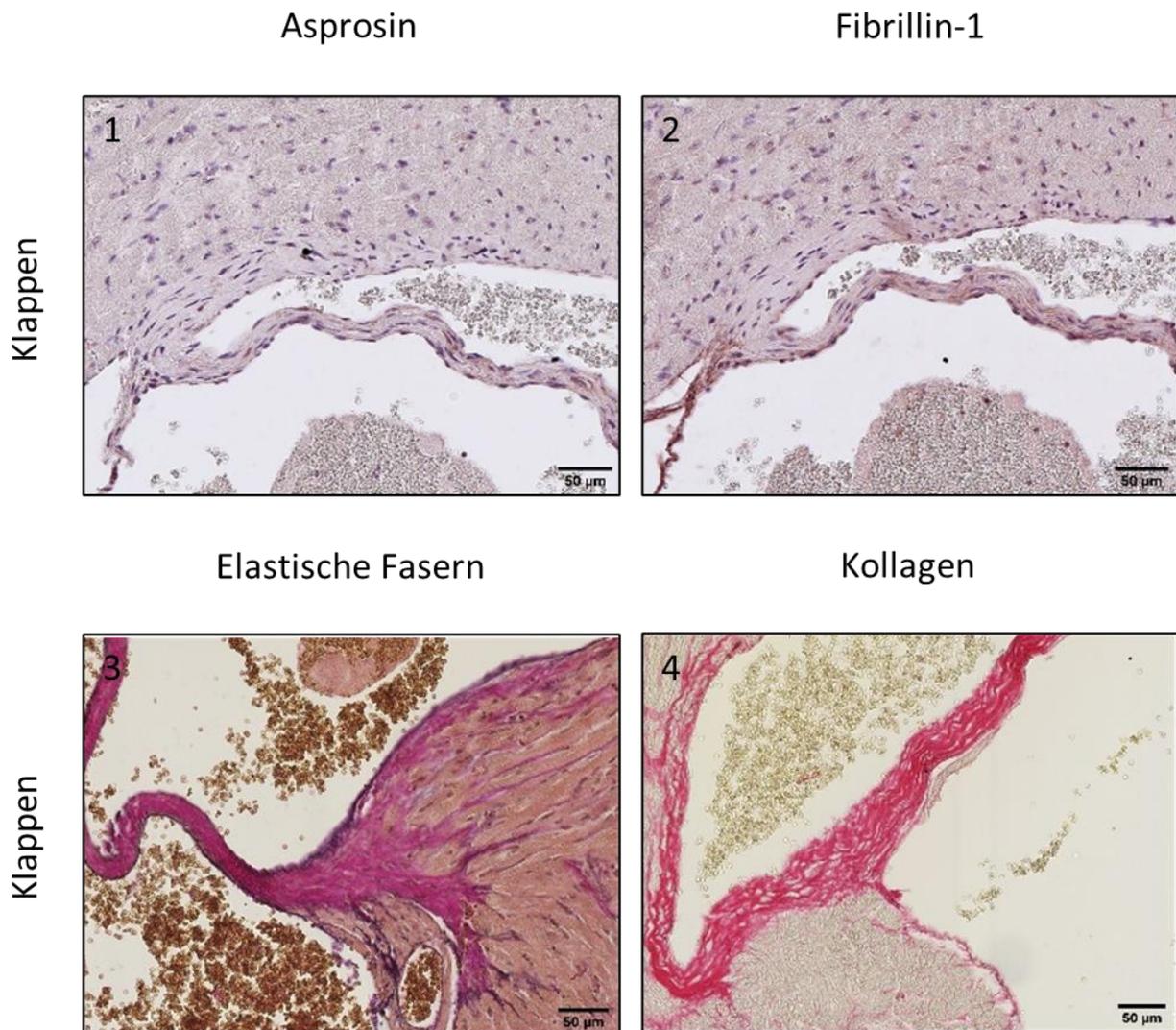


Abbildung 21 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der Herzklappen von Versuchstieren der RUN-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin und Fibrillin-1 am Endokard der Herzklappen (1 & 2). Elastische Fasern und Fibrillin-1 zeigten sich auch zentraler in den Herzklappen und am Anulus fibrosus. Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

An den Blutgefäßen der RUN-Gruppe zeigte sich Asprosin am Endothel und an der Membrana elastica interna (Abbildung 22.1). Fibrillin-1, elastische Fasern und Kollagenfasern waren an der Membrana elastica interna und im perivaskulären Bindegewebe ebenfalls nachzuweisen (Abbildung 22.2 – 22.4).

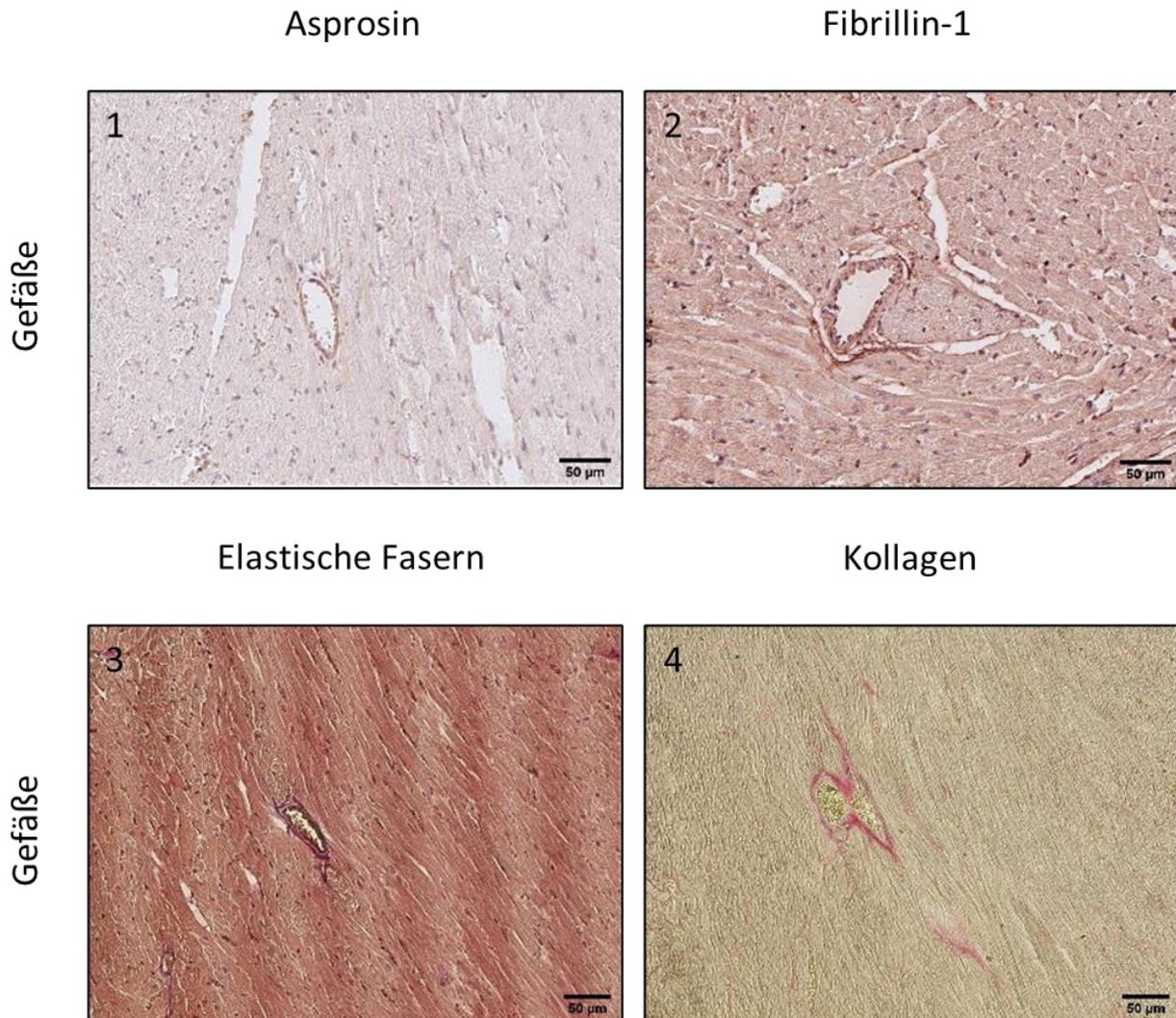


Abbildung 22 Dargestellt sind Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Asprosin (braun, 1) und Fibrillin-1 (braun, 2). Elastische Fasern wurden mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung (schwarz, 3) und Kollagen mit einer Sirius-Red-Färbung (rot, 4) gefärbt. Es handelt sich um 5 µm dicke Schnitte der Blutgefäße von Versuchstieren der RUN-Gruppe. Es zeigte sich eine Färbung für Asprosin am Endothel und an der Membrana elastica interna. Fibrillin-1, elastische Fasern und Kollagen zeigten sich in der Membrana elastica interna und im perivaskulären Bindegewebe (2 – 4). Die Aufnahmen wurden mithilfe des NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner aufgenommen und es wurden mit der Software QuPath beispielhafte Ausschnitte ausgewählt (N=15 pro Färbung).

Bei der qualitativen histologischen Analyse konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation von Asprosin bei SD, DIO und RUN festgestellt werden. Asprosin zeigte sich in allen Gruppen insbesondere am Endokard, an Blutgefäßen und deren Endothel, an Zellkernen der Kardiomyozyten sowie extrazellulär in einer faser-ähnlichen Verteilung, die mit dem Färbemuster von Fibrillin-1 vergleichbar war.

#### 4.7. Asprosin in menschlichen Kardiomyozyten

Um zu untersuchen, ob Asprosin in Kardiomyozyten gebildet wird, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung menschlicher Kardiomyozyten durchgeführt, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen stammen. Die Färbung für Troponin T war positiv und bestätigte die korrekte Differenzierung in menschliche Kardiomyozyten (Abbildung 23.2). Asprosin war im Zytoplasma und hauptsächlich um den Zellkern herum zu finden (Abbildung 23.1).

Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch Asprosin im Kulturmedium auszuschließen, wurde in separaten Experimenten durch andere Mitarbeitende der Arbeitsgruppe das Vorliegen von Asprosin im Kulturmedium mittels Western Blot ausgeschlossen.

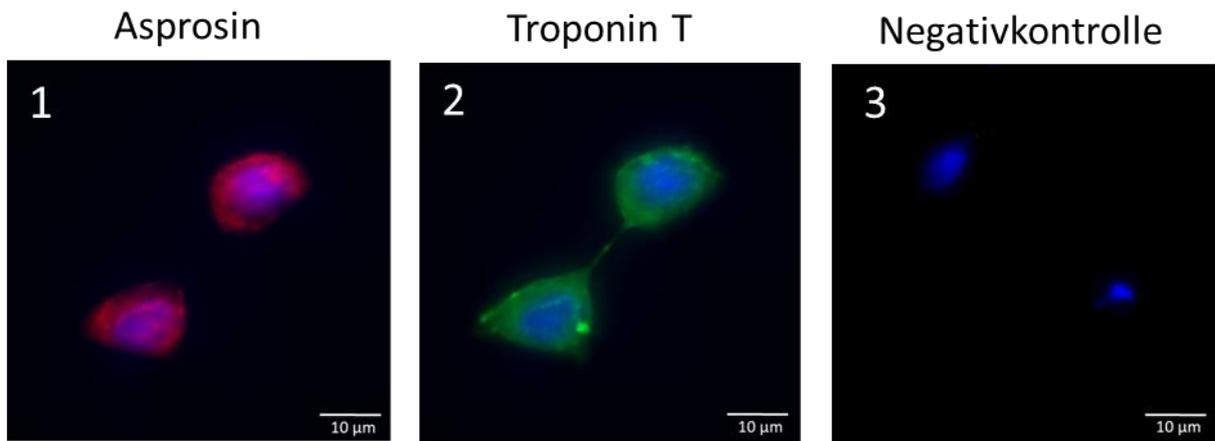


Abbildung 23 Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen humaner Kardiomyozyten. Die Färbung wurde mit DAPI und einem Antikörper gegen Asprosin (1) (rot) und Troponin T (2) (grün) durchgeführt. Die Negativkontrolle (3) wurde ohne Primärantikörper gefärbt. Die Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX53 aufgenommen und mithilfe der Software ImageJ ausgewählt.

## 5. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland, obwohl die Hauptrisikofaktoren wie beispielsweise Adipositas und protektive Faktoren wie Sport für diese Gruppe von Erkrankungen erforscht und veränderbar sind <sup>1,3</sup>. Das kürzlich entdeckte Protein-hormon Asprosin ist bekannt dafür, unter anderem den Appetit und den Blutzucker zu regulieren <sup>113</sup>. Allerdings steht auch die wechselseitige Beziehung zwischen Asprosin und dem kardiovaskulären System zunehmend im wissenschaftlichen Fokus <sup>113</sup>.

Die vorliegende Arbeit verfolgte deshalb das Ziel, neue Erkenntnisse bezüglich der Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzen unter verschiedenen metabolischen Bedingungen zu gewinnen.

### 5.1. Tiermodell und Phänotypisierung

Zu diesem Zweck wurde ein Mausmodell mit männlichen Wildtypmäusen genutzt, welche in eine Standarddiätgruppe (SD), eine Diät-induzierte Adipositas-Gruppe (DIO) mit einer „westlichen“ Nahrungszusammensetzung und eine Gruppe mit freiwilligem Laufradtraining (RUN) eingeteilt wurden.

Die Mäuse der DIO-Gruppe waren signifikant schwerer und die Mäuse der RUN-Gruppe signifikant leichter als die Mäuse der SD-Gruppe. Bei der gemessenen Nahrungsaufnahme in kcal zeigten sich hingegen keine Gruppenunterschiede. Die Mäuse der RUN-Gruppe nutzten ihr Laufrad und liefen durchschnittlich 8,75 km pro Tag. Bei den Glukosetoleranztests zeigten die DIO-Mäuse eine eingeschränkte Glukosetoleranz. Durch die signifikanten Differenzen in Bezug auf das Körpergewicht, die absolvierte Laufstrecke und die Glukosetoleranztests wurden die Voraussetzungen für die weiteren Untersuchungen als gegeben angesehen, da das Tiermodell die angestrebten metabolischen Veränderungen zuverlässig induzieren konnte.

### 5.2. Ventrikuläre Struktur und Kollagenakkumulation

Die Vermessung der Dimensionen des linken Ventrikels zeigten weder im horizontalen oder vertikalen Durchmesser noch in der Dicke des interventrikulären Septums oder der linksventrikulären freien Wand signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Daten weichen von den Ergebnissen anderer Studien ab, die bei Übergewicht eine Hypertrophie und Dilatation der Ventrikel zeigen konnten <sup>59-63</sup>. Auch Sport kann bekanntlich zu physiologisch oder pathologisch veränderten kardialen Dimensionen führen <sup>52-54</sup>. Im Vergleich zu anderen Mausstudien, welche die Hypertrophie des Herzens durch freiwilliges Laufradtraining beschrieben, wurden ähnliche Distanzen und eine ähnliche Dauer der Intervention erreicht. Allerdings wurde

in dieser Arbeit nicht das Herzgewicht gemessen, sondern auf histologische Weise versucht, eine Hypertrophie festzustellen<sup>114,115</sup>. Auf die Schwierigkeiten dieser Methodik wird später eingegangen. Diese erwähnte Abweichung zu anderen Studien, die eine kardiale Hypertrophie bei Adipositas beschreiben, ist möglicherweise auf das junge Alter der Mäuse (70 Tage) bei den vorliegenden Experimenten oder auf ein noch gering ausgeprägtes Übergewicht im Vergleich zur SD-Gruppe zurückzuführen, da die Dauer des Übergewichts und der BMI mit dem Grad der kardialen Hypertrophie korrelieren<sup>60,61</sup>. Viele Ergebnisse in der Literatur sind bislang nur in Menschen gezeigt worden. Im Mausmodell konnte bei übergewichtigen Mäusen eine Hypertrophie mit Hilfe der Echokardiografie nachgewiesen werden<sup>63</sup>. Diese Methode bietet den Vorteil, dass sie wenig invasiv ist, bei lebendigen Tieren durchgeführt werden kann und zusätzlich zu den Dimensionen auch näherungsweise die Herzfunktion bestimmt werden kann. In der hier angewendeten Methode zeigten sich des Weiteren Schwierigkeiten, da sich die in Paraffin eingebetteten Herzen zum Teil verformt hatten. Außerdem erwies es sich als schwierig, in jedem Herzen exakt die gleiche Schnittebene zu erreichen, auch wenn dies für eine möglichst hohe Vergleichbarkeit stets genauestens versucht wurde.

Zusammenfassend muss an dieser Stelle die verwendete Methodik kritisch hinterfragt werden, sodass rückblickend eine Messung der Herzgewichte eine einfachere und eventuell aussagekräftigere Methode gewesen wäre. Dahingegen hätte die Echokardiografie zusätzliche Erkenntnisse über die Herzfunktion geliefert, wäre aber gleichzeitig mit einer aufwändigen Durchführung durch speziell geschultes Personal verbunden gewesen.

### **5.3. Kardiale Fibrose**

Um den Grad der kardialen Fibrose zu bestimmen, wurden Sirius-Red-gefärbte Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. So konnte der relative Anteil des Kollagens am Myokard semiquantitativ bestimmt und verglichen werden. Dies erfolgte in Anlehnung an Vogel et al.<sup>111</sup>. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im relativen Kollagengehalt zwischen den Gruppen. Die mauserperimentellen Belege, die für eine deutliche kardiale Fibrose sprechen, entstammen überwiegend Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen<sup>116</sup>. In Mausmodellen mit Diät-induziertem Übergewicht brauchte es beispielsweise 6-16 Monate, um eine signifikante Fibrose des Myokards zu induzieren<sup>116</sup>. Im Vergleich dazu waren die hier genutzten Mäuse deutlich jünger und haben über eine wesentlich kürzere Zeit DIO-Futter erhalten, sodass sich die Effekte vermutlich noch nicht zeigen konnten. Dass körperliches Training vor einer überschießenden kardialen Fibrosierung schützt, konnte insbesondere für Krankheitszustände wie nach Herzinfarkten gezeigt werden<sup>117</sup>. Da es sich bei den für diese

Forschung genutzten Mäusen um gesunde Versuchstiere handelte, ist es daher wenig überraschend, dass im Vergleich der RUN- und der gesunden SD-Gruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der kardialen Fibrose deutlich wurden.

#### **5.4. *FBN1*- und Asprosin-Expression bei SD, DIO und RUN**

Romere et al. untersuchten die *FBN1*-Expression in verschiedenen Geweben und fanden diese unter anderem im Herzen stark ausgeprägt<sup>70</sup>. Um die relative *FBN1*-Expression unter verschiedenen metabolischen Bedingungen zu beurteilen, wurden qPCR-Analysen der Atria, Ventrikel und Herzspitzen durchgeführt, wobei sich auf keiner der Ebenen Unterschiede zwischen SD, DIO und RUN zeigten. Diese Ergebnisse werden im Folgenden in Zusammenhang mit der Asprosin-Expression gesetzt.

In den Western Blot-Analysen, die verwendet wurden, um in den drei Herzebenen eine Asprosin-Expression nachzuweisen und Unterschiede zwischen den verschiedenen metabolischen Bedingungen zu untersuchen, fand sich in allen Ebenen des Herzens eine Asprosin-Expression. Es ließen sich auf Ebene der Vorhöfe und Herzspitzen keine signifikanten Unterschiede zwischen SD, DIO und RUN feststellen. In den Ventrikeln zeigte sich hingegen die relative Asprosin-Expression in der DIO-Gruppe signifikant erhöht.

In diesem Kontext stellt sich die Frage, warum die Asprosin-Expression bei stabiler *FBN1*-Expression erhöht war, da das *FBN1*-Gen für Asprosin und Fibrillin-1 kodiert<sup>70</sup>. Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression sind eine weithin bekannte Beobachtung und könnten durch eine post-transkriptionelle, translationale oder post-translationale Regulation erklärt werden<sup>118</sup>. Hurley et al. (2018) zeigten, dass die zirkadiane Oszillation von Proteinen, die an Stoffwechselprozessen beteiligt sind, von post-transkriptioneller Regulation dominiert wird<sup>119</sup>. Da Asprosin bekanntermaßen einem zirkadianen Rhythmus folgt und an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt ist, könnte die post-transkriptionelle Regulation möglicherweise auch die Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression von Asprosin erklären<sup>70,113</sup>. Auch ein Vergleich der relativen Proteinexpression von Asprosin und Fibrillin-1 hätte aufschlussreich sein können. Dieser wurde in Western Blot-Analysen versucht, konnte jedoch trotz vielfachen Veränderungen der Methodik nicht erfolgreich durchgeführt und ausgewertet werden, was möglicherweise auf die Größe von Fibrillin-1 als strukturgebendes Protein der Extrazellulär-Matrix zurückzuführen ist.

Insgesamt deckt sich die erhöhte ventrikuläre Asprosin-Expression bei Adipositas mit zahlreichen Studien, die erhöhte Asprosin Spiegel bei Übergewicht feststellen und sogar mit dem BMI korrelieren konnten<sup>88,89</sup>. Bisher wurde allerdings nur das Fettgewebe für seine Produktion diskutiert<sup>113</sup>. Die hier dargelegten Ergebnisse geben erste Hinweise auf die kardiale Rolle bei

erhöhtem Plasma-Asprosin bei Adipositas. Es ist jedoch möglich, dass kardiales Asprosin nicht vollständig in den Kardiomyozyten exprimiert wird, sondern auch aus anderen Organen auf vasokrine oder parakrine Weise dorthin transportiert wird. Insbesondere epikardiales Fettgewebe ist dafür bekannt, dass es das Herz durch vasokrine und parakrine Hormonsekretion beeinflusst <sup>120</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass Adipositas eine Zunahme der ektopischen Lipidakkumulation im Herzen verursachen kann <sup>121,122</sup>. Somit könnten sowohl das Herz als auch das epikardiale Fettgewebe als Asprosinquelle fungieren und die Effekte von Asprosin im Herzen auslösen. Die Frage, ob der verstärkte Nachweis von Asprosin im Western Blot durch erhöhte Plasma-Asprosinpiegel und ein dadurch verstärktes Vorkommen im Herzen oder durch eine gesteigerte Asprosin-Expression im Herzen zustande kommt, lässt sich mit der gewählten Methodik nicht eindeutig beantworten.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum die Asprosin-Expression nur auf Ebene der Ventrikel bei DIO erhöht war. Auf diese Frage soll bei der Untersuchung der Lokalisierung von Asprosin eingegangen werden.

Die Effekte körperlichen Trainings auf zirkulierende Asprosinpiegel sind insgesamt heterogen und scheinen von der jeweiligen Art und Dauer der jeweiligen Intervention und des Geschlechts des Studienkollektivs abhängig zu sein <sup>104–110</sup>. Insgesamt fand sich allerdings nur eine tierexperimentelle Studie, bei der in Ratten mit metabolischem Syndrom gezeigt werden konnte, dass ein chronisches Schwimmtraining zu erniedrigten Asprosinspiegeln im Plasma führt <sup>108</sup>. Das hier verwendete Kollektiv bestand jedoch aus gesunden Mäusen, die ein freiwilliges Laufradtraining absolvierten. Zudem wurde explizit die kardiale Asprosin-Expression untersucht, sodass sich diese Ergebnisse nicht ausreichend vergleichen lassen.

Zusammenfassend lassen sich durch diese Ergebnisse die anfangs aufgeworfenen Fragen, ob Asprosin im Herzen nachweisbar ist und ob sich die Asprosin-Expression im Herzen durch eine Nahrungsintervention oder eine Intervention mit freiwilligem Laufradtraining verändert, beantworten. In den Western Blot-Analysen konnte eindeutig Asprosin in den Herzen nachgewiesen werden. Das durchgeführte Laufradtraining schien keine signifikante Veränderung in der Asprosin-Expression im Herzen zu bewirken, wohingegen durch Diät-induzierte Adipositas (DIO) die Asprosin-Expression im Ventrikel signifikant erhöht war.

## **5.5. Regionsspezifische Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzgewebe**

Um die Asprosin-Expression im Herzen genauer zu lokalisieren, führten wir zuerst Western Blot-Analysen zum Vergleich der Atria, Ventrikel und Herzspitzen durch. In diesen fand sich unter allen metabolischen Bedingungen eine signifikant erhöhte relative Asprosin-Expression

in den Ventrikeln und der Herzspitze im Vergleich zu den Vorhöfen. Um diese regionsabhängigen Unterschiede zu erklären, kann möglicherweise der Vergleich mit einem anderen im Herzen produzierten Hormon helfen.

Das natriuretische Peptid vom B-Typ, ein kardial ausgeschüttetes Hormon, welches insbesondere bei Herzinsuffizienz erhöht ist, kann als Marker für ein erhöhtes Risiko bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie verwendet werden <sup>123</sup>. Während ein erhöhtes BNP bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist, sind höhere Asprosinpiegel mit weniger negativen kardiovaskulären Vorfällen in diesem Kollektiv assoziiert<sup>84,123</sup>. Für BNP konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ausschüttung stark mit der Wandspannung assoziiert ist <sup>124</sup>. Möglicherweise lässt sich die regionsabhängige Asprosin-Expression, die in den Ventrikeln und Herzspitzen signifikant erhöht war, durch ähnliche Mechanismen erklären. Letztere weisen eine deutlich größere Druckbelastung (insbesondere im linken Ventrikel) als die Vorhöfe auf <sup>125</sup>. Interessanterweise geht auch Adipositas mit signifikanten hämodynamischen Veränderungen einher, die eine ventrikuläre Dilatation und eine erhöhte ventrikuläre Belastung bewirken <sup>57,65</sup>. Da diese Veränderungen hauptsächlich auf ventrikulärer Ebene stattfinden, könnte dies die Tatsache erklären, dass die Asprosin-Expression bei Adipositas nur auf ventrikulärer Ebene signifikant erhöht war.

Eine weitere Erklärung für die Ebenen-spezifischen Unterschiede in der Asprosin-Expression könnte die zelluläre Heterogenität des Herzgewebes sein, welches hauptsächlich aus Endothelzellen, Perizyten, glatten Muskelzellen, kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten besteht <sup>126,127</sup>. Ventrikel und Apex enthalten weniger Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen, aber dafür mehr glatte Muskelzellen, Perizyten und Kardiomyozyten als die Vorhöfe <sup>10</sup>. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Großteil des Asprosin im Herzen von Kardiomyozyten produziert wird, die den Hauptbestandteil des ventrikulären und apikalen Gewebes bilden <sup>10</sup>.

Durch die Ergebnisse der Western Blot-Analysen konnte die Frage nach Unterschieden in der Asprosin-Expression in den verschiedenen Ebenen des Herzens eindeutig beantwortet werden. Zu den Ursachen dieser Unterschiede in der Asprosin-Expression wurden verschiedene Hypothesen diskutiert, die in zukünftigen Arbeiten überprüft werden sollten.

## **5.6. Lokalisierung von Asprosin im Vergleich zu Fibrillin-1, elastischen Fasern und Kollagen**

Eine detaillierte Analyse der Asprosin-Lokalisierung zeigte insbesondere ein starkes Signal am Endothel der Blutgefäße und am Endokard. Einerseits könnte die Asprosin-Immunreaktivität in Endothelzellen auf die Aufnahme von Asprosin aus dem Blutkreislauf zurückzuführen sein, da das Fettgewebe bekanntermaßen eine Hauptquelle für zirkulierendes Asprosin ist <sup>70</sup>.

Andererseits wurden in einer weiteren Studie bereits plazentare endotheliale BeWo-Zellen und endotheliales Plazentagewebe als Quelle von Asprosin diskutiert, sodass auch eine Produktion von Asprosin im Endothel der kardialen Blutgefäße möglich wäre <sup>128</sup>. Eine Vielzahl von Studien beschreibt den Zusammenhang zwischen Asprosin und Arteriosklerose beziehungsweise ihren zahlreichen Manifestationen und Folgen. So konnten sowohl bei Patienten mit arteriosklerotischen Plaques der Arteria Carotis und Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit als auch bei solchen mit koronarer Herzkrankheit, der Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien, erhöhte Asprosin Spiegel festgestellt werden <sup>76,77,81</sup>. Ein wesentlicher Mechanismus für die Entstehung der Arteriosklerose ist die Transition von Endothel zu Mesenchym <sup>81</sup>. You et al. konnten in einer Zellkulturstudie mit humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene zeigen, dass Asprosin diese Transition über TGF- $\beta$  induziert <sup>81</sup>. In einer weiteren Studie in derselben Zelllinie und bei Ratten konnte zudem gezeigt werden, dass Asprosin auf Endothelzellen über den IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ Bp65-Signalweg pro-inflammatorisch wirkt <sup>82</sup>. Die endotheliale Inflammation ist ebenso als wichtiger Entstehungsmechanismus der Arteriosklerose bekannt <sup>129</sup>. Es erscheint damit möglich, dass der von uns festgestellte hohe Asprosin Gehalt in Endothelzellen kardialer Blutgefäße ebenfalls mit der Modulation von Entzündungsprozessen sowie der endothelialen Transition zu Mesenchym in den Herzkranzgefäßen zusammenhängt, sodass Asprosin eine entscheidende Rolle in der Arterioskleroseentwicklung und der Entstehung der koronaren Herzkrankheit spielt.

In den hier vorliegenden Färbungen zeigte sich für Asprosin ein Färbemuster, das auf eine faserartige Struktur hinweist sowie eine teilweise auftretende Co-Lokalisierung von Asprosin mit Fibrillin-1. Diese erscheint plausibel, da Asprosin das C-terminale Spaltprodukt von Pro-fibrillin-1 ist und während oder unmittelbar nach dessen Sekretion durch die Protease Furin gespalten wird <sup>71,130</sup>. Nach jetzigem Wissensstand scheint für jedes Fibrillin-1-Molekül auch ein Asprosin-Molekül produziert zu werden, da keine alternativen Spleißmechanismen bekannt sind <sup>131</sup>. Da die Wirkung von Asprosin hochdynamisch unter anderem die Blutglukosespiegel reguliert und von externen Signalen abhängig ist <sup>70,73</sup>, Fibrillin-1 aber ein relativ stabiler Bestandteil der ECM ist <sup>132</sup>, bedarf es eines Mechanismus zur Speicherung und Freisetzung von bereits produziertem Asprosin. Das faserartige Färbemuster sowie die Co-Lokalisierung von Asprosin und Fibrillin-1 könnte darauf hindeuten, dass Asprosin selbst in der ECM in einer faserartigen Form gespeichert wird oder noch mit Fibrillin-1 verbunden ist und erst nach einer spezifischen externen Signalisierung freigesetzt wird. Unsere Studie gibt somit einen ersten Hinweis auf die Speicherung von Asprosin in der ECM. Diese sollte in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

Da die IHC-Färbungen für Asprosin eine sehr hohe Variabilität innerhalb der Gruppen aufwiesen, war eine semi-quantitative Auswertung nicht aussagekräftig. Deshalb beschränkten wir

uns auf eine qualitative Beschreibung der Asprosinlokalisierung. Weitere interessante Fragestellungen wie gruppenspezifische Unterschiede im endothelialen Asprosinvorkommen konnten somit nicht untersucht werden.

Mit Hilfe der histologischen Analyse konnten weitere Belege für das Vorkommen von Asprosin im Herzen gefunden werden. Zusätzlich konnten die genaue Lokalisation von Asprosin mit einem faserartigen Muster im Myokard, welches dem Verteilungsmuster von Fibrillin-1 ähnelt, und einem starken Signal für Asprosin am Endokard an den Endothelzellen der Blutgefäße sowie um die Blutgefäße beschrieben werden.

### **5.7. Asprosin in menschlichen Kardiomyozyten**

Um die eingangs gestellte Frage zu beantworten, ob Asprosin in Kardiomyozyten produziert wird, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung humaner Kardiomyozyten genutzt, in der eine eindeutige Immunreaktivität von Asprosin nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde durch die Analyse des zugesetzten FBS ausgeschlossen, dass die Zellen Asprosin aus den Komponenten des Kulturmediums aufgenommen haben. Dies deutet darauf hin, dass Asprosin in menschlichen Kardiomyozyten produziert werden könnte. Unklar bleibt jedoch, ob dieses produzierte Asprosin hauptsächlich auf autokrine, parakrine oder endokrine Weise wirkt. Anhand unserer Methodik lässt sich nicht beurteilen, wie hoch der Anteil an Asprosin aus dem Herzen im Vergleich zum gesamten zirkulierenden Asprosin ist und welche metabolische Bedeutung kardial produziertem Asprosin systemisch zukommt. Um diese Fragen zu beantworten, wäre beispielsweise ein Modell genveränderter Mäuse, die kein kardiales Asprosin produzieren, von Nutzen.

Interessanterweise könnte die Produktion von Asprosin in Kardiomyozyten bedeuten, dass möglicherweise lokal im Herzen, durch autokrin oder parakrin wirkendes Asprosin zusätzlich zum zirkulierenden Asprosin, deutlich höhere Wirkkonzentrationen vorzufinden sind. Feng et al. fanden einen schützenden Effekt der Asprosin-Behandlung auf murine Kardiomyozyten unter Bedingungen mit hohem Glukosevorkommen<sup>85</sup>. Da das ventrikuläre Asprosin unter DIO erhöht war und die Kardiomyozyten in der Lage sind, Asprosin zu produzieren, könnte dies auf einen Selbstschutzmechanismus durch Asprosin unter Adipositas und diabetischen Bedingungen hinweisen. Es stellt sich infolgedessen die Frage, ob es metabolische Faktoren gibt, welche die Asprosinproduktion im Herzen induzieren und damit die Ursache für die erhöhte ventrikuläre Asprosin-Expression bei DIO erklären. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 5.8. Ausblick

Der weltweit immense Einfluss der „noncommunicable diseases“ und davon insbesondere der Herz-Kreislaufkrankungen stellt das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen. Ein zusätzlicher Faktor in der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen scheint Asprosin zu sein, welches mit dem kardiovaskulären System sowie negativen und positiven Einflussfaktoren wie Adipositas, Diabetes oder körperlichem Training multifaktoriell wechselwirkt. Da Asprosin erst 2016 entdeckt wurde, fehlt allerdings noch viel Grundlagenwissen zu dem Hormon und seiner Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem. Deshalb bestand das Ziel dieser Forschungsarbeit darin, Wissen über die Synthese von Asprosin im Herzen, die regionale Verteilung und die Veränderungen in der Asprosin-Expression unter Adipositas und Sport zu generieren.

Es konnte dargelegt werden, dass die Expression und Lokalisierung von Asprosin im Herzen von der jeweiligen Region abhängig ist, dass Kardiomyozyten eine Quelle für Asprosin sein können und dass der Asprosin-Gehalt auf Ventrikel-Ebene bei Diät-induzierter Adipositas erhöht ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführte Forschung durch die Untersuchung der Expression und Lokalisierung von Asprosin unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen zum weiteren Verständnis von Asprosin und seiner Funktion im Herzen beiträgt. Die vorliegenden Ergebnisse liefern Erklärungsansätze für die kardio-protectiven Wirkungen von Asprosin und seine Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose. Außerdem wurden mögliche Mechanismen der kardialen Asprosin-Speicherung und Wirkung im Herzen diskutiert, die in Zukunft untersucht werden sollten. Der Bedarf an weiteren Studien zur Wechselwirkung von Asprosin mit dem kardiovaskulären System ist weiterhin groß, denn bevor Asprosin, wie diskutiert, als medikamentöser Therapieansatz oder Biomarker für Herz-Kreislaufkrankungen in den klinischen Alltag einziehen kann, müssen ein tieferes Verständnis seiner Wirkweise, Einflussfaktoren, Produktion und Speicherung erfolgen und somit viele der im Rahmen dieser Arbeit aufgeworfenen Fragen beantwortet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Hunter DJ, Reddy KS. Noncommunicable Diseases. *New England Journal of Medicine* 2013; **369**: 1336–43.
- 2 World Health Organization (WHO). Non communicable diseases. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (accessed Aug 15, 2023).
- 3 Statistisches Bundesamt. Todesursachen. [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html) (accessed Aug 21, 2023).
- 4 World Health Organization (WHO). Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2022. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240047761> (accessed Aug 21, 2023).
- 5 Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Innere Organe LernAtlas Anatomie, 4. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2015.
- 6 Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. Physiologie, 6. Auflage. München: Elsevier, 2013.
- 7 Welsch U, Deller T. Histologie - Lehrbuch Histologie, 3. Auflage. München: Elsevier, 2010.
- 8 Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides* 2019; **111**: 18–25.
- 9 Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovascular Research* 2006; **69**: 318–28.
- 10 Litviňuková M, Talavera-López C, Maatz H, *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* 2020; **588**: 466–72.
- 11 Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987; **252**: C1-9.
- 12 Cw D, Je J, Js J, *et al.* Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovascular research* 1988; **22**. DOI:10.1093/cvr/22.10.686.
- 13 Weber KT, Janicki JS, Pick R, *et al.* Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium. *Circulation* 1987; **75**: 140-47.
- 14 Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, *et al.* Type IV procollagen missense mutations associated with defects of the eye, vascular stability, the brain, kidney function and embryonic or post-natal viability in the mouse, *Mus musculus*: an extension of the Col4a1 allelic series and the identification of the first two Col4a2 mutant alleles. *Genetics* 2007; **175**: 725–36.
- 15 Lincoln J, Alfieri CM, Yutzey KE. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev Dyn* 2004; **230**: 239–50.
- 16 Lincoln J, Florer JB, Deutsch GH, Wenstrup RJ, Yutzey KE. ColVa1 and ColXIa1 are required for myocardial morphogenesis and heart valve development. *Developmental Dynamics* 2006; **235**: 3295–305.
- 17 Kern CB, Twal WO, Mjaatvedt CH, *et al.* Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis. *Dev Dyn* 2006; **235**: 2238–47.

- 18Twal WO, Czirok A, Hegedus B, *et al.* Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4587–98.
- 19Mjaatvedt CH, Lepera RC, Markwald RR. Myocardial specificity for initiating endothelial-mesenchymal cell transition in embryonic chick heart correlates with a particulate distribution of fibronectin. *Dev Biol* 1987; **119**: 59–67.
- 20Icardo JM, Nakamura A, Fernandez-Teran MA, Manasek FJ. Effects of injecting fibronectin and antifibronectin antibodies on cushion mesenchyme formation in the chick. An in vivo study. *Anat Embryol (Berl)* 1992; **185**: 239–47.
- 21Steijns F, van Hengel J, Sips P, De Backer J, Renard M. A heart for fibrillin: spatial arrangement in adult wild-type murine myocardial tissue. *Histochem Cell Biol* 2018; **150**: 271–80.
- 22Pelouch V, Dixon IMC, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 1993; **129**: 101–20.
- 23Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2011; **91**: 535–50.
- 24Frangogiannis NG. The extracellular matrix in ischemic and non-ischemic heart failure. *Circ Res* 2019; **125**: 117–46.
- 25Kwak H-B. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil* 2013; **9**: 338–47.
- 26Sakai LY, Keene DR, Renard M, De Backer J. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene* 2016; **591**: 279–91.
- 27Cain SA, Morgan A, Sherratt MJ, Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Proteomic analysis of fibrillin-rich microfibrils. *PROTEOMICS* 2006; **6**: 111–22.
- 28Jensen SA, Handford PA. New insights into the structure, assembly and biological roles of 10–12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies. *Biochemical Journal* 2016; **473**: 827–38.
- 29Campens L, Renard M, Trachet B, *et al.* Intrinsic cardiomyopathy in Marfan syndrome: results from in-vivo and ex-vivo studies of the Fbn1C1039G/+ model and longitudinal findings in humans. *Pediatr Res* 2015; **78**: 256–63.
- 30Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol* 2012; **2**: 1143–211.
- 31Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, *et al.* 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2021; **42**: 3227–337.
- 32Kraus WE, Powell KE, Haskell WL, *et al.* Physical Activity, All-Cause and Cardiovascular Mortality, and Cardiovascular Disease. *Med Sci Sports Exerc* 2019; **51**: 1270–81.
- 33Powell KE, King AC, Buchner DM, *et al.* The Scientific Foundation for the Physical Activity Guidelines for Americans, 2nd Edition. *J Phys Act Health* 2018; : 1–11.
- 34Liu Y, Lee D-C, Li Y, *et al.* Associations of Resistance Exercise with Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality. *Med Sci Sports Exerc* 2019; **51**: 499–508.
- 35Saeidifard F, Medina-Inojosa JR, West CP, *et al.* The association of resistance training with mortality: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2019; **26**: 1647–65.

- 36Ortega FB, Silventoinen K, Tynelius P, Rasmussen F. Muscular strength in male adolescents and premature death: cohort study of one million participants. *BMJ* 2012; **345**: e7279.
- 37Volaklis KA, Halle M, Meisinger C. Muscular strength as a strong predictor of mortality: A narrative review. *Eur J Intern Med* 2015; **26**: 303–10.
- 38Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget* 2015; **6**: 20773–84.
- 39Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 2004; **36**: 533–53.
- 40Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV. Walking, lipids, and lipoproteins: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Prev Med* 2004; **38**: 651–61.
- 41Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 2001; **286**: 1218–27.
- 42Kim C, Choi HE, Lim MH. Effect of High Interval Training in Acute Myocardial Infarction Patients with Drug-Eluting Stent. *Am J Phys Med Rehabil* 2015; **94**: 879–86.
- 43Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, Beniamini Y, Rosenschein U, Sagiv M. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *Int J Cardiol* 2005; **100**: 93–9.
- 44Kjølhede T, Dalgas U, Gade AB, *et al.* Acute and chronic cytokine responses to resistance exercise and training in people with multiple sclerosis. *Scand J Med Sci Sports* 2016; **26**: 824–34.
- 45Rodrigues B, Lira FS, Consolim-Colombo FM, *et al.* Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 702473.
- 46Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2005; **18**: 335–50.
- 47Li J, Zhang H, Zhang C. Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol* 2012; **52**: 865–72.
- 48Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**: 1913–28.
- 49Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012; **2012**: 756132.
- 50Wang H, Bei Y, Lu Y, *et al.* Exercise Prevents Cardiac Injury and Improves Mitochondrial Biogenesis in Advanced Diabetic Cardiomyopathy with PGC-1 $\alpha$  and Akt Activation. *Cell Physiol Biochem* 2015; **35**: 2159–68.
- 51Le Douairon Lahaye S, Bekono FR, Broderick T. Physical activity and diabetic cardiomyopathy: myocardial adaptation depending on exercise load. *Curr Diabetes Rev* 2014; **10**: 371–90.

- 52 Riehle C, Wende AR, Zhu Y, *et al.* Insulin receptor substrates are essential for the bioenergetic and hypertrophic response of the heart to exercise training. *Mol Cell Biol* 2014; **34**: 3450–60.
- 53 Luijkx T, Cramer MJ, Prakken NHJ, *et al.* Sport category is an important determinant of cardiac adaptation: an MRI study. *Br J Sports Med* 2012; **46**: 1119–24.
- 54 Sharma S, Merghani A, Mont L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J* 2015; **36**: 1445–53.
- 55 Eilat-Adar S, Sinai T, Yosefy C, Henkin Y. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. *Nutrients* 2013; **5**: 3646–83.
- 56 Mathieu P, Pibarot P, Larose É, Poirier P, Marette A, Després J-P. Visceral obesity and the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; **40**: 821–36.
- 57 Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; **4**: 436–43.
- 58 Karason K, Wallentin I, Larsson B, Sjöström L. Effects of obesity and weight loss on left ventricular mass and relative wall thickness: survey and intervention study. *BMJ* 1997; **315**: 912–6.
- 59 Amad KH, Brennan JC, Alexander JK. The cardiac pathology of chronic exogenous obesity. *Circulation* 1965; **32**: 740–5.
- 60 Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1991; **266**: 231–6.
- 61 Nakajima T, Fujioka S, Tokunaga K, Hirobe K, Matsuzawa Y, Tarui S. Noninvasive study of left ventricular performance in obese patients: influence of duration of obesity. *Circulation* 1985; **71**: 481–6.
- 62 Alaud-din A, Meterissian S, Lisbona R, MacLean LD, Forse RA. Assessment of cardiac function in patients who were morbidly obese. *Surgery* 1990; **108**: 809–18; discussion 818–820.
- 63 Cittadini A, Mantzoros CS, Hampton TG, *et al.* Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat: an animal model of human obesity. *Circulation* 1999; **100**: 2177–83.
- 64 Mizushige K, Yao L, Noma T, *et al.* Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation* 2000; **101**: 899–907.
- 65 McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS, American College of Physicians and the American Physiological Society. Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med* 2006; **144**: 517–24.
- 66 Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983; **67**: 968–77.
- 67 Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CDA. 'Vasocrine' signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* 2005; **365**: 1817–20.

- 68 Sundell J, Laine H, Luotolahti M, *et al.* Obesity affects myocardial vasoreactivity and coronary flow response to insulin. *Obes Res* 2002; **10**: 617–24.
- 69 Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res* 2018; **122**: 624–38.
- 70 Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, *et al.* Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* 2016; **165**: 566–79.
- 71 Lönnqvist L, Reinhardt D, Sakai L, Peltonen L. Evidence for Furin-type Activity-Mediated C-terminal Processing of Profibrillin-1 and Interference in the Processing by Certain Mutations. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 2039–44.
- 72 Li E, Shan H, Chen L, *et al.* OLFMR734 Mediates Glucose Metabolism as a Receptor of Asprosin. *Cell Metab* 2019; **30**: 319-328.e8.
- 73 Duerrschmid C, He Y, Wang C, *et al.* Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med* 2017; **23**: 1444–53.
- 74 Jung TW, Kim H-C, Kim HU, *et al.* Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKC $\delta$ -activated ER stress and inflammation in skeletal muscle. *Journal of Cellular Physiology* 2019; **234**: 20888–99.
- 75 Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2019; **486**: 96–104.
- 76 Deng X, Zhao Z, Zhao L, *et al.* Association between circulating asprosin levels and carotid atherosclerotic plaque in patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2022; **109–110**: 44–50.
- 77 Moradi N, Fouani FZ, Vatannejad A, Bakhti Arani A, Shahrzad S, Fadaei R. Serum levels of Asprosin in patients diagnosed with coronary artery disease (CAD): a case-control study. *Lipids in Health and Disease* 2021; **20**: 88.
- 78 Güven C, Kafadar H. Evaluation of Plasma Asprosin Concentration in Patients with Coronary Artery Disease. *Braz J Cardiovasc Surg* 2022; **37**: 493–500.
- 79 Serruys PW, Onuma Y, Garg S, *et al.* Assessment of the SYNTAX score in the Syntax study. *EuroIntervention* 2009; **5**: 50–6.
- 80 Acara AC, Bolatkale M, Kızıloğlu İ, İbişoğlu E, Can Ç. A novel biochemical marker for predicting the severity of ACS with unstable angina pectoris: Asprosin. *The American Journal of Emergency Medicine* 2018; **36**: 1504–5.
- 81 You M, Liu Y, Wang B, *et al.* Asprosin induces vascular endothelial-to-mesenchymal transition in diabetic lower extremity peripheral artery disease. *Cardiovasc Diabetol* 2022; **21**: 25.
- 82 Huang Q, Chen S, Xiong X, *et al.* Asprosin Exacerbates Endothelium Inflammation Induced by Hyperlipidemia Through Activating IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ Bp65 Pathway. *Inflammation* 2023; **46**: 623–38.
- 83 Zou J, Xu C, Zhao Z-W, Yin S-H, Wang G. Asprosin inhibits macrophage lipid accumulation and reduces atherosclerotic burden by up-regulating ABCA1 and ABCG1 expression via the p38/Elk-1 pathway. *J Transl Med* 2022; **20**: 337.

- 84Wen M-S, Wang C-Y, Yeh J-K, *et al.* The role of Asprosin in patients with dilated cardiomyopathy. *BMC Cardiovasc Disord* 2020; **20**: 402.
- 85Feng J, Yang Y, Yang Y, Pei H. GW29-e0080 The protective role of Asprosin against diabetes in cardiomyocytes. *Journal of the American College of Cardiology* 2018; **72**: C2.
- 86Zhang Z, Tan Y, Zhu L, *et al.* Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sciences* 2019; **231**: 116554.
- 87Wang X-L, Wang J-X, Chen J-L, *et al.* Asprosin in the Paraventricular Nucleus Induces Sympathetic Activation and Pressor Responses via cAMP-Dependent ROS Production. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; **23**: 12595.
- 88Ugur K, Aydin S. Saliva and Blood Asprosin Hormone Concentration Associated with Obesity. *Int J Endocrinol* 2019; **2019**: 2521096.
- 89Wang C-Y, Lin T-A, Liu K-H, *et al.* Serum asprosin levels and bariatric surgery outcomes in obese adults. *Int J Obes* 2019; **43**: 1019–25.
- 90Cantay H, Binnetoglu K, Gul HF, Bingol SA. Investigation of serum and adipose tissue levels of asprosin in patients with severe obesity undergoing sleeve gastrectomy. *Obesity (Silver Spring)* 2022; **30**: 1639–46.
- 91Sünnetçi Silistre E, Hatipoğlu HU. Increased serum circulating asprosin levels in children with obesity. *Pediatr Int* 2020; **62**: 467–76.
- 92Wang M, Yin C, Wang L, *et al.* Serum Asprosin Concentrations Are Increased and Associated with Insulin Resistance in Children with Obesity. *ANM* 2019; **75**: 205–12.
- 93Corica D, Pepe G, Aversa T, *et al.* Meal-Related Asprosin Serum Levels Are Affected by Insulin Resistance and Impaired Fasting Glucose in Children With Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; **12**: 805700.
- 94Corica D, Aversa T, Currò M, *et al.* Asprosin serum levels and glucose homeostasis in children with obesity. *Cytokine* 2021; **142**: 155477.
- 95Long W, Xie X, Du C, *et al.* Decreased Circulating Levels of Asprosin in Obese Children. *HRP* 2019; **91**: 271–7.
- 96Edrees HM, Morgan EN. ASPROSIN: A RISK FACTOR FOR OBESITY AND METABOLIC DISTURBANCE. *International Journal of Current Research* 2018; **10**.
- 97Zhang L, Chen C, Zhou N, Fu Y, Cheng X. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clin Chim Acta* 2019; **489**: 183–8.
- 98Zhang X, Jiang H, Ma X, Wu H. Increased serum level and impaired response to glucose fluctuation of asprosin is associated with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 2020; **11**: 349–55.
- 99Timurkaan M, Timurkaan ES. Two Important Players for Type 2 Diabetes Mellitus: MetrnI and Asprosin. *Clin Lab* 2022; **68**. DOI:10.7754/Clin.Lab.2021.211015.

- 100 Li X, Liao M, Shen R, *et al.* Plasma Asprosin Levels Are Associated with Glucose Metabolism, Lipid, and Sex Hormone Profiles in Females with Metabolic-Related Diseases. *Mediators of Inflammation* 2018; **2018**: e7375294.
- 101 Alobaidi A, Al-Samarrai R. Correlation between serum asprosin level and oxidative stress in Iraqi patients with type ii diabetes mellitus. *Systematic Reviews in Pharmacy* 2020; **11**: 1729–33.
- 102 Gozel N, Kilinc F. Investigation of plasma asprosin and saliva levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients treated with metformin. *Endokrynol Pol* 2021; **72**: 37–43.
- 103 Jiang A, Feng Z, Yuan L, Zhang Y, Li Q, She Y. Effect of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors on the levels of serum asprosin in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2021; **13**: 34.
- 104 Ceylan Hİ, Saygın Ö, Özel Türkcü Ü. Assessment of acute aerobic exercise in the morning versus evening on asprosin, spexin, lipocalin-2, and insulin level in overweight/obese versus normal weight adult men. *Chronobiol Int* 2020; **37**: 1252–68.
- 105 Wiecek M, Szymura J, Maciejczyk M, Kantorowicz M, Szygula Z. Acute Anaerobic Exercise Affects the Secretion of Asprosin, Irisin, and Other Cytokines - A Comparison Between Sexes. *Front Physiol* 2018; **9**: 1782.
- 106 Morcos YAT, Lütke S, Tenbieg A, *et al.* Sensitive asprosin detection in clinical samples reveals serum/saliva correlation and indicates cartilage as source for serum asprosin. *Sci Rep* 2022; **12**: 1340.
- 107 Seo DY, Ko JR, Bang HS, Han J. Exercise Decreases Hepatic Asprosin in STZ-induced Diabetic Rats. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2020; **104**. DOI:10.1016/j.metabol.2019.12.022.
- 108 Nakhaei H, Mogharnasi M, Fanaei H. Effect of swimming training on levels of asprosin, lipid profile, glucose and insulin resistance in rats with metabolic syndrome. *Obesity Medicine* 2019; **15**: 100111.
- 109 Kantorowicz M, Szymura J, Szygula Z, Kusmierczyk J, Maciejczyk M, Wiecek M. Nordic Walking at Maximal Fat Oxidation Intensity Decreases Circulating Asprosin and Visceral Obesity in Women With Metabolic Disorders. *Front Physiol* 2021; **12**: 726783.
- 110 Jahangiri M, Shahrbanian S, C. Hackney A. Changes in the Level of Asprosin as a Novel Adipocytokine after Different Types of Resistance Training. *Journal of Chemical Health Risks* 2021; **11**: 179–88.
- 111 Vogel B, Siebert H, Hofmann U, Frantz S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX* 2015; **2**: 124–34.
- 112 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- 113 Yuan M, Li W, Zhu Y, Yu B, Wu J. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; **11**: 64.
- 114 Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol (1985)* 2001; **90**: 1900–8.

- 115 Konhilas JP, Maass AH, Luckey SW, Stauffer BL, Olson EN, Leinwand LA. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**: H2768-2776.
- 116 Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Translational Research* 2014; **164**: 323–35.
- 117 Fan D, Kassiri Z. Modulation of Cardiac Fibrosis in and Beyond Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2021; **8**. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.750626> (accessed Aug 23, 2023).
- 118 Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 227–32.
- 119 Hurley JM, Jankowski MS, De Los Santos H, *et al*. Circadian Proteomic Analysis Uncovers Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation in Metabolic Pathways. *Cell Syst* 2018; **7**: 613-626.e5.
- 120 Iacobellis G, Bianco AC. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab* 2011; **22**: 450–7.
- 121 Malavazos AE, Di Leo G, Secchi F, *et al*. Relation of echocardiographic epicardial fat thickness and myocardial fat. *Am J Cardiol* 2010; **105**: 1831–5.
- 122 Gastaldelli A, Basta G. Ectopic fat and cardiovascular disease: what is the link? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; **20**: 481–90.
- 123 Li X, Chen C, Gan F, Wang Y, Ding L, Hua W. Plasma NT pro-BNP, hs-CRP and big-ET levels at admission as prognostic markers of survival in hospitalized patients with dilated cardiomyopathy: a single-center cohort study. *BMC Cardiovascular Disorders* 2014; **14**: 67.
- 124 Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, *et al*. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 742–8.
- 125 Fukuta H, Little WC. The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart Fail Clin* 2008; **4**: 1–11.
- 126 Kohl P. Cardiac cellular heterogeneity and remodelling. *Cardiovasc Res* 2004; **64**: 195–7.
- 127 Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**: H1883-1891.
- 128 Hoffmann T, Morcos YAT, Janoschek R, *et al*. Correlation of metabolic characteristics with maternal, fetal and placental asprosin in human pregnancy. *Endocrine Connections* 2022; **11**. DOI:10.1530/EC-22-0069.
- 129 Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, *et al*. Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; **23**: 3346.
- 130 Jensen SA, Aspinall G, Handford PA. C-terminal propeptide is required for fibrillin-1 secretion and blocks premature assembly through linkage to domains cbEGF41-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 10155–60.

- 131 Muthu ML, Reinhardt DP. Fibrillin-1 and fibrillin-1-derived asprosin in adipose tissue function and metabolic disorders. *J Cell Commun Signal* 2020; **14**: 159–73.
- 132 Summers KM, Bush SJ, Davis MR, Hume DA, Keshvari S, West JA. Fibrillin-1 and asprosin, novel players in metabolic syndrome. *Mol Genet Metab* 2023; **138**: 106979.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Todesursachen nach Krankheitsarten 2021, angelehnt an eine Grafik des Statistischen Bundesamtes .....	11
Abbildung 2 Überblick über die Wirkung von Asprosin. Adaptiert nach Yuan et al. 2020 und Janoschek et al. 2020. ....	15
Abbildung 3 H&E-Färbung ventrikulärer Schnitte.....	33
Abbildung 4 Analyse der linksventrikulären Dimensionen.....	41
Abbildung 5 Fluoreszenzaufnahmen von Picro-Sirius-Red-gefärbten Schnitten .....	42
Abbildung 6 Analyse der relativen Expression des FBN1-Gens .....	43
Abbildung 7 Analyse der relativen Asprosin-Expression in den Vorhöfen .....	44
Abbildung 8 Analyse der relativen Asprosin-Expression in den Ventrikeln .....	45
Abbildung 9 Analyse der relativen Asprosin-Expression in den Herzspitzen .....	46
Abbildung 10 Analyse der relativen Asprosin-Expression unter SD-Bedingungen .....	47
Abbildung 11 Analyse der relativen Asprosin-Expression unter DIO-Bedingungen.....	48
Abbildung 12 Analyse der relativen Asprosin-Expression unter RUN-Bedingungen .....	49
Abbildung 13 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten in den linken Ventrikeln der SD-Gruppe .....	50
Abbildung 14 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Herzklappen der SD-Gruppe.....	51
Abbildung 15 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Blutgefäßen der SD-Gruppe.....	52
Abbildung 16 Lokalisierung von Asprosin in Herzen der SD-Gruppe in 100-facher Vergrößerung .....	53
Abbildung 17 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten in den linken Ventrikeln der DIO-Gruppe.....	54
Abbildung 18 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Herzklappen der DIO-Gruppe. ....	55
Abbildung 19 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Blutgefäßen der DIO-Gruppe .....	56
Abbildung 20 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten in den linken Ventrikeln der RUN-Gruppe .....	57
Abbildung 21 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Herzklappen der RUN-Gruppe. ....	58
Abbildung 22 Lokalisierung von Asprosin und myokardialen ECM-Komponenten an den Blutgefäßen der RUN-Gruppe.....	59

Abbildung 23 Immunfluoreszenzfärbungen humaner Kardiomyozyten für Asprosin.....60

## **7.2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Verwendete Geräte und Software .....	20
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Enzyme.....	22
Tabelle 3 Verwendete Stammlösungen, Gele und Puffer .....	26
Tabelle 4 Verwendete Primer .....	28
Tabelle 5 Verwendete Antikörper für Western Blot .....	29
Tabelle 6 Futterzusammensetzung .....	30
Tabelle 7 Klinische Parameter und Glukosetoleranztests .....	39