

Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Holger Thiele

**Suppression der kardialen Phosphatidat Phosphohydrolase 1 Aktivität und
Lipin 1 mRNA Expression in Zucker diabetic fatty Ratten und
Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Laura Hänsel
aus Hamburg

Lübeck 2016

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Christof Burgdorf
2. Berichterstatter:	Prof. rer. nat. Henrik Oster
Tag der mündlichen Prüfung:	01.02.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.02.2017
- Promotionskommission der Sektion Lübeck -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	5
1.1	Phosphatidat Phosphohydrolase 1	5
1.2	Lipin 1	7
1.3	Pathophysiologie der diabetischen Kardiomyopathie.....	11
1.4	Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	ZDF-Rattenherzen	16
2.1.1	Präparation	16
2.1.2	Hämodynamische Charakterisierung	17
2.2	Humanes Vorhofgewebe.....	20
2.2.1	Probengewinnung	20
2.2.2	Klinische Patientendaten und präoperative hämodynamische Charakterisierung	20
2.3	Aufarbeitung der ZDF-Rattenherzen und des humanen Vorhofgewebes.....	21
2.3.1	Histologische Aufarbeitung	22
2.3.2	Bestimmung der PAP ₁ Aktivität	23
2.3.2.1	PAP ₁ Assay	23
2.3.2.2	Lipidextraktion und Separation mittels HPLC	25
2.3.3	Lipin 1 mRNA Extraktion und Konzentrationsbestimmung	27
2.3.4	cDNA Synthese Lipin 1	28
2.3.5	Real time PCR Lipin 1	28
2.4	Statistische Methoden	31

3	Ergebnisse.....	32
3.1	ZDF-Rattenherzen	32
3.1.1	Basale und hämodynamische Charakterisierung	32
3.1.2	Kollagengehalt des Myokards	33
3.1.3	PAP ₁ Aktivität.....	34
3.1.4	Lipin 1 Expression	35
3.2	Humanes Vorhofgewebe.....	37
3.2.1	Klinische Patientendaten und hämodynamische Charaktersierung	37
3.2.2	Kollagengehalt des Myokards	40
3.2.3	PAP ₁ Aktivität.....	41
3.2.4	Lipin 1 Expression	42
4	Diskussion	43
5	Zusammenfassung	51
6	Veröffentlichungen	52
	Literaturverzeichnis	53
	Danksagung.....	67
	Lebenslauf	68

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Phosphatidat Phosphohydrolase 1

Phosphatidat Phosphohydrolase 1 (PAP₁) ist ein Schlüsselenzym der Lipidsynthese und katalysiert die Dephosphorylierung von 1,2-Diacylglycerol-3-phosphat (PA) zu 1,2-Diacylglycerol (DAG), welches als Substrat für die *de novo* Biosynthese von Lipiden dient [24,25]. Entdeckt wurde PAP₁ 1955 in Pflanzen [60] und konnte in Säugetierzellen erstmals 1962 nachgewiesen werden [29,56,112]. Die Aktivierung von PAP₁ erfolgt unter dem Einfluss freier Fettsäuren durch Translokation des Enzyms vom Zytosol zum Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) [51,57]. Am SR entsteht durch den katalytischen Einfluss von PAP₁ unter Abspaltung eines anorganischen Phosphatmoleküls DAG. DAG ist die gemeinsame Vorläufersubstanz für die *de novo* Synthese von Triacylglycerol (TAG), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) [25,62]. TAG entsteht durch die enzymatische Wirkung der Diacylglycerin-Acyl-Transferase, die ein drittes Acyl-CoA an DAG transferiert. Durch Bindung von Cytidin-5'-diphosphocholin bzw. Cytidin-5'-diphosphoethanolamin an DAG werden durch die Wirkung der Cholin- bzw. Ethanolamin-Phosphotransferase die beiden Phospholipide PC und PE gebildet (Abbildung 1.1) [48,78].

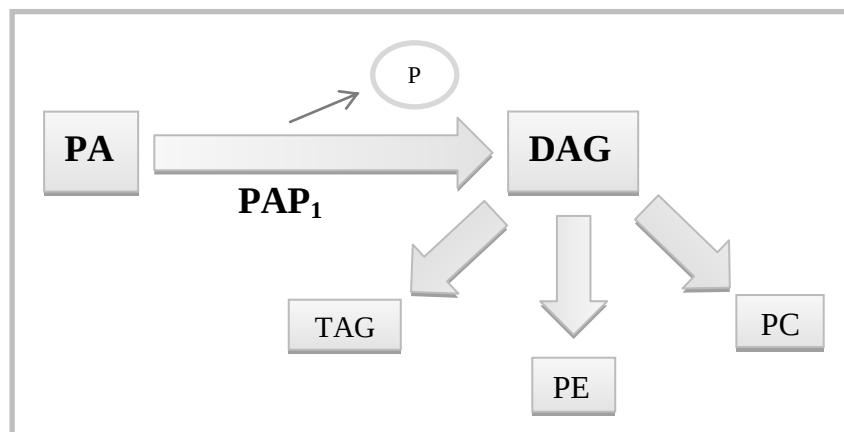


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der *de novo* Biosynthese der Phospholipide und Triacylglyceride, modifiziert nach Kennedy [62] (Abkürzungen siehe Text).

Anhand der Reaktionseigenschaften und der subzellulären Lokalisation konnte ein weiteres Isoenzym von PAP identifiziert werden, die Phosphatidat Phosphohydrolase 2 ($\triangleq$ Lipid Phosphat Phosphohydrolase, LPP). Während PAP₁ vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist, befindet sich LPP an der Außenseite von Plasmamembranen oder an der Innenseite von intrazellulären Membranen, an der sie glykosyliert vorliegt und mit einer Sechstransmembrandomäne verankert ist [18,123]. LPP zeigt im Gegensatz zu PAP₁ weder eine Inhibition durch Sulfhydryl-Reagenzien wie N-Ethylmaleimid noch eine Mg²⁺-abhängige Enzymaktivität [18,59,71,78]. Im Unterschied zur Substratspezifität von PAP₁, welche nur mit PA reagiert und durch deren Mg²⁺-Salze aktiviert wird, dephosphoryliert LPP zusätzlich zu PA weitere Lipide [35,131,132]. Die Verankerung von LPP an Membranen bewirkt, dass LPP nicht an der Biosynthese der Phospholipide und TAG beteiligt ist [17,78], vielmehr vermittelt LPP die Signalfunktion der PC-spezifischen Phospholipase D und ist für den Calciumstoffwechsel von Bedeutung [18,135].

Ein Gen, welches für PAP₁ kodiert, wurde von Han und Mitarbeiter 2006 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert [53]. Eine Mutation (*pah1* Δ) in diesem Gen (*PAH1*) bewirkte eine Akkumulation von PA sowie eine signifikante Reduktion der Konzentration von DAG und TAG [53]. Bei Säugetieren wurde ebenfalls ein Gen identifiziert (*LPIN1*), welches über die Expression des Proteins Lipin 1 auch für ein Enzym mit PAP₁ Enzymaktivität kodiert (Kapitel 1.2.). Die PAP₁ Aktivität wurde bereits an mehreren Gewebetypen (Leber, Fettgewebe, Skelett- und Herzmuskel) nachgewiesen [37] mit Bedeutung des Enzyms bei einigen Erkrankungen (Atherosklerose, Steatosis hepatis, Rhabdomyolyse) [79,111,137]. Über den Einfluss von PAP₁ am diabetischen Myokard gibt es jedoch bisher nur wenig Informationen, obwohl bekannt ist, dass eine gestörte Lipidhomöostase ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Veränderungen am Herzen bei Diabetes mellitus darstellt [3,15].

Aktuell liegen keine Daten hinsichtlich der PAP₁ Aktivität in humanen Kardiomyozyten von Patienten mit Diabetes mellitus vor. Tierexperimentell existieren mehrere Untersuchungen zur kardialen PAP₁ Aktivität beim Diabetes mellitus, die je nach Tiermodell unterschiedliche Ergebnisse erbrachten. Anhand des Modells des Diabetes mellitus Typ 1 an Ratten, induziert durch Streptozotozin, konnte bereits zwei Tage nach Induktion des Diabetes mellitus eine signifikant erhöhte myokardiale PAP₁ Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden [110]. Eine weitere Studie mit Streptozotozin-induziertem Diabetes mellitus der Ratte bestätigte diesen Befund [135]. Eine Arbeit von Jamal und Mitarbeiter hingegen zeigte das gegenteilige Ergebnis: Anhand des Modells der JCR:LA-korpulenten Ratte, welche durch eine Insulinresistenz im Sinne eines Diabetes mellitus Typ 2 gekennzeichnet ist, konnte eine erniedrigte myokardiale PAP₁ Aktivität dokumentiert werden [59].

1.2 Lipin 1

Lipin 1 ist auf biologischer Ebene ein 100 kDa großes, weitgehend unbekanntes Protein, das biochemisch-funktionell eine PAP₁ Isoenzymaktivität besitzt [31,49,53].

Das Lipin 1 Gen (*LPIN1*) wurde erstmals von Péterfy und Mitarbeiter im Jahre 2001 beschrieben, entdeckt wurde es bei der Fatty liver dystrophy (*fld*) Maus, welche durch eine rezessive Mutation in einer Mauskolonie in Maine 1981 spontan entstand [67,88]. Durch positionelles Klonieren konnte bei den Mäusen eine Punktmutation (Gly84Arg) im *LPIN1* Gen festgestellt werden mit Nachweis einem nahezu vollständigen Verlust der PAP₁ Aktivität. Die Wirkung von Lipin 1 konnte anhand der Lipin 1-defizienten (*fld*) Mäuse gezeigt werden: Bei ihnen entwickelte sich neben einer Fettleber in den ersten zwei postnatalen Wochen eine nahezu vollständige Dystrophie des braunen und gelben Fettgewebes.

Zusätzlich konnten bei den Mäusen eine Insulinresistenz, einhergehend mit einer Hyperglykämie und Arteriosklerose, festgestellt werden [88,97]. Funktionell zeigten die Herzen der Lipin 1-defizienten Mäuse eine signifikant reduzierte Ejektionsfraktion als Zeichen der systolischen Dysfunktion [66]. Untersuchungen an transgenen Mäusen mit einer fettgewebespezifischen Überexpression von Lipin 1 zeigten hingegen eine Adipositas und eine vermehrte Insulinsensitivität [91,98].

Nach Identifikation des *LPIN1* Gens stellten Han und Mitarbeiter 2006 fest, dass das katalytische Zentrum des *LPIN1* Gens dem einige Jahre zuvor bereits entschlüsselten *PAH1* Gens der *Saccharomyces cerevisiae* entspricht. Damit konnte auf molekularer Ebene erstmals gezeigt werden, dass das Protein Lipin 1 eine PAP₁ Isoenzymktivität besitzt [53]. Mehrere daraufhin durchgeführte Studien bestätigten diesen Befund: Untersuchungen an sämtlichen Gewebetypen von Lipin 1-defizienten (*fld*) Mäusen wiesen einen nahezu vollständigen Verlust der PAP₁ Aktivität auf [37,55].

Neben Lipin 1 konnten in Säugetierzellen zwei weitere genverwandte Proteine identifiziert werden: Lipin 2 und Lipin 3, welche ebenfalls eine PAP₁ Aktivität besitzen und deren Aminosäuresequenzen zu 44-48 % mit den Sequenzen von Lipin 1 übereinstimmen [37,89, 99,100,101]. Lipin 1, Lipin 2 und Lipin 3 werden gewebespezifisch exprimiert. Die höchste Lipin 1 Expression konnte bisher in Fettgewebe und Skelettmuskel nachgewiesen werden, die höchste Lipin 2 Expression fand sich in der Leber, der Lunge und im Gehirn. Eine Expression von Lipin 3 konnte im Darm, der Leber, der Niere, Milz und im Fettgewebe nachgewiesen werden [32,34,52,101]. Unter Verwendung von Lipin 1 Antikörpern konnte eine Studie mit HeLa-Zellen zeigen, dass es zu einer Reduktion der PAP₁ Aktivität von 86 % kommt. Es wird daher angenommen, dass der Hauptanteil der PAP₁ Aktivität auf das Wirken von Lipin 1 zurückzuführen ist [49].

Mit Blick auf die kardiale Lipin Expression zeigte eine aktuelle Studie eine um über 80 % reduzierte kardiale PAP₁ Aktivität im Myokard der Lipin 1-defizienten (*fld*) Maus.

Die verbliebenen 15 - 20 % der PAP₁ Aktivität wurden auf die Wirkung von Lipin 2 und Lipin 3 zurückgeführt [66]. Studien an humanem Gewebe bestätigen den Befund: Anhand von Zellkulturen humaner Myozyten konnten Donkor und Mitarbeiter nachweisen, dass auch beim Menschen Lipin 1 die höchste Genexpression zuzuschreiben ist [37].

Beim Menschen gibt es drei Lipin 1 Isoformen, welche durch alternatives mRNA-Splicing entstehen: Lipin 1 α , Lipin 1 β und Lipin 1 γ [28,54,89]. Durch Insertion von 33 Aminosäuren innerhalb eines Exons entsteht die β -Splicevariante und durch Insertion von 26 Aminosäuren die γ -Splicevariante, wobei das katalytische Zentrum unverändert bleibt. Unterschiede in Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation, als auch hinsichtlich der Enzymaktivität von Lipin 1 α und 1 β , wurden in Adipozyten festgestellt: Lipin 1 β dominierte im Zytoplasma, während Lipin 1 α vorwiegend im Nukleolus nachgewiesen werden konnte [89]. In Bezug auf die PAP₁ Aktivität der drei Isoformen konnte eine Studie an humanen Hepatozyten Lipin 1 α die höchste Aktivität zuschreiben, die Aktivität von Lipin 1 β war im Vergleich zu Lipin 1 α um 30 % und die von Lipin 1 γ im Vergleich zu Lipin 1 α um 90 % reduziert [54]. Höhere Konzentrationen von Lipin 1 γ konnten zwei aktuelle Studien an humanen Gehirnzellen nachweisen, dabei wird vermutet, dass Lipin 1 γ eine spezialisierte Rolle im Lipidmetabolismus des menschlichen Gehirns einnimmt [129].

Weitere Studien erbrachten den Nachweis, dass Lipin 1 α und Lipin 1 β neben der PAP₁ Aktivität am SR auch am Nukleolus als Coaktivator von DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren wirken [96]. Lipin 1 interagiert mit dem Peroxisom-Proliferations-Aktivierungs-Rezeptor (PPAR α) und dem PPAR γ -Coaktivator-1 α (PGC-1 α), welche beide die Expression von Genen regulieren, die für die β -Oxidation freier Fettsäuren verantwortlich sind [38,54,72].

PPAR α wird hauptsächlich in Geweben mit einem hohen Fettsäureumsatz exprimiert und ist ein wichtiger Regulator des Fettsäuremetabolismus im Herzen [5,43].

Eine Studie am Myokard transgener Mäuse führte durch eine spezifische Aktivierung von PPAR α zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation, einhergehend mit einer kardialen Dysfunktion [44].

Beim Menschen wird Lipin 1 in nahezu allen Organsystemen exprimiert. Eine besonders hohe Genexpression findet sich im Fettgewebe und Skelettmuskel, niedrigere im Herzen, der Leber, Niere, im Magen-Darmtrakt, Gehirn und in den Schwann-Zellen der peripheren Nerven [37,100]. In Hinblick auf den Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Lipin 1 Expression und der Insulinresistenz hergestellt werden. Untersuchungen an Menschen aus Familien mit Dyslipidämie konnten eine inverse Korrelation zwischen der Lipin 1 mRNA Expression im Fettgewebe und der Glukosekonzentration im Blutplasma feststellen [121]. Zudem fand sich eine niedrige Lipin 1 mRNA Expression im Fettgewebe von Menschen mit hoher Insulinresistenz [121]. In einer klinischen Studie wurde ein Glukosetoleranztest durchgeführt und die Lipin 1 mRNA Expression in den Adipozyten der Probanden untersucht, dabei wiesen die Probanden mit einer erhöhten Insulinresistenz eine um 50 % reduzierte Lipin 1 mRNA Expression auf [136]. Croce und Mitarbeiter untersuchten die Lipin 1 mRNA Expression in Leberzellen von adipösen Menschen vor und nach einer Magenbypass-Operation. Sie konnten eine inverse Korrelation zwischen der Lipin 1 Expression und dem Body-Mass-Index (BMI) sowie dem Grad der Insulinresistenz nachweisen. Nach Operation und Gewichtsverlust zeigte sich eine im Vergleich zur präoperativen Messung signifikant niedrigere Lipin 1 mRNA Expression [30]. Eine positive Korrelation konnte zudem zwischen der Lipin 1 Expression und der Insulinsensitivität von Adipozyten festgestellt werden [75].

In Hinblick auf Polymorphismen im *LPIN1* Gen beim Menschen mit Diabetes mellitus konnte eine Studie eine Assoziation zwischen intragenetischen Polymorphismen von Lipin 1 und dem Seruminsulinspiegel zeigen [121]. Spätere Untersuchungen bestätigten dies; so konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem Insulinspiegel von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und einem bestimmten Polymorphismus von *LPIN1* aufgezeigt werden [7]. Zwei weitere Studien wiesen zudem eine Assoziation zwischen der genetischen Varianz von *LPIN1* und dem metabolischen Syndrom beim Menschen nach [68,134], dabei wird von einer genetischen Varianz zwischen den Populationen weltweit ausgegangen [26].

1.3 Pathophysiologie der diabetischen Kardiomyopathie

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronisch progrediente Erkrankung, deren Prävalenz im Jahr 2010 in Deutschland in der Altersgruppe von 55 bis 74 Jahren mit 2,4 Millionen angegeben wurde [20], bis zum Jahr 2025 rechnet man weltweit mit einem Anstieg der Prävalenz auf 300 Millionen Erkrankungsfälle [20,63]. Die Prognose des Diabetes mellitus Typ 2 wird dabei durch kardiovaskuläre Ereignisse bestimmt. Entsprechend ist das kardiale Risiko bei Diabetikern um das 3-fache und bei Diabetikerinnen um das 5-fache im Vergleich zu nichtdiabetischen Kontrollkollektiven erhöht [119].

Klinische und experimentelle Untersuchungen konnten nachweisen, dass es beim Diabetes mellitus bereits frühzeitig und unabhängig von makroangiopathischen Sekundärerkrankungen zu grundlegenden Veränderungen im myokardialen Metabolismus, der Struktur und der Funktion des Herzens kommt [41,42]. Diese Veränderungen werden unter dem Begriff der diabetischen Kardiomyopathie zusammengefasst und wurden 1972 erstmals von Rubler und Mitarbeiter beschrieben [104].

Epidemiologische Studien zeigten, dass die Prävalenz der diabetischen Kardiomyopathie bei Diabetikern, deren Plasmaglukosespiegel unter Therapie im Normbereich liegt, 60 bis 75 % beträgt [10,23,93].

Zu Beginn der Erkrankung besteht meist eine isolierte, linksventrikuläre diastolische Funktionsstörung, die sich anhand echokardiographischer Diagnostik, kardialer Magnetresonanztomographie, szintigraphisch oder mit Hilfe einer Herzkatheteruntersuchung nachweisen lässt [12,34,86,108,113,122]. Experimentell kann die isolierte diastolische Funktionsstörung *ex vivo* an diabetischen Ratten- und Mäuseherzen mit der sogenannten Working Heart Anlage, einer speziellen Apparatur zur Untersuchung der intrakardialen Druckverhältnisse am spontan schlagenden Herzen, gezeigt werden [1]. Parallel zur diastolischen Dysfunktion des linken Ventrikels kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Funktion des rechten Ventrikels [77]. Bei bereits fortgeschrittener Erkrankung dominiert eine kombinierte diastolische und systolische Dysfunktion mit konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie [16,113,115]. Ist die Krankheit progredient, bestehen oft makroangiographische Komorbiditäten, wie die koronare Herzkrankheit, deren Auswirkungen auf die Herzfunktion nicht mehr von der diabetischen Kardiomyopathie zu trennen sind [11,140].

Klinisch sind die betroffenen Patienten im Anfangsstadium der Erkrankung meist asymptomatisch, erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zeigt sich ein Bild der Linksherzinsuffizienz als Ausdruck einer verminderten Herzleistung. Es kommt zu einem Vorwärts- und Rückwärtsversagen des linken Ventrikels und aufgrund erhöhter kardialer Wandspannung zur koronaren Minderperfusion. Die Patienten leiden unter körperlicher Schwäche, Belastungsdyspnoe, Herzrasen und pektanginösen Beschwerden [74].

Als Risikofaktoren für das Auftreten einer diabetischen Kardiomyopathie konnten eine Adipositas, ein HbA1c-Spiegel über 7,5 % und eine längere Krankheitsdauer ausgemacht werden [87].

Neben funktionellen Veränderungen am diabetischen Herzen konnten auch strukturelle Veränderungen festgestellt werden, die zu einer Compliancestörung, d.h. zu einem Verlust der Gewebeelastizität und einer Zunahme der ventrikulären Steifigkeit führen. Es wurden zahlreiche Ursachen für die erhöhte Rückstellkraft gefunden, wie eine pathologische Ansammlung von Kollagenfasern mit perivaskulärer Fibrose [47,81,116], freien Fettsäuren und TAG [8,82].

Zu den strukturellen Ursachen der diabetischen Kardiomyopathie zählt zudem die kardiale autonome Neuropathie, bei der eine zunehmende sympathische Denervation zu einer Funktionsstörung des Herzens führt [109,124].

Die auf molekularbiologischer Ebene bestehenden Mechanismen, denen die strukturellen und funktionellen Veränderungen am diabetischen Herzen zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig geklärt. Neben einer gestörten Calciumhomöostase [2,36,50] konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass es zu grundlegenden Veränderungen in der Lipidhomöostase am diabetischen Herzen kommt.

Am Herzen sind freie Fettsäuren Hauptenergielieferant, 50 bis 75 % der gesamten Energie wird bei Herzgesunden über die β -Oxidation von Fettsäuren gewonnen [120]. Beim Diabetes mellitus kommt es durch die fehlende Wirkung des Insulins zu einer verminderten Glukoseaufnahme in den Kardiomyozyten und zu einer verminderten Glykolyse [27,83]. Reaktiv wird die Lipolyse in den Adipozyten gesteigert und es werden vermehrt freie Fettsäuren freigesetzt. Es findet eine Verlagerung des Energiemetabolismus von der Glukose- zur Fettsäureoxidation statt [3,80,105]; in einer diabetischen Stoffwechsellage kann diese über 90 % zur Energiegewinnung betragen [9,21]. Bei Übersteigerung der Kapazität der β -Oxidation kommt es zur Akkumulation von freien Fettsäuren und TAG im Kardiomyozyten [8,64,82].

Zudem entstehen toxische Lipidmetaboliten, welche für die Apoptose von Kardiomyozyten verantwortlich sind [92,125,141]. Die vermehrte Ansammlung freier Fettsäuren und TAG im Kardiomyozyten ist sowohl aufgrund der Lipotoxizität als auch aufgrund der vermehrten Compliancestörung der Ventrikel mit einer myokardialen Dysfunktion beim Diabetes mellitus assoziiert [19,21,73,102,103,138].

Über die Rolle von PAP₁ und Lipin 1 in Hinblick auf die TAG-Synthese und Fettsäureoxidation und deren Auswirkung auf die Funktion des Myokards beim Diabetes mellitus ist wenig bekannt. Erste Untersuchungen der PAP₁ Aktivität mittels tierexperimenteller Modelle [110,135] wurden anhand des Streptozotocin-induzierten pankreoptiven Diabetes der Ratte erhoben, welche ein Modell für den Typ 1 Diabetes darstellt und grundsätzlich vom Diabetes mellitus Typ 2 zu unterscheiden ist. Bei diesem Modell führt eine einmalige intraperitoneale oder intravenöse Gabe von Streptozotocin zur vollständigen Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Bei den Tieren bestehen klinische Zeichen eines absoluten Insulinmangels [106,128,133]. Aufgrund der zunehmenden Kenntnis der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2 wurde ein anderes tierexperimentelles Modell eingesetzt, das der Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratte, benannt nach den Entdeckern Zucker und Zucker im Jahre 1961 [143]. Diese stellten nach Kreuzung zweier Rattenarten eine missense Mutation im *fa*-Gen fest, welches für den Leptin Rezeptor kodiert [95]. Das autosomal rezessiv vererbte *fa*-Gen bewirkte eine Zunahme des Körpervolumens nach drei bis fünf Wochen, nach 14 Wochen konnte ein Fettgewebeanteil von über 40 % der Körpermasse nachgewiesen werden [144]. Die Tiere zeigten mit fortschreitender Krankheitsdauer neben einer Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und einer Hypertriglyceridämie [61,142,144] auch funktionelle Zeichen einer diabetischen Kardiomyopathie [90,117,126, 129,130,141].

1.4 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden anhand der ZDF-Ratte als Modell des Diabetes mellitus Typ 2 keine Daten hinsichtlich der Bedeutung von Lipin 1 in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie gewonnen. Die bisher durchgeführten Untersuchungen am Modell des Diabetes mellitus Typ 1 deuten jedoch darauf hin, dass Lipin 1 an der Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie beteiligt ist.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet: Kann im Myokard der ZDF-Ratte und im humanen Herzmuskelgewebe der an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Menschen eine veränderte Lipin 1 mRNA Expression bzw. PAP₁ Aktivität nachgewiesen werden?

Um diese Fragestellung zu überprüfen wurden folgende Ansätze gewählt:

1. Im linken Vorhofmyokard und im linken Ventrikelmyokard der an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten ZDF-Ratten wurde im Vergleich zu einer nicht an Diabetes mellitus erkrankten Kontrollgruppe die PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression bestimmt. Das Ausmaß der kardialen Dysfunktion wurde mit Hilfe der Working Heart Anlage am spontan schlagenden Herzen gemessen. Strukturelle Veränderungen an den Herzen wurden zudem durch Überprüfung des Kollagengehaltes des Gewebes untersucht.
2. Das rechte Vorhofmyokard von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2, welches während einer Herzbypass-Operation gewonnen werden konnte, wurde in gleicher Weise wie das Rattenmyokard untersucht mit Messung der PAP₁ Aktivität und der Lipin 1 mRNA Expression im Vorhofgewebe. Das Ausmaß der kardialen Dysfunktion wurde bei den Patienten anhand der präoperativ erhobenen Befunde mittels Echokardiographie und Kardioangiographie bestimmt. Strukturelle Veränderungen der Gewebeproben wurden ebenfalls durch Überprüfung des Kollagengehaltes des Gewebes untersucht.
3. Die anhand des humanen Herzgewebes gewonnenen Daten wurden mit denen des Rattenmyokards verglichen unter Berücksichtigung der medikamentösen Behandlung mit Insulin.

2 Material und Methoden

2.1 ZDF-Rattenherzen

2.1.1 Präparation

ZDF-Ratten wurden als Versuchstiere genutzt. Eine entsprechende Genehmigung zur Organentnahme wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein erteilt (V724.72241.122.4, Genehmigungsbescheid vom 24.08.2004). Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Richtlinien zur Pflege und Nutzung von Labortieren durchgeführt.

Fünfzehn männliche heterozygote *fa/+* und 15 homozygote *fa/fa* ZDF-Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld) im Alter von sechs Wochen bezogen. Die Ratten erhielten eine handelsübliche Tiernahrung (Purina 5008 Diet, International Product Supplies, London, England), Wasser *ad libitum* und wurden in einem Raum mit künstlichem 12-Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus für acht Monate gehalten.

Vor der Präparation der Herzen wurden die ZDF-Ratten gewogen und durch intraperitoneale Injektion mit Thiopental-Natrium (150 mg/kg Körpergewicht, Byk Gulden, Konstanz) narkotisiert. Nach medianer Laparotomie mit einem Skalpell und einer feinen Präparierschere wurden wenige Milliliter Blut aus der Vena cava inferior zur Blutglukosebestimmung entnommen (Ascensia Elite, Bayer Diagnostics, Dublin, Irland) und 1000 IE unfraktioniertes Heparin (Roche, Grenzach-Whylen) zur Vermeidung von Thromben injiziert. Anschließend wurden das Diaphragma und die Rippen der lateralen linken Thoraxwand zur besseren Darstellung der feinen Strukturen mit Hilfe eines Skalpells und einer Präparierschere durchtrennt. Nach Freipräparation und Durchtrennung der zu- und abführenden Gefäße wurde das Herz mobilisiert und das Herz samt der Gefäßstiele entnommen, gewogen und in eiskalte Krebs-Henseleit Lösung gegeben

(Zusammensetzung der Krebs-Henseleit Lösung in mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 1,5, MgSO₄ 2,1, NaHCO₃ 24,7, KH₂PO₄ 0,23, Glucose 11,1, EDTA 0,04, pH 7,4).

2.1.2 Hämodynamische Charakterisierung

An jeweils sechs der 15 ZDF-*fa/fa* bzw. ZDF-*fa/+* Herzen wurde die linksventrikuläre Funktion *ex vivo* mit Hilfe einer Working Heart Anlage (Hugo Sachs Electronic, March-Hugstetten) untersucht. Hierzu wurde der Aortenstumpf der Aorta ascendens frei hängend an der Aortenkanüle der Anlage mit handelsüblichem Nähgarn befestigt, der linke Vorhof kanüliert und mit 95 % O₂/ 5 % CO₂ gesättigter Krebs-Henseleit Lösung (37°) zunächst über die Aortenkanüle für 10 Minuten im Langendorff-Modus (nach Oskar Langendorff, 1895) bei druckkonstantem Fluss mit 10 ml/min/g retrograd perfundiert.

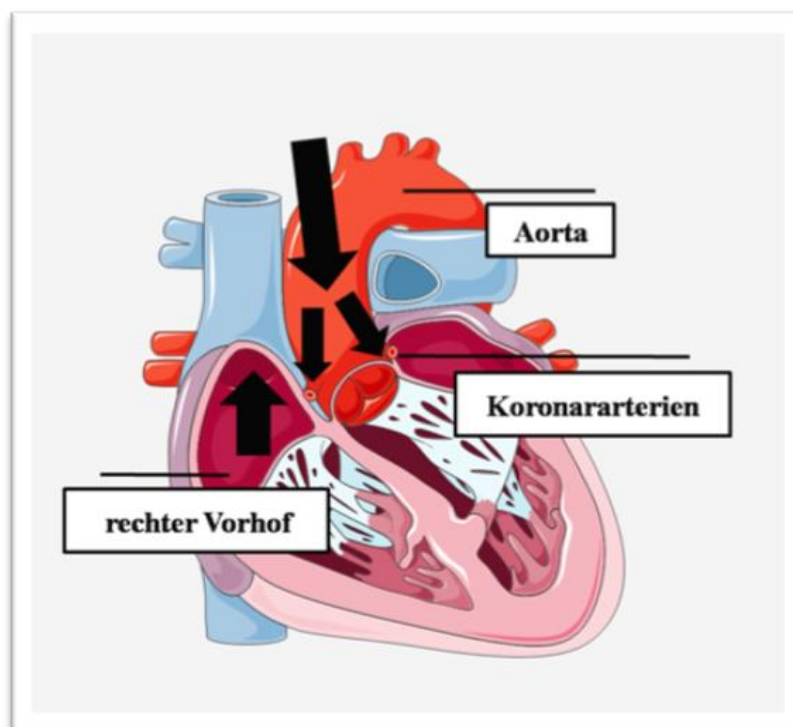


Abbildung 2.1.1 Modell nach Langendorff an der Working Heart Anlage.

Retrograder Perfusionsfluss beim isoliert perfundierten spontan schlagenden Herzen. Das Perfusat gelangt nach Schluss der Aortenklappe über die Aorta ascendens in die Koronararterien. Nach Durchlaufen des Herzkranzsystems strömt das Perfusat in den Sinus coronarius und von dort in den rechten Vorhof. (Abbildung verwendet und modifiziert mit freundlicher Genehmigung der Firma Les Laboratoires Servier, München.)

Im Legendorff-Modus gelangt das Perfusat bei geschlossener Aortenklappe über die Aorta ascendens in die Koronararterien. Nach Durchlaufen des Herzkranzsystems strömt das Perfusat in den Sinus coronarius und von dort in den rechten Vorhof. Vom rechten Vorhof fließt das Perfusat zu einem Teil über die Vv. cavae, zum anderen Teil über die geöffnete Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel und von dort in den verbliebenen Anteil des Truncus pulmonalis in ein Sammelgefäß. In diesem Reperusionsmodus fängt das isolierte Herz spontan an zu schlagen (*Abbildung 2.1.1*). Zur Darstellung der Druckverhältnisse in der linken Herzkammer wurde ein Mikromanometer Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) über die Aortenklappe retrograd eingebracht. Im nachfolgenden Working-Heart Modus (*Abbildung 2.1.2*) wurde das Perfusat anterograd, d.h. in physiologischer Flussrichtung geleitet.

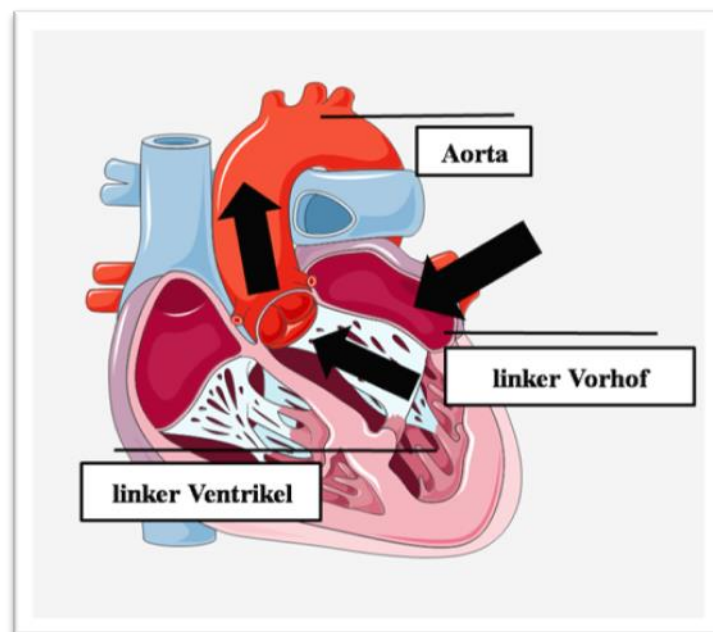


Abbildung 2.1.2 Working Heart Modell an der Working Heart Anlage.

Anterograder Perfusionsfluss beim isoliert perfundierten, spontan schlagenden Herzen. Das Perfusat gelangt über den linken Vorhof in den linken Ventrikel und von dort aus, nach Kontraktion des Ventrikels, in die Aorta. (Abbildung verwendet und modifiziert mit freundlicher Genehmigung der Firma Les Laboratoires Servier, München.)

Bei einer Vorlast von 10 mmHg und einer Nachlast von 70 mmHg wurde das Perfusat für 10 Minuten in den linken Vorhof geleitet, von dort gelangte die Krebs-Henseleit Lösung über den linken Ventrikel in die Aorta ascendens und in die Koronararterien.

Zur Bestimmung der linksventrikulären Ventrikelfunktion wurden folgende Messwerte innerhalb der letzten 30 Sekunden der zehnminütigen Working Heart Perfusion bestimmt: Herzfrequenz, linksventrikulärer systolischer Druck (LVDP), Herzfrequenz-Druck-Produkt (Herzfrequenz x LVDP) als Determinante des myokardialen Sauerstoffverbrauches, linksventrikuläre maximale Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit ($LVdP/dt_{min}$, $LVdP/dt_{max}$) als Maß für den kontraktile Zustand sowie der koronare Fluss (Vorhofeinström – Aortenausfluss).

2.2 Humanes Vorhofgewebe

2.2.1 Probengewinnung

Gewebeproben aus dem rechten Vorhof wurden von 15 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (mittlere Erkrankungsdauer $5,6 \pm 1,2$ Jahre) und 21 Patienten ohne Diabetes mellitus (Kontrollgruppe) untersucht, die sich aufgrund einer fortgeschrittenen koronaren Herzkrankheit einer Bypassoperation am offenen Herzen unterziehen mussten. Alle Patienten wurden zuvor über die Entnahme, den Umgang mit den gewonnenen Daten als auch über das wissenschaftliche Ziel dieser Studie aufgeklärt und gaben mindestens 24 Stunden vor Beginn des operativen Eingriffs ihr schriftliches Einverständnis. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck genehmigte die vorliegende Probenentnahme und weitere Aufarbeitung (Aktenzeichen 07-162, Sitzung der Ethikkommission vom 13. November 2007).

Entnommen wurden die Proben (mittleres Gewicht 97 ± 8 mg) während der Operation bei Kanülierung des rechten Vorhofs im Zuge des Anschlusses an die Herz-Lungenmaschine. Nach einer Umstechungsnaht wurde das Gewebestück mit einem Einstichskalpell durch den Herzchirurgen extrahiert und direkt nach Entnahme in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Transport in das Labor wurden die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.2 Klinische Patientendaten und präoperative hämodynamische Charakterisierung

Die Patientendaten wurden in pseudonymisierter Form dokumentiert. Neben den Basisinformationen wie Alter, Geschlecht, Körpergröße, Körpergewicht, Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck wurden bestimmte Laborparameter (Glukose im Plasma, Hämoglobin A_{1C}, Triglyceride und Kreatinin im Serum) ein bis sieben Tage präoperativ bestimmt.

Von den 15 diabetischen Patienten wurden acht ausschließlich diätetisch behandelt; die anderen sieben Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhielten zusätzlich eine Insulintherapie. Anhand der präoperativen Herzkatheteruntersuchung wurde der linksventrikuläre endsystolische Druck sowie der linksventrikuläre enddiastolische Druck und die Ejektionsfraktion dokumentiert. In der präoperativ ebenfalls durchgeführten Echokardiographie wurden die Durchmesser folgender Herzregionen vermessen: Linker Vorhof, linker Ventrikel in der Diastole, die Septumdicke in der Diastole und die linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Diastole.

2.3 Aufarbeitung der ZDF-Rattenherzen und des humanen Vorhofgewebes

Die übrigen neun ZDF-*fa/fa* und ZDF-*fa/+* Herzen wurden genauso wie die insgesamt 36 humanen Vorhofgewebeproben in drei voneinander getrennten Untersuchungen weiter analysiert mit histologischer Aufarbeitung, Bestimmung der PAP₁ Aktivität und der Lipin 1 mRNA Expression (Abbildung 2.3.1).

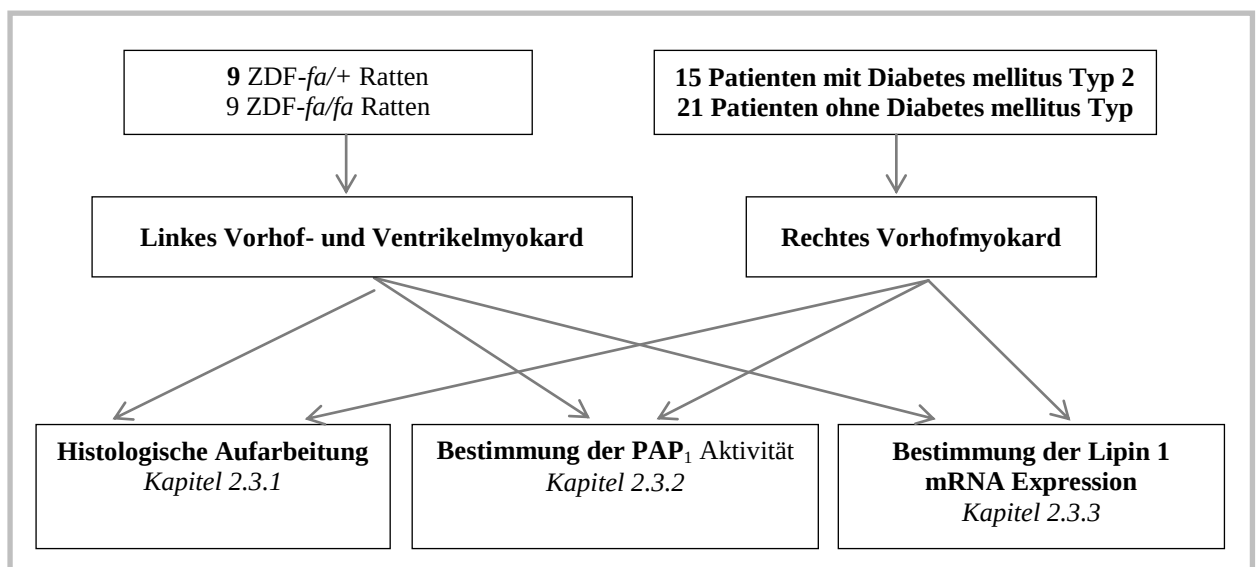


Abbildung 2.3.1

Übersicht über die Arbeitsschritte zur Aufarbeitung des linken Vorhof- und Ventrikelmuskards der ZDF-Ratten und des rechten Vorhofmuskards der Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2. Beschreibung der Methoden unter den aufgeführten Kapiteln.

Bei den Rattenherzen wurde die PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression im linken Vorhof- und Ventrikelgewebe separat untersucht. Die histologische Untersuchung der ZDF-Rattenherzen erfolgte am linksventrikulären Myokard.

2.3.1 Histologische Aufarbeitung

Um die Herzgewebeproben auf ihren Kollagenanteil zu prüfen, wurden von den ZDF-Rattenherzen Paraffinschnitte angefertigt, das humane Vorhofgewebe wurde in Form von Gefrierschnitten untersucht.

Im Zuge der Aufbereitung der ZDF-Rattenherzen wurden bis 1,5 mm große Gewebestücke aus der Mitte der linken Ventrikel präpariert und in 4,5 % Formalin (Formaldehyd, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 24 Stunden fixiert. Im Einbettungsautomaten (Histokinette, Leica, Heidelberg) wurden die Gewebeproben maschinell mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Ethanol) für je eine Stunde dehydriert, in das Intermedium Xylol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) übertragen und mit geschmolzenem Paraffin (Histowax, Leica, Heidelberg) bei einer Temperatur von 56 °C durchtränkt. Die Präparate wurden in einer Paraffinausgießstation (Leica, Heidelberg) mit heißem Paraffin übergossen und eingeblockt.

Das humane Vorhofgewebe wurde im gefrorenen Zustand mit Tissue Freezing Medium (Jung, Nussloch) auf dem Objektträger fixiert. Geschnitten wurden sowohl die humanen Gewebestücke als auch die Proben der Ratten mit dem Kryostat (CM 3050, Leica, Heidelberg) bei einer Raumtemperatur von – 17 bis – 20 °C.

Für das Rattengewebe wurde eine Schichtdicke von 2 µm, für das humane Gewebe eine von 4 µm verwendet und die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgetragen.

Für die Fixierung wurden die Gefrierschnitte 48 Stunden in einer Bouinlösung (gesättigte Pikrinsäure, Fluka, Buchs [Schweiz]; Formaldehyd 35 %, Sigma-Aldrich; Essigsäure 100 %, 15:5:1 v/v/v) belassen.

Zur Färbung der Kollagenfasern wurden die Schnitte in 0,1 % Sirius Red (gesättigte Pikrinsäure; Direkt Rot, J.T. Baker, Deventer [Niederlande], 9:1 v/v) für 60 Minuten (Rattengewebe) bzw. für 10 Minuten (humanes Gewebe) getränkt; dabei stellten sich bei dieser Färbemethode die Kollagenstrukturen rot, das restliche Gewebe gelb dar.

Die Präparate wurden mit *aqua dest.* abgespült und zur Dehydration des Gewebes in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) und in Xylol getaucht. Anschließend wurden die Präparate mit Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckt.

Die lichtmikroskopische Auswertung (Olympus IX70, Hamburg) erfolgte in 10 x Objektivvergrößerung (Ratten) bzw. 20 x Objektivvergrößerung (humanes Gewebe).

Die Bilder wurden fotografisch dokumentiert (CCD Digitalkamera ColorView, Olympus, Hamburg) und mit 5 Gesichtsfeldern pro Gewebeschnitt anhand des Flächenanteils (in %) der Farbe Rot (Kollagen) in jedem Gesichtsfeld semiquantitativ ausgewertet (c[^]cell, Soft Imaging System, Münster).

2.3.2 Bestimmung der PAP₁ Aktivität

2.3.2.1 PAP₁ Assay

Die PAP₁ Aktivität wurde mit Hilfe eines selektiven HPLC-Fluoreszenzdetektionsassay bestimmt, welcher in unserem Labor entwickelt wurde [22]. Bei dieser Methode wird zur Bestimmung der PAP₁ Aktivität das fluoreszenzmarkierte Derivat des PA, 1-Haxanoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-gly-cero-3-phosphat (NBD-PA, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama [USA]) eingesetzt, welches unter dem katalytischen Einfluss der PAP₁ zu NBD-DAG reagiert und mittels HPLC von den anderen Lipiden getrennt und detektiert werden kann.

Da das fluoreszierende NBD an eine Restgruppe von PA gebunden ist, kann die Dephosphorylierung zu DAG ungehindert ablaufen, NBD bleibt dabei gebunden (Abbildung 2.3.2).

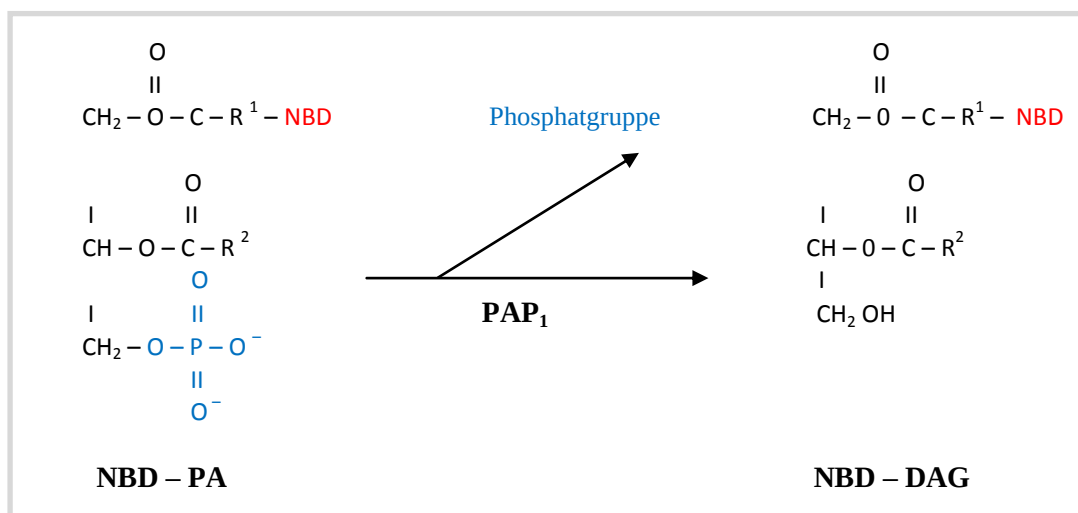


Abbildung 2.3.2

Das fluoreszierende NBD ist an eine Restgruppe von PA gebunden; bei der Dephosphorylierung zu DAG bleibt NBD gebunden und kann nach Trennung aus dem Stoffgemisch durch die HPLC mittels Fluoreszenzdetektion gemessen werden (Abkürzungen siehe Text).

Für die Homogenisation wurde das Vorhof- und das Ventrikelgewebe mit Homogenisationspuffer (5 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA, pH 7,4) versetzt, mit dem Homogenisierungstab (Ultra Turrax Mixer T8, Ika, Staufen) zerkleinert und bei 1000 g (4 °C) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und basierend auf der Methode nach Lowry und Mitarbeiter [69], die Proteinkonzentration des Homogenats mittels DC Protein Assay Kit (BioRad, München) bestimmt.

Zur Bestimmung der PAP₁ Aktivität wurden zwei Ansätze parallel durchgeführt: Der erste Ansatz erfolgte zur Bestimmung der PAP Gesamtaktivität (PAP_{ges}), der zweite Ansatz erfolgte zur Messung der LPP Aktivität. Zur Differenzierung der PAP₁ und LPP Aktivitäten wurde die Sensitivität von LPP für N-Ethylmaleimid genutzt. Aus der Differenz der beiden gemessenen Aktivitäten ließ sich die Aktivität von PAP₁ berechnen: PAP_{ges} – LPP = PAP₁. Für die Bestimmung der PAP_{ges} Aktivität wurde 1 mM NBD-PA mit Assaypuffer (20 mM Tris-acetat, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM Ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether)- tetraacetat, pH 7,5) unter Zugabe von 2 µg kardialen Protein versetzt. Der zweite Assay zur Bestimmung der LPP Aktivität wurde ohne MgCl₂ unter Zugabe von 5 mM N-Ethylmaleimid (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Beiden Ansätzen wurde der Phospholipase A2-Inhibitor Methyl Arachinoyl Fluorosphat (1 μ M, Calbiochem, Bad Soden) hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation im Thermo-mixer (Eppendorf, Hamburg) bei 1000 rpm (37 °C) wurde der Reaktionsstopp unter Zugabe von 450 μ l eiskaltem Stopp-Reagens (300 μ l Methanol, 150 μ l Chloroform/ 0,005 % (w/v) Butylhydroxytoluol [Sigma-Aldrich]) erreicht und die Proben daraufhin für 10 Minuten im Eisbad gekühlt.

2.3.2.2 Lipidextraktion und Separation mittels HPLC

Die Lipidextraktion wurde nach einer modifizierten Methode von Bligh und Dyer [13] vorgenommen. Dafür wurde den Proben jeweils 150 μ l Chloroform/ 0,005 % (w/v) Butylhydroxytoluol und 220 μ l gekühltes KCL hinzugefügt, welche bei 13000 rpm für 2 Minuten geschüttelt und anschließend bei 16000 g (4 °C) für 3 Minuten zentrifugiert wurden. Die untere Chloroformphase wurde entnommen und mit flüssigem Stickstoff eingedampft. Nach Lösung des pulverisierten Rückstandes in 100 μ l Probenlösungsmittel (n-Hexan, 2-Propanol, Essigsäure, Triethylamin [Fluca]) 50:50:1:0,8 v/v/v/v konnten die Lipide mittels HPLC (HPLC Pump 64, Knauer, Berlin; Mischkammer und Autosampler, Techlab, Erkerode) getrennt werden. In der Normalphasen-HPLC gelangte die Probe mit der mobilen, weniger polaren Phase durch die Trennsäule, in der sich die stationäre, stärker polare Phase befand. Abhängig von den Adsorptionseigenschaften der Probe verblieben die einzelnen Stoffe unterschiedlich lange in der Säule (Retentionszeit) und wurden damit getrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse mit Hilfe einer binären Gradientenelution nach einer Methode von Silversand und Haux [118] durchgeführt, dabei setzte sich die mobile Phase aus zwei Fließmitteln zusammen: Fließmittel A (n-Hexan, 2-Propanol, Essigsäure, Triethylamin 820170:10:0,8 v/v/v/v) und Fließmittel B (2-Propanol, Wasser, Essigsäure, Triethylamin 850:140:10:0,8 v/v/v/v).

Bei der binären Gradientenelution konnten die Fließmittel während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt werden, welche gemeinsam mit der zu untersuchenden Probe mit 1 ml/ Minute bei 45 °C die Trennsäule (LichroCART, 100 Diol, 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Merck, Darmstadt) passierten. Dabei diente das Fließmittel B zur Elution der polaren Bestandteile in der untersuchten Probe, welche die Trennsäule besonders langsam passierten. Der Säule nachgeschaltete Fluoreszenzdetektor (SFM 25, Kontron-Instrument, Neurfarn) erfasste die Fluoreszenzsignale von NBD-DAG (Exzitations-/Emissionsmaximum NBD: 460/534 nm). Zur Aufzeichnung und Auswertung wurde die Software Clarity (Techlab) verwendet. Die Messwerte stellten sich als Elutionskurve im Chromatogramm dar (*Abbildung 2.3.4*). Gemessen wurde die Zeit vom Start der Analyse bis zur Detektion des entsprechenden Peaks. Basierend auf den vorherigen Versuchsergebnissen der Peakidentifizierung [22] wurde für NBD-DAG eine Retentionszeit von 10,37 Minuten angenommen. Da die Fläche unter dem Peak proportional der Konzentration des gesuchten Stoffes ist, konnte die PAP_1 Aktivität in der Umsatzeinheit nmol DAG/h/mg Protein berechnet werden. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden NBD-PA Verdünnungsreihen als externer Standard verwendet.

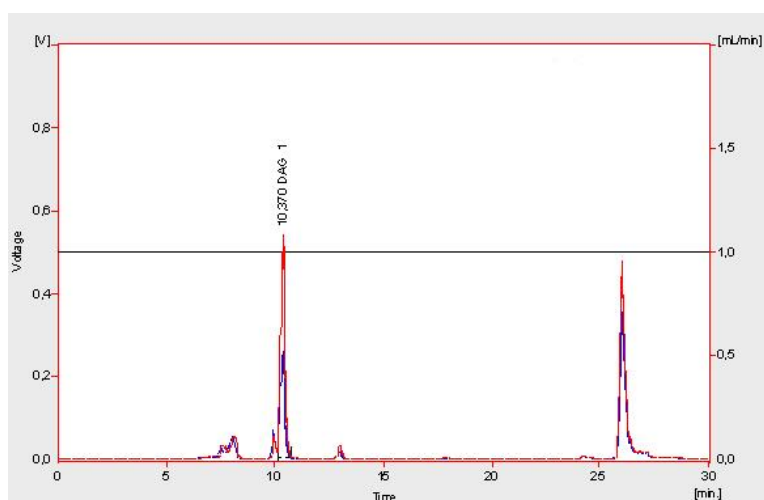


Abbildung 2.3.4 Auswertung der Normalphasen-HPLC mittels Fluoreszenzdetektion von NBD-DAG.

Nach der spezifischen Retentionszeit von 10,37 Minuten zeigt sich ein Peak für DAG im Chromatogramm. Rote Kurve: DAG entstanden aus der PAP_{ges} Aktivität. Blaue Kurve: DAG entstanden aus der LPP Aktivität. Aus der Differenz dieser Aktivitäten ergibt sich die PAP_1 Aktivität (Abkürzungen siehe Text).

2.3.3 Lipin 1 mRNA Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Isoliert wurde die mRNA von Lipin 1 unter Verwendung des NucleoSpin RNA2 Kits (Macherey-Nagel, Düren). Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Gewebestücke (20 mg) homogenisiert (Ultra Turrax Mixer T8, Ika, Staufen) und zur Lyse der Zellmembran mit 3,5 µl 6-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) versetzt. Die Reinigung der Nukleinsäuren von Proteinen gelang durch Inkubation des Homogenats (45 Minuten) mit 7 µl Proteinase K (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und durch Zugabe eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (350 µl, 25:24:1 v/v/v). Nach Zentrifugation für 60 Sekunden bei 11000 g (4 °C) konnte die obere mRNA-haltige, klare Phase vorsichtig abpipettiert werden. Vor Auftragung auf Silicia Membran Säulen wurde diese mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt und 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Nach Verwendung mehrerer spezieller, vom Hersteller vorgegebener Puffer konnte die an der Säulenmatrix haftende mRNA mit 50 µl RNase freiem DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich) eluiert werden. Da gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Absorption ist, kann die Konzentrationsbestimmung der mRNA anhand der spektralphotometrischen Quantifizierung durchgeführt werden; im vorliegenden Versuch gelang diese mit Hilfe des RNA-spezifischen fluoreszierenden Farbstoff RiboGreen unter Verwendung des Quant-iTTM RiboGreen Kits (Invitrogen, Karlsruhe). Die Konzentrationsmessung erfolgte im Fluoreszenzphotometer FluoStar OPTIMA (Labtech, Offenburg). Da ein hohes Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren bei 260 nm und ein hohes Absorptionsspektrum von Proteinen bei 280 nm zu erwarten ist, galt ein RNA Präparat mit einem A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1.9 – 2 als hochgereinigt. Die Konzentration der RNA wurde anhand der Formel $c \text{ (}\mu\text{g/ ml)} = A_{260}/0,025$ berechnet (c = RNA Konzentration, A_{260} = Absorptionsverhalten des Stoffes bei 260 nm) und die Proben bis zur cDNA Synthesebestimmung bei – 80 °C gelagert.

2.3.4 cDNA Synthese Lipin 1

Die extrahierte mRNA wurde unter Verwendung des First-Strand Synthesis Kits (Invitrogen) mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, *in vitro* zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben, die in der Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize dient. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Reaktionsansatz wurde entsprechend der Herstellerangaben mit einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammengestellt und beinhaltete 9 µl RNA, 2 µl dNTP (10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat), 1 µl Oligoprimer (0,5 µg/ µl) und 1 µl Cloned AMV (Avian myoblastosis virus) reverse Transkriptase. Während der Reaktionsansatz 60 Minuten im Thermocycler (Biometra, Göttingen) inkubierte, fügte die reverse Transkriptase die RNA/DNA-Hybridmoleküle zu cDNA-Doppelsträngen zusammen.

2.3.5 Real time PCR Lipin 1

Anhand der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR ist es möglich eine Quantifizierung der mRNA Expression vorzunehmen. Die spezifischen Primer für Lipin 1 wurden von Herrn Professor Dr. rer. nat. Olaf Jöhren (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck) erstellt und bei Invitrogen bezogen (Tabelle 2.3.1). Berücksichtigt wurden dabei die beiden Splicevarianten Lipin 1α und Lipin 1β.

Tabelle 2.3.1 **Lipin 1 Primersequenzen der Ratte und des Menschen** (Abbildungen siehe Text).

Primer	ZDF-Ratte	Humanes Gewebe
Lipin 1	NM_001012111	NM_145693
sense	5`- CTT CCA GAC CAT TCA CAG CGA – 3`	5`- CAG AGT TGT TGC CTC CGT TGT – 3`
antisense	5`- TTT CCG TCT GAG CCT TGC TCT – 3`	5`- AGA AAT CTG CGA TCG ATG GC – 3`

Die Primeroptimierung erfolgte unter Anwendung des qPCR Core Kits for SybrGreen (Eurogentec, Köln). Mit Hilfe einiger Testproben, welche unter Verwendung der sense und antisense Lipin 1 Primer in unterschiedlichen Konzentrationen die Real-time PCR durchliefen, führten wir zur Kontrolle der Produktgrößen eine Gelelektrophorese (Agarosegel: 2 g Agarose (Serva, Heidelberg), 200 ml TAE Puffer) durch. Unter Hinzugabe des in die DNA interkaltierenden, fluoreszierenden Ethidiumbromids (4 µl, Sigma-Aldrich) sollte gezeigt werden, dass gleich große Nukleinsäureprodukte in der PCR amplifiziert wurden, da die Primer sequenzspezifisch an die DNA gebunden hatten. Die Auftrennung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld erfolgte unter Anlage einer Spannung von 100 Volt über eine Stunde, in welcher diese aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wanderten. Anhand des ebenfalls hinzugegebenen Basenpaarmarkers (100 bp, Invitrogen) konnte die Amplifikationslänge in Basenpaaren dokumentiert werden. Das Sichtbarwerden der Banden gelang mit der UV-Lichtkammer Power PAC300 (BioRad, München). Die Spezifität wurde vorausgesetzt, wenn sich im Gel nur eine einzige Amplifikationsbande zeigte.

Für die Real-time PCR wurde das Platinum SYBRGreen qPCR Super Mix with ROX Kit (Invitrogen) verwendet. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt 2 µl cDNA, 0,75 µl sense Primer und 0,75 µl antisense Primer. Analysiert wurden die amplifizierten cDNA Sequenzen in 43 Zyklen mit dem ABI Prism 7000 Sequenz Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mit Hilfe des hinzugegebenen, in die doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffes SybrGreen (Invitrogen) konnte die Fluoreszenzstärke detektiert werden, da die Eigeneffloreszenz des SybrGreens bei Bindung an doppelsträngige Nukleinsäure um ein Vielfaches ansteigt (Exzitations- und Emissionsmaximum SybrGreen 490/ 520 nm). Die relative DNA-Konzentration berechnete sich durch die Fluoreszenzstärke, die in einem bestimmten Bereich des Versuchsablaufes proportional zum Logarithmus der relativen DNA-Konzentration ist.

An jeden PCR-Zyklus schloss sich für diese Messung eine Detektionsphase an, in der die Fluoreszenzstärke gemessen wurde. Für die Auswertung der Real-time PCR Ergebnisse ist der C_t Messpunkt (threshold cycle) entscheidend, welcher als derjenige Schwellenwert definiert wird, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Der C_t -Wert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve der PCR und bietet die Möglichkeit, quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge der Ziel-DNA (Lipin 1) der einzelnen Proben zu machen.

Zur Bestimmung der absoluten DNA-Konzentration wurde eine cDNA Verdünnungskurve ($10^3 - 10^7$) mit bekannter Konzentration in jedem PCR-Lauf parallel als Standardkurve amplifiziert (externer Standard). Anhand dieser Bezugspunkte war es möglich auf die Templatkonzentration zu schließen; die Effizienz der PCR ließ sich anhand der Steigung der Standardkurve in der exponentiellen Phase bestimmen.

Da die einzelnen Proben keine exakt gleichen Mengen an cDNA beinhalten, erfolgte die relative Quantifizierung mit Hilfe des internen Standards. Dazu wurden Primer eines endogenen, nicht regulierten Referenzgens (Housekeeping gene) verwendet, welches in jeder Zelle konstant exprimiert wird. In der vorliegenden Studie wurden Primer der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Invitrogen), ein Enzym des Glukoseabbaus, eingesetzt (Tab. 2.3.2).

Das Ergebnis der Lipin 1 mRNA Kopien in einer Probe wurde auf die gemessene GAPDH mRNA Kopien bezogen und erlaubte damit den Vergleich der Proben untereinander.

An die Real-time PCR schloss sich die Schmelzkurvenanalyse an, um Kontaminationen durch Nebenprodukte, wie Primer-Dimere und unspezifische Produkte auszuschließen. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Ansätzen keine Primer-Dimere gefunden.

Tabelle 2.3.2 **Primersequenzen von GAPDH von Ratte und Mensch** (Abkürzungen siehe Text).

Primer	ZDF-Ratte	Humanes Gewebe
GAPDH	NM_017008	NM_002046
sense	5`- CCT ACC CCC AAT GTA TCC GTT – 3`	5`- ATA AAT TGA GCC CGC AGC CT – 3`
antisense	5`- TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT – 3`	5`- ACC AAA TCC GTT GAC TCC GAC – 3`

2.4 Statistische Methoden

Bei der Berechnung der Ergebnisse dieser Arbeit wurde von einer Normalverteilung der Kenngrößen ausgegangen. Die Ergebnisse der Stichproben sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Der statistische Vergleich zweier Parameter/ Gruppen wurde mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen Student's *t*- Test für unabhängige Stichproben analysiert. Die einfache Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni's post hoc Test wurden angewandt, um Unterschiede zwischen drei oder mehr Parametern/ Gruppen zu beurteilen. Bei der Untersuchung von normalskalierten (kategorischen) Variablen wurden der Chi-Quadrat-Test (χ^2) eingesetzt. Der Korrelationskoeffizient *r* wurde mit dem Pearson Test evaluiert. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ gewertet.

Die statistische Berechnung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.00, San Diego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 ZDF-Rattenherzen

3.1.1 Basale und hämodynamische Charakterisierung

Basale Charakteristika wie Körpergewicht, Gewicht der Herzen und die Blutglukosekonzentration im Plasma der acht Monate alten ZDF-Ratten sind in *Tabelle 3.1* dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen fanden sich hinsichtlich der Blutglukosekonzentration im Plasma und des Körpergewichts. Das Herzgewicht *ex vivo* als auch das errechnete Verhältnis aus Herzgewicht zu Körpergewicht zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Herzfrequenz, LVDP, Herzfrequenz-Druck-Produkt und die linksventrikuläre maximale Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit wurden bei den ZDF-*fa/fa* Ratten mit Hilfe der Working Heart Anlage um 14 – 34 % im Sinne einer kardialen Dysfunktion erniedrigt gemessen. Die koronare Flussrate ergab nahezu identische Werte innerhalb beider Gruppen (*Tabelle 3.2*).

*Tabelle 3.1 Basale Charakteristika der acht Monate alten ZDF-*fa/+* und ZDF-*fa/fa* Ratten.*
* $p < 0.01$ vs. ZDF-*fa/+*.

	ZDF-<i>fa/+</i> (<i>n</i> = 15)	ZDF-<i>fa/fa</i> (<i>n</i> = 15)
Blutglukose im Plasma (mg/dl)	109 ± 4	498 ± 29*
Körpergewicht (g)	430 ± 11	363 ± 15*
Herzgewicht (g)	1.79 ± 0.08	1.67 ± 0.07
Herzgewicht/ Körpergewicht (g/kg)	4.19 ± 0.18	4.68 ± 0.21

Tabelle 3.2 **Hämodynamische Charakteristika der ZDF-*fa*/+ und ZDF-*fa*/*fa* Ratten.**

LVDP = Linksventrikulärer systolischer Druck, LV dp/dt_{max} und LV dp/dt_{min} = Linksventrikuläre maximale Druckerhöhungs- und Druckabfallgeschwindigkeit, $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. ZDF-*fa*/+, $*p < 0.01$ vs. ZDF-*fa*/+.

	ZDF- <i>fa</i> /+ (n = 6)	ZDF- <i>fa</i> / <i>fa</i> (n = 6)
Herzfrequenz (Schläge/min)	171 ± 12	133 ± 11 [‡]
LVDP (mm Hg)	138 ± 2	119 ± 5*
Herzfrequenz-Druck- Produkt (BPM x mmHg)	23530 ± 1410	15720 ± 1386*
LV dp/dt_{max} (mm Hg/s)	5371 ± 266	3549 ± 241*
LV dp/dt_{min} (mm Hg/s)	- 4608 ± 106	- 3256 ± 279*
Koronare Flussrate (ml/min)	11,71 ± 1,61	11,65 ± 1,24

3.1.2 Kollagengehalt des Myokards

Die histologische Beurteilung des linksventrikulären Kollagengehaltes der ZDF-*fa*/+ Ratten und ZDF-*fa*/*fa* Ratten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der Anteil angefärbter Kollagenfasern betrug 13 ± 2 % bei ZDF-*fa*/+ Ratten und 15 ± 2 % bei ZDF-*fa*/*fa* Ratten (Abbildung 3.1).

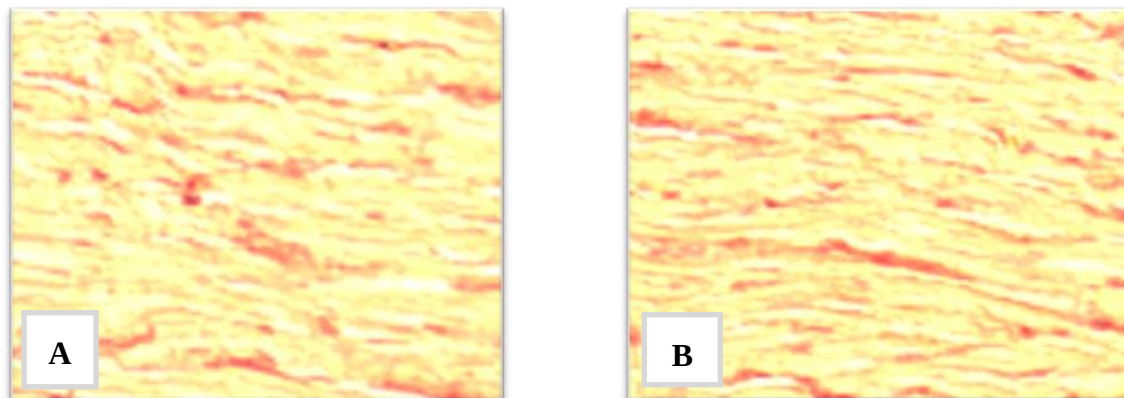


Abbildung 3.1 Repräsentative Paraffinschnitte des linken Ventrikelmyokards von **A** ZDF-*fa*/+ und **B** ZDF-*fa*/*fa* Ratten. Färbung: 0.1 % Sirius Red, Schichtdicke: 2 μ m, Objektivvergrößerung: 10 x.

3.1.3 PAP₁ Aktivität

Die Untersuchung der linksventrikulären PAP₁ Aktivität ergab eine um 29 % reduzierte Aktivität bei ZDF-*fa/fa* Ratten (224 ± 11 nmol DAG/h/mg Protein) im Vergleich zu den heterozygoten ZDF-*fa/+* Ratten (344 ± 25 nmol DAG/h/mg Protein) ($p < 0.01$) (Abb. 3.2). Dieser Unterschied konnte im Vorhofmyokard nicht nachgewiesen werden: Die PAP₁ Aktivität des Vorhofgewebes der ZDF-*fa/fa* Ratten betrug 96 ± 5 nmol DAG/h/mg Protein, die der ZDF-*fa/+* Ratten 114 ± 6 nmol DAG/h/mg Protein (Abbildung 3.2).

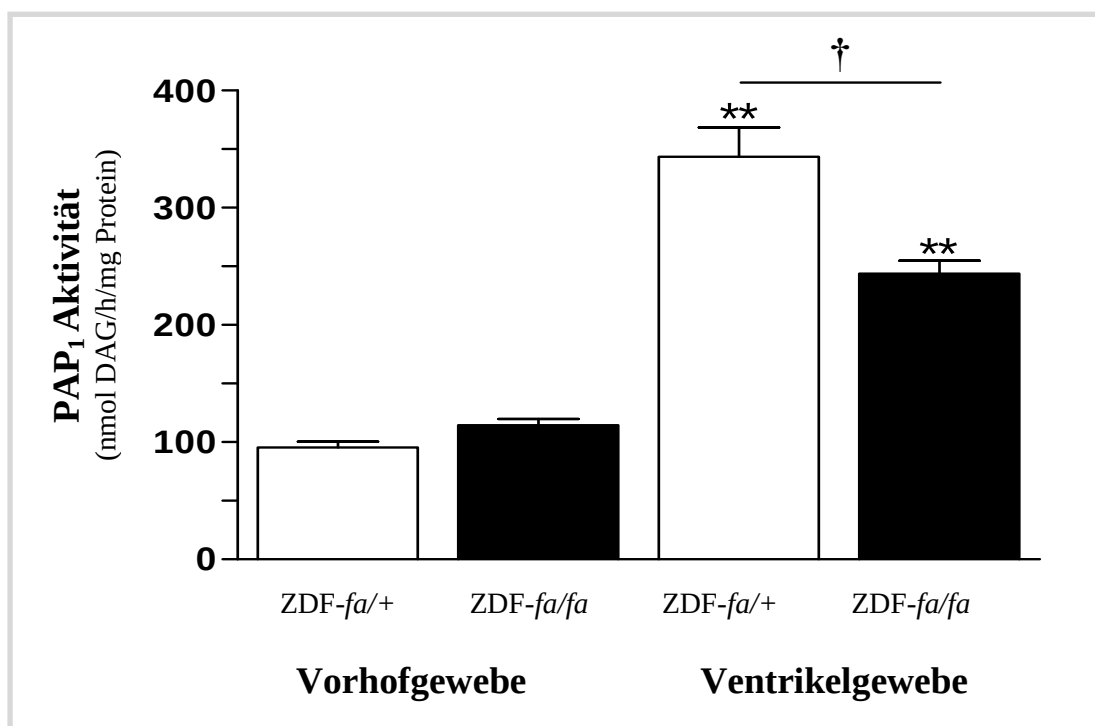


Abbildung 3.2 PAP₁ Aktivität im linken Vorhof- und Ventrikelmyokard der 8 Monate alten heterozygoten ZDF-*fa/+* und homozygoten ZDF-*fa/fa* Ratten ($n = 9$ je Gruppe).

** $p < 0.01$ vs. jeweilige Vorhofenzymaktivität, † $p < 0.01$.

3.1.4 Lipin 1 Expression

Entsprechend der reduzierten linksventrikulären PAP₁ Aktivität bei den ZDF-*fa/fa* Ratten konnte eine um 36 % verminderte linksventrikuläre Lipin 1 Expression im Vergleich zu den ZDF-*fa/+* Ratten nachgewiesen werden ($0,18 \pm 0,03$ mRNA Kopien/ GAPDH mRNA Kopien vs. $0,12 \pm 0,03$ mRNA Kopien/ GAPDH mRNA Kopien) ($p < 0.01$), siehe *Abbildung 3.3*. Im Vorhofgewebe konnte dieser Unterschied hingegen nicht gezeigt werden ($0,025 \pm 0,01$ mRNA Kopien/ GAPDH mRNA Kopien vs. $0,019 \pm 0,01$ mRNA Kopien/ GAPDH mRNA Kopien). Gemäß der regionalen PAP₁ Aktivitätsunterschiede konnte im linken Ventrikel eine, im Vergleich zum jeweiligen Vorhofgewebe, 6- bis 7-fach höhere Lipin 1 mRNA Expression gemessen werden.

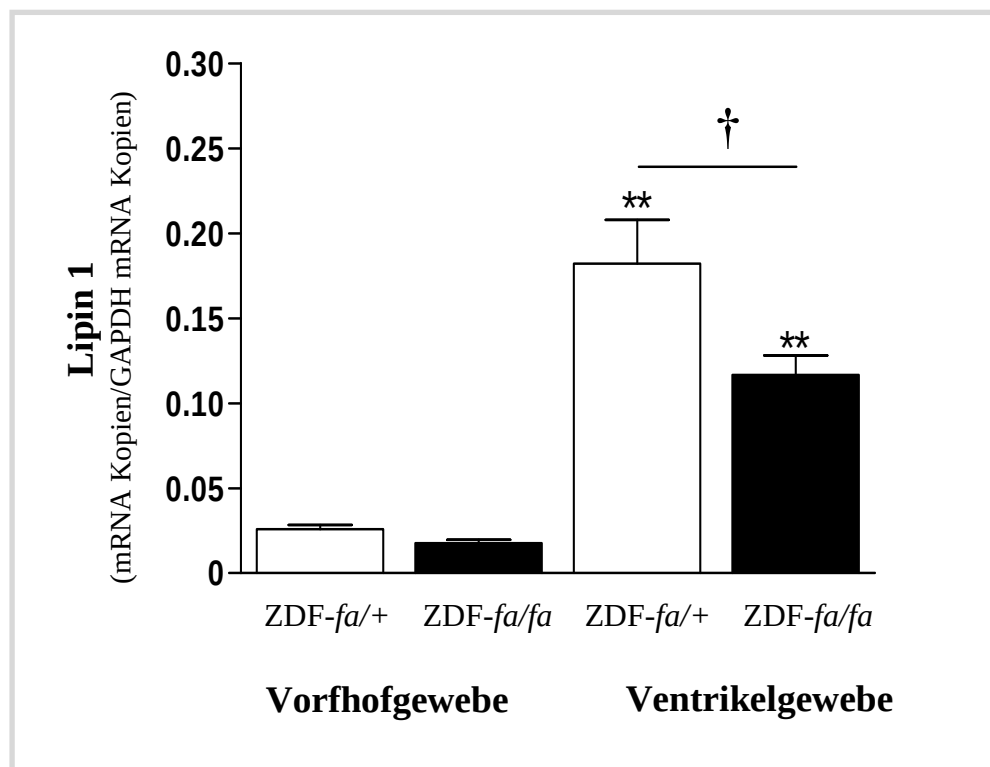


Abbildung 3.3 Lipin 1 mRNA Expression im linken Vorhof- und Ventrikelgewebe der 8 Monate alten heterozygoten ZDF- *fa/+* und homozygoten ZDF-*fa/fa* Ratten ($n = 9$ je Gruppe). ** $p < 0.01$ vs. Lipin 1 Expression im jeweiligen Vorhofgewebe. † $p < 0.01$.

Die Korrelationsanalyse zwischen der PAP_1 Aktivität und Lipin 1 mRNA Expression im Vorhof- und Ventrikelmyokard der ZDF-*fa*/+ und ZDF-*fa*/*fa* Ratten ergab eine strenge Korrelation mit $r = 0.99$ ($p < 0.01$) (Abbildung 3.4).

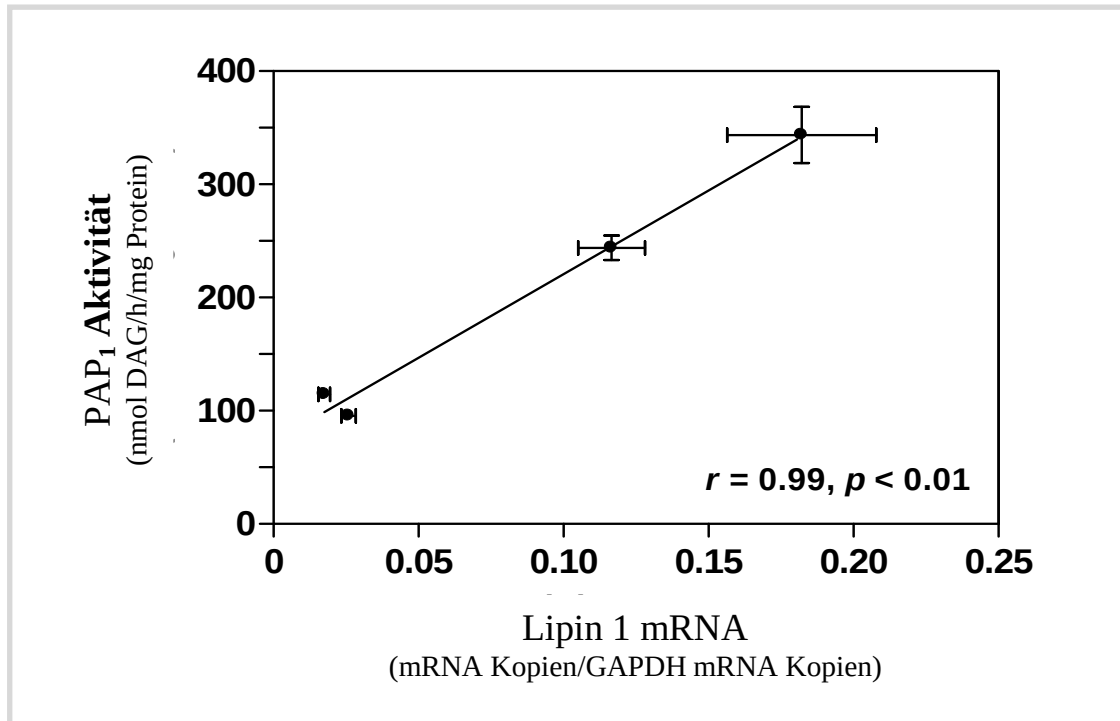


Abbildung 3.4 Korrelationsanalyse zwischen PAP_1 Aktivität und Lipin 1 mRNA Expression in Vorhof- und Ventrikelmyokard der 8 Monate alten ZDF-*fa*/+ und ZDF-*fa*/*fa* Ratten ($n = 9$ je Gruppe).

3.2 Humanes Vorhofgewebe

3.2.1 Klinische Patientendaten und hämodynamische Charakterisierung

Die klinischen Patientendaten der Kontrollgruppe ($n = 21$) wurden verglichen mit der Gruppe der Diabetiker mit Insulinbehandlung ($n = 7$) und ohne Insulintherapie ($n = 8$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-diabetischen Patienten und den diabetischen Patienten fand sich in Bezug auf den Plasmaglukosespiegel, der bei den diabetischen Patienten (157 ± 22 mg/dl vs. 197 ± 25 mg/dl) im Vergleich zur Kontrollgruppe (106 ± 5 mg/dl) um das 1,5-fache bzw. 1,8-fache erhöht vorlag (*Tabelle 3.3*). Der Vergleich der Gruppen ergab außerdem einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Alters der Patienten mit Diabetes und Insulintherapie, welche zum Zeitpunkt der Bypass-Operation deutlich jünger waren als die Patienten der anderen beiden Gruppen. Der Plasmaglukosespiegel war unabhängig von der Insulintherapie in beiden Gruppen der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten signifikant erhöht.

Es konnte ein moderat erhöhter Hämoglobin A_{1C}-Spiegel im Serum der Patienten mit Diabetes mellitus und diätetischer Behandlung ($6,7 \pm 0,2$ %) sowie ein deutlich erhöhter Spiegel im Serum der Patienten mit Insulintherapie ($8,4 \pm 0,9$ %) nachgewiesen werden. Die diabetischen Patienten mit Insulintherapie zeigten zudem, im Vergleich zur Kontrollgruppe, einen 2-fach höheren Triglyzeridspiegel im Plasma.

Die transthorakale echokardiographische Untersuchung konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leicht reduzierte Ejektionsfraktion in der Gruppe der Diabetiker mit und ohne Insulintherapie nachweisen (*Tabelle 3.3*).

Tabelle 3.3 Klinische Daten der Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 2 ($n = 21$) und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, aufgeteilt nach der jeweiligen Therapie.

BMI = Body Mass Index; IVSd = Intraventrikuläre Septumdicke in der Diastole; KHK = Koronare Herzkrankheit; LA = Durchmesser linker Vorhof; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck; LVED = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVDP = linksventrikulärer diastolischer Druck; LVSP = linksventrikulärer systolischer Druck; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck.

[†] $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe, * $p < 0.01$ vs. Kontrollgruppe.

	Kontrollgruppe ($n = 21$)	Diabetische Patienten (Diät) ($n = 8$)	Diabetische Patienten (Diät + Insulin) ($n = 7$)
Alter (Jahre)	66 ± 2	65 ± 3	$57 \pm 2^{\dagger}$
Männer : Frauen ($n : n$)	15 : 6	6 : 2	6 : 1
Glukose im Plasma (mg/dl)	106 ± 5	$157 \pm 22^{\dagger}$	$197 \pm 25^*$
Haemoglobin A _{1C} (%)	-	6.7 ± 0.2	8.4 ± 0.9
BMI (kg/m^2)	27 ± 1	27 ± 1	31 ± 3
Triglyzeride im Plasma (mg/dl)	160 ± 24	123 ± 25	$335 \pm 11^{\dagger}$
Kreatinin im Serum ($\mu\text{mol/l}$)	84 ± 4	86 ± 7	85 ± 9
Herzfrequenz (Schläge/min.)	84 ± 4	79 ± 7	72 ± 5
MAP (mm Hg)	96 ± 2	90 ± 5	107 ± 5

	Kontrollgruppe (<i>n</i> = 21)	Diabetische Patienten (Diät) (<i>n</i> = 8)	Diabetische Patienten (Diät + Insulin) (<i>n</i> = 7)
Koronarangiografie			
1-Gefäß KHK (<i>n</i>)	-	-	1 (14 %)
2-Gefäß KHK (<i>n</i>)	2 (10 %)	1 (13 %)	1 (14 %)
3-Gefäß KHK (<i>n</i>)	19 (90 %)	7 (87 %)	5 (72 %)
LVEF (%)	62 ± 3	56 ± 7	54 ± 4
LVSP (mmHg)	149 ± 6	144 ± 13	158 ± 12
LVEDP (mmHg)	19 ± 2	13 ± 2	22 ± 4
Echokardiografie			
LVEF (%)	47 ± 3	46 ± 6	52 ± 2
LA (mm)	39 ± 1	46 ± 3	41 ± 2
LVDd (mm)	53 ± 2	56 ± 5	46 ± 3
IVSd (mm)	12 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
LVPWd (mm)	12 ± 1	11 ± 1	13 ± 1

3.2.2 Kollagengehalt des Myokards

Die histologische Untersuchung des rechten Vorhofgewebes zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Kollagengehaltes zwischen den Gruppen (Patienten ohne Diabetes mellitus: 12 ± 1 %, Patienten mit Diabetes mellitus ohne Insulintherapie: 12 ± 2 %, Patienten mit Diabetes mellitus und Insulintherapie: 15 ± 3 %).

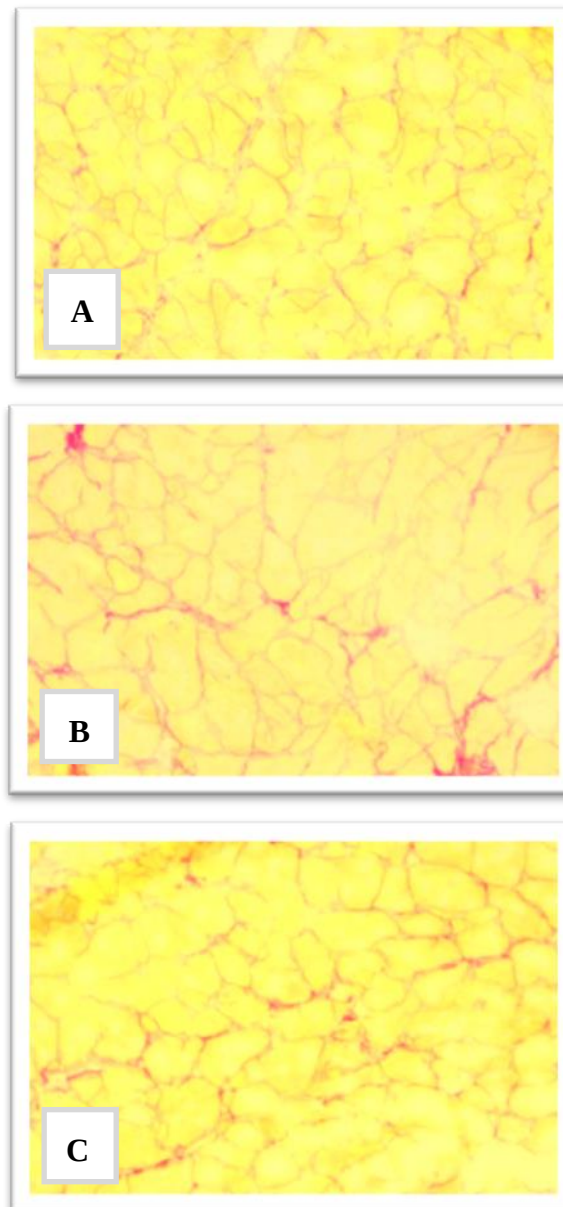


Abbildung 3.5 Repräsentative Gefrierschnitte eines Patienten ohne Diabetes mellitus (A) und eines Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 jeweils ohne Insulintherapie (B) und mit Insulintherapie (C). Schichtdicke $4 \mu\text{m}$, 0,1 % Sirius Red Färbung, 20 x Objektivvergrößerung.

3.2.3 PAP₁ Aktivität

Im Vergleich zu den nicht-diabetischen Patienten konnte eine um 33% reduzierte PAP₁ Aktivität im Vorhofgewebe der diätetisch behandelten Diabetiker nachgewiesen werden (312 ± 24 DAG nmol/h/mg Protein vs. 215 ± 23 DAG nmol/h/mg Protein). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-diabetischen Patienten und den diabetischen Patienten mit Insulintherapie festgestellt werden (270 ± 18 DAG nmol/h/mg Protein) (*Abbildung 3.6*).

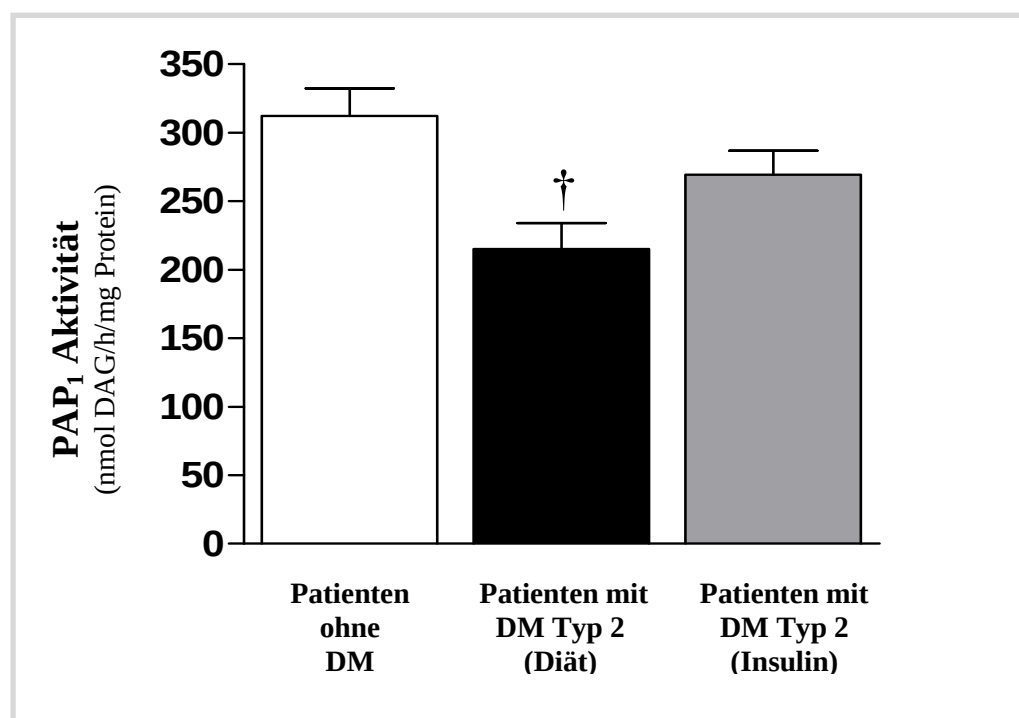


Abbildung 3.6 PAP₁ Aktivität im rechten Vorhofgewebe von Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 2, $n = 21$, Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und diätetische Behandlung $n = 8$ und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Insulintherapie, $n = 7$; DM = Diabetes mellitus.

† $p < 0.05$ vs. nicht diabetische Patienten.

3.2.4 Lipin 1 Expression

Die Lipin 1 mRNA Expression im Vorhofgewebe von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und ausschließlich diätetischer Behandlung zeigte im Vergleich zur Lipin 1 mRNA Expression bei Patienten ohne Diabetes mellitus eine 50 % -ige Verminderung ($0,07 \pm 0,02$ Kopien/GAPDH mRNA Kopien vs. $0,15 \pm 0,02$ Kopien/GAPDH mRNA Kopien) (Abbildung 3.7).

Diese Beobachtung wurde bei den diabetischen Patienten mit Insulintherapie nicht gemacht. Bei diesen Patienten konnte kein Unterschied zur Gruppe der nicht-diabetischen Patienten nachgewiesen werden ($0,16 \pm 0,04$ Kopien/GAPDH mRNA Kopien).

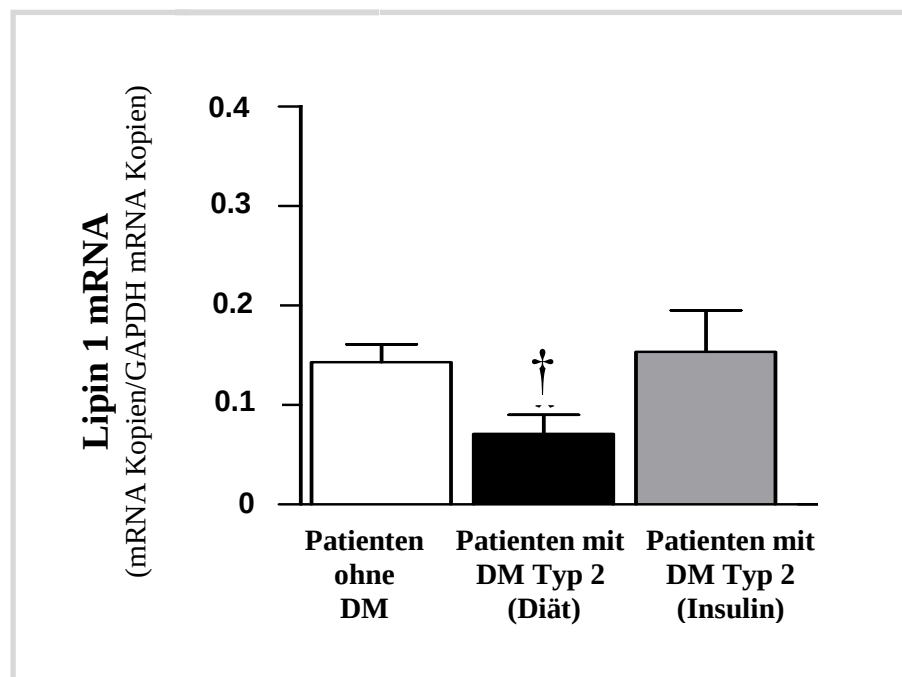


Abbildung 3.7 Lipin 1 mRNA Expression im rechten Vorhofgewebe von Patienten ohne Diabetes mellitus, $n = 21$, Patienten mit Diabetes mellitus und diätetischer Behandlung $n = 8$ und Patienten mit Diabetes mellitus mit Insulintherapie $n = 7$; DM = Diabetes mellitus, † $p < 0,05$ vs. Patienten ohne Diabetes mellitus.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression im linken Vorhof- und Ventrikelmyokard von diabetischen und nicht-diabetischen ZDF-Ratten sowie im rechten Vorhofmyokard von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Die PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression ist sowohl im linksventrikulären Myokard der Typ 2 diabetischen ZDF-Ratte als auch im rechten Vorhofmyokard von Patienten mit diätetisch behandeltem Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.
2. Es findet sich eine strenge Korrelation zwischen der myokardialen PAP₁ Aktivität und Lipin 1 mRNA Expression bei der ZDF-Ratte.

Die Ergebnisse, welche anhand der ZDF-Ratte gewonnen wurden zeigen, dass die homozygoten Ratten Zeichen des natürlichen Verlaufs eines unkontrollierten Diabetes mellitus im frühen Stadium aufwiesen [84]. Die Tiere verloren deutlich an Körpergewicht und fielen im Vergleich zu den nicht-diabetischen ZDF-Ratten durch eine erhöhte Blutglukosekonzentration auf. Zudem konnten bei den ZDF-*fa/fa* Ratten signifikant verminderte hämodynamische Parameter der erkrankten Herzen im Sinne einer kardialen Dysfunktion nachgewiesen werden mit vergleichbaren Ergebnissen zu anderen Studien [6,90]. Ein unterschiedlicher Kollagengehalt im Myokard der diabetischen und nicht-diabetischen Gruppen konnte histologisch ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Eignung der ZDF-Ratte als Tiermodell, um frühe Veränderungen am Herzen durch den Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen.

Zur Untersuchung des kardialen Lipidmetabolismus wurde zunächst die PAP₁ Aktivität im Myokard der ZDF-Ratte untersucht. Dabei zeigte sich die PAP₁ Aktivität der ZDF-*fa/fa* Ratte im Vergleich zur ZDF-*fa/+* Ratte signifikant erniedrigt. Dieser Befund unterstreicht bereits publizierte Daten, welche anhand des Modells der JCR:LA-korpulenten Ratte, die durch eine Insulinresistenz im Sinne eines Typ 2 Diabetes mellitus gekennzeichnet ist, gewonnen wurden und bei welchen im Vergleich zum Wildtyp eine erniedrigte myokardiale PAP₁ Aktivität nachgewiesen werden konnte [59].

Kontrovers hingegen erscheinen die Ergebnisse der bisher publizierten Experimente am Streptozotizin-induzierten Diabetesmodell, da hier erhöhte PAP₁ Aktivitäten gemessen werden konnten [110,135]. Dieser Umstand ist am ehesten durch die unterschiedlichen Tiermodelle zu erklären. Die vorliegenden Untersuchungen mit der ZDF-Ratte stellt ein Modell des Typ 2 Diabetes mellitus dar; die Ergebnisse am Streptozotizin-induzierten Diabetes leiten sich dagegen durch die vollständige Zerstörung der B-Zellen des Pankreas, einem Modell des Typ 1 Diabetes, ab. Aufgrund der divergierenden Pathogenese dieser beiden Formen des Diabetes mellitus sind die Ergebnisse der Studien demnach nicht vergleichbar.

Die weiteren Ergebnisse der PAP₁ Aktivitätsmessung und die Darstellung der Lipin 1 mRNA Expression bei den ZDF-Ratten zeigten eine strenge Korrelation zwischen der PAP₁ Aktivität und der Lipin 1 Expression in Vorhof und Ventrikel. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass die nachgewiesene PAP₁ Aktivität der enzymatischen Wirkung des exprimierten Lipin 1 entspricht. Bestätigung findet diese Vermutung in den zuvor durchgeführten Studien an der (*fld*) Maus, bei welcher ein inaktives Lipin 1 Gen zu einer um über 80 % reduzierten [49,66], oder nicht mehr nachweisbaren PAP₁ Aktivität führte [37,55]. Die aktuellen Ergebnisse untermauern die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass Lipin 1 eine PAP₁ Aktivität besitzt.

Interessanterweise wurde im Jahr 2011 ebenfalls eine Studie an Herzmuskelgewebe durchgeführt, welche die Lipin 1 Expression untersuchte. Eine der Untersuchungen wurde an Kardiomyozyten der TG9 Maus durchgeführt, welche durch eine kardiale ventrikuläre Hypertrophie im Sinne einer globalen Herzinsuffizienz gekennzeichnet ist. Im Herzen der erkrankten Mäuse konnte sowohl eine signifikant reduzierte Lipin 1 mRNA Expression, als auch eine signifikant erniedrigte Lipin 1 Konzentration nachgewiesen werden, korrelierend zur ebenfalls erniedrigten PAP₁ Aktivität und einer erhöhten Konzentration von PA im Kardiomyozyten [76]. Diese Entdeckung unterstreicht erneut den Zusammenhang der Wirkung von Lipin 1 und deren PAP₁ Aktivität am Myozyten.

Mit Blick auf die PAP₁ Aktivität in den Kardiomyozyten der ZDF-Ratten kann die vorliegende Arbeit regionale Unterschiede zeigen mit einer erheblich niedrigeren Aktivität im linken Vorhofgewebe, verglichen mit der Aktivität im linken Ventrikelgewebe. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Befunden, welche an humanen Myozyten gewonnen wurden mit Nachweis einer höheren Stoffwechselaktivität im Ventrikelgewebe [22].

Die Ergebnisse, welche anhand der Vorhofgewebeproben von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 gewonnen wurden, ergaben eine gute Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander. Bis auf einen signifikant erhöhten Plasmaglukosespiegel und einer leicht reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion in der Echokardiographie, welche in der Herzkatheteruntersuchung kein Korrelat fand, zeigten sich in der Gruppe der Diabetiker mit und ohne Insulintherapie keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Der Kollagengehalt des Gewebes war zwischen den Gruppen vergleichbar und stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein [40,127].

Zur Testung der kardialen PAP₁ Aktivität und Lipin 1 mRNA Expression in humanem Gewebe wurde ausschließlich rechtes Vorhofgewebe verwendet. Die Tatsache, dass kein Ventrikelgewebe, insbesondere kein linkes Ventrikelgewebe untersucht wurde, kann als Limitation dieser Arbeit gesehen werden.

Die Schwierigkeit, humanes Ventrikelgewebe zu gewinnen liegt in den Operationsverfahren begründet, da nur selten im Zuge einer Herzoperation Ventrikelgewebe entnommen wird. Daher war es nicht möglich, humanes Ventrikelgewebe in ausreichender Menge zu gewinnen und zu untersuchen.

Die hier vorliegenden Ergebnisse, welche anhand des rechten Vorhofgewebes gewonnen wurden, zeigen eine erniedrigte PAP₁ Aktivität und Lipin 1 mRNA Expression im Vorhofmyokard der an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten, die eine diätetische Behandlung erhielten. Dieses Ergebnis stimmt mit den zuvor beschriebenen Befunden überein, welche am Rattenmyokard erhoben wurden sowie mit den bisher veröffentlichten Daten, welche die Lipin 1 Expression bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersuchten. In einer Vielzahl von Studien konnte eine erniedrigte Lipin 1 mRNA Expression in Adipozyten bei Menschen mit einer erhöhten Insulinresistenz aufgezeigt werden [30,121,136]. Überraschenderweise war die PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression im Vorhofmyokard der diabetischen Patienten, die regelmäßig Insulin substituierten, auf dem Niveau der Patienten ohne Diabetes mellitus Typ 2. Die Frage, ob die Insulintherapie die PAP₁ Aktivität bzw. die Lipin 1 mRNA Expression gesteigert haben könnte, kann nicht sicher beantwortet werden. Interessanterweise kam eine Studie von Yao-Borengasser und Mitarbeiter zu ähnlichen Ergebnissen, welche im Fettgewebe von Patienten mit Insulinresistenz eine verminderte Lipin 1 Expression nachweisen und diese mit Hilfe der Gabe eines Insulin-Sensitizers um 200 % steigern konnten [136].

Mehrfach wurde die Wirkung von Insulin auf die PAP₁ Aktivität bzw. auf die Lipin 1 mRNA Expression untersucht, bisher jedoch nicht an Kardiomyozyten. In einer Arbeit von Saggerson und Mitarbeiter führte die Inkubation von Adipozyten der Streptozotizin-induzierten diabetischen Ratte mit Insulin zu einer signifikanten PAP₁ Aktivitätssteigerung *in vitro* [106].

Zu gegenteiligen Befunden kamen hingegen andere Studien, in denen Insulin zu einer Hemmung der Transkription des *LPIN1* Gens führte [70,100], vermutet wurde eine insulinabhängige Phosphorylierung des *LPIN1* Gens [49,55,58].

Die Analyse der Korrelation der Lipin 1 Werte mit der zellulären PAP₁ Aktivität des humanen Vorhofmyokards erbrachte keinen nachweisbaren Zusammenhang, obwohl dieser in der vorliegenden Studie anhand des ZDF-Rattenmodells, als auch anhand anderer Studien am Tiermodell mehrfach aufgezeigt werden konnte [37,49,55]. Es ist anzunehmen, dass multiple Einflüsse auf das Myokard der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 die Lipin 1 mRNA Expression und die PAP₁ Aktivität in noch unbekannter Weise beeinflussen. Das untersuchte humane Vorhofgewebe stammte von älteren Patienten, welche unter den Folgen einer schweren, langjährigen koronaren Herzkrankheit litten. Die Herzkranzgefäße waren bereits arteriosklerotisch verändert und führten zu einer Minderperfusion des Myokards. Eine reine diabetische Kardiomyopathie, wie sie bei den ZDF-Ratten nachzuweisen war, lag damit nicht vor. Zudem wiesen die Patienten, die an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren, eine unterschiedliche Krankheitsdauer auf. Die Patienten erfuhren zudem verschiedene pharmakologische Interventionen, deren Auswirkungen auf die Lipidhomöostase des Myokards nicht abzuschätzen sind.

Bei einer Suppression der PAP₁ Aktivität muss davon ausgegangen werden, dass die in der Enzymkaskade vorgeschalteten Proteine erhöht vorliegen und es zu einer gesteigerten Wirkung dieser Proteine kommt. Vorherige Untersuchungen an Kardiomyozyten der (*fld*) Maus mit erniedrigter PAP₁ Aktivität bestätigten die Vermutung durch Nachweis einer Akkumulation von PA [33,66,76]. PA ist das Substrat für die PAP₁ Reaktion, gleichzeitig dient es auch der *de novo* Synthese anderer Phospholipide, wie Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Cardiolipin [107].

Aktuelle Studien konnten nachweisen, dass eine Akkumulation von PA die *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) Kaskade aktiviert, was zu einer Zellvergrößerung [85,114], einer Hypertrophie der Kardiomyozyten mit kardialer Dysfunktion führen kann [14].

Nach dem heutigen Erkenntnisstand reguliert Lipin 1 den Fettstoffmetabolismus auf zwei Weisen: Über die *de novo* Glycerolipid- und TAG Synthese, wie auch über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der Gene, welche für die β -Oxidation der Fettsäuren verantwortlich sind. Initial wurden die beiden Wirkweisen als antagonisierende Reaktionen gesehen, zunehmend werden diese jedoch als synergistische Effekte verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung freier Fettsäuren, welche aus TAG freigesetzt werden, zu einem signifikanten Anstieg der Fettsäureoxidation führt [4,64]. Lipin 1 besitzt daher eine Schlüsselfunktion in der Homöostase zwischen TAG-Synthese und Fettsäureoxidation. Über die Regulation des *LPIN1* Gens ist bisher jedoch wenig bekannt. Lange galt die Aktivierung der Transkription des *LPIN1* Gens durch freie Fettsäuren als unumstritten [71]. Paradox scheint hingegen das Ergebnis einer Studie nach Elabaddi und Mitarbeiter zu sein; hier konnte eine reversible Hemmung der PAP₁ Aktivität durch freie Fettsäuren festgestellt werden [39].

Bezüglich der Regulation des *LPIN1* Gens konnte PGC1- α , der Co-Aktivator des Transkriptionsfaktors PPAR α , als auch der Transkriptionsfaktor PPAR α , ausgemacht werden, welche selbst durch Lipin 1 aktiviert werden [45]. PGC1- α induziert die Transkription von Lipin 1 am Kardiomyozyten über das erste Intron des *LPIN1* Gens [43,44]. Eine aktuelle Studie von Mitra und Mitarbeiter konnte zeigen, dass eine kardiale Überexpression von PGC1- α einen Anstieg der Lipin 1 mRNA Expression auf über den 2-fachen Wert bewirkt und zu einer Steigerung der PAP₁ Aktivität um ca. 50 % führt [76]. Nach Aktivierung des Co-Aktivators PGC-1 α und des Transkriptionsfaktors PPAR α durch Lipin 1 kommt zu einer gesteigerten Expression von Genen, welche die Synthese von Enzymen des Fettsäuretransports und der Fettsäureoxidation steuern [74].

Unter der gesteigerten Fettsäureoxidation entstehen vermehrt freie Fettsäuren, welche ihrerseits die Lipin 1 Expression steigern (*Abbildung 4.1*).

In Hinblick auf die Wirkung von Glukokortikoiden konnte gezeigt werden, dass diese die hepatische *LPIN1* Transkription stimulieren und damit zu einer höheren Lipin 1 Expression und einer erhöhten PAP₁ Aktivität in den Hepatozyten führen [70]. Reue und Mitarbeiter fanden zudem heraus, dass aktivierte Glukokortikoidrezeptoren in Adipozyten und Hepatozyten in den Nukleolus translozieren und an das Glukokortikoid-Rezeptor-Element am Lipin 1 Promotor binden und diesen aktivieren [100,139].

Auch am Kardiomyozyten konnte eine gesteigerte Lipin 1 Expression durch Glukokortikoide aufgezeigt werden [65]. Mit Blick auf die Regulation des *LPIN1* Gens und die Aktivierung durch freie Fettsäuren, Glukokortikoide und PGC-1 α stellt sich die Frage nach der Wirkung dieser Faktoren auf den Kardiomyozyten beim Diabetes mellitus Typ 2. Das diabetische Herz ist durch hohe Konzentrationen freier Fettsäuren und TAG gekennzeichnet [3] und es kommt am Herzen aufgrund der verminderten Insulinwirkung zu einer Steigerung der Glukokortikoidsekretion [94]. Daher würde man bei dieser Stoffwechsellage mit einer gesteigerten Lipin 1 mRNA rechnen, insbesondere um eine kompensatorische Steigerung der β -Oxidation zu bewirken und die Bildung toxischer Lipidmetaboliten zu verhindern.

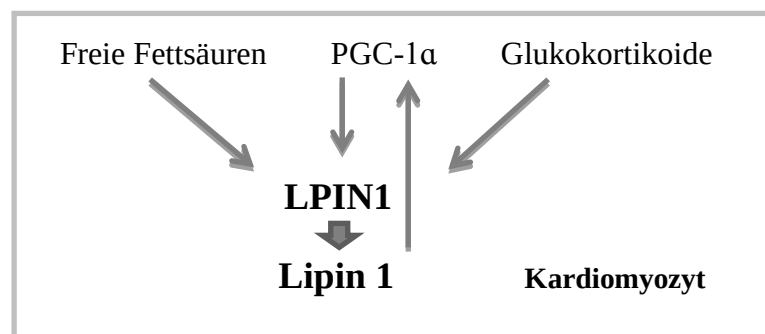


Abbildung 4.1 Förderung der Transkription von *LPIN1* durch freie Fettsäuren, Glukokortikoide und den Transkriptionsfaktor PGC-1 α , welcher selbst durch Lipin 1 aktiviert wird (Abkürzungen siehe Text).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit sowie viele andere bereits genannte Studien widersprechen dieser Annahme, daher muss von weiteren, bisher unbekannten regulatorischen Mechanismen ausgegangen werden. Möglicherweise ist beim Diabetes mellitus Typ 2 die kompensatorische Gegenregulation gestört. Es ist zudem anzunehmen, dass es bei einem fortgeschrittenen Diabetes mellitus mit einer länger bestehenden Schädigung der Kardiomyozyten zu einer chronischen Dysregulation kommt. Hinweise darauf ergab eine Studie an Ratten mit einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz, hier konnte eine reduzierte Fettsäureoxidation sowie eine erniedrigte PCG-1 α -Konzentration aufgezeigt werden [46].

Zu vermuten ist zudem das Bestehen einer genetischen Grundlage aufgrund der signifikant häufiger auftretenden Polymorphismen des *LPIN1* Gens bei Patienten mit metabolischem Syndrom und Diabetes Typ 2 [7,134].

5 Zusammenfassung

Lipin 1 besitzt eine Phosphatidat Phosphohydrolase 1 (PAP₁) Enzymaktivität und katalysiert die Konversion von Phosphatidat zu Diacylglycerol. Diacylglycerol dient der Triacylglycerol und Phospholipid *de novo* Synthese und nimmt eine wichtige Rolle in der kardialen Lipidhomöostase ein. Bisherige Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen der Lipin 1 mRNA Expression und dem Bestehen einer Insulinresistenz.

In der vorliegenden Arbeit wurden die kardiale PAP₁ Aktivität und die Lipin 1 mRNA Expression *ex vivo* im linken Vorhof- und Ventrikelmyokard von acht Monate alten diabetischen und nicht-diabetischen Zucker diabetic fatty (ZDF) Ratten und im rechten Vorhofgewebe von Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 untersucht.

Im Vergleich zu den nicht-diabetischen ZDF-*fa/+* Ratten fand sich bei den Typ 2 diabetischen ZDF-*fa/fa* Ratten eine um 29 % verminderte linksventrikuläre PAP₁ Aktivität. Korrelationsuntersuchungen am Rattenmyokard ergaben eine strenge Korrelation zwischen PAP₁ Aktivität und kardialer Lipin 1 mRNA Expression ($r = 0.99$).

Analog zu diesen Ergebnissen fand sich im Vorhofmyokard der Patienten mit diätetisch behandelten Diabetes mellitus Typ 2 eine im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe eine um 33 % verminderte PAP₁ Aktivität und eine um 50 % supprimierte Lipin 1 mRNA Expression. Im Vorhofmyokard der Diabetiker, welche Insulin substituierten, konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eine Verbindung zwischen dem Bestehen eines Diabetes mellitus Typ 2 und dem Vorliegen einer supprimierten kardialen PAP₁ Aktivität bzw. Lipin 1 mRNA Expression nach unter der Annahme, dass diese zur metabolischen Dysfunktion des diabetischen Herzens beiträgt.

6 Veröffentlichungen

Burgdorf C¹, Hänsel L¹, Heidbreder M, Jöhren O, Schütte F, Schunkert H, Kurz T: **Suppression of cardiac phosphatidate phosphohydrolase 1 activity and lipin mRNA expression in Zucker diabetic fatty rats and human with type 2 diabetes mellitus.**
Biochemical and Biophysical Research Communications 2009; 390: 165-170.

¹ Gemeinsame Erstautorenschaft

Burgdorf C, Hänsel L, Heidbreder M, Jöhren O, Schütte F, Schunkert H, Kurz T: **Suppression of left ventricular Lipin 1 mRNA and corresponding phosphatidate phosphohydrolase 1 activity in experimental type 2 diabetic cardiomyopathy.**
Clinical Research in Cardiology 2009; 98 [Suppl.1]: V635.

Burgdorf C, Hänsel L, Heidbreder M, Jöhren O, Schütte F, Schunkert H, Kurz T: **Suppression of left ventricular Lipin 1 mRNA and corresponding phosphatidate phosphohydrolase 1 activity in experimental type 2 diabetic cardiomyopathy.**
European Heart Journal 2009; 30 [Suppl.]: 574.

weitere Veröffentlichungen

Hänsel L, Ewald H, Hoch J: **Qualitätsbericht – nur eine administrative Bürde?**
German Medical Science 2013 [Suppl]: 14.

Hänsel L, Kisse B, Bormann C, Hoch J: **Unteres Bodylift und HLT-Abdominoplastik: Maßnahmen zur Senkung des Risikos der Gabe von Blutersatzstoffen.**
German Medical Science 2016 [Suppl]: 239.

Kisse B, Hänsel L, Tomala M: **Ausgedehnte Abdominoplastik nach Gewichtsreduktion mit gleichzeitiger Hernioplastik – steigt das Risiko?**
German Medical Science 2016 [Suppl]: 238.

Literaturverzeichnis

- 1 Aasum E, Hafstad AD, Severson DL, Larsen TS: Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice, *Diabetes* 2003; 52: 434-441.
- 2 Abe T, Ohga Y, Tabayashi N, Kobayashi S, Sakata S, Misawa H, Tsuji T, Kohzuki H, Suga H, Taniguchi S, Takaki M: Left ventricular diastolic dysfunction in the type 2 diabetes mellitus model rat, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H138-H148.
- 3 An D, Rodrigues B: Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1489-H1506.
- 4 Banke N, Wende AR, Leone TC, O'Donnell JM, Abel ED, Kelly PD, Lewandowski ED: Preferential oxidation of triglyceride-derived fatty acids in the heart is augmented by the nuclear receptor PPARalpha, *Circ Res* 2010; 107: 233-241.
- 5 Barger PM, Kelly DP: PPARsignaling in the control of cardiac energy metabolism, *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 238-245.
- 6 Baynes J, Murray DB: Cardiac and renal function are progressively impaired with aging in Zucker diabetic fatty Typ II diabetic rats, *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2: 328-334.
- 7 Bego T, Dujic T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, Ostanek B, Marc J, Causević A: Association of PPARG and LPIN1 gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Med Glas Ljek komore Zenicko-dobojski* 2011; 8: 76-83.
- 8 Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA: Diabetic cardiomyopathy: Mechanism and Therapeutic Targets, *Drug Disc Today Dis Mech* 2010; 7: e135-e143.
- 9 Belke DD, Larsen TS, Lopaschuk GD, Severson DL: Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart, *Am J Physiol* 1999; 277: R1210-1217.

- 10 Bell DS: Diabetic cardiomyopathy, *Diabetes care* 2003; 23: 2949-2951.
- 11 Bell DS, Face MB: Heart failure; the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes, *Diabetes Care* 2003; 26: 2433-2440.
- 12 Bertoni AG, Tsai A, Kasper EK, Brancati FL: Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study, *Diabetes Care* 2003; 26: 2791-2795.
- 13 Blygh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
- 14 Boluyt MO, Li ZB, Loyd AM, Scalia AF, Cirrincione GM, Jackson RR: The mTOR/p70S6K signal transduction pathway plays a role in cardiac hypertrophy and influences expression of myosin heavy chain genes in vivo, *Cardiovasc Drugs Ther* 20004; 18: 257-267.
- 15 Boudina S, Abel ED: Diabetic cardiomyopathy revisited, *Circulation* 2007; 115: 3213-3223.
- 16 Boudina S, Abel ED: Diabetic cardiomyopathy, causes and effects, *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 31-39.
- 17 Brindley DN: Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis, *Prog Lipid Res* 1984; 23: 115-133.
- 18 Brindley DN, Pilquin C, Sariahmetohlu M, Reue K, Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases, *Biochem Biophys Acta* 2009; 1791: 956-961.
- 19 Brindley DN, Kok BP, Kienesberger PC, Lehner R, Dyck JR: Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E897-E908.
- 20 Brinks R, Tomayo T, Kowall B, Rathmann W: Prevalence of type 2 diabetes in Germany in 2040: estimates from an epidemiological model, *Eur J Epidemiol* 2012; 27: 791-797.

- 21 Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED: Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity, *Endocrinology* 2005; 146: 5341-5349.
- 22 Burgdorf C, Prey A, Richardt G, Kurz T: A HPLC-fluorescence detection method for determination of phosphatidic acid phosphohydrolase activity: application in human myocardium, *Anal Biochem* 2008; 374: 291-297.
- 23 Boyer JK, Thanigaraj S, Schechtman KB, Pérez JE: Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus, *Am J Cardiol* 2004; 93: 870-875.
- 24 Carman GM, Henry SA: Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes, *Prog Lipid Res* 1999; 38: 261-399.
- 25 Carman GM, Han GS: Roles of phosphatase enzymes in lipid metabolism, *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 694-699.
- 26 Chang YC, Chang LY, Chang TJ, Jiang YD, Lee KC, Kuo SS, Lee WJ, Chuang LM: The association of LPIN1 gene expression in adipose tissue with metabolic phenotypes in the Chinese population, *Obesity* 2010; 18: 7-12.
- 27 Chen V, Ianuzzo CD, Fong BC, Spitzer JJ: The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats, *Diabetes* 1984; 33: 1078-1084.
- 28 Chen Y, Rui B-B, Tang L-Y, Hu C-M: Lipin Family Proteins – Key Regulators in Lipid Metabolism, *Ann Nutr Metab* 2015; 66: 10-18.
- 29 Coleman R, Hubscher G: Metabolism of phospholipids. V. Studies on phosphatidic acid phosphatase, *Biochim Biophys Acta* 1962; 56: 479-490.
- 30 Croce MA, Eagon JC, LaRiviere LL, Korenblat KM, Klein S, Finck BN: Hepatic Lipin 1 β Expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss, *Diabetes* 2007; 56: 2395-2399.
- 31 Csaki LS, Reue K: Lipins: Multifunctional Lipid metabolism proteins, *Annu Rev Nutr* 2010; 30: 257-272.

- 32 Csaki LS, Dwyer JR, Li X, Nguyen MHK, Dewald J, Brindley DN, Luis AJ, Yoshinaga Y, de Jong P, Fong L, Young SG, Reue K: Lipin 1 and lipin 3 together determine adiposity in vivo, *Molecular Metabolism* 2014; 3: 145-154.
- 33 Csaki LS, Dwyer JR, Fong LG, Tontonoz P, Young SG, Reue K: Lipids, Lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling, *Prog Lipid Res* 2013; 52: 305-316.
- 34 Diamant M, Lamb HJ, Groeneveld Y, Endert EL, Smit JW, Bax JJ, Romijn JA, de Roots A, Radder JK: Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus, *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 328-335.
- 35 Dillon D, Chen X, Zeimet GM, Wu W, Waggoner D, Dewald J, Brindley D, Carman G: Mammalian Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphatase activity, *J Biol Chem* 1997; 272: 10361-10266.
- 36 Dobrin JS, Lebeche D: Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches, *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010; 8: 373-391.
- 37 Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K: Three mammalian lipins act as a phosphate phosphohydrolases with distinct tissue expression patterns, *J Biol Chem* 2007; 282: 3450-2457.
- 38 Donkor J, Sparks LM, Xie H, Smith SR, K. Reue K: Adipose tissue lipin-1 expression is correlated with peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression and insulin sensitivity in healthy young men, *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 233-239.
- 39 Elabbadi N, Day CP, Virden R, Yeaman SJ: Regulation of phosphatidic acid phosphatase 1 by fatty acids, *Lipids* 2002; 37: 69-73.
- 40 Falcao-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, van Heerebeek L, Stienen GJ, Biessen HW, Leite-Moreira AF, Paulus WJ: Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness, *Circulation* 2011; 124: 1151-1159.
- 41 Fang ZY, Prins JB, Marwick TH: Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanism, and therapeutic implications, *Endocr Rev* 2004; 25: 543-567.

- 42 Fein FS: Diabetic cardiomyopathy, *Diabetes Care* 1990; 13: 1169-1179.
- 43 Finck BN, Kelly DP: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart, *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1249-1257.
- 44 Finck BN: The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway in pathological remodeling of the diabetic heart, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 391-396.
- 45 Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC, Kelly DP: Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway, *Cell Metab* 2006; 3: 199-210.
- 46 Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Venutra-Clapier R: Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles, *J Physiol* 2003; 551: 491-501.
- 47 Genda A, Mizuno S, Nunoda S, Nakayama A, Igarashi Y, Sugihara N, Namura M, Takeda R, Bunko H, Hisada K: Clinical studies on diabetic myocardial disease using exercise testing with myocardial scintigraphy and endomyocardial biopsy, *Clin Cardiol* 1986; 9: 375-382.
- 48 Gibellini F, Smith TK: The Kennedy pathway – De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, *IUBMB Life* 2010; 62: 414-428.
- 49 Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniossoglou S: Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphohydrolases lipin 1 and 2, *J Biol Chem* 2008; 283: 29166-29174.
- 50 Golfman LS, Takeda N, Dhalla NS: Cardiac membrane Ca(2+)-transport in alloxan-induced diabetes in rats, *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 33: 73-77.
- 51 Gomez-Munoz A, Hatch GM, Martin A, Jamal Z, Vance DE, Brindley DN: Effects of okadaic acid on the activities of two distinct phosphatidate phosphatases in rat hepatocytes, *FEBS Lett* 1992; 301: 103-106.
- 52 Gropler MC, Harris TE, Hall AM, Wolins NE, Gross RW, Han X, Chen Z, Finck BN: Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice, *J Biol Chem* 2009; 284: 6763-6772.

- 53 Han GS, Wu WI, Carman GM: The *saccharomyces cerevisiae* lipin is a Mg^{2+} -dependent phosphatidate phosphohydrolase enzyme, *J Biol Chem* 2006; 281: 9210-9218.
- 54 Han GS, Carman GM: Characterization of human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms, *J Biol Chem* 2010; 285: 14628–14638.
- 55 Harris TE, Huffmann TA, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, Lawrence JC: Insulin controls subcellular localization of multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1, *J Biol Chem* 2007; 282: 277-286.
- 56 Hokin LE, Hokin MR, Mathison D: Phosphatidic acid phosphatase in erythrocyte membrane, *Biochim Biophys Acta* 1963; 67: 485-497.
- 57 Hopewell R, Martin-Sanz P, Martin A, Saxton J, Brindley DN: Regulation of the translocation of phosphatidate phosphohydrolase between the cytosol and the endoplasmic reticulum of rat liver. Effects of unsaturated fatty acids, spermine, nucleotides, albumin and chlorpromazine, *Biochem J* 1985; 232: 485-491.
- 58 Huffman TA, Mothe-Satney I, Lawrence JC: Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1047-1052.
- 59 Jamal Z, Martin A, Gomez-Muñoz A, Hales P, Chang E, Russell JC, Brindley DN: Phosphatidate phosphohydrolase in liver, heart and adipose tissue of the JCR: LA corpulent rat and the lean genotypes: implications for glycerolipid synthesis and signal transduction, *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992; 16: 789-799.
- 60 Kates M: Hydrolysis of lecithin by plant plasmid enzymes, *Can J Biochem Physiol* 1955; 33: 575-589.
- 61 Kava R, Greenwood MRC, Johnson PR: Zucker (*fa/fa*) Rat, *ILAR J* 1990; 32: 4-8.
- 62 Kennedy EP: The biosynthesis of phospholipids, *Lipids and Membranes: Past, Present, and Future*, Elsevier Science 1986: 171-206.
- 63 King H, Aubert RE, Herman WH: Global burden of diabetes, 1995-2025, *Diabetes Care* 1998; 2: 1414-1431.
- 64 Kok BP, Brindley DN: Myocardial fatty acid metabolism and lipotoxicity in the setting of insulin resistance, *Heart Fail Clin* 2012; 8: 643-661.

- 65 Kok BP, Dyck JR, Harris TE, Brindley DN: Differential regulation of the expressions of the PGC-1 α splice variants, lipins, and PPAR α in heart compared to liver, *J Lipid Res* 2013; 54: 1662-1677.
- 66 Kok BP, Kienesberger PC, Dyck JRB, Brindley DN: Relationship of glucose and oleate metabolism to cardiac function in lipin-1 deficient (*fld*) mice, *J Lipid Res* 2012; 53: 105-118.
- 67 Langner CA, Birkenmeier EH, Ben-Zeev O, Scholtz MC, Sweet HO, Davisson MT, Gordon JI: The fatty liver dystrophy (*fld*) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities, *J Biol Chem* 1989; 264: 7994-8003.
- 68 Loos RJ, Rankinen T, Perusse L, Tremblay A, Despres JP, Bouchard C: Association if lipin 1 polymorphism with measures of energy and glucose metabolism, *Obesity* 2007; 15: 2723-2732.
- 69 Lowry OH, Rosenbourg NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 70 Manmontri B, Sariahmetoglu M, Donkor J, Khalil MB, Sundaram M, Yao Z, Reue K, Lehner R, Brindley DN: Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatidic lipin 1 expression, and insulin acts antagonistically, *J Lipid Res* 2008; 49: 1056-1067.
- 71 Martin A, Gomez-Munoz A, Jamal Z, Brindley DN: Characterization and assay of phosphatidate phosphatase, *Methods Enzymol* 1991; 197: 553-563.
- 72 Martin PGP, Guillou H, Lasserre F, Dejean S, Lan A, Pascussi JM, Sancristobal M, Legrand P, Besse P, Pineau T: Novel aspects of PPAR α -mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study, *Hepatology* 2007; 45: 767-777.
- 73 McGavock JM, Lingvay I, Zib I, Tillery T, Salas N, Unger R, et al.: Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study, *Circulation* 2007; 116: 1170-1175.
- 74 Meinertz T, Rösen P, Schömig A, Tschöpe D, Ziegler D: Diabetes und Herz, 1. Auf., Steinkopf Verlag Darmstadt 2005: 157-158.

- 75 Miranda M, Chacón MR, Gómez J, Megía A, Ceperuelo-Mallafre V, Veloso S, Saumony M, Gallart L, Richart C, Fernández-Real JM, Vendrell J: Human subcutaneous adipose tissue LPIN1 expression in obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus—associated lipodystrophy syndrome, *Metabolism* 2007; 56: 1518-1526.
- 76 Mitra MS, Schilling JD, Wang X, Jay PJ, Huss JM, Su X, Finck BN: Cardiac lipin 1 expression is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor α coactivator 1 α /estrogen related receptor axis, *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 120-128.
- 77 Movahed MR, Milne N: Presence of biventricular dysfunction in patients with type II diabetes mellitus, *Congest Heart Fail* 2007; 13: 78-80.
- 78 Nanjundan M, Possmayer F: Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphatase, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L1-L23.
- 79 Navratil AR, Vozenilek AE, Cardelli JA, Green JM, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG, Orr AW, Woolard MD: Lipin-1 contributes to modified low-density lipoprotein-elicited macrophage pro-inflammatory responses, *Atherosclerosis* 2015; 242: 424-432.
- 80 Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF: Myocardial utilization of carbohydrate and lipids, *Prog Cardiovasc Dis* 1972; 15: 289-329.
- 81 Nunoda S, Genda A, Sugihara N, Nakayama A, Mizuno S, Takeda R: Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus, *Heart Vessels* 1985; 1: 43-47.
- 82 O'Brien RC, Luo M, Balazs N, Mercuri J: In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide, *J Diabetes Complicat* 2000; 14: 201-206.
- 83 Ohtake T, Yokoyama I, Watanabe T, Momose T, Serezawa T, Nishikawa J, Sasaki Y: Myocardial glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients evaluated by PDG-PET, *J Nucl Med* 1995; 36: 456-463.
- 84 Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA: Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1780-H1787.
- 85 O'Neil TK, Duffy L, Frey JW, Hornberger TA: The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric conditions, *J Physiol* 2009; 587: 3691-3701.

- 86 Patil MB, Burji NP: Echocardiographic evaluation of diastolic dysfunction in asymptomatic type 2 diabetes mellitus, *J Assoc Physicians India* 2012; 60: 23-26.
- 87 Patil VC, Patil HV, Shah KB, Vasani JD, Shetty P: Diastolic dysfunction in asymptomatic type 2 diabetes mellitus with normal systolic function, *J Cardiovasc Dis Res* 2011; 2/4: 213-222.
- 88 Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K: Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, *lipin*, *Nat Genet* 2001; 27: 121-124.
- 89 Péterfy M, Phan J, Reue K: Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis, *J Biol Chemistry* 2005; 280: 32883-32889.
- 90 Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA, Eichenberg J, Zucker diabetic fatty rats as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Ilar News* 1990; 32: 16-19.
- 91 Phan J, Reue K: Lipin, a lipodystrophy and obesity gene, *Cell Metabol* 2005; 1: 73-83.
- 92 Pillutla P, Hwang YC, Augustus A, Yokomyama M, Yagyu H, Johnston TP, Kaneko M, Ramasamy R, Goldberg IJ: Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in the lipotoxic cardiomyopathy, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E1229-E1235.
- 93 Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG: Diastolic dysfunction in normotensiv men with well-controlled typ 2 diabetes: Importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy, *Diabetes Care* 2010; 24: 5-10.
- 94 Puthanveetil P, Rodrigues B: Glucocorticoid excess induces accumulation of cardiac glycagon and triglyceride: suggested role for AMPK, *Curr Pharm Des* 2013.
- 95 Reed MJ, Scribner KA: In-vivo and in-vitro models of type 2 diabetes in pharmaceutical drug discovery, *Diabetes Obes Metab* 1999; 1: 75-86.
- 96 Ren H, Federico L, Huang H, Sunkara M, Drennan T, Frohman MA, Smyth SS, Morris AJ: A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin 1 function in lipid metabolism and adipogenesis, *Mol Biol Cell* 2010; 21: 3171-3181.

- 97 Reue K, Peterfy M: Mouse models of lipodystrophy, *Curr Artheroscler Rep* 2000; 2: 390-392.
- 98 Reue K, Xu P, Wang XP, Slavin BG: Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene, *J Lipid Res* 2000; 41: 1067-1076.
- 99 Reue K, Zhang P: The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression, *FEBS Lett* 2008; 582/1: 90-96.
- 100 Reue K, Brindley DN: Multiple roles of lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism, *J Lipid Res* 2008; 49: 2493-2503.
- 101 Reue K: The Lipin Family: Mutations and Metabolism, *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 165-170.
- 102 Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, et al.: Myokardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in typ 2 diabetes mellitus, *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1793-1799.
- 103 Rijzewik LJ, van der Meer RW, Lamb HJ, de Jong HW, Lubberink M, Roijn JA, Bax JJ et al.: Altered myocardial substrate metabolism and dereased diastolic function in nonischemic human diabetic cardiomyopathy: studies with cardiac positron emission tomography and magnetic resonance imaging, *J Am Coll Cardiol* 2009; 54/16: 1524-1532.
- 104 Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Brandwood AW, Grishman A: New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis, *Am J Cardiol* 1972; 30: 595-602.
- 105 Saddik M, Lopaschuk GD: Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts, *J Biol Chem* 1991; 266: 8162-8170.
- 106 Saggerson ED, Carpenter CA: Effects of streptozotoin-diabetes and insulin administration in vivo or in vitro on the activities of five enzymes in the adipose-tissue triacylglycerol-pathway, *Biochem J* 1987; 243: 289-292.
- 107 Schlame M: Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes, *J Lipid Res* 2008; 49: 1607-1620.

- 108 Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE: Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy, *Cardiology* 2002; 98: 33-39.
- 109 Schmid H, Forman LA, Cao X, Sherman PS, Stevens MJ: Heterogeneous cardiac sympathetic denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes, *Diabetes* 1999; 48: 603-608.
- 110 Schoonderwoerd K, Broekhoven-Schokker S, Hulsmann WC, Stamm H: Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischaemia and diabetes, *Biochem J* 1990; 268: 487-492.
- 111 Schweitzer GG, Collier SL, Chen Z, Connolly AM, Bucelli RC, Pestronk A, Harris TE, Finck BN: Rhabdomyolysis-associated mutations in human LPIN1 lead to loss of phosphatidic acid phosphohydrolase activity, *JIMP Rep* 2015; 23: 133-122.
- 112 Sedgwick B, Hubscher G: Metabolism of phospholipids. IX. Phosphatidate phosphohydrolase in rat liver, *Biochem Biophys Acta* 1965; 106: 63-77.
- 113 Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL: Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283/3: H976-982.
- 114 Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM: Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress, *Mol Cell* 2010; 40: 310-322.
- 115 Severson DL: Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes, *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 813-823.
- 116 Shimizu M, Umeda K, Sugihara N, Yoshio H, Ino H, R. Takeda R et al.: Collagen remodeling in myocardial patients with diabetes, *J Clin Pathol* 1993; 46/1: 32-36.
- 117 Shiota M, Printz RL: Diabetes in Zucker diabetic fatty rat, *Methods Mol Biol* 2012; 933: 103-123.
- 118 Silversand C, Haux C: Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 703: 7-14.
- 119 Standl E, Schnell O: A new look at the heart in diabetes mellitus: from ailing to failing, *Diabetologia* 2000; 43: 1455-1469.

- 120 Stanley WC, Reccia FA, Lopaschuk GD: Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart, *Physiol Rev* 2005; 85: 1093-1129.
- 121 Suviolahti E, Reue K, Cantor RM, Phan J, Gentile M, Naukkarinen J, Soro-Paavonen A, Oksanen L, Kaprio J et al., Cross-species analyses implicate Lipin 1 involvement in human glucose metabolism, *H Mol Genetics* 2005; 15: 377-386.
- 122 Teupe C, Rosak C: Diabetic cardiomyopathy and diastolic heart failure – difficulties with relaxation, *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 97: 185-194.
- 123 Toke DA, Bennett WL, Oshiro J, Wu WI, Voelker DR, Carman GM: Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *LPP1* gene encoding a Mg^{2+} -independent phosphatidate phosphohydrolase, *J Biol Chem* 1999; 273: 14331-14338.
- 124 Turpeinen AK, Vanninen E, Kuikka JT, Uuitupa MI: Demonstration of regional sympathetic denervation of the heart in diabetes. Comparison between patients with NIDDM and IDDM, *Diabetes Care* 1996; 19: 1083-1090.
- 125 Unger RH: Lipotoxic diseases, *Annu Rev Med* 2002; 53: 319-336.
- 126 van den Brom CE, Bosmans JWAM, Vlasblom R, Handoko LM, Huisman MC, Lubberik M, Molthoff CFM, Lammertsma AA, Ouwens MD, Diamant M, Boer C: Diabetic cardiomyopathy in Zucker Diabetic fatty rats: the forgotten right ventricle, *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9/25.
- 127 van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Diamant M, Birbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ: Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end product, and myocyte resting tension, *Circulation* 2008; 117: 43-51.
- 128 Vatlamudi R, McNeill JH: Effect of chronic streptozotocin induced diabetes on cardiac performance in rats, *Proc West Pharmacol Soc* 1981: 73-77.
- 129 Wang H, Zhang J, Qiu W, Han GS, Carman GM, Adeli K: Lipin-1 α isoforms is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain, *FEBS Lett* 2011; 585: 1979-1984.
- 130 Wang P, Chatham JC: Onset of diabetes in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats leads to improve recovery of function after ischemia in the isolated perfused heart, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E725-E736.

- 131 Waggoner DW, Gómez-Muñoz A, Dewald J, Brindley DN: Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate, *J Biol Chem* 1996; 271: 16506-16509.
- 132 Waggoner DW, Xu J, Singh I, Jasinska R, Zhang QX, Brindley DN: Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction, *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439: 299-316.
- 133 Whiting H, Bowley M, Sturton RG, Pichard PH, Brindley DN, Hawthorne JN, *Biochem J* 1977; 168: 147-153.
- 134 Wiedmann S, Fischer M, Koehler M, Neureuther K, Riegger G, Doering A, Schunkert H, Herngstenberg C, Baessler A: Genetic variants within the LPIN1 gene, encoding lipin, are influencing phenotypes of the metabolic syndrome in humans, *Diabetes* 2008; 57: 209-217.
- 135 Williams SA, Tappia PS, Yu C, Bibeau M, Panagia V: Impairment of the Sarcolemmal Phospholipase D-Phosphate Phosphohydrolase Pathway in Diabetic Cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 109-118.
- 136 Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanavanh B, Starks TN, Phan J, Spencer HJ, McGehee RE, Reue K, Kern PA: Lipin Expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor α activation, *Diabetes* 2006; 55: 2811-2818.
- 137 You M, Jogasuria A, Lee K, Wu J, Zhang Y, Lee YK, Taylor C, Sadana P: Signal transduction mechanismus of alcoholic fatty liver disease: Emerging role of Lipin 1, *Curr Mol Pharmacol* 2015.
- 138 Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, Youker KA, Taegtmeier H: Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart, *Diabetes* 2002; 51: 2587-2595.
- 139 Zhang P, O'Loughlin L, Brindley DN, Reue K: Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis, *J Lipid Res* 2008; 49: 1519-1528.
- 140 Zhang X, Chen C: A new insight of mechanismus, diagnosis and treatment of diabetic cardiomyopathy, *Endocrine* 2012; 41: 398-409.

- 141 Zhou Y-T, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH: Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1784-1789.
- 142 Zucker LM, Antoniades HN: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese fat “fatty”, *Endocrinology* 1972; 90: 1320-1330.
- 143 Zucker LM, Zucker TF: Fatty, a new mutation in the rat, *J Hered* 1961; 52: 275-278.
- 144 Zucker TF, Zucker LM: Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol, *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 110: 165-171.

Danksagung

Als erstes gebührt mein Dank dem ärztlichen Direktor der Medizinischen Klinik II, Herrn Professor Dr. med. Holger Thiele, sowie dem ehemaligen ärztlichen Direktor Herrn Professor Dr. med. Heribert Schunkert, die es mir ermöglichten diese Arbeit in ihrer Klinik durchzuführen. Ich möchte außerdem Herrn Professor Dr. med. Thomas Kurz danken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm und mich die vorliegende Arbeit in seinem Labor realisieren ließ. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Christof Burgdorf, dem ich für seine hervorragende und stets tatkräftige Betreuung danken möchte. Er konnte mir durch seine Erfahrung in allen Phasen des Promotionsprozesses beratend zur Seite stehen. Seine freundliche und engagierte Art hat mir im großen Maße geholfen, diese Arbeit zu erstellen.

Von Herzen danke ich den beiden Mitarbeiterinnen des Labors der Medizinischen Klinik II, Frau Ines Stölting und Frau Anke Constanz, für ihre Geduld und ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. Danken möchte ich zudem Herrn Professor Dr. rer. nat. Olaf Jöhren aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Er half mir bei der Erstellung der Lipin 1 Primersequenzen. Ich möchte mich außerdem bei Frau Beate Limbrich und Frau Christine Eichholz aus selbigem Institut bedanken.

Großer Dank gebührt den ärztlichen Mitarbeitern der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie unter der ärztlichen Leitung von Professor Dr. med. Hans-H. Sievers, ohne deren Hilfe die Gewinnung des humanen Vorhofgewebes nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meinem Lebenspartner Mathias Maciej Tomala sowie meinen Eltern für ihre Liebe und ihre bedingungslose Unterstützung, mit deren Hilfe ich diesen Weg gehen konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Laura Hänsel
Geburtsdatum: 10.01.1984
Geburtsort: Hamburg



Beruflicher Werdegang

seit 03/2013 Assistenzärztin in der Schön Klinik Neustadt in Holstein
Klinik für Hand-, Brust-, Plastische und Ästhetische Chirurgie
Ärztliche Leitung: Professor Dr. med. Josef Hoch

**09/2010 – 12/2012 Assistenzärztin in der Schön Klinik Hamburg Eilbek
(Weiterbildung Common Trunk)**
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Ärztliche Leitung: Dr. med. Lutz Steinmüller
Klinik für Unfallchirurgie
Ärztliche Leitung: Professor Dr. med. Florian Krug
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Ärztliche Leitung: Privatdozent Dr. med. Dietmar Holst

Medizinische Ausbildung

05/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/2009 – 01/2010 Praktisches Jahr
Klinik für Chirurgie und Unfallchirurgie
Schön Klinik Neustadt in Holstein
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Tartu Ülikooli Kliinikum, Tartu (Estland)

Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Medizinische Klinik II

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

10/2005 – 02/2009 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

Dissertation: Experimentelle Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik II, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Arbeitsgruppe Professor Dr. med. Thomas Kurz und Privatdozent Dr. med. Christof Burgdorf

01/2007 Beginn mit dem praktischen Teil der Doktorarbeit

10/2008 - 03/2009 Promotionssemester

06/2009 Veröffentlichung der Ergebnisse

10/2003 – 09/2005 Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Schul Ausbildung

1994 – 2003 Walddorfer Gymnasium Hamburg, Abitur 06/2003

1990 – 1994 Grundschule Bergstedt, Hamburg