

Diplomarbeit

**Einfluss einer Sirt4-Überexpression auf die high-fat diet
induzierte kardiale Hypertrophie**

eingereicht von

Ivan Vosko

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Priv. Doz. Dr. med. Heiko Bugger

Dr. med. Johannes Gollmer

Graz, am 04.03.2021

I. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 04.03.2021

Ivan Vosko eh

II. Danksagung

Zunächst gilt mein großer Dank Ass.-Prof. PD Dr. med. Heiko Bugger, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses interessante Thema im Rahmen der Diplomarbeit unter seiner Leitung bearbeiten zu dürfen. Danke für die exzellente Betreuung, den ansteckenden Enthusiasmus für die Forschung und die vielen wertvollen Ratschläge weit über die Diplomarbeit hinaus.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. med. Johannes Gollmer als meinen Zweitbetreuer bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für mich und half mir sehr mit seinen zahlreichen Verbesserungsvorschlägen.

Besonderer Dank geht auch an Frau Dipl.-Biol.ⁱⁿ Katharina Pfeil, die mir jederzeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite stand und mir immer dann geholfen hat, wenn ich sie gebraucht habe. Durch sie lernte ich, wie wichtig besonders Präzision und Durchhaltevermögen in der Arbeit im Labor sind. Darüber hinaus möchte ich mich auch beim gesamten Kollektiv der experimentellen Kardiologie bedanken, die mir die vielen Stunden im Labor verschönert haben.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium ermöglicht hat. Danke für Euren bedingungslosen Rückhalt und die vielen motivierenden Worte während meines Studiums. Ohne Euch wäre das nicht möglich gewesen.

Danke auch an meine Freunde, die mich während meines Studiums begleitet und immer unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Freundin und großen Stütze Lena bedanken, die mich stets motiviert hat und mir jederzeit helfend zur Seite stand.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Eidesstattliche Erklärung	2
II. Danksagung.....	3
III. Inhaltsverzeichnis	4
1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
2. Abbildungsverzeichnis.....	8
3. Tabellenverzeichnis	9
4. Zusammenfassung.....	10
5. Abstract	11
6. Einleitung.....	12
6.1. Der kardiale Stoffwechsel	12
6.1.1. Energiegewinnung im physiologischen Zustand.....	12
6.1.2. Auswirkungen des metabolischen Syndroms auf den kardialen Stoffwechsel	18
6.2. Sirtuine	19
6.2.1. Geschichte, Einteilung und Übersicht	19
6.2.2. SIRT4	23
6.3. Ziel der Arbeit	28
7. Material und Methoden.....	29
7.1. Materialien.....	29
7.1.1. Laborgeräte.....	29
7.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	29
7.1.3. Kit-Systeme	30
7.1.4. Chemikalien und Reagenzien	30
7.1.5. Primer	31
7.1.6. Tiere und Tierhaltung	32
7.1.7. Spezialfutter.....	33
7.2. Methoden.....	34

7.2.1. Fütterung.....	35
7.2.2. Genotypisierung	34
7.2.3. Euthanasie und Organentnahme	36
7.2.4. Triglyceridassay	36
7.2.5. RNA Isolation, cDNA-Synthese, RT-qPCR	36
7.2.6. Histologie	39
7.2.7. Statistik.....	42
8. Resultate.....	43
8.1. Genotypisierung	43
8.2. Quantitative Bestimmung der SIRT4-Überexpression.....	44
8.3. Myokardiale Triglyceridkonzentration.....	45
8.4. Myokardialer Gehalt von mRNA von Stoffwechselproteinen und Ppar α	45
8.5. Kardiomyozytengröße	48
8.6. Myokardiale Fibrose.....	50
9. Diskussion.....	51
10. Literaturverzeichnis	59
11. Anhang.....	73

1. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ATP	Adenosintriphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
CoA	Coenzym A
CMV	Cytomegalievirus
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CT	Carnitintranslokase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fettsäuren-Acyl-CoA-Synthase
FAD(H)	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAT	fatty acid translocase
FATP	fatty acid transportprotein
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GLUT1/4	Glukosetransporter 1/4
HFD	high-fat diet
Hsp60	Hitzeschockprotein 60
LCAD	long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
LFD	low-fat diet
MCAD	medium-chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
MCCC	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase
MCD	Malonyl-CoA Decarboxylase
MTPα	mitochondrial trifunction protein – subunit α
mRNA	messenger RNA
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PFK-2	Phosphofruktokinase 2
PGC-1	peroxisomal proliferator-activated receptor γ coactivator-1
PPARα	peroxisome proliferating activating receptor α
PTM	posttranslationale Modifikation
rDNA	ribosomale DNA

RNA	Ribonukleinsäure
Rplp0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCAD	short-chain Acyl-CoA-Dehydrogenase
SIRT	Sirtuin
TG	Transgen
VLCAD	very-long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
WT	Wildtyp

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Simplifizierte Darstellung des kardialen mitochondrialen Fettsäure- und Glukosestoffwechsels	17
Abbildung 2: Phylogenetische Einteilung von Sirtuinen).....	20
Abbildung 3: Funktionen von SIRT 4	27
Abbildung 4: Generierung der Versuchsmäuse	33
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Studienablaufes.....	35
Abbildung 6: Ablauf der RT-qPCR.....	39
Abbildung 7: Genotypisierung von WT und TG Mäusen..	43
Abbildung 8: Nachweis der globalen SIRT4-Überexpression auf Proteinebene.....	44
Abbildung 9: Myokardialer Triglyceridgehalt	45
Abbildung 10: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von Proteinen und Regulatoren des Fettsäurestoffwechsels.....	46
Abbildung 11: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von Proteinen und Regulatoren des Glukosestoffwechsels.....	47
Abbildung 12: Bestimmung der Kardiomyozytengröße.....	49
Abbildung 13: Bestimmung des myokardialen Fibrosegehalts.....	50

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subzelluläre Hauptlokalisierung und Enzymaktivität von humanen Sirtuinen	21
Tabelle 2: Laborgeräte	29
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial	29
Tabelle 4: Kit-Systeme	30
Tabelle 5: verwendete Chemikalien	30
Tabelle 6: Primer, welche für die RT-qPCR verwendet wurden	31
Tabelle 7: Nährstoffzusammensetzung des Tierfutters	35
Tabelle 8: Zusammensetzung Mastermix cDNA-Synthese	37

4. Zusammenfassung

Die sieben bislang bekannten Sirtuine (SIRT1-7) sind NAD⁺-abhängige Deacylasen, die im Wesentlichen durch die Entfernung posttranslationaler Modifikationen ihrer Zielproteine zahlreiche essentielle zelluläre Prozesse wie den Energiesubstratstoffwechsel, die Redox-Homöostase und die zellulären Alterungsprozesse regulieren können. Die Funktion von SIRT4, ein mitochondrial lokalisiertes Sirtuin, ist bisher wenig verstanden, aber scheint eine Rolle in der Regulation der zellulären Fettsäureverwertung und in der Anpassung an zelluläre Stressoren zu spielen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Sirt4-Überexpression auf den kardialen Lipidmetabolismus und die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie unter Bedingungen einer fettreichen Diät im Mausmodell zu untersuchen. Es wurden dafür 6 Wochen alte global Sirt4-überexprimierende transgene Mäuse (TG) und Wildtypmäuse (WT) für 12 Wochen entweder einer fettreichen Diät (high fat diet; HFD) oder einer fettarmen Diät (low fat diet; LFD) unterzogen. Die Quantifizierung der Kardiomyozytengröße erfolgte mittels einer Wheat-Germ-Agglutinin-Färbung, und für die Bestimmung der kardialen Fibrose wurde eine Masson's-Trichrome-Färbung verwendet. Es wurde der mRNA-Gehalt von Schlüsselenzymen und Transportern im Fettsäure- und Glukosemetabolismus mittels RT-qPCR untersucht. Die HFD führte zu einer signifikanten Zunahme der Kardiomyozytengröße, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen TG und WT Mäusen gab. Weder eine HFD noch eine Überexpression von Sirt4 in TG Mäusen, war mit einem erhöhten kardialen Fibrosegehalt assoziiert. Die kardiale Triglyceridkonzentration war ebenfalls nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Der kardiale mRNA-Gehalt von Proteinen der mitochondrialen Fettsäureoxidation und -imports war in WT Mäusen, aber nicht in TG Mäusen, nach der HFD erhöht. In HFD-gefütterten WT-Mäusen kam es zu keiner Veränderung des kardialen Ppar α -mRNA-Gehaltes, wohingegen in TG-Mäusen eine signifikante Erniedrigung des Ppar α -mRNA-Spiegels nach HFD beobachtet wurde. Der mRNA-Gehalt von Glukosetransportern war nach HFD erhöht, wobei es keinen Unterschied zwischen WT und TG Mäusen gab. Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass eine Überexpression von SIRT4 selbst unter Bedingungen einer erhöhten kardialen Fettzufuhr 1) die Entwicklung einer Kardiomyozytenhypertrophie nicht zusätzlich begünstigt, und 2) weder die Oxidation von Fettsäuren noch die Speicherung von Triglyceriden stärker differentiell beeinflussen dürfte.

5. Abstract

Seven sirtuins (SIRT1-7) have been identified thus far, which are NAD⁺-dependent deacylases that regulate their target proteins predominantly by removal of posttranslational modifications, thereby modulating fundamental cellular processes such as energy metabolism, redox homeostasis, or cellular aging. The function of SIRT4 is incompletely understood but seems to include a role in the regulation of intracellular fatty acid utilization and in the adaptation to cellular stressors. This study aimed to investigate the effect of Sirt4 overexpression on cardiac lipid metabolism and the development cardiac hypertrophy under conditions of high fat feeding. 6-week-old mice with global overexpression of Sirt4 (TG), or respective wildtype mice (WT), were fed either a high-fat diet (HFD) or a low-fat control diet (LFD) for 12 weeks. Wheat-germ-agglutinin staining was used for quantification of cardiomyocyte size, and Masson's Trichrome staining was performed to evaluate the degree of cardiac fibrosis. Myocardial mRNA levels of selected enzymes and transport proteins involved in fatty acid and glucose utilization were investigated by RT-qPCR. After 12 weeks of HFD, cardiomyocyte size was significantly increased, although no difference was observed between WT and TG mice. Neither HFD nor overexpression of Sirt4 in TG mice was associated with an increase in cardiac fibrosis. Similarly, myocardial triglyceride content was not different among groups. Myocardial mRNA content of proteins of mitochondrial fatty acid oxidation and import was increased in WT but not TG mice following HFD. HFD did not induce Ppar α expression in WT mice. Instead, Ppar α mRNA content was decreased in HFD-fed TG mice. Myocardial mRNA content of glucose transporters was increased in response to HFD but was not different between WT and TG mice. Thus, we conclude that even in response to HFD, increased expression of Sirt4 1) does not exaggerate the development of cardiac hypertrophy, and 2) does not synergistically affect the regulation of fatty acid oxidation or storage of triglycerides in the heart.

6. Einleitung

6.1. Der kardiale Stoffwechsel

6.1.1. Energiegewinnung im physiologischen Zustand

Das Herz gesunder Menschen pumpt jede Minute in etwa 4 bis 5 Liter Blut durch den Körper (Stanley et al., 2005). Für diesen Zweck benötigt das Herz viel Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Das Ziel des kardialen Metabolismus ist es, dieses ATP möglichst effektiv, in großen Mengen und permanent zu generieren, da es für den Erhalt seiner Funktion täglich rund 6 kg ATP verbraucht (Neubauer, 2007).

Die Synthese von ATP erfolgt überwiegend in den Mitochondrien im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung. Dieser Prozess besteht zum einen aus der Synthese von ATP durch Phosphorylierung von ADP durch die ATP-Synthase in der inneren Membran des Mitochondriums. Die notwendige Energie für die Phosphorylierung von ADP liefert der Fluss von Protonen entlang eines Gradienten durch die ATP-Synthase hindurch. Für die Aufrechterhaltung des benötigten Protonengradienten sind der ATP-Synthase die Enzyme der Atmungskette vorgeschaltet. Diese Enzyme pumpen Protonen in den Intermembranraum, wobei sie die dafür benötigte Energie aus dem Fluss von Elektronen durch die einzelnen Komplexe beziehen. Die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ liefern den Atmungskettenkomplexen die notwendigen Elektronen. Ihre Synthese wiederum erfolgt letztlich aus den Bestandteilen der Nahrung im Rahmen der β -Oxidation von Fettsäuren, des Citratzykluses sowie der Glykolyse. Bei maximaler Arbeit braucht das Herz 80-90% der mitochondrialen oxidativen Kapazität, während es in Ruhe nur etwa 15-25% dieser benötigt. Eine Adaptation der Stoffwechselaktivität in Phasen erhöhten Energiebedarfs wie z.B. bei körperlicher Anstrengung ist von großer Bedeutung, da ATP nur in geringer Konzentration in den Zellen vorliegt. Erhöhter Bedarf muss also stets durch eine zeitlich begrenzte erhöhte Produktion gedeckt werden. Diese Anpassung geschieht durch allosterische Modifikationen, Veränderungen der Konzentrationen stimulierender und inhibitorischer Metaboliten oder Translokation metabolischer Proteine. (Stanley et al., 2005)

Die kardiale mitochondriale Energiegewinnung ist simplifiziert in Abbildung 1 dargestellt. Die Fettsäuren, die in Ruhe wichtigsten Substrate für die kardiale Energiegewinnung, gelangen zum Herzen entweder direkt an Albumin gebunden oder in Form von in Lipoproteinen gespeicherten Triacylglyceriden. Die Aufnahme der Fettsäuren in die Kardiomyozyten erfolgt entweder passiv oder mit Hilfe von Transportern, wie der

Fettsäuretranslokase/CD36 (=fatty acid translocase, FAT) oder dem Fettsäuretransportprotein (=fatty-acid transport protein, FATP. Diese Fettsäuren werden zunächst im Zytosol der Kardiomyozyten mit Hilfe der Fettsäuren-Acyl-CoA-Synthase (FACS) mit Coenzym A (CoA) in Fettsäuren-Acyl-CoA umgewandelt. Das Fettsäuren-Acyl-CoA wird dann an der Außenmembran der Mitochondrien durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) zu einem Acylcarnitin verestert, um folglich mit Hilfe der Carnitintranslokase (CT) in die Mitochondrien zu gelangen. (Lopaschuk et al., 2010)

CPT1 kommt in Menschen in verschiedenen Isoformen vor, welche je nach Gewebe, verschieden exprimiert werden. Während CPT1a vor allem in Leber und braunem Fettgewebe vorkommt und CPT1c die im Gehirn vorkommende Isoform ist, ist im Herzen vorwiegend CPT1b vorhanden (Bonnefont et al., 2004). Ein wichtiger Mechanismus in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels ist die allosterische Hemmung der CPT1 durch Malonyl-CoA. Die Steuerung dieses Mechanismus gelingt durch das Gleichgewicht zwischen der, durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) katalysierten Synthese aus Acetyl-CoA, und dem vom Enzym Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD) katalysierten Abbau von CPT1. Ein wichtiger Mediator in diesem Gleichgewicht ist die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), welche die Aufnahme der Fettsäuren in die Mitochondrien in Phasen, in denen mehr Energie benötigt wird, über eine Inaktivierung der ACC steigert. (Stanley et al., 2005) An der mitochondrialen Innenmembran wird das Acylcarnitin durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT2) zurück in Fettsäuren-Acyl-CoA umgewandelt (Azevedo et al., 2013). Das Fettsäuren-Acyl-CoA wird in die β -Oxidation eingeschleust, bei welcher der sukzessive Abbau der Fettsäuren erfolgt. Ein β -Oxidationszyklus läuft in vier Schritten ab und wird von der Acyl-CoA-Dehydrogenase, der Enoyl-CoA-Hydratase, der 3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase, sowie die 3-Kotacyl-CoA-Thiolase katalysiert. (Lopaschuk et al., 2010) Von jedem der Enzyme existieren jeweils verschiedene Isoformen, die eine unterschiedliche Spezifität für die verschieden langen Fettsäureketten aufweisen. Von den Acyl-CoA-Dehydrogenasen, welche den ersten Schritt der β -Oxidation katalysieren, gibt es fünf Isoformen, welche in der β -Oxidation eine Rolle spielen: die very-long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (VLCAD) 1 und 2, die long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (LCAD), die medium-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD), sowie die short-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (SCAD) (Ghisla and Thorpe, 2004). In jedem Zyklus werden die Fettsäureketten um zwei Kohlenstoffatome verkürzt und es entstehen jeweils ein Acetyl-CoA Molekül, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird, sowie ein Molekül FADH_2

und ein Molekül NADH, welche für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden (Lopaschuk et al., 2010).

Eine Möglichkeit der Regulation der β -Oxidation sind Feedback-Mechanismen. Hierbei werden die beteiligten Enzyme jeweils von den Produkten der von ihnen katalysierten Reaktionen gehemmt. Vor allem die Hemmung der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase durch Acetyl-CoA hat eine große Bedeutung. In Phasen der Ruhe kommt es zu einer Anhäufung von nicht-verbrauchtem Acetyl-CoA, weshalb durch diesen Feedback-Mechanismus die Energiebereitstellung durch die β -Oxidation inhibiert wird. (Lopaschuk et al., 2010)

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Fettsäureoxidation sind Veränderungen in der Expression der Enzyme. Der peroxisomal proliferator activated receptor α (PPAR α), sowie peroxisomal proliferator-activated receptor γ coactivator 1 (PGC1) sind hierbei von entscheidender Bedeutung. PPAR α ist ein zentraler Regulator im Fettsäuremetabolismus und beeinflusst die Expression beinahe aller im Fettsäurestoffwechsel beteiligten Enzyme (Lopaschuk et al., 2010). PGC1 hat einen maßgeblichen Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel und kontrolliert als Koaktivator viele im Energiestoffwechsel beteiligten Proteine, unter anderem auch PPAR α (Neubauer, 2007).

Neben dem oxidativen Abbau von Fettsäuren werden auch Glukose und Laktat als Energielieferanten genutzt. In Ruhe spielt die Energiegewinnung über die Verarbeitung von Glukose bzw. Laktat im Vergleich zum Fettsäurestoffwechsel eine untergeordnete Rolle und macht etwa 30% der myokardialen ATP-Produktion aus. In Phasen, in denen das Herz jedoch z.B. durch Ischämie, körperliche Anstrengung, oder eine Druckhypertrophie gestresst ist, kommt es zu einer verstärkten Energiegewinnung durch Glykolyse. (Abel, 2004)

Die Glukose gelangt entweder nach exogener Aufnahme oder durch den Abbau der körpereigenen Kohlenhydratreserve, der Glykogenolyse, zum Myokard. Die Aufnahme ins Zytosol erfolgt über Glukosetransportproteine (GLUT). Wie in der quergestreiften Skelettmuskulatur, geschieht dies im Herzmuskel erwachsener Menschen vorwiegend durch GLUT4 und zu einem geringeren Teil über GLUT1 (Gupta and Houston, 2017). Eine Steuerungsmöglichkeit der Glukoseaufnahme ist, die durch Insulin, sowie durch Stress bedingte Translokation von Glukosetransportern aus intrazellulären Vesikeln an die Sarkolemmmembran (Stanley et al., 2005). Auf enzymatischer Ebene wird dieser Vorgang unter anderem von AMPK getriggert (Coven et al., 2003).

Nach der Aufnahme wird die Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert, wobei ein Molekül ATP verbraucht wird. Katalysiert wird die Phosphorylierung über das

Enzym Hexokinase. Nach diesem Schritt kann das G-6-P entweder direkt in die Glykolyse eingeschleust werden, oder in Glykogen umgewandelt werden. In den Kardiomyozyten ist der Glykogenspeicher eher gering und das produzierte Glykogen wird schnell wieder verbraucht. (Tran and Wang, 2019) Die Glykolyse erfolgt im Zytosol, wobei pro Glukosemolekül, 2 Moleküle NADH, sowie 2 Moleküle ATP gebildet werden (Heinrich et al., 2014). Neben der Rolle von AMPK im Glukosetransport fungiert AMPK auch über die Beeinflussung der Phosphofruktokinase 2 (PFK2). Diese ist ein Schlüsselenzym im Glukosestoffwechsel, induziert die Glykolyse und stimuliert darüber hinaus auch den Glykogenabbau (Nagendran et al., 2013).

Im letzten Schritt der Glykolyse entsteht Pyruvat. Das Pyruvat wird nun entweder anaerob in Laktat umgewandelt, mit Hilfe der ALT zu Alanin weiterverarbeitet oder über den mitochondrialen Pyruvatcarrier (PC) ins Innere des Mitochondriums transportiert (Tran and Wang, 2019). Dort angelangt, entstehen aus dem Pyruvat gemeinsam mit NAD^+ durch den Abbau im Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDH) ein Acetyl-CoA, ein NADH und CO_2 . Dieser Vorgang wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase gehemmt. Die häufigste Isoform von PDK im Herzen ist die PDK4, welche vor allem im Zustand einer hohen Fettsäurebelastung hochreguliert ist und so die Oxidation von Pyruvat hemmt. Das NADH liefert im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung Elektronen für die Atmungskette. Das Acetyl-CoA bildet den Ausgangspunkt des Citratzykluses. Der Citratzyklus ist ein zentraler Vorgang in der Energiegewinnung und dient zur Herstellung der Reduktionsäquivalente FADH_2 und NADH, welche für die Atmungskette benötigt werden, sowie von Guanosintriphosphat (GTP), welches über die Nucleosiddiphosphatase direkt in ATP umgewandelt werden kann. (Stanley et al., 2005) Der Citratzyklus besteht aus acht Schritten und erfolgt in der Matrix der Mitochondrien. Zu Beginn des Citratzykluses wird das Acetyl-CoA gemeinsam mit Oxalacetat in das für den Prozess namensgebende Citrat umgewandelt. Mit Hilfe des Enzyms Aconitase wird das Citrat in Isocitrat isomerisiert, ehe es durch die Isocitrat-Dehydrogenase unter Entstehung eines NADH-Moleküls zu α -Ketoglutarat decarboxyliert wird. Nach der oxidativen Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA, bei der wieder ein NADH entsteht, wird das Coenzym A mit Hilfe der Succinat-Thiokinase abgespalten, wobei bei diesem Vorgang das GDP zu GTP phosphoryliert wird. Im nächsten Schritt wird Succinat zu Fumarat oxidiert, während FAD zu FADH_2 reduziert wird. Nach zwei weiteren Oxidationsschritten entsteht wieder Oxalacetat, welches erneut in den Citratzyklus eingespeist werden kann. (Heinrich et al., 2014)

Das Zentrum der aeroben Energiegewinnung ist die Atmungskette. Hierbei wird dank eines Transfers von Elektronen der Reduktionsäquivalente FADH_2 und NADH das meiste ATP im menschlichen Körper generiert. Die Zellatmung erfolgt in der Innenmembran der Mitochondrien und benötigt für den Vorgang insgesamt fünf Enzymkomplexe. Im Komplex I werden die Elektronen von NADH aufgenommen und die H^+ -Ionen in den mitochondrialen Intermembranraum geschleust. Succinat wird im Komplex II zu Fumarat oxidiert, wobei die Elektronen des in dieser Reaktion entstandenen FADH_2 aufgenommen werden. Im nächsten Schritt werden die Elektronen von Komplex I und II auf Ubichinon übertragen. Ubichinon nimmt außerdem Elektronen aus FADH_2 auf, welches schon zuvor in anderen Stoffwechselprozessen gebildet worden ist. Bei der Aufnahme der Elektronen kommt es zur Reduktion des Ubichinons zum Ubichinol. Komplex III schleust wieder H^+ -Ionen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranbereich und übernimmt die Elektronen vom Ubichinol. Diese werden an Cytochrom C weitergegeben, welches diese zum Komplex IV überträgt, um dort unter Entstehung von H_2O auf O_2 weitergegeben werden. Durch diesen Vorgang hat sich zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Intermembranbereich ein H^+ -Ionen-Gradient entwickelt. Dieser Gradient wird nun im Komplex V, der ATP-Synthase, genutzt um aus ADP und einem Phosphat, den Energieträger ATP herzustellen. (Heinrich et al., 2014)

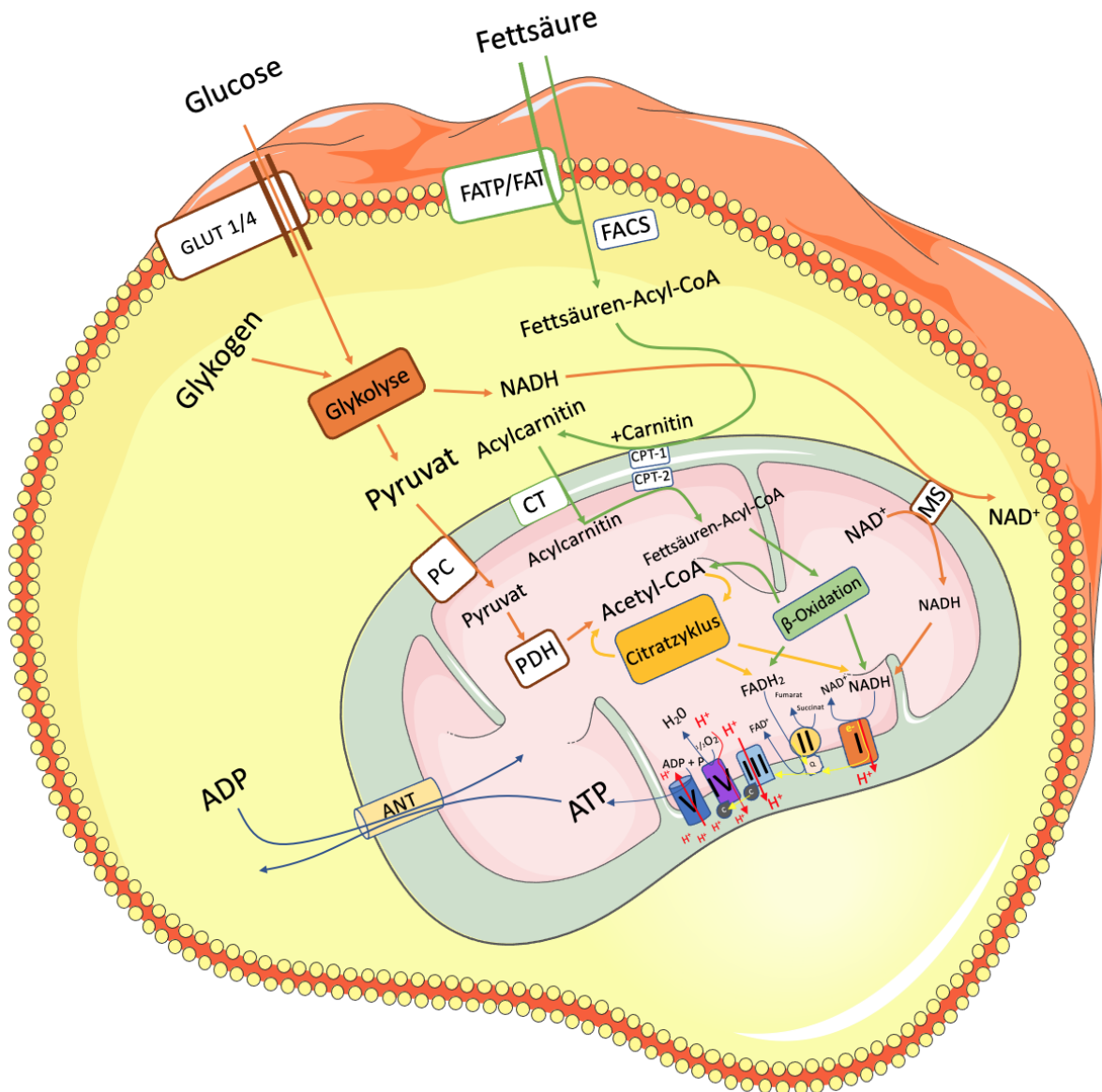


Abbildung 1: Simplifizierte Darstellung des kardialen mitochondrialen Fettsäure- und Glukosestoffwechsels

Der kardiale Energiestoffwechsel ist ein komplexer Regelkreislauf, der darauf abzielt konstant und viel Energie in Form von ATP zu liefern und in Phasen von Stress sich adäquat adaptieren zu können. Fettsäuren und Glukose stellen hierbei die wichtigsten Substrate dar. ADP/ATP (= Adenosin-Di/Tri-Phosphat), ANT (= Adeninnukleotidtransporter), CT (=Carnitintranslokase) FAD (=Flavin-Adenin-Dinukleotid), GLUT1/4 (= Glukosetransporter 1/4), MS (=Malat-Shuttle), NAD (=Nicotinamiddinukleotid), PC (= Pyruvatcarrier), PDH (=Pyruvatdehydrogenase),. Diese Abbildung wurde mit Hilfe modifizierter Bilder aus der SMART-Datenbank von Servier erstellt (www.smart.servier.com)

6.1.2. Auswirkungen des metabolischen Syndroms auf den kardialen Stoffwechsel

Das metabolische Syndrom ist ein Symptomkomplex welcher nach den Kriterien der International Diabetes Federation 2005 wie folgt definiert wurde: Zentrale Adipositas kombiniert mit mindestens 2 weiteren Faktoren aus beeinträchtigter Glukosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2, erniedrigtem HDL Cholesterin, erhöhten Triglyceriden oder Hypertonie. Aufgrund der schwerwiegenden Komplikationen sowie der immer weiter steigenden Inzidenz, stellt das metabolische Syndrom eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen in der westlichen Welt dar. (Alberti et al., 2006) Die unterschiedlichen Komponenten des metabolischen Syndroms stellen insbesondere kardiovaskuläre Risikofaktoren dar, es scheint jedoch, dass es auch über die KHK hinaus negative Effekte auf das Herz gibt. So haben Studien gezeigt, dass Typ 2 Diabetiker*innen eine höhere Inzidenz der Herzinsuffizienz aufweisen und diese dann ein schlechteres Outcome haben. Auch die Infarktgröße scheint bei Diabetiker*innen größer zu sein. (Kenny and Abel, 2019) Als mögliche Ursache werden neben einer chronischen Entzündung auch Veränderungen des Stoffwechsels diskutiert, welche auf Grund des Phänotyps der Erkrankung wahrscheinlich erscheinen (Gollmer et al., 2020).

Im Zustand des erhöhten Angebotes von Fettsäuren kommt es zu einer verstärkten Fettsäureoxidation bei gleichzeitig reduzierter Aufnahme von Glukose und eingeschränkter Glykolyse (Lopaschuk et al., 2007). Dieses Phänomen scheint vor allem in der Anfangsphase durch eine erniedrigte GLUT4-Expression getriggert zu sein (Wright et al., 2009). In weiterer Folge kommt es auch zu einer verstärkten Translokation von CD36 an die Sarkolemmmembran, wodurch die Aufnahme von Fettsäuren ins Zytosol gesteigert wird (Ouwens et al., 2007). Übersteigt die Fettsäureaufnahme die β -Oxidationskapazität, so kann es zu einem vermehrten Einschleusen von Fettsäuren in alternative Abbauege und hierdurch zu einer Anhäufung von toxischen Metaboliten, wie Ceramiden und Diacylglycerol kommen (Piche and Poirier, 2018). Es gibt einige Hinweise darauf, dass diese Akkumulation die Entwicklung einer Hypertrophie begünstigt (Chiu et al., 2005, Tsushima et al., 2018, Chiu et al., 2001). Darüber hinaus kommt es nach einer anfänglichen erniedrigten Expression zu einer verstärkten Expression von PPAR α (Buchanan et al., 2005, Wright et al., 2009). PPAR α ist ein zentraler Regulator der Fettsäureoxidation und induziert die Expression von fast allen im Fettsäurestoffwechsel beteiligten Enzymen, was unter anderem zu einer verstärkten Oxidation führt (Bugger and Abel, 2008). Zusätzlich zu den Alterationen im Glukose- bzw. Fettsäurestoffwechsel kommt es zu einem vermehrten Anfall

reaktiver Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species* = ROS). ROS entstehen vorwiegend durch ein Elektron-*leak* während des Elektronentransfers in der mitochondrialen Atmungskette. Im Rahmen von Diabetes trägt eine vermehrte Produktion von ROS zu erhöhtem oxidativen Stress bei, durch den die mitochondriale Funktion gestört wird. (Gollmer et al., 2020).

Alles in allem gibt es Hinweise darauf, dass es vor allem durch diese mitochondrialen Veränderungen zu einer kardialen Dysfunktion kommt. Dies stellt eine der führenden Hypothesen für die gefundenen kardialen Auswirkungen für Patient*innen mit metabolischem Syndrom/Diabetes dar.

6.2. Sirtuine

6.2.1. Geschichte, Einteilung und Übersicht

Die Sirtuine sind eine Gruppe von NAD⁺-abhängigen Enzymen, welche sich vom Genprodukt des Silent information regulator 2 – Gens (Sir2) von Hefen ableiten (Haigis and Sinclair, 2010). Dieses konnte erstmals vor ungefähr 40 Jahren in der Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden (Rine et al., 1979). Sir2 ist in der Regulation der Rekombination von ribosomaler DNA beteiligt (Gottlieb and Esposito, 1989) und greift über ein Silencing in die Transkription stummer Mating-Genloci und von Telomeren ein (Imai et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass eine Sir2-Überexpression zu einer deutlichen Verlängerung der replikativen Lebensspanne in *S. cerevisiae* führt und die dahinterliegenden Mechanismen vermutlich die Hemmung der rDNA-Rekombination, sowie eine Inhibition der Bildung von extrachromosomaler rDNA sind (Kaeberlein et al., 1999). Auf Enzymebene konnte zunächst gezeigt werden, dass Sir2 NAD⁺-abhängig als ADP-Ribosyltransferase wirken kann (Frye, 1999). Die Hauptenzymaktivität von Sir2 entschlüsselten Imai und Kollegen, als sie demonstrierten, dass Sir2 die Funktion besitzt Acetylgruppen von Proteinen zu entfernen (Imai et al., 2000). Für diesen Vorgang wird ebenso NAD⁺ benötigt. Da die Konzentration von NAD⁺ an den Energiezustand in der Zelle gekoppelt ist, stellte man die Hypothese auf, dass Sir2 auch für eine beobachtete Lebensverlängerung von einigen Modellorganismen durch Kalorienrestriktion (KR) verantwortlich sein könnte und konnte diese Hypothese durch Beobachtungen untermauern (Lin et al., 2000). Die Beobachtung, dass Sir2 zu einer Verlängerung der Lebensspanne bei KR führt, wurde in den folgenden Jahren auch in Fliegen der Gattung *Drosophila melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004), sowie in Fadenwürmern der Gattung

Caenorhabditis elegans (Wood et al., 2004) bestätigt. Das Sir2-Gen ist evolutionär hochkonserviert und kommt von Bakterien bis hin zu hoch entwickelten Lebewesen, wie Menschen, vor (Brachmann et al., 1995).

In Säugetieren konnten bisher 7 Homologe von Sir2 identifiziert werden (SIRT1-7) und eine phylogenetische Einteilung der Sirtuine in 5 Klassen ist aufgrund von Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz möglich (siehe Abbildung 2). Die eukaryotischen Sirtuine SIRT1-3 gehören der Klasse 1 an, wobei SIRT1 die größte Übereinstimmung mit dem Sir2-Gen aufweist. SIRT 4 ist ein Protein der Klasse II und SIRT5 gehört der Klasse III an, während SIRT6 und 7 zu den Klasse IV-Sirtuinen gezählt werden. (Frye, 2000)

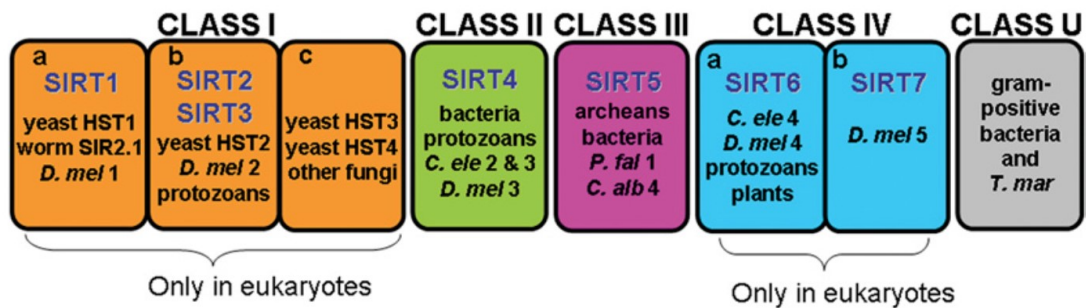


Abbildung 2: Phylogenetische Einteilung von Sirtuinen (aus Michan and Sinclair, 2007)

Während SIRT1 und 2 im Zellkern, sowie im Nucleus vorkommen, sind SIRT3/4/5 (fast) ausschließlich in Mitochondrien vorhanden. SIRT6 bzw. 7 werden als nukleäre Proteine beschrieben. (Finkel et al., 2009)

Die Funktionen von Sirtuinen in Säugetieren sind vielfältig. Die bereits oben beschriebene NAD⁺-abhängige Histondeacetylierung ist eine von vielen posttranslationalen Modifikationen (PTM), die den Sirtuinen zugeschrieben werden (siehe Tabelle 1). Durch PTMs kann u.a. die Aktivität von Proteinen reguliert werden, nachdem diese bereits in Ribosomen aus der mRNA hergestellt worden sind. Diese Modifikationen entstehen durch das Anhängen, bzw. durch das Entfernen von funktionellen chemischen Gruppen. PTMs von Histonen nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation des menschlichen Metabolismus ein (Kouzarides, 2007).

Tabelle 1: Subzelluläre Hauptlokalisierung und Enzymaktivität von humanen Sirtuinen

Sirtuin	Hauptlokalisierung	Enzymatische Aktivität
SIRT1	Nucleus, Zytosol	Deacetylierung
SIRT2	Zytosol	Deacetylierung, Delipoylisierung
SIRT3	Mitochondrien	Deacetylierung, Decrotonylierung
SIRT4	Mitochondrien	ADP-Ribosylierung, Delipoylisierung, Deacetylierung, Deacylierung
SIRT5	Mitochondrien	Desuccinylierung, Demalonylierung, Deglutarylierung
SIRT6	Nucleus	ADP-Ribosylierung
SIRT7	Nucleolus	Deacetylierung

SIRT1 ähnelt dem Sir2 als Deacetylase und wird vor allem in Leber, Skelettmuskulatur, Fettgewebe, Pankreas, Endothel, sowie im Herzen exprimiert (Michishita et al., 2005). Es ist das bisher am genauesten untersuchte Sirtuin und spielt in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, wie in etwa in der Regulation von Apoptose, dem Zellzyklus, sowie dem Energiestoffwechsel (Nogueiras et al., 2012). Obwohl SIRT1 vorwiegend im Zytosol, bzw. im Nucleus lokalisiert ist (Michishita et al., 2005), greift es u.a. über eine Regulation der Aktivität von PGC-1 wesentlich in den mitochondrialen Stoffwechsel ein (Houtkooper et al., 2012). Im kardiovaskulären System scheint SIRT1 gegenüber einem Ischämie-Reperfusionsschaden protektiv zu wirken (Hsu et al., 2010). Bezüglich der Atherogenese gibt es widersprüchliche Daten. Einerseits konnte demonstriert werden, dass eine Endothel-spezifische SIRT1-Überexpression der Entwicklung einer Atherosklerose über die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), sowie die Hemmung vom nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) entgegen wirkt (Zhang et al., 2008). Andererseits scheint eine ubiquitäre Sirt1-Überexpression zu schlechteren Lipidprofilen und vermehrter Atherosklerose zu führen (Qiang et al., 2011). Bezüglich der Entwicklung einer altersbedingten kardialen Hypertrophie scheint der Grad an Aktivierung von SIRT1 eine Rolle zu spielen. Während in Mäusen eine deutliche Überexpression von Sirt1 (etwa 12-fach) zu einer vermehrten Hypertrophie führt, scheint sich eine mildere Überexpression (2-fach) kardioprotektiv auszuwirken (Alcendor et al., 2007).

SIRT2 ist ein hauptsächlich im Cytoplasma befindliches Protein, welches seine Zielproteine über Deacetylierung (North et al., 2003), sowie Delipoylisierung (Xie et al., 2019) posttranslational modifizieren kann. In Bezug auf das Herz konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass SIRT2 über die Aktivierung von AMPK einen kardioprotektiven Effekt aufweist und der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie entgegenwirkt (Tang et al., 2017). Eine mitochondriale Dysfunktion kann die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen (Zhou and Tian, 2018). Die genauen Pathomechanismen sind hierbei noch nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass die mitochondrialen Sirtuine SIRT3-5 (Michishita et al., 2005, Onyango et al., 2002) eine wesentliche Bedeutung in der Entstehung bzw. Verhinderung von Herzinsuffizienz haben können und auch als therapeutische Ziele für neue Medikamente genutzt werden könnten (Bugger et al., 2016). SIRT3 ist das bisher am besten charakterisierte mitochondriale Sirtuin. SIRT3 beeinflusst den mitochondrialen Energiestoffwechsel nachhaltig und wird insbesondere im Herzen, in den Nieren, in der Leber, sowie im Gehirn exprimiert (Michishita et al., 2005). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass das Herz SIRT3 benötigt, um seine kontraktile Funktion erhalten zu können (Koentges et al., 2016). Möglicherweise kann eine erhöhte SIRT3-Aktivität das Herz vor Hypertrophie, Herzinsuffizienz, sowie myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden schützen (Bugger et al., 2016). Die Rolle von SIRT4 ist bisher noch nicht genau untersucht worden. Auf die Funktionen und von SIRT4 und den derzeitigen Stand der Wissenschaft wird in Kapitel 6.2.2 im Detail eingegangen. SIRT5 ist das dritte bekannte Säugetier-Sirtuin, welches vorwiegend in Mitochondrien lokalisiert ist und eine hohe Expression im Herzen aufweist (Michishita et al., 2005). Es modifiziert Proteine mittels einer Desuccinylierung, sowie einer Demalonylierung (Du et al., 2011) und Deglutarylierung (Tan et al., 2014, Anderson et al., 2017). Hershberger und Kollegen konnten zeigen, dass Mäuse mit einem ubiquitären Sirt5-knockout eine deutlich höhere Mortalität nach kardialer Nachlast-induzierten Drucküberbelastung als Wildtypmäuse aufweisen (Hershberger et al., 2017). Im postnatalen, herzspezifischen knockout konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass der Effekt auf die Mortalität entweder auf die Rolle von SIRT5 in der embryonalen Entwicklung oder auf extrakardiale Funktionen von SIRT5 zurückzuführen ist (Hershberger et al., 2018).

SIRT6 ist ein nukleäres Sirtuin (Michishita et al., 2005), welches seine Zielproteine mittels Deacetylierungen (Michishita et al., 2008), sowie mono-ADP-Ribosylierungen (Liszt et al., 2005) verändert. Die Hauptfunktion von SIRT6 liegt in der Aufrechterhaltung und Regulation des menschlichen Stoffwechsels (Chang et al., 2020). SIRT6 wurde außerdem

als Tumorsuppressoren beschrieben (Kugel et al., 2016, Van Meter et al., 2011) und scheint ebenso eine Rolle im Prozess der Inflammation, des Alterns, sowie in der Reaktion des menschlichen Körpers auf Stress zu spielen (Chang et al., 2020). Im Herzen scheint SIRT6 auch einen protektiven Einfluss zu haben und im Rahmen einer Drucküberlastung der Ausbildung einer Hypertrophie entgegenzuwirken (Sundaresan et al., 2012).

SIRT7 ist ein vor allem im Nukleus, genauer im Nukleolus, lokalisiertes Protein (Michishita et al., 2005). Die enzymatische Hauptaktivität dieses Sirtuins konnte lange Zeit nicht entschlüsselt werden. SIRT7 scheint ähnlich wie viele Sirtuine kardioprotektiv zu wirken. Vakrusheva und Kollegen konnten zeigen, dass es im Sirt7-knockout-Mausmodell zu einer vermehrten Entwicklung einer alters-bedingten Kardiomyopathie kommt (Vakrusheva et al., 2008). In Bezug auf Tumore haben einerseits einige Studien Hinweise darauf gefunden, dass SIRT7 die Malignität und Invasion in verschiedenen Tumoren fördert und hohe SIRT7-Spiegel mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind (Blank and Grummt, 2017). Andererseits scheint SIRT7 im Prozess der DNA-Reparatur und der Beibehaltung der genomischen Stabilität eine Rolle zu spielen (Blank and Grummt, 2017).

6.2.2. SIRT4

SIRT4 ist ein bisher unzureichend charakterisiertes Sirtuin und die genaue Funktion von SIRT4 ist noch nicht vollständig geklärt. Die bisher beobachteten Einflüsse von SIRT4 sind in Abbildung 3 dargestellt. Ähnlich, wie SIRT3 und SIRT5, ist die hauptsächliche subzelluläre Lokalisation von SIRT4 das Mitochondrium (Michishita et al., 2005, Ramadani-Muja et al., 2019, Ahuja et al., 2007). Diese Lokalisation wird von einer N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz (mitochondrial targeting sequence = MTS) vermittelt (Ramadani-Muja et al., 2019, Michishita et al., 2005). Mittlerweile gibt es auch Evidenz, die darauf hindeutet, dass SIRT4 nicht nur rein in den Mitochondrien vorkommt, sondern auch in den Nukleus einwandern kann und es wird vermutet, dass SIRT4 besonders in Phasen von mitochondrialem Stress als Mediator zwischen Zellkern und Mitochondrium dient (Ramadani-Muja et al., 2019). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SIRT4 auch in Centrosomen vorkommen kann, weshalb spekuliert wird, dass SIRT4 als Regulator der Mitose fungieren könnte (Bergmann et al., 2020).

Im Gegensatz zu SIRT3 gelang es zunächst nicht eine enzymatische Funktion von SIRT4 zu entdecken. In der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass SIRT4 nicht die Fähigkeit hat, Proteine mittels Deacetylierung zu modifizieren. Letzlich konnte gezeigt werden, dass

SIRT4 zwar Proteine deacetylieren kann, dies aber substrat- und organspezifisch erfolgt (Betsinger and Cristea, 2019). Die erste nachgewiesene enzymatische Aktivität von SIRT4 war der Transfer einer ADP-Ribosyl-Gruppe von NAD auf ein Histonprotein (Haigis et al., 2006). Die Expression von SIRT4 ist in den stoffwechselaktiven Organen Herz, Leber, Niere, Gehirn und Lunge am höchsten (Michishita et al., 2005, Haigis et al., 2006).

Im Pankreas ist die relative SIRT4-Expression in den Langerhans'schen Inseln stark erhöht, weshalb angenommen wurde, dass SIRT4 eine größere Bedeutung in der Regulation der Insulinsekretion hat (Haigis et al., 2006). Haigis und Kollegen konnten zeigen, dass SIRT4 die Glutamatdehydrogenase (GDH), über eine NAD-abhängige ADP-Ribosylierung inhibiert (Haigis et al., 2006). Die GDH katalysiert die Umwandlung von Glutamat in α -Ketoglutarat, welches direkt in den Citratzyklus eingeschleust werden kann und speziell nach Leucinstimulation so eine Insulinsekretion in den β -Zellen fördert (Carobbio et al., 2004). Haigis und Kollegen konnten außerdem beobachten, dass ein Sirt4-knockout in Mäusen zu einer gesteigerten Insulinsekretion nach Stimulation mit Aminosäuren führt und konnten demonstrieren, dass dies vor allem durch eine gesteigerte Aktivität von GDH in den KO-Mäusen getriggert ist (Haigis et al., 2006). Anderson und Kollegen untersuchten die Struktur von SIRT4 und konnten über Computer-gestützte Analysen Hinweise darauf finden, dass SIRT4 die Fähigkeit besitzt an Lysinen einige Acylgruppen, wie Methylglutaryl, Hydroxymethylglutaryl, und 3-Methylglutar-Conyl zu modifizieren (Anderson et al., 2017). Sie konnten diese Modifikationen auch in vitro in Zellkulturexperimenten nachweisen und dadurch die Funktion von SIRT4 als Deacylase untermauern (Anderson et al., 2017). Zudem fanden sie heraus, dass SIRT4 über die Entfernung von acylierten Lysinresten die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCCC) modifiziert und diese inhibiert (Anderson et al., 2017). Die MCCC ist ein Biotin-abhängiges Enzym, welches im Abbau der Aminosäure Leucin eine wesentliche Rolle spielt (Baumgartner, 2005). Da Leucin die Insulinsekretion anregt, wurde auch hier eine Verbindung zur Regulation der Insulinausschüttung vermutet. In der Tat konnten die Autoren diese bestätigen und demonstrieren, dass der Leucinmetabolismus in Sirt4-knockout Mäusen gehemmt ist und die Insulinausschüttung dadurch gesteigert wird (Anderson et al., 2017). Dieser Mechanismus ist im Einklang mit den von Haigis und Kollegen publizierten Ergebnissen und liefert eine zusätzliche Erklärung für den gefundenen Einfluss von SIRT4 auf die Insulinausschüttung nach Leucin-Stimulation. Als weiteren Mechanismus über den SIRT4 in den Insulinhaushalt eingreifen kann, beschrieben Ahuja und Kollegen eine Interaktion von SIRT4 mit den Adenin-Nukleotid-Transportern (ANT) 2

und 3, welche zum ADP/ATP-Translokasekomplex gehören, sowie dem insulin-degrading enzyme (IDE) (Ahuja et al., 2007). Das IDE ist eine Protease, welche im Abbau von Insulin, sowie über die Regulation von Amyloid- β in der Entwicklung der Alzheimerdemenz eine maßgebliche Rolle zugesprochen wird (Farris et al., 2003). Die ADP/ATP-Translokase sorgt für den Austausch von ADP und ATP zwischen den Mitochondrien und dem Zytosol (Klingenberg, 2008). Die Exkretion von Insulin ist streng an die ATP-Konzentration gekoppelt, womit die auch in dieser Arbeit bestätigte Hemmung der Insulinausschüttung erklärt werden könnte (Ahuja et al., 2007). Interessanterweise konnte der Einfluss von SIRT4 auf die Regulation der Insulinsekretion im β -Zell-spezifischen knockout nicht nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass dieser Effekt vermutlich auf den Funktionen von SIRT4 außerhalb der Langerhans'schen Inseln basiert (Huynh et al., 2020).

Einen weiteren wichtigen Mechanismus über welchen SIRT4 maßgeblich in den Energiestoffwechsel eingreift ist die von Mathias und Kollegen publizierte Hemmung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) (Mathias et al., 2014). Sie konnten zeigen, dass SIRT4 über eine Delipoylisierung die PDH modifizieren kann und in Zellkulturexperimenten bestätigen, dass eine SIRT4 Überexpression die Aktivität von PDH hemmt (Mathias et al., 2014). Passend zu diesen Ergebnissen beschrieb man eine erhöhte Aktivität von PDH in vivo in Sirt4-knockout-Mäusen (Mathias et al., 2014). Diese Resultate sind insofern relevant, da die PDH eine zentrale Schaltstelle zwischen Glykolyse und Citratzyklus darstellt.

SIRT4 scheint außerdem ein wesentlicher Regulator im Fettsäurestoffwechsel zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass SIRT4 die Malonyl-CoA-Decarboxylase über eine substratspezifische Deacetylierung hemmt, was zu einer gesteigerten Lipogenese bei gehemmter Fettsäureoxidation führt (Laurent et al., 2013b). Laurent und Kollegen konnten weiterhin in einem Sirt4-knockout Mausmodell zeigen, dass es in der Leber zu einer Überexpression von Zielgenen von PPAR α und einer gesteigerten β -Oxidation kommt und schlussfolgerten, dass SIRT4 über diesen Mechanismus den Fettsäuremetabolismus hemmt (Laurent et al., 2013a). In ihren Experimenten konnten Guo und Kollegen demonstrieren, dass SIRT4 über eine spezifische Deacetylierung eines Lysinrestes die Mitochondrial trifunctional protein alpha – subunit (MTP α) unterdrückt und so in den Stoffwechsel von Fettsäuren eingreift (Guo et al., 2016). MTP α gehört zum Komplex des mitochondrialen trifunctional proteins, eines Enzyms, welches als Katalysator für drei der vier Teilschritte der β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren fungiert (Kamijo et al., 1994). Die SIRT4-medierte Inhibition von MTP α führt ebenso zu einer erniedrigten Fettsäureoxidation und

begünstigt so die Entstehung einer Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) (Guo et al., 2016).

In einer Acetylom-Studie, welche potenzielle Acetylierungsziele aller menschlichen Sirtuine untersucht hat konnten weitere Proteine identifiziert werden, welche von SIRT4 modifiziert werden. Hierbei handelt es sich mit dem mitochondrialen Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) und Stress-70 um Proteine, welche offenbar eine Rolle im Alterungsprozess spielen und mit der NAD(P)-Transhydrogenase um ein Enzym, welches mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird (Rauh et al., 2013). Die klinische Bedeutung dieser durch SIRT4 katalysierten Deacetylierung ist jedoch bisher unklar.

In Bezug auf den Effekt von SIRT4 auf die Entwicklung, bzw. Progression einer Atherosklerose gibt es bereits Daten, die zeigen, dass SIRT4 hier einen protektiven Effekt haben könnte und dass eine SIRT4-Überexpression die von oxidiertem low-density-lipoprotein (LDL)-Cholesterin ausgelöste Zytokinfreisetzung und Apoptose in humanen Zellen reduziert (Tao et al., 2019).

In vielen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass SIRT4 auch einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung, bzw. die Prognose von einer Vielzahl von Tumorerkrankungen hat. Die Expression von SIRT4 wird durch DNA-Schäden induziert und es gibt Hinweise darauf, dass SIRT4 über die Hemmung des Glutaminmetabolismus eine Reduktion der Tumorgenese, und -progression verursacht (Jeong et al., 2013). Ein potenzieller Mechanismus für Tumorzellen, um diesen Effekt zu umgehen, ist die von Csibi und Kollegen gefundene Hemmung von SIRT4 nach Aktivierung von mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), einer Serin/Threonin-Kinase, welche eine zentrale Schaltstelle zwischen katabolem und anabolem Stoffwechsel darstellt (Csibi et al., 2013).

Die genaue Funktion von SIRT4 im Herzmuskel konnte bisher nicht vollständig entschlüsselt werden und es ist weiterhin unklar, ob SIRT4 eher kardioprotektiv oder herzscheidend wirkt. Luo und Kollegen konnten zeigen, dass es im Rahmen einer experimentellen Angiotensin-II-vermittelten Nachlasterhöhung bei kardiospezifisch Sirt4-überexprimierenden Mäusen zu einer deutlich größeren Zunahme an kardialem Remodeling im Sinne eines größeren Fibroseanteils, sowie zu einer deutlichen Zunahme der Kardiomyozytengröße im Vergleich zu Sirt4-knockout Mäusen kommt (Luo et al., 2017). Im Gegensatz dazu scheint SIRT4 die Kardiomyozyten während einer Hypoxie zu schützen (Liu et al., 2013, Zeng et al., 2018). In Zellkulturexperimenten konnte demonstriert werden, dass die Apoptose in H9C2-Kardiomyoblasten mit einer erhöhten SIRT4-Aktivität im Vergleich zu Sirt4-unterexprimierenden Zellen nach einer Hypoxie signifikant niedriger ist

Liu et al., 2013). Interessanterweise fand man ebenso eine erniedrigte Aktivität der Caspasen 3 bzw. 9, welche im Prozess der Apoptose eine zentrale Rolle einnehmen, und postulierte dies als den Mechanismus für die gefundene Hemmung der Apoptose (Liu et al., 2013). Die Expression von SIRT4 scheint im Rahmen einer Hypoxie ebenso erniedrigt zu sein (Liu et al., 2013). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnten Zeng und Kollegen auch im Mausmodell belegen, dass SIRT4 über die Hemmung der Apoptose das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens mindert und somit hier kardioprotektiv wirkt. (Zeng et al., 2018).

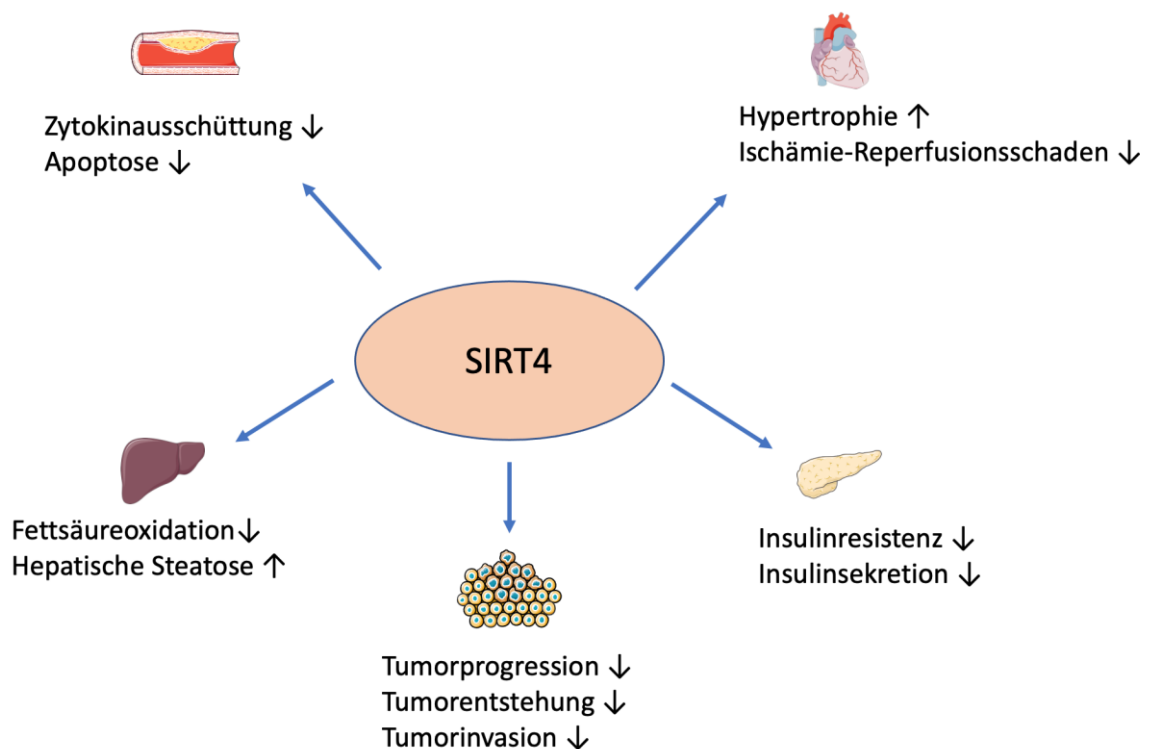


Abbildung 3: Funktionen von SIRT 4

Bisher beschriebene Auswirkungen von SIRT4. In vorwiegend Zellkultur- und KO-Mausmodellexperimenten konnte gezeigt werden, dass SIRT4 eine wesentliche Rolle in vielen Prozessen spielt und einen Einfluss auf den gesamten Körper hat. Diese Abbildung wurde mit Hilfe modifizierter Bilder aus der SMART-Datenbank von Servier erstellt (www.smart.servier.com)

6.3. Ziel der Arbeit

Ein Ungleichgewicht der Fettsäureoxidation und Lipidspeicherung im Herzmuskel kann eine kardiale Hypertrophie und kontraktile Dysfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz bewirken (Chiu et al., 2005, Tsushima et al., 2018, Chiu et al., 2001). Während in C2C12 Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden konnte, dass die Oxidation von Fettsäuren bei Sirt4-Überexpression erniedrigt und bei Sirt4-Deletion erhöht ist, ist der Einfluss von SIRT4 auf den kardialen Energiestoffwechsel bislang nur unzureichend untersucht (Laurent et al., 2013a, Laurent et al., 2013b, Guo et al., 2016). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Sirt4-Überexpression auf den Lipidmetabolismus und die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie unter Bedingungen einer fettreichen Diät zu untersuchen.

7. Material und Methoden

7.1. Materialien

7.1.1. Laborgeräte

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
CFX96-PlateReader	Bio Rad, München, Deutschland
Cryotom HM550	ThermoFisher, Walldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BX51	Olympus Austria, Wien, Österreich
NanoDrop™2000/2000c-Spektralphotometer	ThermoFisher, Wilmington, DE, USA
Thermocycler	Bio Rad, München, Deutschland
Tischzentrifuge Combispin PCV-2400	Grant Instruments, Cambridge, UK
Ultra Turrax Homogenizer T10 basic	IKA, Stauffen, Deutschland
Vortexer	IKA, Stauffen, Deutschland
Zentrifuge, 4°C Hereaus Fresco 21	Thermo Electron LED GmbH, Osterode, Deutschland

7.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Objektträger	Leica Biosystems, Peterborough, UK
PCR-Plates	Bio Rad, München, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

7.1.3. Kit-Systeme

Tabelle 4: Kit-Systeme

Kit	Hersteller
Accustain Trichrome Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

7.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4%Paraformaldehyd	Morphisto, Frankfurt, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Bouin´sche Lösung	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Chloroform (CHCl₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithyothretol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
dNTP	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako. Carpinteria, CA, USA
oligo(dT)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Qiazol	Qiagen, Hilden, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SYBR-Green Supermix	BioRad, Hercules, CA, USA
O.C.T. Compound	Scigen Scientific, Gardena, CA, USA
Nuclease-Free Water	Life Technologies Europe, Bleiswijk, Niederlande
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotimount	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

7.1.5. Primer

Tabelle 6: Primer, welche für die RT-qPCR verwendet wurden

Sämtliche Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH, Wien bezogen.

Target genes	Primer	Sequenz (5'→3')
Cpt1b	Cpt1b-fwd	TGCCTTTACATCGTCTCCAA
	Cpt1b-rev	AGACCCCGTAGCCATCATC
Cpt2	Cpt2-fwd	CCAGCTGACCAAAGAAGCA
	Cpt2-rev	GCAGCCTATCCAGTCATCGT
Glut1	Glut1-fwd	GTCCTGCTGCTATTGCTGTG
	Glut1-rev	GCCTTTGGTCTCAGGGACTT
Glut4	Glut4-fwd	GGCATGGGTTTCCAGTATGT
	Glut4-rev	GAGGAAAGGAGGGAGTCTGG
Lcad	Lcad-fwd	ATGGCAAATACTGGGCATC
	Lcad-rev	TCTTGCGATCAGCTCTTTCA
Mcad	Mcad-fwd	ACTGACGCCGTGCAGATTTT
	Mcad-rev	GCTTAGTTACACGAGGGTGATG
Pdk4	Pdk4-fwd	GCTTGCCAATTTCTCGTCTC
	Pdk4-rev	CTTCTCCTTCGCCAGGTCT
Pparα	Ppar α -fwd	GAGAATCCACGAAGCCTACC
	Ppar α -rev	AATCGGACCTCTGCCTCTTT
Rplp0	Rplp0-fwd	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT
	Rplp0-rev	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT

7.1.6. Tiere und Tierhaltung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden an Wildtypmäusen durchgeführt, sowie an Mäusen, welche durch eine genetische Modifikation eine global erhöhte Expression von Sirt4 aufgewiesen haben. Die Versuchstiere wurden von der Firma GenOway Genome Engineering, Lyon, Frankreich generiert und sind genetisch auf einem gemischten C57BL/6 und 129/SvImJ Hintergrund. Mit Hilfe eines CMV-Promoters wurde in den x-chromosomalen Hprt-Locus männlicher Mäuse ein Sirt4-Gen und eine direkt vorgeschaltete loxP-flankierte Stop-Sequenz inseriert. Diese Männchen wurden mit sogenannten „Cre-Deleter“-Weibchen gekreuzt, welche heterozygot eine Cre-Rekombinase exprimieren. Diese Cre-Rekombinase erkennt die loxP-Flanken und schneidet so die Stop-Sequenz aus dem Genom. Bei dieser Kreuzung entstanden nun unter anderem heterozygot Sirt4-überexprimierende Weibchen, bei denen die Stop-Sequenz durch die Cre-Rekombinase entfernt wurde, sowie Wildtyp-Männchen.

Diese heterozygoten Weibchen wurden anschließend mit Wildtyp-Männchen, die bei einer parallelen Kreuzung entstanden sind, gekreuzt. Somit entstanden nun neben den Weibchen, hemizygot Sirt4-überexprimierende Männchen und wieder Wildtyp-Männchen. Für die Untersuchungen wurden, um eine möglichst homogene Gruppe zu haben, nur die männlichen Mäuse verwendet.

Die Quantifizierung der globalen Sirt4-Überexpression auf Proteinebene mittels Western Blots wurde von Dr. med. Johannes Gollmer durchgeführt und die Ergebnisse sind in Kapitel 8.2. dargestellt.

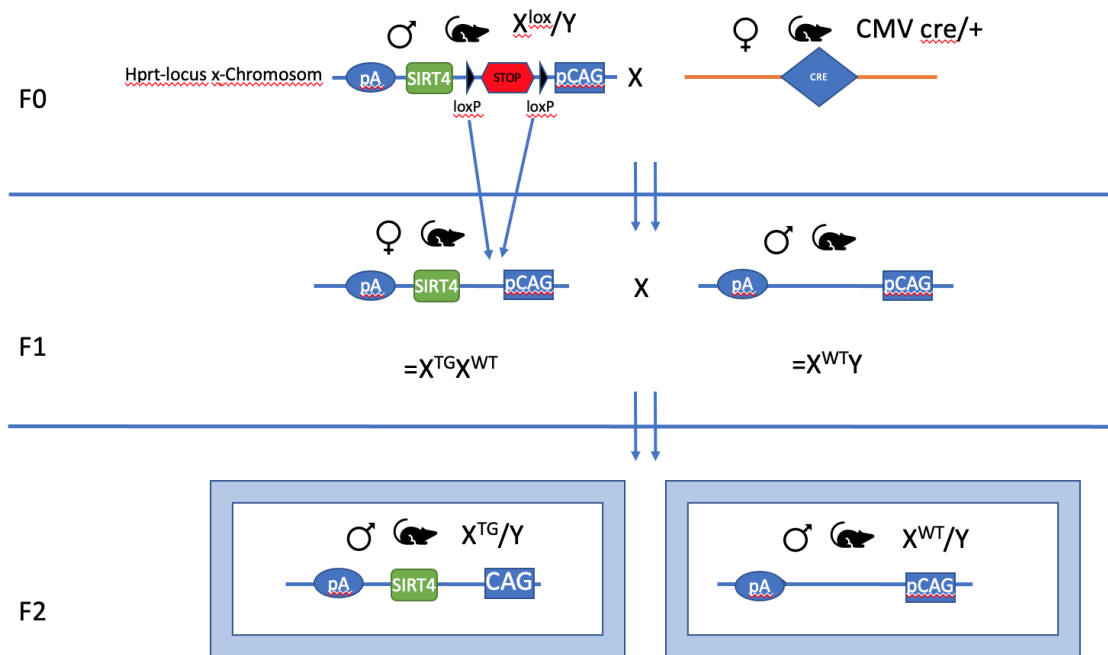


Abbildung 4: Generierung der Versuchsmäuse

In der Generation F0 sieht man die Männchen mit dem zusätzlichen Sirt4-Gen und der loxP-flankierten Stop-Sequenz. Nach Kreuzung mit einem Cre-Deleter Weibchen kommt es unter anderem zu heterozygot Sirt4-überexprimierenden Weibchen und Wildtyp-Männchen (F1). Diese Weibchen werden mit Wildtyp-Männchen gekreuzt und es entstehen unter anderem hemizygot Sirt4-überexprimierende Männchen und Wildtyp-Männchen (F2), welche den Versuchsmäusen entsprechen. Die Weibchen wurden für die Versuche nicht verwendet.

Es wurden maximal 5 Mäuse in einem Käfig untergebracht und der Tages- und Nachtrhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Mäuse hatten einen freien Zugang zu Futter und Wasser und die Temperatur in den Käfigen betrug 22°C. Die in dieser Arbeit gemachten Experimente wurden durch die Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Freiburg genehmigt (Antragsnummer G-14/75). Die Tiere wurden am CEMT Freiburg, Deutschland gezüchtet und gehalten.

7.1.7. Spezialfutter

Die Spezialfutter wurden von der Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland bezogen. Als High Fat Diet wurde das Futter D12492 (I) und als Kontrolldiät (LFD) das Futter D12450B (I) verwendet.

7.2. Methoden

7.2.1. Genotypisierung

Die Genotypisierung ist ein wichtiger Vorgang, bei dem man die untersuchten Mäuse auf Genebene charakterisiert und in unserem Fall überprüft, ob die Maus Träger des Sirt4-Transgens oder die Wildtypversion ist. Die Genotypisierung der Mäuse, welche das Gewebe für die Experimente der vorliegenden Arbeit lieferten, wurden von Dr. med. Johannes Gollmer durchgeführt.

Der erste Schritt der Genotypisierung ist die Lyse des zu untersuchenden Materials. Hierzu wurden Ohrenstanzen der Mäuse verwendet. Diese wurden von 3 Wochen-alten Mäusen gewonnen und bis zur Lyse bei -20°C eingefroren. Bei der Lyse werden die Zellen zerstört, um so zur DNA zu gelangen. Hierzu werden die Ohrenstanzen zunächst in einem Lysepuffer inkubiert und in weiteren Schritten aufgereinigt. Anschließend werden die für die Genotypisierung interessanten Genabschnitte mittels einer konventionellen Polymeraseketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction = PCR) amplifiziert. Zunächst werden hierbei die DNA-Doppelstränge bei etwa 95°C denaturiert. Darauf folgt eine Abkühlung auf etwa 65°C , damit die Primer an die DNA binden können. Den letzte Schritt eines PCR-Zyklus stellt die Elongation dar, bei der durch eine hitzestabile DNA-Polymerase die komplementären Doppelstränge gebildet werden. Diese Abfolge wird 35-mal wiederholt und so die gewünschten Abschnitte in einer großen Menge vervielfältigt. Nachdem die Zielsequenz im Rahmen der PCR amplifiziert wurde, folgt der Schritt der Agarose-Gelelektrophorese, bei der die zu erwartenden PCR-Produkte nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht darauf, dass sich in einem elektrischen Feld längere DNA-Stränge langsamer und kürzere schneller bewegen. Zunächst fügt man der gewonnenen DNA einen Ladepuffer, sowie einen Fluoreszenzfarbstoff bei. Neben den Proben lässt man auch einen Vergleichsmarker mitlaufen, bei dem die Banden in definierten Basenpaarabständen zu sehen sind, und man so in weiterer Folge auch die Banden der Proben zuordnen kann. Für die Elektrophorese benötigt man ein Agarosegel, wobei der Agarosegehalt an die Größe des Zielproduktes angepasst wird. Durch einen UV-Transilluminator können die sichtbar gemacht und in weiterer Folge abfotografiert und ausgewertet werden.

7.2.2. Fütterung

Die Mäuse bekamen für 12 Wochen ab der 6. Lebenswoche entweder eine hochkalorische, fettreiche Nahrung (high-fat diet, HFD) oder wurden mit einem Kontrollfutter (low-fat-diet, LFD) gefüttert. Um stets eine ausreichende Menge frischen Futters zu gewährleisten, wurde das Futter zweimal wöchentlich gewechselt.

Tabelle 7: Nährstoffzusammensetzung des Tierfutters

Futter	Low-fat diet	High-fat diet
Energiegehalt	3657 kcal/kg	5150 kcal/kg
Fett	20 %	60 %
Kohlenhydrate	60 %	20 %
Proteine	20 %	20 %

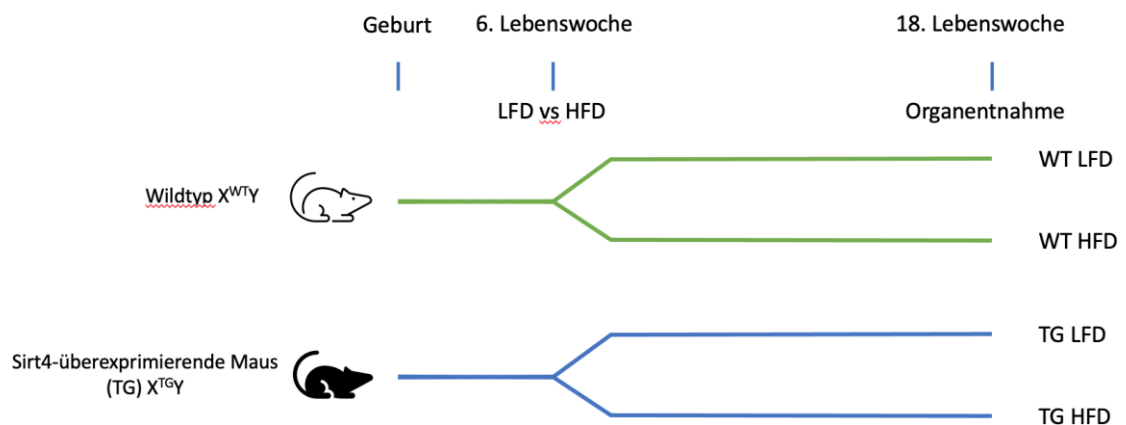


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Studienablaufes

Hierbei stellt die obere Zeitachse den zeitlichen Ablauf der Kontroll-Wildtyp-Mäuse, und die untere die der Sirt4-überexprimierenden Mäuse dar. LFD = low-fat-diet; HFD = high-fat diet

7.2.3. Euthanasie und Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte in etwa 17-18 Wochen alten Mäusen, nachdem diese 12 Wochen lang mit den Versuchsdäten gefüttert worden sind. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Thiopental narkotisiert, wobei gewichtsadaptiert jeweils 0,3 mg/kg intraperitoneal verabreicht wurden. Da für die Untersuchungen eine kurze kalte Ischämiezeit sehr wichtig ist, wurden die Organe entnommen, bevor der Tod eingetreten ist. Dies wurde jedoch erst durchgeführt, nachdem eindeutig sichergestellt worden ist, dass die Tiere bereits tief narkotisiert waren, nicht auf Schmerzreize reagiert haben und keine Reflexe mehr vorhanden waren. Für die weiterführenden Experimente wurden Herz, Leber Niere, Lunge, der Musculus soleus und eine Tibia entnommen. Für die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden die Herzen der Versuchsmäuse verwendet. Die Organentnahmen der Organe, welche das Gewebe für die Experimente der vorliegenden Arbeit lieferten, wurden von Dr. med. Johannes Gollmer durchgeführt.

7.2.4. Triglyceridassay

Die Quantifizierung der Triglyceridspiegel erfolgte mittels des serum triglyceride determinatin kits der Firma Sigma Aldrich und wurde von Dr. med. Johannes Gollmer durchgeführt. Es wurden die Triglyceridkonzentrationen im Herzen, in den Nieren, der Leber und der Skelettmuskulatur von etwa 15 Wochen lang gefütterten Mäusen bestimmt. Das Protokoll ist in der Doktorarbeit von Dr. med. Johannes Gollmer beschrieben (Gollmer, 2019).

7.2.5. RNA Isolation, cDNA-Synthese, RT-qPCR

RNA-Isolation

Für die quantitative Analyse der Genexpression mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR erfolgt zunächst die Gewinnung der RNA. Hierbei werden 20-30 mg der bei -80 °C gelagerten Herzen verwendet. Die Proben werden zunächst in Trizol für 40-60 Sekunden mittels eines IKA Ultra-Turrax-Dispensiergeräts homogenisiert. Es folgt eine 5-minütige Inkubation bei Raumluft. Daraufhin fügt man 120 µl Chloroform (CHCl₃) hinzu und vortext dies nun für 15 Sekunden, gefolgt von einer 3-minütigen Inkubation bei Raumluft. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4 °C für 15 Minuten wird anschließend der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zu dem transferierten Überstand werden

200 µl Ethanol hinzugefügt. Dies wird wieder gevortext und in die Säule des Qiagen RNeasy Mini Kits überführt. Darauf folgt ein Zentrifugationsschritt mit 8.000 x g bei 4 °C für 30 Sekunden. Anschließend werden 700 µl des RW1-Puffers auf die Säule pipettiert, welcher Biomoleküle, wie Proteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren entfernt, während größere RNA Moleküle in der Säule gebunden bleiben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt fügt man 500 µl eines RPE-Puffers bei, der dafür sorgt, dass Salze, welche noch, vor allem durch das Trizol, sowie den RW1-Puffer, vorhanden sind, rausgewaschen werden. Hierauf wird die Säule wieder bei 8.000 x g bei 4 °C für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Waschschruttes und der Zentrifugation wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit RNase freiem Wasser gespült. Das Eluat wird daraufhin ein weiteres Mal auf die Säule gegeben und ein letztes Mal bei 8.000 x g bei 4 °C für eine Minute zentrifugiert. Dieser Durchfluss wird in ein 600 µl Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Konzentration, sowie die Reinheit der Proben werden über die Lichtabsorption im NanoDrop Vollspektrum-Spektralphotometer bestimmt, wobei die RNA-Konzentration über die Absorption bei 260nm erhoben wird. Der 260/280 nm Quotient stellt das Verhältnis Nukleinsäure zu Protein dar und der 260/230 nm Quotient wird zur Beurteilung der Reinheit verwendet.

Die Aufbewahrung der isolierten RNA erfolgt bei -80 °C.

cDNA Synthese

Die für die Quantifizierung der Genexpression verwendete quantitative Reverse-Transkriptase-PCR benötigt DNA. Deshalb muss aus der isolierten RNA die komplementäre copyDNA (cDNA) hergestellt werden, welche einzelsträngig ist. Für diese cDNA-Synthese benötigt man zuerst einen Mastermix bestehend aus einem 5xFirstStrand Buffer, Dithyothretol (DTT), Nukleotiden (dNTP) und einer reversen Transkriptase (SuperScript III) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung Mastermix cDNA-Synthese

Für eine Probe	µl	[Final]
5x First Strand Buffer	3	1
DTT (0.1 M)	0.75	5 mM
dNTP (10 mM)	0.75	0.5 mM
SuperScript III (200U/µl)	1,25	10 U/µl

Bei der cDNA-Synthese werden zunächst 1,5 µg der in Wasser verdünnten RNA (Volumen je nach gemessener Konzentration) mit Nuclease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 8,5 µl weiter verdünnt. Dann werden 0,75 µl des Oligo-dT-Primers beigelegt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Hierbei bindet der Oligo-dT-Primer, welcher nur aus Wiederholungen von Thymin besteht, an den Poly-A-Schwanz der isolierten mRNA. Daraufhin werden 5,75 µl des Mastermixes hinzugefügt. Der First Strand Buffer sorgt für eine optimale Umgebung für die Synthese der cDNA. DTT schützt die mRNA über eine Verhinderung der Bildung von Disulfidbrücken und die dNTPs sind die Bausteine für die cDNA Synthese. Nach kurzer Zentrifugation folgt die reverse Transkription der reversen Transkriptase für 90 Minuten bei 50 °C. In diesem Temperaturfenster kann die reverse Transkriptase arbeiten und erzeugt den komplementären cDNA-Strang. Zum Schluss wird die reverse Transkriptase bei 70 °C für 15 Minuten inaktiviert und der Syntheseprozess somit beendet. Der cDNA-Gehalt wird abschließend erneut im NanoDrop-Spektralphotometer gemessen.

Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR)

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgt mittels einer quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR). Die cDNA wird hierbei zunächst im Verhältnis von 1:100 in Nuclease-freiem Wasser verdünnt und in jedes Well 12,5 ng der in H₂O verdünnten cDNA (Volumen je nach gemessener cDNA-Konzentration) pipettiert. Pro untersuchter Maus wurden jeweils zwei Wells befüllt (Duplikate). Anschließend wird jedes Well mit Nuclease-freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 8,5 µl aufgefüllt. Der Mastermix für die RT-qPCR besteht aus den Primern, sowie dem iQ SYBR-Green Supermix (BioRad). Für jedes untersuchte Gen benötigt man einen Forward-, sowie Reverse-Primer. Die 100µM Primer werden 1:80 mit H₂O verdünnt. Von dieser Verdünnung verwendet man dann jeweils 2 µl pro Well für den Mastermix. Nun werden den Primern 12,5 µl des iQ SYBR-Green Supermixes pro Well zugefügt, welches SYBR-Green I, einen Farbstoff, der zur Detektion der doppelsträngigen DNA verwendet wird, enthält. Dieses bindet an die DNA-Doppelstränge und bildet einen Komplex, welcher Licht bei 480 nm maximal absorbiert und bei 520 nm emittiert. Durch die Emission kann die Menge der Komplexe und somit auch des doppelsträngigen PCR-Produktes gemessen werden. Neben den Proben wird auch eine Standardreihe angefertigt. Diese besteht aus verschiedenen Verdünnungen der cDNA (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400) einer Kontrollmaus (Wildtyp, low-fat-diet). Durch diesen

Standard ist es nun möglich bei vorher gemessenen Werten der cDNA einen absoluten DNA-Produkt-Gehalt auszurechnen. Anschließend wird die PCR-Platte mit einer Folie bedeckt und nach einer kurzen Zentrifugation in den Thermozykler mit integriertem PCR-Detektion System gelegt, wo die eigentliche PCR durchgeführt wird.

Das Grundprinzip der RT-qPCR gleicht dem der konventionellen PCR und besteht aus der Denaturierung, der Primeranlagerung und der Elongation, mit dem Unterschied, dass hier nach jedem Zyklus die PCR-Produkte durch das SYBR-Green quantifiziert werden (Ablauf der RT-qPCR siehe Abbildung 6). Ausgewertet wird hierbei immer die Ct-Zahl, bei der die Kurve der PCR-Produkte ein exponentielles Wachstum aufweist. Die Ergebnisse wurden darüber hinaus auf das Referenzgen Rplp0 normiert.

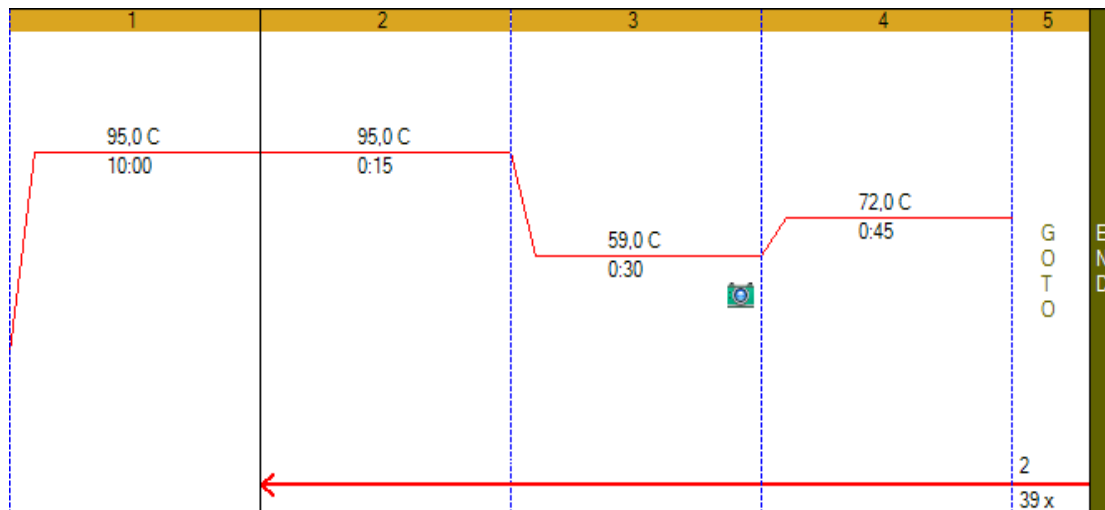


Abbildung 6: Ablauf der RT-qPCR

7.2.6. Histologie

Organeinbettung

Bevor die Herzen entnommen werden, werden sie zunächst mit 3 ml 0,9%iger NaCl-Lösung durch Punktion des linken Ventrikels gespült. Direkt nach der Entnahme und bevor die endgültige Einbettung erfolgt, werden die Herzen erneut mit NaCl gespült, worauf diese dann in O.C.T. Compound eingebettet werden und mittels mit Flüssigstickstoff gekühltem Methylbutan eingefroren werden können. Die Lagerung erfolgt dann bis zur weiteren Prozessierung bei -20°C.

Masson-Trichrome-Färbung

Pathologische kardiale Hypertrophie ist häufig von einer Fibrose begleitet. Die Masson-Trichrome-Färbung ist, die am häufigste histologische Färbemethode, um den Anteil der Fibrose zu quantifizieren.

Zuerst werden die in O.C.T. Compound konservierten Herzen mittels Cryotom in 12 µm breite Schnitte geschnitten und kommen auf elektrostatisch vorbehandelte Objektträger. Für die Färbung wurde das Accustain Trichrome Stain Kit (Sigma Aldrich) verwendet. Die Objektträger werden zu Beginn der Färbung aufgetaut und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Dann werden diese zunächst für eine Stunde in einer Küvette mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung inkubiert, worauf sie kurz in einer Küvette mit destilliertem (dd)H₂O gespült und anschließend über Nacht in einer Küvette mit Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur fixiert werden. Daraufhin werden die Objektträger in eine frische Küvette gestellt, in die lauwarmes Leitungswasser zügig einfließt und so für 1-2 Minuten gewaschen und anschließend wieder kurz in eine Küvette mit ddH₂O gegeben. Im ersten Färbeschritt wird ausreichend Weigerts-Hämatoxin auf die Schnitte pipettiert, so dass diese gut bedeckt sind und lässt sie für 5 Minuten inkubieren. Hiermit werden die Zellkerne schwarz gefärbt. Es folgt ein 10-minütiger Waschschriff unter in eine Küvette einfließendem warmen Leitungswasser. Die Objektträger werden danach für 5 Minuten in eine Küvette mit Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin gelegt. Dadurch kommt es zur Rotfärbung der Muskelfasern. Danach werden die Objektträger in 3 frischen Küvette mit ddH₂O für jeweils eine Minute gewaschen. Um eine Färbung des Kollagens zu ermöglichen werden jeweils etwa 800 µl einer Phosphorwolfram/Phosphormolybdänsäure-Lösung auf die Objektträger pipettiert und dies nun für 10 Minuten inkubiert. Schließlich werden die Objektträger für 5 Minuten in eine mit Anilinblau gefüllten Küvette gelegt, wo es zu der Blaufärbung der Kollagenfasern kommt. Anschließend folgt ein weiterer Waschschriff in 3 frischen Küvetten mit ddH₂O für jeweils eine Minute mit darauffolgender Inkubation in einer Küvette mit 1 %iger Essigsäure. Es folgt eine Entwässerung mittels einer Alkoholreihe. Hierbei benötigt man 70%, 90% und 100% Ethanol, in welchem die Objektträger wieder in Küvetten für jeweils 3 Minuten entwässert werden. Darauf werden die Objektträger in einer Küvette mit Xylen geklärt. Abschließend wird etwas Permount auf die Objektträger pipettiert und die Deckgläser auf die Objektträger gelegt.

Von jedem Mauserzen wird dann ein Objektträger zufällig ausgewählt. Auf jedem Objektträger befinden sich vier Schnitte und es werden pro Schnitt vier zufällig ausgewählte Bereiche bei 20-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop abfotografiert und später in der

Software ImageJ ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels eines Rastergitters und es wurden die Kästchen, welche blau gefärbte Kollagenanteile enthielten, gezählt und dann als Fibroseanteil in Prozent dokumentiert.

Wheat-Germ-Agglutinin-Färbung

Die Größe der Kardiomyozyten ist ein wichtiger Parameter in der Beurteilung einer Hypertrophie. Für diesen Zweck wird die Wheat-Germ-Agglutinin-Färbung (WGA) verwendet. Hierbei können die Zellgrenzen dargestellt und in weiterer Folge die Fläche der Kardiomyozyten ausgemessen werden. Man benötigt für diese Färbung 12µm breite Schnitte der in O.C.T. Compound eingelegten Herzen. Diese werden wie bei der Masson-Trichrome Färbung auf elektrostatisch vorbehandelte Objektträger gelegt und können bis zur weiteren Färbung bei -20°C gelagert werden.

Zu Beginn der Färbung werden die Objektträger aufgetaut und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Danach werden die Objektträger für 15 Minuten in einer Küvette mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das Wheat-Germ-Agglutinin (1 mg/ml) wird dann in einem Verhältnis von 1:100 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline = PBS) weiter verdünnt. Zunächst werden die Objektträger 3-mal für 3 Minuten in Küvetten mit PBS gewaschen. Anschließend pipettiert man jeweils etwa 800 µl der WGA-Lösung auf die Objektträger und inkubiert dies im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zum Schluss wäscht man die Objektträger wieder 3-mal für 3 Minuten in frischen Küvetten mit PBS und bettet die Schnitte nun mit jeweils einem Tropfen Fluorescent Mounting Medium (Fa. Dako) ein.

Bis zur weiteren Auswertung können die Objektträger nun bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Die Analyse erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 488 nm. Pro Herz werden drei Schnitte verwendet und drei zufällig ausgewählte Bereiche pro Schnitt bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Die Quantifizierung der Kardiomyozytengröße erfolgt mit Hilfe des Programmes Olympus CellSense Standard. Hierbei wurden die querschnittenen Kardiomyozyten umrundet, womit man die innere Fläche der Kardiomyozyten in µm² erhielt.

7.2.7. Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Programme IBM SPSS Statistics 26 und Microsoft Excel angefertigt. Ein Vergleich von 2 Gruppen erfolgte mit einem Student T-Test. Beim Vergleich von vier Gruppen anhand zweier Variablen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (2-Way ANOVA). In den Abbildungen wurden hierbei statistisch signifikante Genotypeffekte mit einem § und statistisch signifikante Diäteeffekte mit einer # gekennzeichnet. Als Post-hoc Test wurde der zweiseitige T-Test für unabhängige Variablen verwendet und ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einem * gekennzeichnet. Ein Ergebnis wurde ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ als signifikant gewertet.

8. Resultate

8.1. Genotypisierung

Die Differenzierung des Genotyps von Wildtyp (WT) Mäusen und Mäusen mit Sirt4-Überexpression (TG) erfolgte mittels konventioneller PCR. Abbildung 7 zeigt ein repräsentatives Bild eines Agarose-Gels mit Auftrennung von PCR-Produkten. Wie linksseitig dargestellt, weisen die PCR-Produkte von TG Mäusen (hier Sirt4tg11-53 und Sirt4tg11-59) Banden bei 378 bp auf. Wie rechtsseitig dargestellt, weisen die PCR-Produkte von WT-Mäusen (hier Sirt4tg11-54, Sirt4tg11-55 und Sirt4tg11-56) eine Bande bei 345 bp auf.

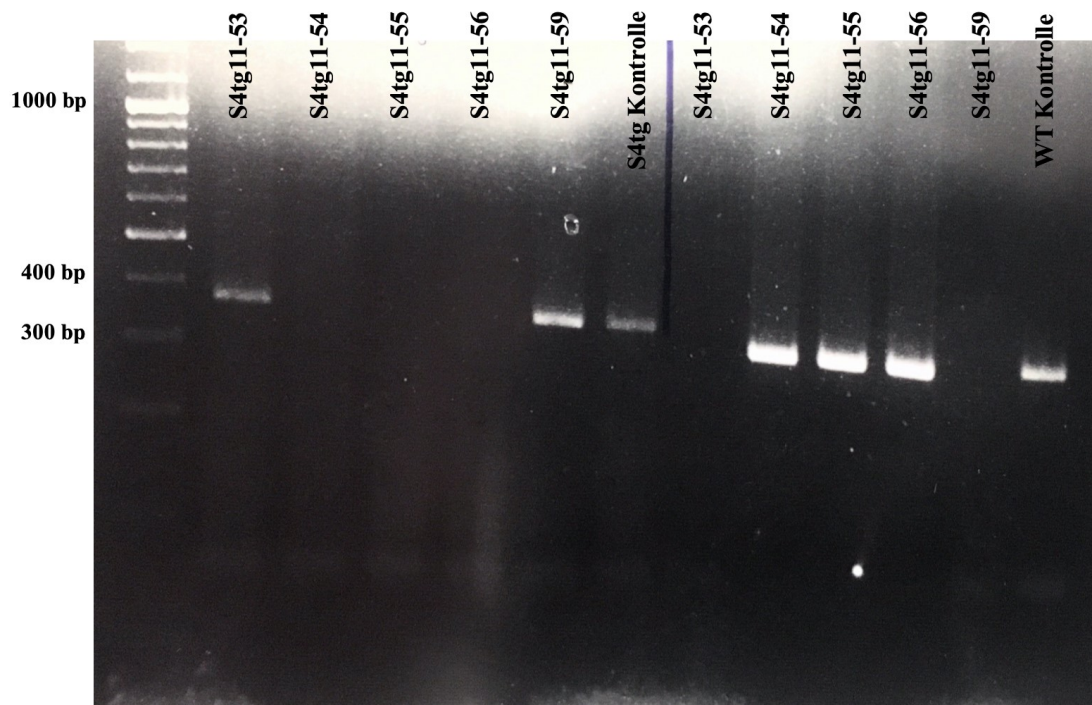


Abbildung 7: Genotypisierung von WT und TG Mäusen. Repräsentatives Bild eines Agarose-Gels mit Auftrennung von PCR-Produkten entsprechend dem Molekulargewicht nach erfolgter konventioneller PCR, die zur Zuordnung der Genotypen verwendet wurde. Der Molecular Weight Marker ist linksseitig zu sehen.

8.2. Quantitative Bestimmung der SIRT4-Überexpression

Die Quantifizierung der SIRT4-Überexpression auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot und wurde von Dr. Johannes Gollmer durchgeführt. Abbildung 8 zeigt die Proteinspiegel von SIRT4 in Herzgewebe (A), Lebergewebe (B) und Nierengewebe (C). Im Vergleich zum WT waren die SIRT4-Proteinspiegel im Herzgewebe um das 19-fache, in Lebergewebe auf das 17-fache, und in Nierengewebe auf das 6-fache erhöht.

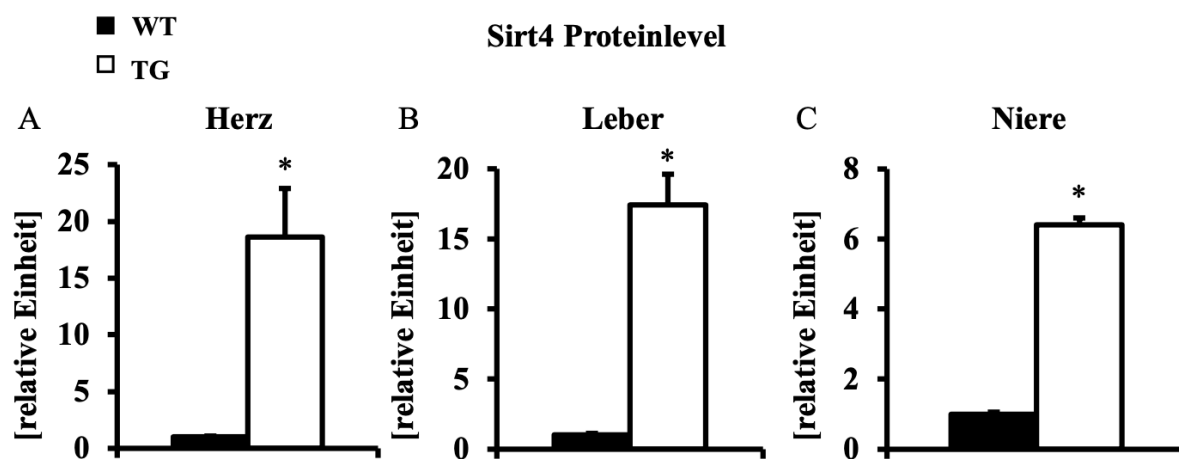


Abbildung 8: Nachweis der globalen SIRT4-Überexpression auf Proteinebene. Relative SIRT4-Konzentration in Herzgewebe (A), Lebergewebe (B) und Nierengewebe (C) von WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD. Proteinlevel in WT Mäusen wurden willkürlich als 1 dargestellt; n=4 in allen Gruppen. * p<0.05 versus WT

8.3. Myokardiale Triglyceridkonzentration

Studien legen nahe, dass SIRT4 die Verwertung von Fettsäuren reguliert und damit bestimmt, ob diese oxidiert oder als Triglyceride gespeichert werden. Abbildung 9 zeigt die Triglyceridspiegel im Herzgewebe von WT und TG Mäusen, die 12 Wochen lang entweder einer LFD oder einer HFD ausgesetzt wurden. Die Triglyceridspiegel zeigten keine Unterschiede zwischen WT und TG Mäusen, weder unter LFD, noch unter HFD.

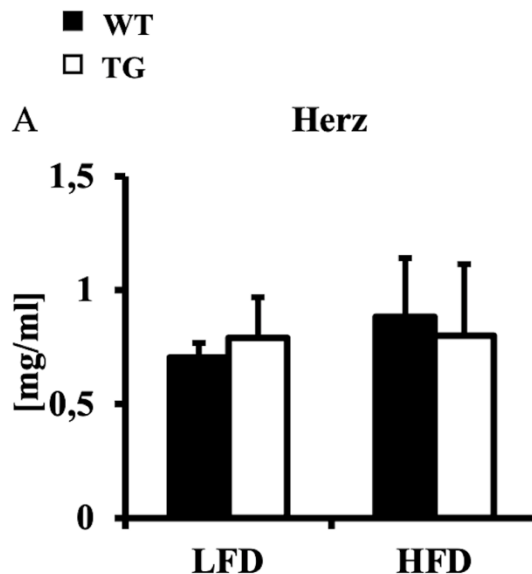


Abbildung 9: Myokardialer Triglyceridgehalt. Quantifizierung des myokardialen Triglyceridgehalts in Herzgewebe von WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD; n=6

8.4. Myokardialer mRNA-Gehalt von Stoffwechselproteinen und Ppar α

Anpassungen des myokardialen Stoffwechsels an langfristige Stressoren erfolgen wesentlich durch die Anpassung der Genexpression. Der mRNA-Gehalt von Genen, die für Proteine und Regulatoren des Fettsäurestoffwechsels kodieren, sind in Abbildung 10 und in den Tabellen 1 bis 10 im Anhang dargestellt. Die mRNA-Spiegel der Cpt1 unterschieden sich nicht signifikant in allen vier Gruppen (siehe Tabellen 1 und 2 im Anhang). Die 2-Way ANOVA der Cpt2 Expression ergab eine erhöhte Expression von Cpt2 durch die HFD, jedoch keinen Effekt aufgrund des Genotyps (siehe Tabelle 3 im Anhang). Der Effekt der HFD auf die Cpt2 Expression war durch eine erhöhte Expression in HFD-gefütterten WT Mäusen im Vergleich zu LFD-gefütterten WT-Mäusen bedingt (siehe Tabelle 4 im Anhang). In TG-Mäusen führte die HFD nicht zu einer erhöhten Expression von Cpt2. Wie bei Cpt2

konnte auch für Lcad, aber nicht für Mcad, ein Behandlungseffekt durch die HFD mit erhöhter Expression von Lcad nachgewiesen werden (siehe Tabellen 5 und 7 im Anhang). Der Effekt der HFD auf Lcad war wie bei Cpt2 durch eine erhöhte Expression in HFD-gefütterten WT Mäusen im Vergleich zu LFD-gefütterten WT-Mäusen bedingt (siehe Tabelle 8 im Anhang). Auch Mcad zeigte eine erhöhte Expression in HFD-gefütterten WT Mäusen im Vergleich zu LFD-gefütterten WT-Mäusen, wengleich kein Behandlungseffekt nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 6 im Anhang). Bei der Analyse des mRNA-Gehaltes von Ppara zeigte sich kein signifikanter Genotypeneffekt oder Behandlungseffekt (siehe Tabelle 9 im Anhang). In der Post-hoc Analyse war die Expression von Ppara in TG-Mäusen nach HFD signifikant niedriger im Vergleich zu TG-Mäusen mit LFD (siehe Tabelle 10 im Anhang).

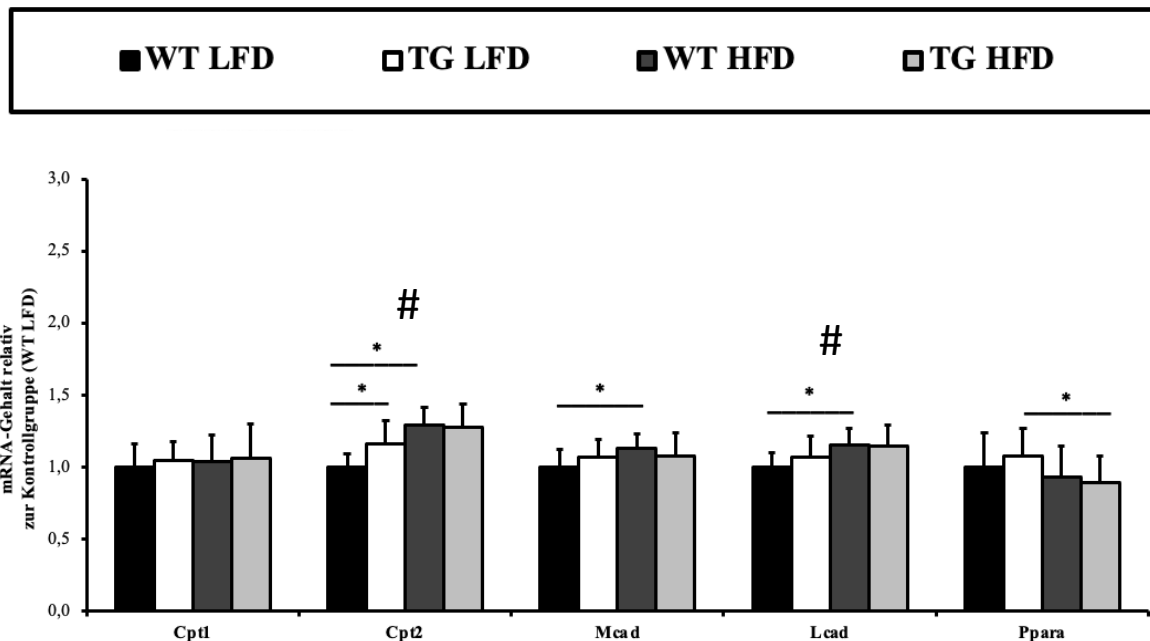


Abbildung 10: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von selektierten Proteinen und Regulatoren des Fettsäurestoffwechsels. Darstellung des myokardialen mRNA Gehaltes von WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD. Die Kontrollgruppe (WT LFD) wurde willkürlich als 1 bezeichnet, und Expression wurde normiert auf das Housekeeping-Gen Rplp0. Mitochondriale Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (Cpt1); Carnitin-Palmitoyltransferase-2 (Cpt2); medium-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (Mcad); long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (Lcad); peroxisome-proliferating-activated-receptor-subunit- α (Ppara); 2-Way ANOVA: § = Genotypeneffekt $p < 0,05$; # = Diäteneffekt $p < 0,05$; Post-hoc Analyse: * $p < 0,05$.

Der mRNA Gehalt von Genen, die für Proteine und Regulatoren des Glukosestoffwechsels kodieren, sind in Abbildung 11 und in den Tabellen 11 bis 16 im Anhang dargestellt. Entsprechend der 2-Way ANOVA zeigte sich ein Behandlungseffekt für die Pdk4-Expression, wohingegen ein Effekt durch den Genotyp nicht nachweisbar war (siehe Tabelle 11 im Anhang). Die Post-hoc Analyse ergab, dass sowohl bei WT-Mäusen als auch bei TG-Mäusen nach HFD die mRNA Spiegel erhöht waren (siehe Tabelle 12 im Anhang). Ein Behandlungseffekt zeigte sich auch für Glut1 und Glut4. Die Post-hoc Analyse ergab, dass sowohl bei WT-Mäusen als auch bei TG-Mäusen nach HFD die mRNA Spiegel für Glut1 und Glut4 erniedrigt waren (siehe Tabellen 13 und 15 im Anhang). Ein Effekt des Genotyps konnte für Glut1 und Glut4 jeweils nicht nachgewiesen werden (siehe Tabellen 13 bis 15 im Anhang).

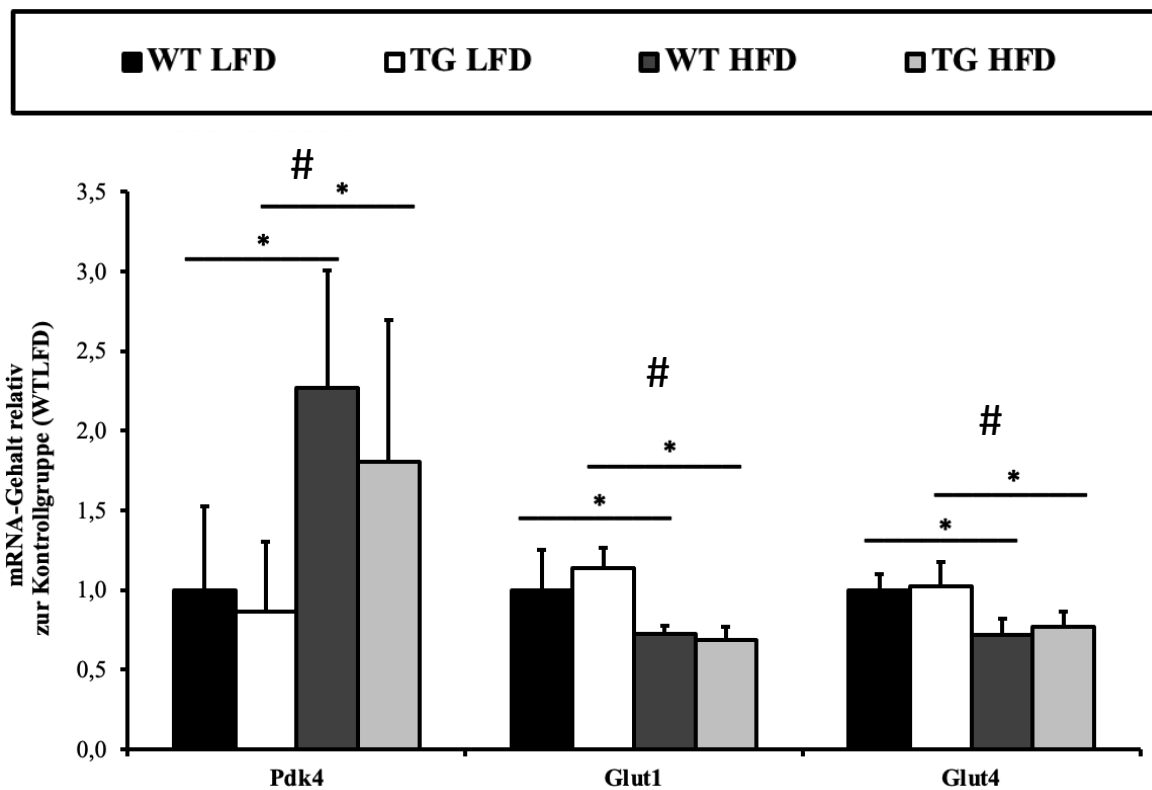


Abbildung 11: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von Proteinen und Regulatoren des Glukosestoffwechsels. Darstellung des myokardialen mRNA Gehaltes von WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD. Die Kontrollgruppe (WT LFD) wurde willkürlich als 1 bezeichnet, und Expression wurde normiert auf das Housekeeping-Gen Rplp0. Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-4 (Pdk4); Glukosetransporter 1 bzw. 4 (Glut1 bzw. 4); 2-Way ANOVA: § = Genotypeffekt $p < 0,05$; # = Diäteeffekt $p < 0,05$; Post-hoc Analyse: * $p < 0,05$.

8.5. Kardiomyozytengröße

Das Vorliegen einer kardialen Hypertrophie wurde mittels Bestimmung der Kardiomyozytengröße unter Verwendung einer WGA-Färbung untersucht. Repräsentative Bilder der Färbung sowie deren Quantifizierung sind in Abbildung 12, sowie in den Tabellen 19 und 20 im Anhang, dargestellt. In LFD gefütterten WT-Mäusen betrug die Kardiomyozytengröße $334 \pm 23 \mu\text{m}^2$. Die 2-Way ANOVA ergab, dass die HFD zu einer größeren Kardiomyozytengröße führt. Die Post-hoc Analyse zeigte, dass dieser signifikante Effekt durch eine erhöhte Kardiomyozytengröße in HFD-gefütterten WT-Mäusen, verglichen mit LFD-gefütterten WT-Mäusen, zustande kam. In TG-Mäusen führte HFD nicht zu erhöhter Kardiomyozytengröße. Auch der Genotyp führte zu einem Anstieg der Kardiomyozytengröße, wobei die Post-hoc Analyse ergab, dass die Kardiomyozytengröße sowohl in der LFD Gruppe als auch in der HFD Gruppe nur im Mittelwert, aber nicht statistisch signifikant, erhöht war.

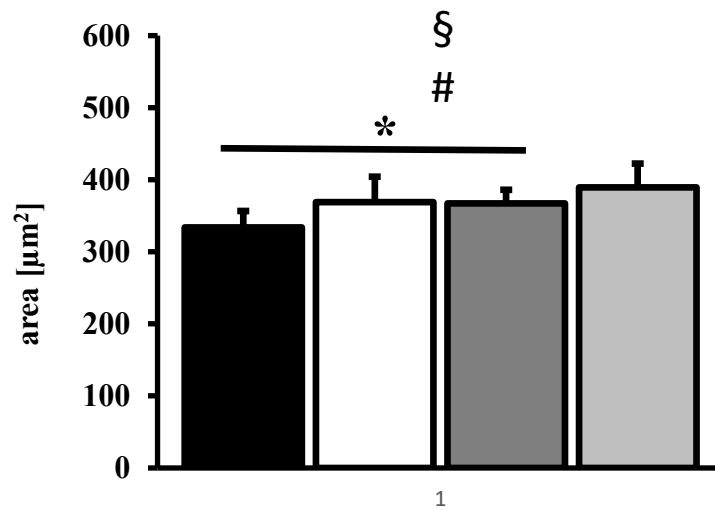
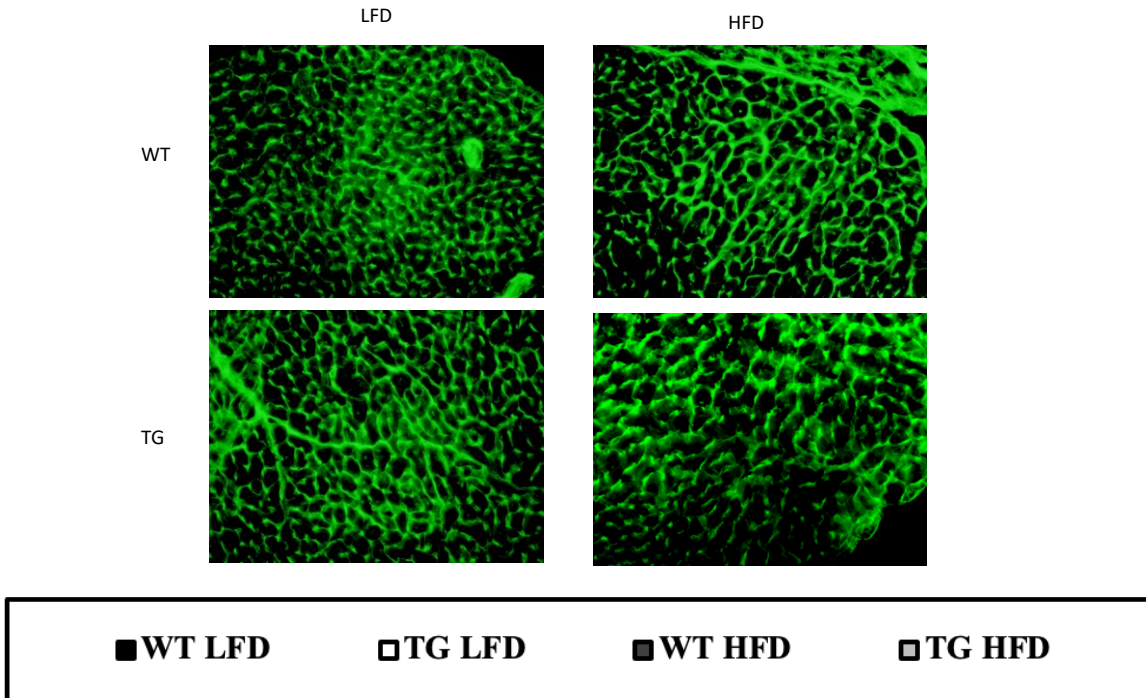


Abbildung 12: Bestimmung der Kardiomyozytengröße. Repräsentative Bilder der WGA-Färbungen und Quantifizierung der Kardiomyozytengröße in WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD. n=6; 2-Way ANOVA: § = Genotypeffekt $p < 0,05$; # = Diäteeffekt $p < 0,05$; Post-hoc Analyse: * $p < 0,05$.

8.6. Myokardiale Fibrose

Pathologische kardiale Hypertrophie ist häufig von einer Fibrose begleitet. Der myokardiale Bindegewebsgehalt wurde mittels Masson-Trichrome Färbung untersucht. Repräsentative Bilder der Färbung sowie deren Quantifizierung sind in Abbildung 13, sowie in den Tabellen 17 und 18 im Anhang, dargestellt. In LFD gefütterten WT-Mäusen betrug der Fibrosegehalt $0,86 \pm 0,31$ %. Es konnte kein Unterschied im Fibrosegehalt zwischen WT und TG Mäusen mit LFD oder HFD nachgewiesen werden.

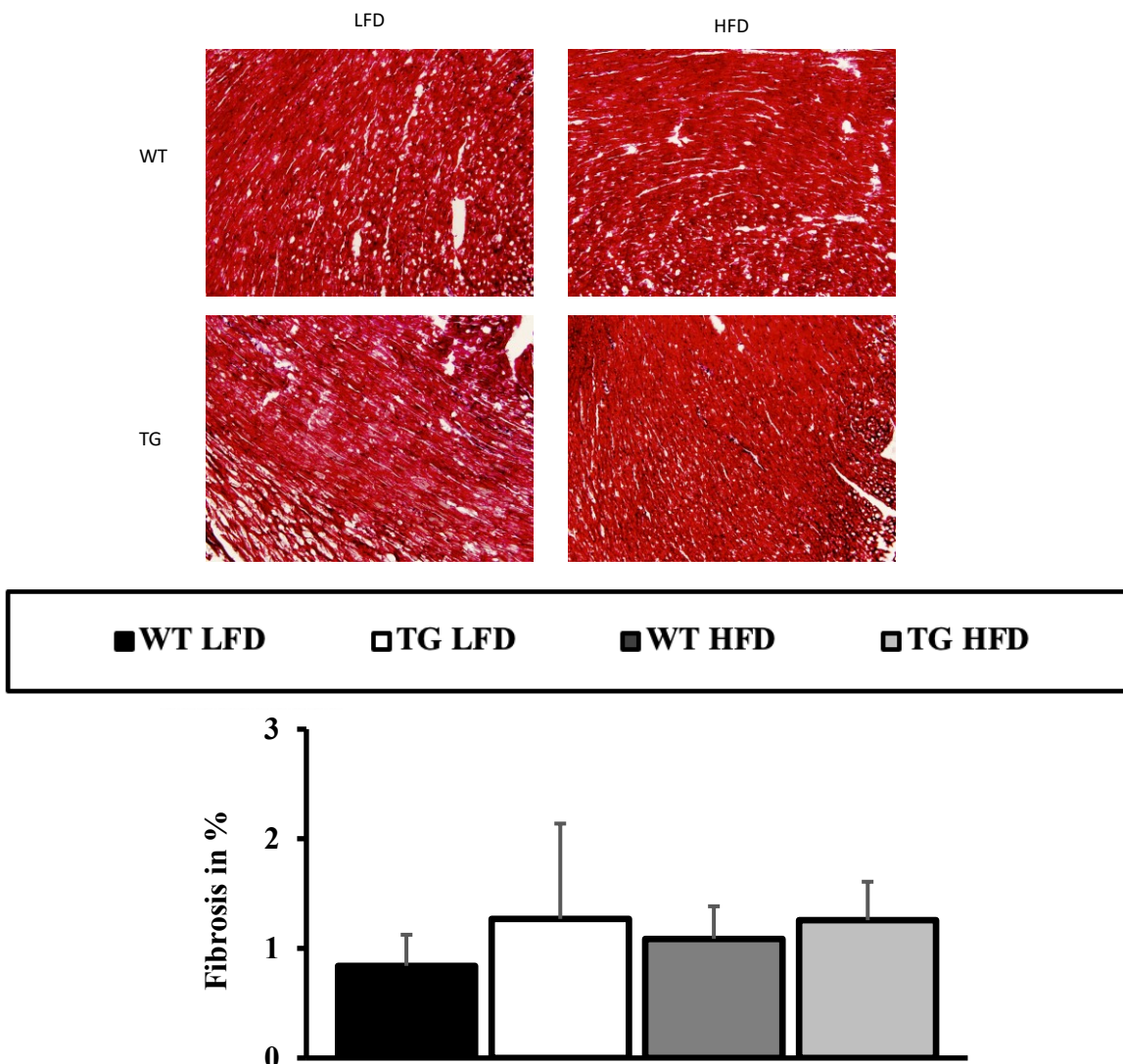


Abbildung 13: Bestimmung des myokardialen Fibrosegehalts. Repräsentative Bilder der Trichrome-Färbungen und Quantifizierung des Fibrosegehalts in WT und TG Mäusen 12 Wochen nach LFD oder HFD; n=6.

9. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Sirt4-Überexpression auf den Lipidmetabolismus und die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie unter Bedingungen einer fettreichen Diät zu untersuchen. Es konnte mittels 2-Way ANOVA gezeigt werden, dass HFD und Genotyp zu einer milden Zunahme der Kardiomyozytengröße führten, jedoch kein synergistischer Effekt in HFD-behandelten TG Mäusen beobachtet werden konnte. Es führte die HFD zu einem erhöhten mRNA-Gehalt von Proteinen des mitochondrialen Fettsäurenimports und -oxidation, sowie zu einem erniedrigten mRNA-Gehalt von Proteinen der Glukoseaufnahme. Diese Regulation war in TG Mäusen nicht stärker ausgeprägt als in WT Mäusen. Der Triglyceridgehalt war nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass eine Überexpression von SIRT4 selbst unter Bedingungen einer erhöhten kardialen Fettzufuhr 1) die Entwicklung einer Kardiomyozytenhypertrophie nicht zusätzlich begünstigt, und 2) weder die Oxidation von Fettsäuren noch die Speicherung von Triglyceriden stärker differentiell beeinflussen dürfte. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse im Kontext der verfügbaren Literatur diskutiert.

Die Auswertung mittels 2-Way ANOVA konnte in der vorgelegten Studie nachweisen, dass eine 12-wöchige HFD zu einer erhöhten Kardiomyozytengröße führt. Ouwens und Kollegen konnten im Einklang mit unseren Ergebnissen in histologischen Untersuchungen zeigen, dass es in Ratten nach einer 10-wöchigen HFD zu einer signifikanten Vergrößerung der Kardiomyozyten kommt (Ouwens et al., 2007). Wang und Kollegen konnten darüber hinaus beschreiben, dass eine 11-Monate andauernde HFD in CD1-Mäusen histologisch sogar zu einer Verdoppelung der Kardiomyozytengröße führt (Wang et al., 2015). Die genauen Pathomechanismen sind hierbei noch nicht genau geklärt. Es wird diskutiert, dass die Hypertrophie durch die Akkumulation lipotoxischer Metaboliten, und/oder durch eine reduzierte kardiale Effizienz aufgrund einer vorwiegenden Energiegewinnung aus Fettsäuren, die weniger ATP pro O₂-Molekül als die Oxidation von Glukose liefern, induziert werden könnte (Lopaschuk et al., 2007). Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass eine HFD zu der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie führt.

Die Auswertung mittels 2-Way ANOVA in der vorgelegten Studie konnte außerdem einen Genotypeneffekt auf die Kardiomyozytengröße nachweisen. Interessanterweise waren in der Post-hoc Analyse in TG-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen weder in der HFD-Gruppe noch in der LFD-Gruppe, signifikant höhere Mittelwerte der Kardiomyozytengröße nachweisbar. Luo und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Sirt4-Überexpression zu größeren Kardiomyozyten führt (Luo et al., 2017). Der Effekt war jedoch durch eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich stärkere Zunahme der Kardiomyozytengröße in SIRT4-überexprimierenden Mäusen nach einer Angiotensin-II-vermittelten Nachlasterhöhung bedingt, während sich die Kardiomyozytengröße in den unbehandelten Tieren unverändert zeigte (Luo et al., 2017). In echokardiographischen Untersuchungen der Mäuse der hier vorgelegten Studie aus unserer Arbeitsgruppe zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die Pumpfunktion zwischen TG- und WT-Mäusen (Gollmer, 2019). In der Zusamau beider Studien kann vermutet werden, dass eine SIRT4-Überexpression nur dann eine Zunahme der Kardiomyozytengröße bedingt, wenn ein zusätzlicher Stressfaktor wie eine Nachlasterhöhung, oder eine Abweichung der Ernährungskomposition hin zu einem relativ niedrigen oder hohen Fettanteil (also metabolischem Stress) vorliegt. Da eine Langzeitbeobachtung von Sirt4-überexprimierenden Mäusen mit Nachlasterhöhung in der Studie von Luo et al. im Verlauf zu einer Einschränkung der Herzfunktion führt, kann spekuliert werden, dass Sirt4-Überexpression zunächst zu einer kompensierten Hypertrophie führt, die im Verlauf zu einer pathologischen Hypertrophie mit Herzinsuffizienz fortschreitet und damit möglicherweise die Entwicklung einer Herzinsuffizienz z.B. bei Vorliegen einer schlecht eingestellten Hypertonie oder einer Nachlast-erhöhenden Herzklappenerkrankung begünstigen könnte.

Während eine Sirt4-Überexpression zu größeren Kardiomyozyten zu führen scheint, führte sie jedoch in unserem Mausmodell nach HFD nicht zu einer zusätzlichen Zunahme der Kardiomyozytengröße im Vergleich zu HFD-behandelten WT-Mäusen. Im Vergleich dazu konnten Luo und Kollegen demonstrieren, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Sirt4-Überexpression im Rahmen einer Angiotensin-II-vermittelten Nachlasterhöhung in Mäusen zu einer beschleunigten Hypertrophie führt, wobei unbehandelte Mäuse keinen Unterschied in der kardialen Myozytengröße aufwiesen (Luo et al., 2017). Dies würde dafür sprechen, dass SIRT4 eine Rolle in der Anpassung an kardialen Stress spielen könnte. Warum es in unserem Modell zu keiner beschleunigten Hypertrophie gekommen ist, könnte mit den unterschiedlichen Pathomechanismen der HFD-induzierten und Nachlast-induzierten

Hypertrophie erklärt werden. Eine Nachlasterrhöhung stellt einen potenten Stressstimulus für das Herz dar, wobei eine Erhöhung der linksventrikulären Wandspannung zur Induktion von Signalkaskaden führt, die ein Zellwachstum induzieren. Hierbei kann es in C57BL/6J-Mäusen bereits 5 Wochen nach einer Nachlasterrhöhung mittels transverser Aortenkonstriktion zu einer Zunahme des Herzgewichts von über 37 Prozent kommen (Barrick et al., 2007). Die HFD-induzierte kardiale Hypertrophie fällt hingegen deutlich milder aus (Chess et al., 2008), weshalb ein zusätzlicher Effekt von SIRT4 auf die Regulation der Kardiomyozytengröße möglicherweise nicht sichtbar werden konnte. Andererseits könnte eine ausbleibende Vergrößerung der Kardiomyozytengröße der TG-Mäuse nach HFD auch ein Hinweis dafür sein, dass die Mechanismen der HFD-induzierten Zunahme der Kardiomyozytengröße durch eine Aktivierung der SIRT4-Aktivität und/oder Expression bedingt ist. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, könnte die kardiale Expression von SIRT4, oder posttranslationale Modifikationen, die eine erhöhte SIRT4-Aktivität anzeigen (z.B. Deacetylierung der Malonyl-CoA-Decarboxylase), untersucht werden. Ein weiteres Experiment wäre die Untersuchung der Kardiomyozytengröße in HFD-gefütterten Sirt4-knockout-Mäusen, die infolge der HFD keine Zunahme der Kardiomyozytengröße aufweisen sollten, wenn SIRT4 tatsächlich an der Entwicklung einer HFD-induzierten kardialen Hypertrophie beteiligt sein sollte.

Die Fütterung der Mäuse mit einer HFD führte in unserer Studie zu keinem signifikanten Unterschied in Bezug auf den Fibroseanteil. Einige Arbeiten konnten demonstrieren, dass eine HFD die Ausbildung einer kardialen Fibrose induziert (Sun et al., 2020, Wang et al., 2015, Zuo et al., 2020). So konnte nach einer 20-wöchigen HFD in C57BL/6J Mäusen ein Fibroseanteil von etwa 8% (Sun et al., 2020) und nach einer 11-monatigen HFD in CD1-Mäusen eine etwa 13%-ige kardiale Fibrose beschrieben werden (Wang et al., 2015). Ein möglicher Grund für das Ausbleiben statistisch signifikanter Veränderungen in unserer Studie wäre, dass in den meisten Arbeiten, in denen es zu einer ausgeprägten kardialen Fibroseentwicklung im Rahmen einer HFD kam, die Dauer der HFD wesentlich länger war. Deshalb wäre davon auszugehen, dass sich hier ein signifikanter Effekt erst nach einer länger andauernden HFD zeigen würde.

TG-Mäuse wiesen in unseren Experimenten weder unter HFD noch LFD einen erhöhten Bindegewebsgehalt auf. Luo und Kollegen konnten in ihren Experimenten im Gegensatz dazu zeigen, dass es in Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischer Sirt4-Überexpression im Rahmen einer Angiotensin-II-vermittelten Nachlasterrhöhung auch zu einer verstärkten Fibroseentwicklung kommt, während in unbehandelten Sirt4-TG-Mäusen kein Unterschied erkennbar war (Luo et al., 2017). Die Beobachtung einer fehlenden Zunahme der Fibrose ist im Einklang mit der fehlenden Zunahme der Kardiomyozytengröße in HFD-behandelten TG Mäusen, so dass erneut ein zu gering ausgeprägter Stimulus für eine Fibroseentwicklung durch die HFD (wie bei der Kardiomyozytengröße) die Diskriminierung eines synergistischen Effektes in HFD-behandelten TG Mäusen nicht erlaubt. Eventuell war erneut die Dauer der HFD zu kurz. Andere Arbeiten konnten diesbezüglich nämlich nachweisen, dass eine längere HFD zu einer Zunahme der kardialen Fibrose führen kann (Sun et al., 2020, Wang et al., 2015, Zuo et al., 2020). Insofern wären Experimente mit SIRT4-überexprimierenden Tieren von Interesse, die einer länger andauernden HFD unterzogen wurden, um mögliche SIRT4-bedingte Unterschiede aufdecken zu können.

In Bezug auf die mRNA-Gehalte von Transportproteinen des Glukosestoffwechsels war die Expression von Glut1 und 4 nach HFD supprimiert. Die Expression der Pdk4 zeigte sich nach der HFD erhöht. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit anderen Arbeiten, die ebenfalls eine Hemmung der kardialen Expression von Glut1 und 4 (Vettor et al., 2002), sowie eine kardiale Induktion von Pdk4 (Sikder et al., 2018, Inserate et al., 2019) im Rahmen einer chronisch erhöhten Fettzufuhr beschrieben haben. Dass eine Fettzufuhr zu einer Hemmung des Glukosestoffwechsels führt ist hinlänglich bekannt und wird nach dem Erstbeschreiber als Randle-Zyklus, oder als Glukose-Fettsäuren-Zyklus bezeichnet (Hue and Taegtmeyer, 2009, Randle et al., 1963). Kurz zusammengefasst kommt es im Zuge einer erhöhten Fettzufuhr durch das erhöhte Angebot an Fettsäuren zu einer Reduktion der Glykolyserate mit einer verstärkten Energiegewinnung über die Fettsäureoxidation. Im Rahmen eines erhöhten Glukoseangebots kommt es hingegen zu einer verstärkten Glukoseaufnahme und Glykolyse, wobei nun die Fettsäureoxidation gehemmt wird. Während kurzfristige Veränderungen der Fettsäure-/Glukosezufuhr zu Adaptationen v.a. über Signalstoffe und Feedbackmechanismen führen, kommt es bei Persistenz eines hohen Fettsäuren- bzw. Glukoseangebotes zu transkriptionellen Veränderungen (Lopaschuk et al., 2010). Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse somit die Annahme, dass es allein durch

eine erhöhte Fettzufuhr zu einer transkriptionellen Hemmung der kardialen Glukoseaufnahme und der Glukoseoxidation kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit waren die mRNA-Spiegel von Glut1 bzw. Glut4 und Pdk4 zwischen WT und TG Mäusen nicht unterschiedlich. In der Literatur gibt es noch keine Beschreibung, ob SIRT4 den kardialen Glukosemetabolismus auf transkriptioneller Ebene beeinflusst. Es konnte allerdings beschrieben werden, dass SIRT4 durch Lipoamidylierung die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase und somit die Glukoseoxidation hemmen kann (Mathias et al., 2014). Da PDK4 ein starker Regulator der PDH ist und somit bei veränderter PDH-Aktivität mit einer entsprechenden Feedback-gesteuerten Anpassung der Pdk4-Expression zu rechnen wäre, spricht die unveränderte Expression von Pdk4 in der vorgelegten Studie gegen eine Veränderung der Glukoseoxidation in unseren TG Mäusen. Zu klären wäre dennoch, ob die tatsächliche Aufnahme und/oder Oxidation von Glukose in TG Mäusen verändert ist. Methodisch kann die Glukoseoxidation beispielsweise mittels radioaktiv-markierten Glukosemolekülen im isoliert arbeitenden Mäuseherzen bestimmt werden (Belke et al., 1999), und die Glukoseaufnahme beispielsweise in frisch isolierten Kardiomyozyten unter Verwendung von nicht-metabolisierbarer 2-Deoxyglukose (Mazumder et al., 2004). Da jedoch chronische Veränderungen (wie eine dauerhafte Überexpression von Sirt4) in der Regel zu Anpassungen auf dem Transkriptionslevel führen, kann basierend auf den generierten Ergebnissen a.e von einem fehlenden Einfluss auf Glukoseaufnahme und -oxidation ausgegangen werden.

In Bezug auf die mRNA-Spiegel selektierter Enzyme des mitochondrialen Fettsäurenimports und -abbaus zeigten sich in unserer Studie die mRNA-Gehalte von Cpt2 und Lcad nach der HFD signifikant erhöht. Der mRNA-Gehalt von Cpt1 war im Rahmen der HFD unverändert und Mcad zeigte sich nur in den WT-Mäusen nach der HFD erhöht. Es wurde bereits früher beschrieben, dass es im Rahmen einer HFD zu einer Induktion von Enzymen des kardialen mitochondrialen Fettsäurestoffwechsels kommt. So konnten Wright und Kollegen in C57BL/6J-Mäusen bereits nach einer 5-wöchigen HFD in isoliert arbeitenden Mäuseherzen eine gesteigerte Oxidation von Palmsäure, sowie einen erhöhten mRNA- Spiegel von Mcad beobachten (Wright et al., 2009). Dazu konnten Buchanan und Kollegen ebenso in 16-Wochen alten adipösen ob/ob-Mäusen zeigen, dass es zu einer Steigerung der mRNA-Gehalte von Mcad und Vlcad kommt (Buchanan et al., 2005). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen somit die weitläufig akzeptierte

Annahme, dass eine chronisch erhöhte Fettzufuhr zu einer Induktion der Transkription von Enzymen/Proteinen der Fettsäureaufnahme und Fettsäureoxidation führt. Um zu untersuchen, wie sich die transkriptionellen Veränderungen in unserem Modell auch physiologisch auswirken, sind weitere Experimente, wie direkte Messungen der Fettsäureoxidationsrate im working-heart Modell notwendig, wobei wir uns hier eine gesteigerte β -Oxidation erwarten würden.

In unserer Studie konnte in der 2-Way ANOVA kein Genotypeffekt in Bezug auf den mRNA-Gehalt von im Fettstoffwechsel beteiligten Enzymen festgestellt werden. Außerdem kam es in TG-Mäusen nach einer HFD nicht zu einer signifikanten Erhöhung der kardialen mRNA-Gehalte von Cpt2, Lcad und Mcad. In der Literatur wurde bereits in einigen Arbeiten beschrieben, dass SIRT4 die mitochondriale Aufnahme von Fettsäuren sowie die β -Oxidation hemmen kann. Laurent und Kollegen konnten zeigen, dass SIRT4 über eine substratspezifische Deacetylierung die MCD hemmen kann und so eine Senkung der Fettsäureaufnahme bewirken kann (Laurent et al., 2013b). Guo und Kollegen konnten darüber hinaus in HEK293 und AML12 Zellen demonstrieren, dass SIRT4 MTP α , ein Enzym der β -Oxidation, unterdrückt und diskutierten dies als zusätzlichen Mechanismus, über den SIRT4 in den Fettstoffwechsel eingreift (Guo et al., 2016). Wir schlussfolgern aus unseren Ergebnissen, dass SIRT4 im Herzen in Phasen, in denen das Herz nicht gestresst ist, keinen Einfluss auf die Transkription von Enzymen des Fettstoffwechsels zu haben scheint. Jedoch wäre es durch die fehlende Induktion der Expression von Cpt2, Lcad und Mcad in den TG-Mäusen nach einer HFD denkbar, dass eine Sirt4-Überexpression den kardialen Fettsäurenabbau im Rahmen einer HFD hemmen könnte. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen wären auch hier direkte Messungen der Fettsäureoxidation im working-heart Modell von großem Interesse.

Der kardiale mRNA-Gehalt von Ppar α zeigte sich in unserer Studie nach einer 12-wöchigen HFD unverändert. PPAR α ist der wichtigste bekannte Transkriptionsfaktor von Genen, die für Enzyme und Proteine der Fettsäureoxidation kodieren (Huss and Kelly, 2004). In Bezug auf die Auswirkungen einer HFD auf den kardialen mRNA-Gehalt von PPAR α gibt es widersprüchliche Daten. So demonstrierten Cole und Kollegen eine Erhöhung des kardialen Ppar α -mRNA-Gehaltes nach einer 3-wöchigen HFD in Sv1/EV Mäusen (Cole et al., 2016). Wright und Kollegen konnten jedoch im Gegensatz dazu in C57BL/6J Mäusen beschreiben,

dass es nach einer 5-wöchigen HFD zu keiner Änderung des Ppar α -mRNA-Gehaltes kommt (Wright et al., 2009). Bonda und Kollegen konnten nach einer 16-wöchigen HFD in C57BL/6J-Mäusen sogar eine signifikante Erniedrigung des kardialen Ppar α -mRNA-Gehaltes feststellen (Bonda et al., 2016). In db/db und ob/ob-Mäusen, welche als Tiermodelle für Diabetes mellitus bzw. Adipositas verwendet werden und ebenfalls deutlich erhöhte Triglycerid- und Fettsäurespiegel im Serum aufweisen, kam es hingegen zu einer Erhöhung der kardialen Ppar α -Expression (Buchanan et al., 2005). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass sowohl das Modell als auch der genetische Hintergrund (und damit die Reaktion auf einen transkriptionellen Stimulus) eine Rolle in der Expression von PPAR α und seiner Zielgene spielt. Es ist denkbar, dass in der vorgelegten Studie die HFD auf diesem bestimmten genetischen Hintergrund ausreicht, um durch direkte Bindung von Fettsäuren an PPAR α dessen Aktivität durch Ko-Aktivierung zu erhöhen und damit die Expression der Zielgene zu aktivieren. Jedoch mag der gut beschriebene Feedforward-Mechanismus, über welchen PPAR α seine eigene Expression stimulieren kann, hierbei in diesem Modell nicht ausreichend aktiviert sein. PPAR α -Signaling wäre also aktiv, aber seine Expression bliebe damit unverändert. Um den Einfluss und die Interaktion von HFD und genetischem Hintergrund auf die Expression von Ppar α und seiner Zielgene besser verstehen zu können, sollte deren kardiale Expression auch in 129/SvImJ bzw. C57BL/6J Mäusen im Rahmen einer identischen HFD untersucht werden.

Im 2-way ANOVA zeigte sich kein Genotypeffekt in Bezug auf den mRNA-Gehalt von Ppar α . Interessanterweise zeigte die Post-hoc Analyse in den TG-Mäusen nach der HFD einen signifikant erniedrigten mRNA-Gehalt von Ppar α , während es in der WT-Gruppe nicht zu signifikanten Änderungen des mRNA-Spiegels kam. In einer Arbeit konnten Laurent und Kollegen in für 16h gefasteten Mäusen zeigen, dass es im Sirt4-KO zu einer Induktion der hepatischen Expression von Zielgenen von Ppar α kommt, während die Ppar α -Expression nicht signifikant beeinflusst war (Laurent et al., 2013a). Deshalb stellten sie die Hypothese auf, dass SIRT4 die Aktivität von Ppar α hemmen könnte und konnten in weiteren Experimenten in embryonalen Mausfibroblasten beobachten, dass SIRT4 tatsächlich die transkriptionelle Aktivierung von Ppar α inhibiert (Laurent et al., 2013a). Im Herzen zeigten sich die Zielgene von Ppar α durch den Sirt4-KO nicht verändert (Laurent et al., 2013a). Unsere Studie gibt einen Hinweis darauf, dass eine Sirt4-Überexpression im Herzen im Rahmen einer HFD die Transkription von Ppar α hemmen könnte. Eine Hemmung von

Ppar α könnte demnach auch die bereits beschriebene fehlende Erhöhung der mRNA-Gehalte von Cpt2, Mcad und Lcad in TG-Mäusen nach einer HFD erklären.

Die Ergebnisse der kardialen Triglyceridassays zeigten, dass weder die HFD noch die Sirt4-Überexpression einen Einfluss auf den kardialen Triglyceridgehalt hatten. Im Vergleich dazu konnte in einigen Arbeiten demonstriert werden, dass eine HFD die kardiale Akkumulation von Triglyceriden induziert (Ouwens et al., 2005, Unger, 2002). Dies sind im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch die Resultate von HFD-gefütterten Ratten, was ein möglicher Grund für den Unterschied sein könnte. Lucas und Kollegen konnten in einer Studie, in der sie den intrakardialen Lipidanteil mittels histologischen Untersuchungen ermittelt haben, in C57BL/J6 Mäusen beschreiben, dass es nach 30-wöchiger HFD zu einer vermehrten intrakardialen Ansammlung von Lipidtropfen kommt (Lucas et al., 2016). Wie sich SIRT4 auf die kardiale Akkumulation von toxischen Lipidmetaboliten auswirkt, wurde bislang noch nicht beschrieben. Die Ergebnisse unserer Studie sprechen gegen einen Einfluss einer Sirt4-Überexpression auf die Akkumulation von Triglyceriden im Myokard. Allerdings kann ein Einfluss der Sirt4-Überexpression auf die Akkumulation anderer und möglicherweise reaktiver und lipotoxischer Metabolite wie Acyl-CoA, Diacylglycerol oder Ceramide nicht ausgeschlossen werden. Diese intermediären Metabolite könnten mittels Massenspektrometrie im Rahmen einer Metabolomics-Analyse bestimmt werden.

10. Literaturverzeichnis

ABEL, E. D. 2004. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*, 9, 201-15.

AHUJA, N., SCHWER, B., CAROBBIO, S., WALTREGNY, D., NORTH, B. J., CASTRONOVO, V., MAECHLER, P. & VERDIN, E. 2007. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 282, 33583-92.

ALBERTI, K. G., ZIMMET, P. & SHAW, J. 2006. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, 23, 469-80.

ALCENDOR, R. R., GAO, S., ZHAI, P., ZABLOCKI, D., HOLLE, E., YU, X., TIAN, B., WAGNER, T., VATNER, S. F. & SADOSHIMA, J. 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*, 100, 1512-21.

ANDERSON, K. A., HUYNH, F. K., FISHER-WELLMAN, K., STUART, J. D., PETERSON, B. S., DOUROS, J. D., WAGNER, G. R., THOMPSON, J. W., MADSEN, A. S., GREEN, M. F., SIVLEY, R. M., ILKAYEVA, O. R., STEVENS, R. D., BACKOS, D. S., CAPRA, J. A., OLSEN, C. A., CAMPBELL, J. E., MUOIO, D. M., GRIMSRUD, P. A. & HIRSCHHEY, M. D. 2017. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab*, 25, 838-855 e15.

AZEVEDO, P. S., MINICUCCI, M. F., SANTOS, P. P., PAIVA, S. A. & ZORNOFF, L. A. 2013. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*, 21, 135-40.

BARRICK, C. J., ROJAS, M., SCHOONHOVEN, R., SMYTH, S. S. & THREADGILL, D. W. 2007. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H2119-30.

BAUMGARTNER, M. R. 2005. Molecular mechanism of dominant expression in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 28, 301-9.

BELKE, D. D., LARSEN, T. S., LOPASCHUK, G. D. & SEVERSON, D. L. 1999. Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart. *Am J Physiol*, 277, R1210-7.

BERGMANN, L., LANG, A., BROSS, C., ALTINOLUK-HAMBUCHEN, S., FEY, I., OVERBECK, N., STEFANSKI, A., WIEK, C., KEFALAS, A., VERHULSDONK, P., MIELKE, C., SOHN, D., STUHLER, K., HANENBERG, H., JANICKE, R. U., SCHELLER, J., REICHERT, A. S., AHMADIAN, M. R. & PIEKORZ, R. P. 2020. Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein. *Cells*, 9.

BETSINGER, C. N. & CRISTEA, I. M. 2019. Mitochondrial Function, Metabolic Regulation, and Human Disease Viewed through the Prism of Sirtuin 4 (SIRT4) Functions. *J Proteome Res*, 18, 1929-1938.

BLANK, M. F. & GRUMMT, I. 2017. The seven faces of SIRT7. *Transcription*, 8, 67-74.

BONDA, T. A., SZYNAKA, B., SOKOLOWSKA, M., DZIEMIDOWICZ, M., WASZKIEWICZ, E., WINNICKA, M. M., BERNACZYK, P., WAWRUSIEWICZ-KURLONEK, N. & KAMINSKI, K. A. 2016. Interleukin 6 modulates PPARalpha and PGC-1alpha and is involved in high-fat diet induced cardiac lipotoxicity in mouse. *Int J Cardiol*, 219, 1-8.

BONNEFONT, J. P., DJOUADI, F., PRIP-BUUS, C., GOBIN, S., MUNNICH, A. & BASTIN, J. 2004. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 25, 495-520.

BRACHMANN, C. B., SHERMAN, J. M., DEVINE, S. E., CAMERON, E. E., PILLUS, L. & BOEKE, J. D. 1995. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*, 9, 2888-902.

BUCHANAN, J., MAZUMDER, P. K., HU, P., CHAKRABARTI, G., ROBERTS, M. W., YUN, U. J., COOKSEY, R. C., LITWIN, S. E. & ABEL, E. D. 2005. 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*, 146, 5341-9.

BUGGER, H. & ABEL, E. D. 2008. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*, 114, 195-210.

BUGGER, H., WITT, C. N. & BODE, C. 2016. Mitochondrial sirtuins in the heart. *Heart Fail Rev*, 21, 519-28.

CAROBBO, S., ISHIHARA, H., FERNANDEZ-PASCUAL, S., BARTLEY, C., MARTIN-DEL-RIO, R. & MAECHLER, P. 2004. Insulin secretion profiles are modified by overexpression of glutamate dehydrogenase in pancreatic islets. *Diabetologia*, 47, 266-76.

CHANG, A. R., FERRER, C. M. & MOSTOSLAVSKY, R. 2020. SIRT6, a Mammalian Deacylase with Multitasking Abilities. *Physiol Rev*, 100, 145-169.

CHESS, D. J., LEI, B., HOIT, B. D., AZIMZADEH, A. M. & STANLEY, W. C. 2008. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. *J Card Fail*, 14, 82-8.

CHIU, H. C., KOVACS, A., BLANTON, R. M., HAN, X., COURTOIS, M., WEINHEIMER, C. J., YAMADA, K. A., BRUNET, S., XU, H., NERBONNE, J. M., WELCH, M. J., FETTIG, N. M., SHARP, T. L., SAMBANDAM, N., OLSON, K. M., ORY, D. S. & SCHAFFER, J. E. 2005. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*, 96, 225-33.

CHIU, H. C., KOVACS, A., FORD, D. A., HSU, F. F., GARCIA, R., HERRERO, P., SAFFITZ, J. E. & SCHAFFER, J. E. 2001. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 107, 813-22.

COLE, M. A., ABD JAMIL, A. H., HEATHER, L. C., MURRAY, A. J., SUTTON, E. R., SLINGO, M., SEBAG-MONTEFIORE, L., TAN, S. C., AKSENTIJEVIC, D., GILDEA, O. S., STUCKEY, D. J., YEOH, K. K., CARR, C. A., EVANS, R. D., AASUM, E., SCHOFIELD, C. J., RATCLIFFE, P. J., NEUBAUER, S., ROBBINS, P. A. & CLARKE,

K. 2016. On the pivotal role of PPARalpha in adaptation of the heart to hypoxia and why fat in the diet increases hypoxic injury. *FASEB J*, 30, 2684-97.

COVEN, D. L., HU, X., CONG, L., BERGERON, R., SHULMAN, G. I., HARDIE, D. G. & YOUNG, L. H. 2003. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E629-36.

CSIBI, A., FENDT, S. M., LI, C., POULOGIANNIS, G., CHOO, A. Y., CHAPSKI, D. J., JEONG, S. M., DEMPSEY, J. M., PARKHITKO, A., MORRISON, T., HENSKE, E. P., HAIGIS, M. C., CANTLEY, L. C., STEPHANOPOULOS, G., YU, J. & BLENIS, J. 2013. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell*, 153, 840-54.

DU, J., ZHOU, Y., SU, X., YU, J. J., KHAN, S., JIANG, H., KIM, J., WOO, J., KIM, J. H., CHOI, B. H., HE, B., CHEN, W., ZHANG, S., CERIONE, R. A., AUWERX, J., HAO, Q. & LIN, H. 2011. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334, 806-9.

FARRIS, W., MANSOURIAN, S., CHANG, Y., LINDSLEY, L., ECKMAN, E. A., FROSCH, M. P., ECKMAN, C. B., TANZI, R. E., SELKOE, D. J. & GUENETTE, S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 4162-7.

FINKEL, T., DENG, C.-X. & MOSTOSLAVSKY, R. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460, 587-591.

FRYE, R. A. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 273-9.

FRYE, R. A. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 273, 793-8.

GHISLA, S. & THORPE, C. 2004. Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur J Biochem*, 271, 494-508.

GOLLMER, J. 2019. *Einfluss einer globalen Sirtuin 4 Überexpression im Mausmodell*. Thesis.

GOLLMER, J., ZIRLIK, A. & BUGGER, H. 2020. Mitochondrial Mechanisms in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J*, 44, 33-53.

GOTTLIEB, S. & ESPOSITO, R. E. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, 56, 771-776.

GUO, L., ZHOU, S. R., WEI, X. B., LIU, Y., CHANG, X. X., LIU, Y., GE, X., DOU, X., HUANG, H. Y., QIAN, S. W., LI, X., LEI, Q. Y., GAO, X. & TANG, Q. Q. 2016. Acetylation of Mitochondrial Trifunctional Protein alpha-Subunit Enhances Its Stability To Promote Fatty Acid Oxidation and Is Decreased in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Cell Biol*, 36, 2553-67.

GUPTA, A. & HOUSTON, B. 2017. A comprehensive review of the bioenergetics of fatty acid and glucose metabolism in the healthy and failing heart in nondiabetic condition. *Heart Fail Rev*, 22, 825-842.

HAIGIS, M. C., MOSTOSLAVSKY, R., HAIGIS, K. M., FAHIE, K., CHRISTODOULOU, D. C., MURPHY, A. J., VALENZUELA, D. M., YANCOPOULOS, G. D., KAROW, M., BLANDER, G., WOLBERGER, C., PROLLA, T. A., WEINDRUCH, R., ALT, F. W. & GUARENTE, L. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, 126, 941-54.

HAIGIS, M. C. & SINCLAIR, D. A. 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*, 5, 253-95.

HEINRICH, P. C., MUELLER, M. & GRAEVE, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

HERSHBERGER, K. A., ABRAHAM, D. M., LIU, J., LOCASALE, J. W., GRIMSRUD, P. A. & HIRSCHEY, M. D. 2018. Ablation of Sirtuin5 in the postnatal mouse heart results in protein succinylation and normal survival in response to chronic pressure overload. *J Biol Chem*, 293, 10630-10645.

HERSHBERGER, K. A., ABRAHAM, D. M., MARTIN, A. S., MAO, L., LIU, J., GU, H., LOCASALE, J. W. & HIRSCHEY, M. D. 2017. Sirtuin 5 is required for mouse survival in response to cardiac pressure overload. *J Biol Chem*, 292, 19767-19781.

HOUTKOOPEL, R. H., PIRINEN, E. & AUWERX, J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 225-238.

HSU, C. P., ZHAI, P., YAMAMOTO, T., MAEJIMA, Y., MATSUSHIMA, S., HARIHARAN, N., SHAO, D., TAKAGI, H., OKA, S. & SADOSHIMA, J. 2010. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation*, 122, 2170-82.

HUE, L. & TAEGTMEYER, H. 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, E578-91.

HUSS, J. M. & KELLY, D. P. 2004. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*, 95, 568-78.

HUYNH, F. K., PETERSON, B. S., ANDERSON, K. A., LIN, Z., COAKLEY, A. J., LLAGUNO, F. M. S., NGUYEN, T. N., CAMPBELL, J. E., STEPHENS, S. B., NEWGARD, C. B. & HIRSCHEY, M. D. 2020. beta-Cell-specific ablation of sirtuin 4 does not affect nutrient-stimulated insulin secretion in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 319, E805-E813.

IMAI, S., ARMSTRONG, C. M., KAEBERLEIN, M. & GUARENTE, L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.

INSERTE, J., ALUJA, D., BARBA, I., RUIZ-MEANA, M., MIRO, E., PONCELAS, M., VILARDOSA, U., CASTELLANO, J. & GARCIA-DORADO, D. 2019. High-fat diet

improves tolerance to myocardial ischemia by delaying normalization of intracellular PH at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 133, 164-173.

JEONG, S. M., XIAO, C., FINLEY, L. W., LAHUSEN, T., SOUZA, A. L., PIERCE, K., LI, Y. H., WANG, X., LAURENT, G., GERMAN, N. J., XU, X., LI, C., WANG, R. H., LEE, J., CSIBI, A., CERIONE, R., BLENIS, J., CLISH, C. B., KIMMELMAN, A., DENG, C. X. & HAIGIS, M. C. 2013. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*, 23, 450-63.

KAEBERLEIN, M., MCVEY, M. & GUARENTE, L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*, 13, 2570-80.

KAMIJO, T., AOYAMA, T., KOMIYAMA, A. & HASHIMOTO, T. 1994. Structural analysis of cDNAs for subunits of human mitochondrial fatty acid beta-oxidation trifunctional protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 199, 818-25.

KENNY, H. C. & ABEL, E. D. 2019. Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res*, 124, 121-141.

KLINGENBERG, M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1978-2021.

KOENTGES, C., BODE, C. & BUGGER, H. 2016. SIRT3 in Cardiac Physiology and Disease. *Front Cardiovasc Med*, 3, 38.

KOUZARIDES, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.

KUGEL, S., SEBASTIAN, C., FITAMANT, J., ROSS, K. N., SAHA, S. K., JAIN, E., GLADDEN, A., ARORA, K. S., KATO, Y., RIVERA, M. N., RAMASWAMY, S., SADREYEV, R. I., GOREN, A., DESHPANDE, V., BARDEESY, N. & MOSTOSLAVSKY, R. 2016. SIRT6 Suppresses Pancreatic Cancer through Control of Lin28b. *Cell*, 165, 1401-1415.

LAURENT, G., DE BOER, V. C., FINLEY, L. W., SWEENEY, M., LU, H., SCHUG, T. T., CEN, Y., JEONG, S. M., LI, X., SAUVE, A. A. & HAIGIS, M. C. 2013a. SIRT4 represses peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity to suppress hepatic fat oxidation. *Mol Cell Biol*, 33, 4552-61.

LAURENT, G., GERMAN, N. J., SAHA, A. K., DE BOER, V. C., DAVIES, M., KOVES, T. R., DEPHOURE, N., FISCHER, F., BOANCA, G., VAITHEESVARAN, B., LOVITCH, S. B., SHARPE, A. H., KURLAND, I. J., STEEGBORN, C., GYGI, S. P., MUOIO, D. M., RUDERMAN, N. B. & HAIGIS, M. C. 2013b. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*, 50, 686-98.

LIN, S. J., DEFOSSEZ, P. A. & GUARENTE, L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289, 2126-8.

LISZT, G., FORD, E., KURTEV, M. & GUARENTE, L. 2005. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 280, 21313-20.

LIU, B., CHE, W., XUE, J., ZHENG, C., TANG, K., ZHANG, J., WEN, J. & XU, Y. 2013. SIRT4 prevents hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Cell Physiol Biochem*, 32, 655-62.

LOPASCHUK, G. D., FOLMES, C. D. & STANLEY, W. C. 2007. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*, 101, 335-47.

LOPASCHUK, G. D., USSHER, J. R., FOLMES, C. D., JASWAL, J. S. & STANLEY, W. C. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 207-58.

LUCAS, E., VILA-BEDMAR, R., ARCONES, A. C., CRUCES-SANDE, M., CACHOFEIRO, V., MAYOR, F., JR. & MURGA, C. 2016. Obesity-induced cardiac lipid accumulation in adult mice is modulated by G protein-coupled receptor kinase 2 levels. *Cardiovasc Diabetol*, 15, 155.

LUO, Y. X., TANG, X., AN, X. Z., XIE, X. M., CHEN, X. F., ZHAO, X., HAO, D. L., CHEN, H. Z. & LIU, D. P. 2017. SIRT4 accelerates Ang II-induced pathological cardiac

hypertrophy by inhibiting manganese superoxide dismutase activity. *Eur Heart J*, 38, 1389-1398.

MATHIAS, R. A., GRECO, T. M., OBERSTEIN, A., BUDAYEVA, H. G., CHAKRABARTI, R., ROWLAND, E. A., KANG, Y., SHENK, T. & CRISTEA, I. M. 2014. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*, 159, 1615-25.

MAZUMDER, P. K., O'NEILL, B. T., ROBERTS, M. W., BUCHANAN, J., YUN, U. J., COOKSEY, R. C., BOUDINA, S. & ABEL, E. D. 2004. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, 53, 2366-74.

MICHAN, S. & SINCLAIR, D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404, 1-13.

MICHISHITA, E., MCCORD, R. A., BERBER, E., KIOI, M., PADILLA-NASH, H., DAMIAN, M., CHEUNG, P., KUSUMOTO, R., KAWAHARA, T. L., BARRETT, J. C., CHANG, H. Y., BOHR, V. A., RIED, T., GOZANI, O. & CHUA, K. F. 2008. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, 452, 492-6.

MICHISHITA, E., PARK, J. Y., BURNESKIS, J. M., BARRETT, J. C. & HORIKAWA, I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, 16, 4623-35.

NAGENDRAN, J., WALLER, T. J. & DYCK, J. R. 2013. AMPK signalling and the control of substrate use in the heart. *Mol Cell Endocrinol*, 366, 180-93.

NEUBAUER, S. 2007. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 356, 1140-51.

NOGUEIRAS, R., HABEGGER, K. M., CHAUDHARY, N., FINAN, B., BANKS, A. S., DIETRICH, M. O., HORVATH, T. L., SINCLAIR, D. A., PFLUGER, P. T. & TSCHOP, M. H. 2012. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*, 92, 1479-514.

- NORTH, B. J., MARSHALL, B. L., BORRA, M. T., DENU, J. M. & VERDIN, E. 2003. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*, 11, 437-444.
- ONYANGO, P., CELIC, I., MCCAFFERY, J. M., BOEKE, J. D. & FEINBERG, A. P. 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13653-8.
- OUWENS, D. M., BOER, C., FODOR, M., DE GALAN, P., HEINE, R. J., MAASSEN, J. A. & DIAMANT, M. 2005. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*, 48, 1229-37.
- OUWENS, D. M., DIAMANT, M., FODOR, M., HABETS, D. D. J., PELSERS, M., EL HASNAOUI, M., DANG, Z. C., VAN DEN BROM, C. E., VLASBLOM, R., RIETDIJK, A., BOER, C., COORT, S. L. M., GLATZ, J. F. C. & LUIKEN, J. 2007. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia*, 50, 1938-1948.
- PICHE, M. E. & POIRIER, P. 2018. Obesity, ectopic fat and cardiac metabolism. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 13, 213-221.
- QIANG, L., LIN, H. V., KIM-MULLER, J. Y., WELCH, C. L., GU, W. & ACCILI, D. 2011. Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Creb deacetylation. *Cell Metab*, 14, 758-67.
- RAMADANI-MUJA, J., GOTTSCHALK, B., PFEIL, K., BURGSTALLER, S., RAUTER, T., BISCHOF, H., WALDECK-WEIERMAIR, M., BUGGER, H., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2019. Visualization of Sirtuin 4 Distribution between Mitochondria and the Nucleus, Based on Bimolecular Fluorescence Self-Complementation. *Cells*, 8.
- RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N. & NEWSHOLME, E. A. 1963. The Glucose Fatty-Acid Cycle Its Role in Insulin Sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus. *The Lancet*, 281, 785-789.

RAUH, D., FISCHER, F., GERTZ, M., LAKSHMINARASIMHAN, M., BERGBREDE, T., ALADINI, F., KAMBACH, C., BECKER, C. F., ZERWECK, J., SCHUTKOWSKI, M. & STEEGBORN, C. 2013. An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat Commun*, 4, 2327.

RINE, J., STRATHERN, J. N., HICKS, J. B. & HERSKOWITZ, I. 1979. A Suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics*, 93.

ROGINA, B. & HELFAND, S. L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15998-6003.

SIKDER, K., SHUKLA, S. K., PATEL, N., SINGH, H. & RAFIQ, K. 2018. High Fat Diet Upregulates Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR-gamma. *Cell Physiol Biochem*, 48, 1317-1331.

STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A. & LOPASCHUK, G. D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85, 1093-129.

SUN, X., HAN, F., LU, Q., LI, X., REN, D., ZHANG, J., HAN, Y., XIANG, Y. K. & LI, J. 2020. Empagliflozin Ameliorates Obesity-Related Cardiac Dysfunction by Regulating Sestrin2-Mediated AMPK-mTOR Signaling and Redox Homeostasis in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*, 69, 1292-1305.

SUNDARESAN, N. R., VASUDEVAN, P., ZHONG, L., KIM, G., SAMANT, S., PAREKH, V., PILLAI, V. B., RAVINDRA, P. V., GUPTA, M., JEEVANANDAM, V., CUNNINGHAM, J. M., DENG, C. X., LOMBARD, D. B., MOSTOSLAVSKY, R. & GUPTA, M. P. 2012. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat Med*, 18, 1643-50.

TAN, M., PENG, C., ANDERSON, K. A., CHHOY, P., XIE, Z., DAI, L., PARK, J., CHEN, Y., HUANG, H., ZHANG, Y., RO, J., WAGNER, G. R., GREEN, M. F., MADSEN, A. S., SCHMIESING, J., PETERSON, B. S., XU, G., ILKAYEVA, O. R., MUEHLBAUER, M. J., BRAULKE, T., MUHLHAUSEN, C., BACKOS, D. S., OLSEN, C. A., MCGUIRE, P. J., PLETCHER, S. D., LOMBARD, D. B., HIRSCHHEY, M. D. & ZHAO, Y. 2014. Lysine

glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab*, 19, 605-17.

TANG, X., CHEN, X. F., WANG, N. Y., WANG, X. M., LIANG, S. T., ZHENG, W., LU, Y. B., ZHAO, X., HAO, D. L., ZHANG, Z. Q., ZOU, M. H., LIU, D. P. & CHEN, H. Z. 2017. SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 136, 2051-2067.

TAO, Y., YU, S., CHAO, M., WANG, Y., XIONG, J. & LAI, H. 2019. SIRT4 suppresses the PI3K/Akt/NFkappaB signaling pathway and attenuates HUVEC injury induced by oxLDL. *Mol Med Rep*, 19, 4973-4979.

TRAN, D. H. & WANG, Z. V. 2019. Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Am Heart Assoc*, 8, e012673.

TSUSHIMA, K., BUGGER, H., WENDE, A. R., SOTO, J., JENSON, G. A., TOR, A. R., MCGLAUFLIN, R., KENNY, H. C., ZHANG, Y., SOUVENIR, R., HU, X. X., SLOAN, C. L., PEREIRA, R. O., LIRA, V. A., SPITZER, K. W., SHARP, T. L., SHOGHI, K. I., SPARAGNA, G. C., ROG-ZIELINSKA, E. A., KOHL, P., KHALIMONCHUK, O., SCHAFFER, J. E. & ABEL, E. D. 2018. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lipotoxic Hearts Induce Post-Translational Modifications of AKAP121, DRP1, and OPA1 That Promote Mitochondrial Fission. *Circ Res*, 122, 58-73.

UNGER, R. H. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-36.

VAKHRUSHEVA, O., SMOLKA, C., GAJAWADA, P., KOSTIN, S., BOETTGER, T., KUBIN, T., BRAUN, T. & BOBER, E. 2008. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, 102, 703-10.

VAN METER, M., MAO, Z., GORBUNOVA, V. & SELUANOV, A. 2011. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle*, 10, 3153-8.

- VETTOR, R., FABRIS, R., SERRA, R., LOMBARDI, A. M., TONELLO, C., GRANZOTTO, M., MARZOLO, M. O., CARRUBA, M. O., RICQUIER, D., FEDERSPIL, G. & NISOLI, E. 2002. Changes in FAT/CD36, UCP2, UCP3 and GLUT4 gene expression during lipid infusion in rat skeletal and heart muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 838-47.
- WANG, Z., LI, L., ZHAO, H., PENG, S. & ZUO, Z. 2015. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *Metabolism*, 64, 917-25.
- WOOD, J. G., ROGINA, B., LAVU, S., HOWITZ, K., HELFAND, S. L., TATAR, M. & SINCLAIR, D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430, 686-689.
- WRIGHT, J. J., KIM, J., BUCHANAN, J., BOUDINA, S., SENA, S., BAKIRTZI, K., ILKUN, O., THEOBALD, H. A., COOKSEY, R. C., KANDROR, K. V. & ABEL, E. D. 2009. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res*, 82, 351-60.
- XIE, Y., CHEN, L., WANG, R., WANG, J., LI, J., XU, W., LI, Y., YAO, S. Q., ZHANG, L., HAO, Q. & SUN, H. 2019. Chemical Probes Reveal Sirt2's New Function as a Robust "Eraser" of Lysine Lipoylation. *J Am Chem Soc*, 141, 18428-18436.
- ZENG, G., LIU, H. & WANG, H. 2018. Amelioration of myocardial ischemia-reperfusion injury by SIRT4 involves mitochondrial protection and reduced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 502, 15-21.
- ZHANG, Q. J., WANG, Z., CHEN, H. Z., ZHOU, S., ZHENG, W., LIU, G., WEI, Y. S., CAI, H., LIU, D. P. & LIANG, C. C. 2008. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*, 80, 191-9.
- ZHOU, B. & TIAN, R. 2018. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*, 128, 3716-3726.

ZUO, A., ZHAO, X., LI, T., LI, J., LEI, S., CHEN, J., XU, D., SONG, C., LIU, T., LI, C. & GUO, Y. 2020. CTRP9 knockout exaggerates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy through inhibiting the LKB1/AMPK pathway. *J Cell Mol Med*, 24, 2635-2647.

11. Anhang

Tabelle 1: 2-Way ANOVA Cpt1

Genotyp	Diät	Mittelwert	n	Std.- Abweichung
WT	LFD	1	10	0,16125
	HFD	1,041	10	0,18064
	Insgesamt	1,0205	20	0,16797
TG	LFD	1,047	10	0,13598
	HFD	1,064	10	0,23263
	Insgesamt	1,0555	20	0,18566
Insgesamt	LFD	1,0235	20	0,14716
	HFD	1,0525	20	0,20305
	Insgesamt	1,038	40	0,17565

2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,022 ^a	3	0,007	0,225	0,879	0,018
Konstanter Term	43,098	1	43,098	1313,578	0	0,973
Genotype	0,012	1	0,012	0,373	0,545	0,01
Diet	0,008	1	0,008	0,256	0,616	0,007
Genotype * Diet	0,001	1	0,001	0,044	0,835	0,001
Fehler	1,181	36	0,033			
Gesamt	44,301	40				
Korrigierte Gesamtvariation	1,203	39				

a. R-Quadrat = ,018 (korrigiertes R-
Quadrat = -,063)

Tabelle 2: T-Test Cpt1

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,05	1,04	1,07
SD	0,16	0,14	0,18	0,23
SEM	0,05	0,04	0,06	0,07
Var	16,2%	12,9%	17,5%	21,9%
T-Test				
Gruppen	p – value			
WT LFD vs TG LFD	0,50			
WT LFD vs WT HFD	0,60			
TG LFD vs TG HFD	0,83			
WT HFD vs TG HFD	0,80			

Tabelle 3: 2-Way ANOVA Cpt2

Genotype	Diet	Mittelwert	N	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1	10	0,09031		
	HFD	1,289	10	0,12288		
	Insgesamt	1,1445	20	0,18164		
TG	LFD	1,159	10	0,16272		
	HFD	1,28	10	0,15868		
	Insgesamt	1,2195	20	0,16829		
Insgesamt	LFD	1,0795	20	0,15185		
	HFD	1,2845	20	0,1382		
	Insgesamt	1,182	40	0,17696		
2-way-ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,547 ^a	3	0,182	9,737	0,0000	0,448
Konstanter Term	55,885	1	55,885	2984,156	0,0000	0,988
Genotype	0,056	1	0,056	3,004	0,0920	0,077
Diet	0,42	1	0,42	22,441	0,0000	0,384
Genotype * Diet	0,071	1	0,071	3,768	0,0600	0,095
Fehler	0,674	36	0,019			
Gesamt	57,106	40				
Korrigierte Gesamtvariation	1,221	39				
a. R-Quadrat = ,448 (korrigiertes R-Quadrat = ,402)						

Tabelle 4: T-Test Cpt2

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,16	1,29	1,28
SD	0,09	0,16	0,12	0,16
SEM	0,03	0,05	0,04	0,05
Var	9,1%	14,0%	9,5%	12,4%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,02			
WT LFD vs WT HFD	0,00			
TG LFD vs TG HFD	0,11			
WT HFD vs TG HFD	0,88			

Tabelle 5: 2-Way ANOVA Mcad

Genotype	Diet	Mittelwert	n	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1,001	10	0,12013		
	HFD	1,135	10	0,10102		
	Insgesamt	1,068	20	0,12805		
TG	LFD	1,067	10	0,1249		
	HFD	1,073	10	0,16499		
	Insgesamt	1,07	20	0,14246		
Insgesamt	LFD	1,034	20	0,12399		
	HFD	1,104	20	0,1369		
	Insgesamt	1,069	40	0,1337		
2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,090 ^a	3	0,03	1,779	0,169	0,129
Konstanter Term	45,71	1	45,71	2710,284	0	0,987
Genotype	4,00E-05	1	4,00E-05	0,002	0,961	0
Diet	0,049	1	0,049	2,905	0,097	0,075
Genotype * Diet	0,041	1	0,041	2,429	0,128	0,063
Fehler	0,607	36	0,017			
Gesamt	46,408	40				
Korrigierte Gesamtvariation	0,697	39				
a. R-Quadrat = ,129 (korrigiertes R-Quadrat = ,057)						

Tabelle 6: T-Test Mcad

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,07	1,13	1,07
SD	0,12	0,13	0,10	0,17
SEM	0,04	0,04	0,03	0,05
Var	12,1%	11,8%	8,9%	15,4%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,24			
WT LFD vs WT HFD	0,02			
TG LFD vs TG HFD	0,92			
WT HFD vs TG HFD	0,35			

Tabelle 7: 2-Way ANOVA Lcad

Genotyp	Diät	Mittelwert	n	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1,001	10	0,1029		
	HFD	1,154	10	0,11616		
	Insgesamt	1,0775	20	0,13254		
TG	LFD	1,068	10	0,1498		
	HFD	1,149	10	0,14571		
	Insgesamt	1,1085	20	0,14971		
Insgesamt	LFD	1,0345	20	0,12972		
	HFD	1,1515	20	0,12828		
	Insgesamt	1,093	40	0,14044		
2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,159 ^a	3	0,053	3,138	0,037	0,207
Konstanter Term	47,786	1	47,786	2821,172	0	0,987
Genotype	0,01	1	0,01	0,567	0,456	0,016
Diet	0,137	1	0,137	8,082	0,007	0,183
Genotype * Diet	0,013	1	0,013	0,765	0,388	0,021
Fehler	0,61	36	0,017			
Gesamt	48,555	40				
Korrigierte Gesamtvariation	0,769	39				

a. R-Quadrat = ,207 (korrigiertes R-Quadrat = ,141)

Tabelle 8: T-Test Lcad

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,07	1,15	1,15
SD	0,10	0,15	0,12	0,14
SEM	0,03	0,05	0,04	0,05
Var	10,3%	13,9%	10,1%	12,6%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,24			
WT LFD vs WT HFD	0,01			
TG LFD vs TG HFD	0,25			
WT HFD vs TG HFD	0,90			

Tabelle 9: 2-Way ANOVA Ppara

Genotyp	Diät	Mittelwert	N	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1	10	0,24046		
	HFD	0,933	10	0,21003		
	Insgesamt	0,9665	20	0,22241		
TG	LFD	1,08	10	0,18809		
	HFD	0,896	10	0,17908		
	Insgesamt	0,988	20	0,20214		
Insgesamt	LFD	1,04	20	0,21408		
	HFD	0,9145	20	0,19091		
	Insgesamt	0,9773	40	0,21005		
2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,196 ^a	3	0,065	1,546	0,219	0,114
Konstanter Term	38,201	1	38,201	902,112	0	0,962
Genotype	0,005	1	0,005	0,109	0,743	0,003
Diet	0,158	1	0,158	3,719	0,062	0,094
Genotype * Diet	0,034	1	0,034	0,808	0,375	0,022
Fehler	1,524	36	0,042			
Gesamt	39,922	40				
Korrigierte Gesamtvariation	1,721	39				

a. R-Quadrat = ,114 (korrigiertes R-Quadrat = ,040)

Tabelle 10: T-Test Ppara

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,08	0,93	0,90
SD	0,24	0,19	0,21	0,18
SEM	0,08	0,06	0,07	0,06
Var	24,0%	17,3%	22,7%	20,2%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,42			
WT LFD vs WT HFD	0,52			
TG LFD vs TG HFD	0,04			
WT HFD vs TG HFD	0,67			

Tabelle 11: 2-Way ANOVA Pdk4

Genotype	Diet	Mittelwert	N	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1,001	10	0,52701		
	HFD	2,269	10	0,73734		
	Insgesamt	1,635	20	0,90122		
TG	LFD	0,865	10	0,43798		
	HFD	1,806	10	0,88818		
	Insgesamt	1,3355	20	0,8352		
Insgesamt	LFD	0,933	20	0,47676		
	HFD	2,0375	20	0,82923		
	Insgesamt	1,4853	40	0,87094		
2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	13,364 ^a	3	4,455	9,887	0	0,452
Konstanter Term	88,239	1	88,239	195,855	0	0,845
Genotype	0,897	1	0,897	1,991	0,167	0,052
Diet	12,199	1	12,199	27,077	0	0,429
Genotype * Diet	0,267	1	0,267	0,593	0,446	0,016
Fehler	16,219	36	0,451			
Gesamt	117,821	40				
Korrigierte Gesamtvariation	29,583	39				
a. R-Quadrat = ,452 (korrigiertes R-Quadrat = ,406)						

Tabelle 12: T-Test Pdk4

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	0,86	2,27	1,81
SD	0,53	0,44	0,74	0,89
SEM	0,17	0,14	0,23	0,28
Var	52,7%	50,7%	32,4%	49,1%
T-Test				
WT LFD vs TG LFD	0,54			
WT LFD vs WT HFD	0,00			
TG LFD vs TG HFD	0,01			
WT HFD vs TG HFD	0,22			

Tabelle 13: 2-Way ANOVA Glut1

Genotyp	Diät	Mittelwert	n	Std.- Abweichung		
WT	LFD	1	10	0,25421		
	HFD	0,725	10	0,05148		
	Insgesamt	0,8625	20	0,22752		
TG	LFD	1,14	10	0,1232		
	HFD	0,686	10	0,07919		
	Insgesamt	0,913	20	0,25377		
Insgesamt	LFD	1,07	20	0,20726		
	HFD	0,7055	20	0,06802		
	Insgesamt	0,8878	40	0,23927		
2-way-ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	1,434 ^a	3	0,478	21,554	0	0,642
Konstanter Term	31,524	1	31,524	1421,263	0	0,975
Genotype	0,026	1	0,026	1,15	0,291	0,031
Diet	1,329	1	1,329	59,9	0	0,625
Genotype * Diet	0,08	1	0,08	3,611	0,065	0,091
Fehler	0,798	36	0,022			
Gesamt	33,757	40				
Korrigierte Gesamtvariation	2,233	39				
a. R-Quadrat = ,642 (korrigiertes R-Quadrat = ,613)						

Tabelle 14: T-Test Glut1

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,14	0,73	0,69
SD	0,25	0,12	0,05	0,08
SEM	0,08	0,04	0,02	0,03
Var	25,5%	10,7%	7,1%	11,6%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,14			
WT LFD vs WT HFD	0,01			
TG LFD vs TG HFD	0,00			
WT HFD vs TG HFD	0,22			

Tabelle 15: 2-Way ANOVA Glut4

Genotyp	Diät	Mittelwert	n	Std.- Abweichung		
WT	LFD	0,999	10	0,10104		
	HFD	0,721	10	0,10038		
	Insgesamt	0,86	20	0,17305		
TG	LFD	1,025	10	0,14924		
	HFD	0,769	10	0,0941		
	Insgesamt	0,897	20	0,17886		
Insgesamt	LFD	1,012	20	0,12476		
	HFD	0,745	20	0,09785		
	Insgesamt	0,8785	40	0,17472		
2-way-ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	,728 ^a	3	0,243	18,874	0	0,611
Konstanter Term	30,87	1	30,87	2401,75	0	0,985
Genotype	0,014	1	0,014	1,065	0,309	0,029
Diet	0,713	1	0,713	55,463	0	0,606
Genotype * Diet	0,001	1	0,001	0,094	0,761	0,003
Fehler	0,463	36	0,013			
Gesamt	32,061	40				
Korrigierte Gesamtvariation	1,191	39				
a. R-Quadrat = ,611 (korrigiertes R-Quadrat = ,579)						

Tabelle 16: T-Test Glut4

	WT LFD	TG LFD	WT HFD	TG HFD
Mittelwerte	1,00	1,02	0,72	0,77
SD	0,10	0,15	0,10	0,09
SEM	0,03	0,05	0,03	0,03
Var	10,0%	14,7%	13,9%	12,3%
T-Test				
Gruppen	p-value			
WT LFD vs TG LFD	0,68			
WT LFD vs WT HFD	0,00			
TG LFD vs TG HFD	0,00			
WT HFD vs TG HFD	0,30			

Tabelle 17: 2-Way ANOVA Fibroseanteil

Diät	Genotyp	Mittelwert	Std.- Abweichung	n	
LFD	WT	0,8405	0,31298	7	
	TG	1,2694	0,86924	6	
	Gesamt	1,0385	0,64291	13	
HFD	WT	1,087	0,29688	6	
	TG	1,2572	0,35094	6	
	Gesamt	1,1721	0,32239	12	
Gesamt	WT	0,9543	0,31948	13	
	TG	1,2633	0,63203	12	
	Gesamt	1,1026	0,50887	25	
2-Way ANOVA					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	,793 ^a	3	0,264	1,023	0,402
Konstanter Term	30,861	1	30,861	119,527	0
DIET	0,085	1	0,085	0,331	0,571
Genotype	0,558	1	0,558	2,162	0,156
DIET * Genotype	0,104	1	0,104	0,403	0,532
Fehler	5,422	21	0,258		
Gesamt	36,609	25			
Korrigierte Gesamtvariation	6,215	24			
a. R-Quadrat = ,128 (korrigiertes R-Quadrat = ,003)					

Tabelle 18: T-Test Fibroseanteil

WT			TG				
Gruppe	Mausname	Mittelwert (in %)		Gruppe	Mausname	Mittelwert (in %)	
WT LFD	6-5	1,24	Mittelwert 0,86 SABW 0,31 SEM 0,12	TG LFD	6-9	2,64	Mittelwert 1,24 SABW 0,89 SEM 0,36
	6-10	1,01			6-11	2,01	
	7-13	1,23			6-12	1,02	
	7-15	0,91			6-13	0,59	
	8-5	0,67			19-17	0,45	
	15-58	0,41			20-15	0,70	
	15-59	0,57					
WT HFD	6-3	0,82	Mittelwert 1,08 SABW 0,34 SEM 0,14	TG HFD	5-8	1,27	Mittelwert 1,19 SABW 0,34 SEM 0,14
	6-4	0,79			5-9	1,47	
	7-4	1,24			6-6	1,65	
	7-6	1,65			7-7	1,04	
	8-12	0,81			8-3	1,02	
	16-51	1,18			8-8	0,69	
T-Test							
Gruppe	p-value						
WTLFD vs WTHFD	0,27						
WTLFD vs TGLFD	0,37						
TGLFD vs TGHFD	0,91						
TGHFD vs WTHFD	0,59						

Tabelle 19: 2-Way ANOVA Kardiomyozytengröße

Genotyp	Diät	Mittelwert	n	Std.- Abweichung
WT	LFD	334,025	6	22,6295
	HFD	367,247	6	18,8025
	Insgesamt	350,636	12	26,3528
TG	LFD	369,088	6	35,1269
	HFD	389,533	6	32,8689
	Insgesamt	379,311	12	34,1458
Insgesamt	LFD	351,557	12	33,5996
	HFD	378,39	12	28,0577
	Insgesamt	364,973	24	33,2304

2-Way ANOVA						
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Korrigiertes Modell	9498,565 ^a	3	3166,188	3,983	0,022	0,374
Konstanter Term	3196932,82	1	3196932,817	4021,434	0	0,995
Genotype	4933,534	1	4933,534	6,206	0,022	0,237
DIET	4320,167	1	4320,167	5,434	0,03	0,214
Genotype * DIET	244,865	1	244,865	0,308	0,585	0,015
Fehler	15899,469	20	794,973			
Gesamt	3222330,85	24				
Korrigierte Gesamtvariation	25398,034	23				

a. R-Quadrat = ,374 (korrigiertes R-Quadrat = ,280)

Tabelle 20: T-Test Kardiomyozytengröße

WT				TG			
Gruppe	Mausna me	Mittelwert in μm		Gruppe	Mausna me	Mittelwert in μm	
WT LFD	6-5	329,21	Mittelwert 334,03	TG LFD	6-9	352,66	Mittelwert 369,09
	6-10	322,20			6-11	391,50	
	7-13	357,91	SABW 22,62		6-12	373,26	SABW 35,13
	7-15	353,44			6-13	397,50	
	8-5	344,09	SEM 9,24		19-17	393,56	SEM 14,34
	15-59	297,32			20-15	306,05	
WT HFD	6-3	375,10	Mittelwert 367,25	TG HFD	5-8	438,35	Mittelwert 389,53
	6-4	350,47			5-9	361,77	
	7-4	360,39	SABW 18,80		6-6	407,44	SABW 32,87
	7-6	386,51			7-7	360,01	
	8-12	387,87	SEM 7,68		8-3	407,30	SEM 9,24
	16-51	343,14			8-8	362,33	
T-Test							
Gruppe	p-value						
WTLFD vs WTHFD	0,02						
TGLFD vs TGHFD	0,32						
WTLFD vs TGLFD	0,07						
WTHFD vs TGHFD	0,19						