

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Palmitoleinsäure (C16:1n7) auf kardiales
Remodeling vermittelt durch den nukleären Hormonrezeptor
PPAR-delta

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Iris Rosa Betz
aus Beverly, MA, USA

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Beyhoff, N., Brix, S., Betz, I.R., Klopffleisch, R., Foryst-Ludwig, A., Krannich, A., Stawowy, P., Knebel, F., Grune, J., and Kintscher, U. (2017). Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *Journal of the American Society of Echocardiography* 30, 1239–1250.e2.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	9
Zusammenfassung	14
1 Einleitung	16
1.1 Lipide als Bausteine des Lebens	16
1.2 Palmitoleinsäure (C16:1n7) und ihre Rolle im menschlichen Körper	17
1.3 Die Auswirkungen von C16:1n7 auf Krankheitsentitäten im Menschen	18
1.4 Herzinsuffizienz als kardiovaskuläre Erkrankung	23
1.5 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) als nukleäre Hormonrezeptoren	26
1.6 PPAR-Aktivierung als Therapieoption für Herzinsuffizienz.....	30
1.7 ISO-vermitteltes kardiales Remodeling	31
1.8 Induktion von physiologischer kardialer Hypertrophie durch C16:1n7	35
1.9 Hypothese und Zielsetzung	38
2 Material	39
2.1 Verwendete Geräte	39
2.2 Laborequipment.....	39
2.3 Lösungen, Medien, Kits	40
2.4 Chemikalien.....	41
2.5 Zell- und Mauslinien	42
2.6 Lösungen und Puffer	43
2.7 Antikörper	46
2.8 Primer	46
2.9 Computerprogramme	47
3 Methoden	48
3.1 in vitro Methoden	48
3.1.1 Zellkulturen	48
3.1.2 HL-1 Zelllinie.....	49
3.1.3 Primäre Maus-Kardiomyozyten (PMK).....	50
3.1.4 Immunfluoreszenzfärbung	53
3.1.5 Western Blot	53
3.1.6 RNA-Isolation	55
3.1.7 cDNA Synthese	55
3.1.8 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	56
3.1.9 RNA-Sequenzierung.....	56

3.1.10 <i>Overrepresentation</i> -Analyse mittels <i>ConsensusPath DB</i> (CPDB).....	57
3.2 in vivo Methoden	57
3.2.1 Versuchsaufbau des Isoproterenol (ISO) Herzfibrosemodells	57
3.2.2 Erhebung von Körpergewicht und Organentnahme	59
3.2.3 Echokardiographie.....	60
3.2.4 Histologie.....	63
3.3 Statistik.....	64
4 Ergebnisse	66
4.1 Identifizierung neuer Signalwege induziert durch C16:1n7	66
4.1.1 Etablierung der PMK-Kultur.....	66
4.1.2 Stimulationsdauer.....	67
4.1.3 C16:1n7 reguliert PPAR δ und α Zielgene auf mRNA Ebene	69
4.1.4 Bestätigung der PPAR-Zielgene.....	71
4.1.5 Regulation von PPAR δ -Zielgenen im Zeitverlauf	72
4.1.6 <i>Consensus Path DB</i> (CPDB) <i>Overrepresentation</i> -Analyse	74
4.2 Effekte von C16:1n7 auf die ISO-induzierte kardiale Fibrose im Mausmodell	76
4.2.1 Grundliniencharakteristika der Mäuse	76
4.2.2 C16:1n7 reduziert die ISO-induzierte kardiale Fibrose an Tag 22	78
4.2.3 C16:1n7 hat keine Auswirkung auf Marker des kardialen fibrotischen Umbaus an Tag 11	81
4.2.4 ISO induziert geringe kardiale Hypertrophie an Tag 22	83
4.2.5 C16:1n7 hat keine Auswirkungen auf kardiale Hypertrophie direkt nach der ISO Gabe (Tag 10/11).....	86
4.2.6 Expressionsanalyse verschiedener Markergene für kardiales Remodeling und kardialen Schaden	89
4.2.7 Kardiale Regulation von PPAR-Zielgenen im ISO-Modell.....	91
5 Diskussion	94
5.1 PMK zur Untersuchung von pharmakologischen Fragestellungen.....	95
5.2 Methodische Evaluation der RNA-Expressionsanalyse	97
5.3 Aktivierung von PPAR-Signalwegen durch C16:1n7.....	98
5.4 Vermittlung von anti-fibrotischen Effekten durch die Beeinflussung von Wnt/TGF- β , PPARs und Angptl4	100
5.5 Protektive Auswirkungen auf kardiale Fibrose durch C16:1n7 im ISO-Modell.....	105
5.6 Kardiale Hypertrophie im ISO-Modell kann nicht durch C16:1n7 beeinflusst werden.....	107
5.7 Fehlende in vivo PPAR-Aktivierung im Herzen durch C16:1n7.....	109
5.8 Anti-inflammatorische Eigenschaften von C16:1n7.....	111
5.9 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen.....	114
5.10 Zusammenfassung und vorgeschlagener Mechanismus	116

6 Literaturverzeichnis	118
7 Eidesstattliche Versicherung	138
8 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	139
9 Lebenslauf	140
10 Publikationsliste.....	142
11 Danksagungen.....	143

Abkürzungsverzeichnis

<i>Acs1</i>	Acyl-CoA Synthetase-1
<i>Angptl4</i>	Angiopoetin-like 4 Gen
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> = Varianzanalyse
<i>Anp</i>	Atriales natriuretisches Peptid
ARB	Angiotensin-II Rezeptor Subtyp 2 Antagonist
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
BSA	Bovines Serumalbumin
C16:0	Palmitinsäure
C18:0	Stearinsäure
cDNA	<i>Complementary RNA</i> = Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Claycomb-Medium-	Claycomb-Hungermedium mit 0,5 % FBS
Claycomb-Medium+	Claycomb-Medium mit 10 % FBS und Noradrenalin
CPDB	Consensus Path Database
<i>Cpt1b</i>	Carnitine Palmitoyltransferase 1B
d H ₂ O	<i>Distilled Water</i> = Destilliertes Wasser
DBD	DNA-bindende Domäne
dd H ₂ O	<i>Double-Distilled Water</i> = Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	<i>Ejection Fraction</i> = Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> = Fetales Kälberserum
FC	<i>Fold Change</i> = x-facher Unterschied
FS	<i>Fractional Shortening</i> = Linksventrikuläre Verkürzungsfraction
GCS	<i>Global Circumferential Strain</i> = Globaler zirkumferentieller <i>Strain</i>
GCSR	<i>Global Circumferential Strain Rate</i> = Globale zirkumferentielle <i>Strain Rate</i>
GLS	<i>Global Longitudinal Strain</i> = Globaler longitudinaler <i>Strain</i>
GLSR	<i>Global Longitudinal Strain Rate</i> = Globale longitudinale <i>Strain Rate</i>
GRS	<i>Global Radial Strain</i> = Globaler radialer <i>Strain</i>
GRSR	<i>Global Radial Strain Rate</i> = Globale radiale <i>Strain Rate</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HFpEF	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i> = Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i> = Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HG	Herzgewicht
HG/TL	Herzgewicht in Relation zur Tibialänge
HI	Herzinsuffizienz
<i>Hilpda</i>	<i>hypoxia inducible lipid droplet associated Gen</i>
hs-CRP	<i>High sensitivity C-reaktives Protein</i> = Hochsensitives C-reaktives Protein

IGF-1	<i>Insulin-like-Growth-Factor-1</i>
IL	Interleukin
IVS	<i>interventricular septum</i> = Diastolische Septumdicke
KHK	Ischämische Herzkrankheit
KO	<i>Knock Out</i> = „außer Gefecht setzen“
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<i>Lpl</i>	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharide
LRPs	<i>Low-Density-Lipoprotein-Receptor-Related Proteins</i>
LV	linksventrikulär
LVAW	<i>Left Ventricular Anterior Wall Diameter</i> = linksventrikulärer Durchmesser der anterioren Wand
LVID	<i>Left Ventricular Inner Diameter</i> linksventrikuläre innerer Durchmesser
LVM	Linksventrikuläre Masse
LVM/KG	Linksventrikuläre (gemessen in der Echokardiographie) in Relation zum Körpergewicht
LVM/TL	Linksventrikuläre (gemessen in der Echokardiographie) in Relation zur Tibialänge
LVPW	<i>Left Ventricular Posterior Wall Diameter</i> = linksventrikulärer Durchmesser der posterioren Wand
mFC	<i>Mean Fold Change</i> = durchschnittlicher x-facher Unterschied
mRNA	<i>Messenger RNA</i> = Botenribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
n	Anzahl technischer Replikate
N	Anzahl der Versuchswiederholungen
NESTs	Network neighborhood-based entity sets
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NH	Nukleäre Hormonrezeptoren
P	Signifikanzniveau
p. o.	per os
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	<i>Principal component analysis</i> = Hauptkomponentenanalyse
<i>Pdk4</i>	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PL	Perfusionslösung
PMK	Primäre Maus-Kardiomyozyten
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPRE	<i>Peroxisom Proliferator Response Element</i> = Peroxisom Proliferator Antwort Element
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> = RNA Integritätsnummer
RIPA	<i>Radioimmuno-precipitation assay buffer</i> = Radioimmunpräzipitation Assay Puffer
RIPA-Puffer+	RIPA-Puffer mit Proteasen- und Phosphataseninhibitor
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> = Ribonukleinsäure

s. c.	subkutan
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase
T/E	Trypsin/EDTA
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAC	<i>Transverse Aortic Constriction</i> = Transverses Aortenkonstriktionsmodell
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i> = Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TL	Tibiallänge
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Wnt	<i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
WT	Wildtyp
β -MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Kapitel 1

Abb. 1.1 Die Auswirkungen von Palmitoleinsäure auf kardiovaskuläre Erkrankungen im Menschen.	22
Abb. 1.2 Hospitalisationsrate der Herzinsuffizienz seit 2000 gesamt und nach Geschlecht.	23
Abb. 1.3 Diagnosekriterien und Klassifikation der Herzinsuffizienz.	25
Abb. 1.4 Aufbau des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors.	26
Abb. 1.5 PPAR-Expression in verschiedenen Geweben im Menschen.	28
Abb. 1.6 PPAR-Expression in verschiedenen Geweben in der Maus.	29
Abb. 1.7 Schema der Fibroseentstehung.	34
Abb. 1.8 Übersicht über Veränderungen während physiologischer und pathologischer Hypertrophie.	37

Quellen der Abbildungen:

Abb. 1.1:

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „Artere_proco.png; coeur_07.png; Coeur_beau.png; Prise_tension.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>), Größe und Transparenz verändert

Abb. 1.2:

Copyright: Deutscher Herzbericht 2018/Deutsche Herzstiftung (Hg.). Mit freundlicher Genehmigung der Deutschen Herzstiftung

Abb. 1.3:

Eigene Abbildung; Inhalt adaptiert von „Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, u. a. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. European Heart Journal. 14. Juli 2016;37(27):2129–200“

Abb. 1.4:

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „adn_05.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>), Größe verändert. Inhalt adaptiert von „Kumar R, Litwack G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. Steroids. November 2009;74(12):877–83.“ (A) und „Berger J, Moller DE. The Mechanisms of Action of PPARs. Annual Review of Medicine. Februar 2002;53(1):409–35“ (B)

Abb. 1.5:

Eigene Abbildung; Inhalt adaptiert von „Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, u. a. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. Mol Cell Proteomics. Februar 2014;13(2):397–406“. Abbildungen heruntergeladen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> am 08.11.2019

Abb. 1.6:

Eigene Abbildung; Inhalt adaptiert von „Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, u. a. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. Nature. 20. November 2014;515(7527):355–64“. Abbildungen heruntergeladen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> am 08.11.2019

Abb. 1.7:

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „collagene_02.png; endothelium_01.png; cellule_NK.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>), Größe verändert; Inhalt adaptiert von „Dobaczewski M, Frangogiannis NG. Chemokines and cardiac fibrosis. Front Biosci (Schol Ed). 1. Juni 2009;1:391–405“

Abb. 1.8:

Eigene Abbildung; Inhalt adaptiert von „Dorn GW. The Fuzzy Logic of Physiological Cardiac Hypertrophy. Hypertension. 5. Januar 2007;49(5):962–70“

Kapitel 3

Abb. 3.1 Versuchsaufbau des <i>in vitro</i> Teils.	48
Abb. 3.2 Isolation der primären murinen Kardiomyozyten (PMK).....	52
Abb. 3.3 Formel zur Berechnung der Zellzahl mit Neubauerzählkammer.	52
Abb. 3.4 Versuchsaufbau des Modells der Isoproterenol-induzierten kardialen Schädigung.....	59
Abb. 3.5 Auswertung der B-Mode Bilder für die <i>Speckle Tracking</i> -Echokardiographie.....	62
Abb. 3.6 Auswertung der M-Mode Bilder für die konventionelle Echokardiographie.....	63
Abb. 3.7 Histologiequantifizierung.	64

Quellen der Abbildungen:

Abb. 3. 1

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „cardiomyocyte_09.png; petri_01.png; ARN2.png; Electrophorese_gel.png; adn_01.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>), Größe verändert; Powerpoint Pictogramm, Größe verändert

Abb. 3. 2

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „Bain-marie1.png; Buchner.png; Fleche_08.png; Fleche_15.png; Fleche_20.png; PipettePasteur_01.png; refrigerant_droit.png; refrigerant_serpentin.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>); Größe verändert; Powerpoint Pictogramm, Größe verändert

Abb. 3. 3

Neubauerzählkammer: „Self-made with Corel Draw“ von User: Alcibiades, gemeinfrei, (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=560642>, abgerufen am 15.06.2019); Größe verändert und Einfärbung in Graustufen

Abb. 3. 4

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: Zur Verfügung gestellt von Dr. Franziska Schwarz, SciVisTo

Abb. 3. 5

Eigene Abbildung; eigenes Bildmaterial; Inhalt adaptiert nach „Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of, Cardiovascular Imaging. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. April 2016;17(4):412“ und „1. Beyhoff N, Brix S, Betz IR, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Krannich A, u. a. Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. Journal of the American Society of Echocardiography. Dezember 2017;30(12):1239–1250.e2“

Abb. 3. 6

Eigene Abbildung; eigenes Bildmaterial; Inhalt adaptiert nach „Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of, Cardiovascular Imaging. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. April 2016;17(4):412.“ und „1. Beyhoff N, Brix S, Betz IR, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Krannich A, u. a. Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. Journal of the American Society of Echocardiography. Dezember 2017;30(12):1239–1250.e2“

Abb. 3. 7

Eigene Abbildung; eigenes Bildmaterial

Kapitel 4

Abb. 4.1 Etablierung der primären Kardiomyozyten (PMK) Isolation und Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer. 68

Abb. 4.2 Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. 70

Abb. 4.3 Differentielle Genexpression von PPAR δ - und - α -Zielgenen nach 3 h gemessen mittels quantitativer Real Time-Polymerasekettenreaktion. 71

Abb. 4.4 Zeitverlaufsexperiment mit Messung der differentiellen Genexpression von PPAR δ -Zielgenen in HL-1 Zellen unter Stimulation mit C16:1n7 gemessen mittel qRT-PCR. 73

Abb. 4.5 CPDB *Overrepresentation*-Analyse. 75

Abb. 4.6 Echokardiographie- und Histologieergebnisse am finalen Endpunkt (Tag 21/22). 80

Abb. 4.7 *Speckle Tracking* Echokardiographie- und Histologieergebnisse an Tag 10/11. 82

Abb. 4.8 Ergebnisse der konventionellen Echokardiographie, Histologie und Makroskopie der Herzen in Bezug auf Parameter der Hypertrophie an Tag 21/22. 85

Abb. 4.9 Hypertrophieparameter in der Echokardiographie, in der Makroskopie und Histologie an Tag 10/11. 88

Abb. 4.10 Genexpressionsprofil gemessen mit quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion verschiedener mit kardialen Schaden assoziierter Gene aus Herzgewebe. 90

Abb. 4.11 Genexpressionsprofil verschiedener PPAR α - und - δ -Zielgene im Herz. 92

Ergänzungen zur Anzahl der Proben/Tiere:

Abb. 4. 1:

D–F: Ein Triplikat ausgeschlossen (24 h), da es hier zu einer Probenverwechslung gekommen ist

Abb. 4. 4:

A Mitte: Ein Triplikat ausgeschlossen, da die Stimulation nicht funktioniert hat

Abb. 4. 6:

A, B-H, I: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen

B: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen, ISO-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

G: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen sowie ein weiteres aufgrund eines statistischen Ausreißer; ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder SAX-Echobildqualität ausgeschlossen

H: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen, KON-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer, ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder SAX-Echobildqualität ausgeschlossen

L: ISO-H₂O: 3 Tiere ausgeschlossen wegen schlechter Schnittqualität der Histologie (= mehr Herzgewebe aus dem Ring fehlend als sichtbar bzw. sehr ungleichmäßiger Schnitt)

Abb. 4. 7:

A: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen; ISO-H₂O: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen; ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

B–D: HF: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen; ISO-H₂O: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen; ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

I: KON-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer; ISO-H₂O: Ein Tier ausgeschlossen wegen schlechter Schnittqualität der Histologie (= Mehr Herzgewebe aus dem Ring fehlend als sichtbar bzw. sehr ungleichmäßiger Schnitt)

J: KG-Zunahme: ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

Abb. 4. 8:

A–C: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen; ISO-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer; ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen

B: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen

Abb. 4. 9:

B: ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen; KON-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer; ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen

Abb. 4. 10:

A: ISO-H₂O: 2 statistisch signifikante Ausreißer

B: ISO-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

Abb. 4. 11:

A, C: KON-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

E: ISO-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer; ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

F: ISO-H₂O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

Kapitel 5

Abb. 5.1 Möglicher Wirkmechanismus von C16:1n7 im Herzen. Erklärung im Text zu Kapitel 5.10..... 117

Quellen der Abbildungen:

Abb. 5. 1:

Eigene Abbildung; Verwendetes Bildmaterial: „adipocyte_03.png; capsule.png; cellule_NK.png; cellule_vide_03.png; jonctions_06.png; noyau_02.png; protein_05.png; protein_07.png; couces_artere_02.png“, lizenziert von Servier Medical Art unter CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com/>), Größe verändert

Tabellenverzeichnis

Kapitel 4:

Tab. 4. 1 PMK-Isolationscharakteristika der Proben für die Sequenzierung.	67
Tab. 4.2 Gruppengröße des ISO-Versuches mit Anzahl der verstorbenen Tiere.....	76
Tab. 4.3 Grundliniencharakteristika der behandelten Tiere an Tag 0.....	77
Tab. 4.4 BZ-, KG-, und HF-Werte bei der letzten Echokardiographie am Endpunkt Tag 21.....	79
Tab. 4.5 BZ-, KG-, und HF-Werte der Tiere zur Echokardiographie einen Tag nach der letzten ISO Gabe (Tag 10/11).....	81
Tab. 4.6 Echokardiographische Parameter und gravimetrisches Herzgewicht an Tag 21/22.	84
Tab. 4.7 Basiswerte der konventionellen Echokardiographie sowie Herzgewicht der Makroskopie an Tag 10/11.87	

Ergänzungen zur Anzahl der Proben/Tiere:

Tab. 4.3:

GLS: Ein ISO-C16:1n7 Tier ausgeschlossen, da statistischer Ausreißer

Tab. 4.4:

KG Zunahme: ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

Tab. 4.5:

KG: ISO-C16:1n7: Ein statistisch signifikanter Ausreißer

HF: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen; ISO-H2O: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX ausgeschlossen

Tab. 4.6:

LVAW;d, LVPW;d, LVID;d, LVM: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen; ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen

FS: KON-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität der LAX und SAX ausgeschlossen; ISO-H2O: Ein statistisch signifikanter Ausreißer; ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen

Tab. 4.7:

LVAW, LVPW, LVID, LVM, EF, FS: ISO-C16:1n7: Ein Tier wegen mangelnder Echobildqualität des M-Modes ausgeschlossen

Zusammenfassung

Palmitoleinsäure (C16:1n7) ist eine einfach ungesättigte Fettsäure, die anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und physiologische kardiale Hypertrophie induzieren kann. Die molekularen Mechanismen hinter diesem Effekt sind jedoch wenig verstanden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit intrazellulären Signalwegen, die durch C16:1n7 induziert werden. Hierzu wurden adulte primäre murine Kardiomyozyten (PMK) mit C16:1n7 und/oder bovinem Serumalbumin als Kontrolle für 3 h stimuliert und mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) das Genexpressionsprofil untersucht. Die Bestätigung von ausgewählten RNA-Seq Zielgenen erfolgte mittels Stimulationsexperimenten in HL-1 Zellen und PMK. Mittels Consensus Pathway Data Base (CPDB) wurde eine *overrepresentation*-Analyse der RNA-Seq Ergebnisse durchgeführt. Anschließend wurde ein Mausmodell des Isoproterenol (ISO) induzierten Schadens genutzt, um die Effekte von C16:1n7 auf kardiales Remodeling zu untersuchen. Hierfür erhielten 129sv Mäuse C16:1n7 oder Wasser (H₂O) oral (p. o.) für 22 Tage (d) +/- ISO subkutan (s. c.) für 4 d. Eine transthorakale Echokardiographie wurde nach 1 und 13 d nach der Applikation durchgeführt sowie *Strain* und konventionelle Echokardiographieparameter ausgewertet. Die Herzschnitte wurden mit Pikro-Siriusrot gefärbt. Zudem wurden qRT-PCR Analysen des Herzgewebes durchgeführt.

In der RNAseq-Analyse waren in den mit C16:1n7 stimulierten PMK 129 Gene differentiell exprimiert, unter anderem *Angiopoetin-like factor 4 (Angptl4)* und *Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (Pdk4)*, beides Zielgene des nukleären Hormonrezeptors PPAR δ . In weiteren Stimulationsexperimenten wurde diese Hochregulation bestätigt. Die CPDB-Analyse zeigte, dass mehrere Fibrosesignalwege durch C16:1n7 beeinflusst werden, unter anderem der Wnt- und TGF- β -Signalweg.

In der echokardiographischen Auswertung konnte ein protektiver Einfluss von C16:1n7 auf das Herz dokumentiert werden. Der globale longitudinale *Strain* (GLS), der eng mit dem Ausmaß der subendokardialen Fibrose assoziiert ist, wurde durch die Behandlung mit C16:1n7 verbessert sowie die endokardiale Fibrose in der Histologie reduziert. Obwohl die Regulation der PPAR δ -Zielgene durch C16:1n7 *in vivo* nicht reproduziert werden konnten, wurde die Genexpression von *Cluster of differentiation*

68 (*Cd68*) durch C16:1n7 signifikant reduziert, was auf eine anti-inflammatorische Wirkung hindeuten könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass C16:1n7 vor kardialer Fibrose schützen kann. Dies könnte durch eine anti-inflammatorische Wirkung der Fettsäure bedingt sein. Diese Studie liefert einen Hinweis darauf, dass diätetische Interventionen mit C16:1n7 einen schützenden Effekt vor der Entwicklung von kardialer Fibrose, z. B. bei Herzinsuffizienz, vermitteln könnte.

Abstract

Palmitoleic acid (C16:1n7) is a monounsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties. It was identified as a regulator of physiological cardiac hypertrophy. The underlying mechanism of this effect remains elusive. The aim of this study was to investigate the molecular pathways involved in C16:1n7-responses in adult primary murine cardiomyocytes (PMC) using a RNA sequencing (RNA-Seq) approach. In addition, a mouse model of isoproterenol (ISO)-induced cardiomyopathy was used to study the effects of C16:1n7 on cardiac remodeling *in vivo*.

RNAseq revealed 129 genes differentially expressed in PMC stimulated with C16:1n7, including highly regulated *Angiopoietin-like factor 4 (Angptl4)* and *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (Pdk4)*, both target genes of the nuclear hormone receptor PPAR δ . qRT-PCR analysis of HL-1 cells and PMC treated with C16:1n7 confirmed this upregulation. The CPDB analysis revealed several fibrosis pathways (including Wnt and Tgf- β) that were regulated by C16:1n7.

Echocardiographic analysis indicated a cardioprotective effect of C16:1n7 in ISO-treated mice. Global longitudinal *Strain* (GLS), which is closely associated with subendocardial fibrosis, was significantly improved under C16:1n7 treatment and histological analysis showed diminished subendocardial fibrosis. Although the regulation of the PPAR δ target genes by C16:1n7 could not be replicated, gene expression of *Cluster of differentiation 68 (Cd68)* was significantly downregulated by C16:1n7, suggesting an anti-inflammatory action of C16:1n7.

In conclusion it could be shown that C16:1n7 might influence cardiac remodeling, especially cardiac fibrosis. This might be mitigated by an anti-inflammatory effect of the fatty acid. This study indicates that a dietary intervention with C16:1n7 might be beneficial in heart conditions associated with cardiac fibrosis, e.g. heart failure.

1 Einleitung

1.1 Lipide als Bausteine des Lebens

Lipide sind ein wichtiger Grundbaustein des menschlichen Körpers und an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Das Grundgerüst der Lipide, die Fettsäure, besteht aus einer Kohlenwasserstoffkette mit einer endständigen Carboxylgruppe [1] und kann, je nach Zweck, weiter modifiziert werden.

Zur Energiespeicherung können Fettsäuren z. B. zu Triacylglyceriden umgewandelt werden und dienen, neben Kohlenhydraten und Proteinen, als energiereicher Speicher der ATP-Gewinnung [2]. Als Phospholipide sind sie Teil der Zellmembran und beeinflussen durch ihre Zusammensetzung zelluläre Funktionen wie das *Budding* oder Fission und Fusion von Vesikeln [3]. Andere Moleküle können ebenfalls durch Konjugation von Fettsäuren modifiziert werden und neue Funktionen erhalten, beispielsweise Proteine. So können sie durch diese sog. Acylierung als Lipoproteine wie Chylomikronen Fette und Cholesterol im Blut transportieren und spielen eine essentielle Rolle in der Atheroskleroseentwicklung [4].

Zudem können Fettsäurederivate hormonähnliche Eigenschaften besitzen [5]. Ein Hormon ist dadurch charakterisiert, dass es in einem endokrinen Organ gebildet wird und mit dem Blut zu einem anderen, dem Zielorgan, transportiert wird [6]. Dort steuert es bestimmte Stoffwechselprozesse [6]. Beispiele hierfür sind die Arachidonsäurederivate Eicosanoide und Leukotriene, die pro-inflammatorisch wirken, wie auch die pro- oder anti-inflammatorischen Prostaglandine [7]. Als Regulatoren sind sie an verschiedenen biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Regulation des Vasotonus oder der Magensäuresekretion, beteiligt [7]. Des Weiteren können aus dem Fettgewebe freie Fettsäuren mittels Lipolyse in das Blut abgegeben werden, die auf andere Organe, z. B. das Herz, Einfluss haben [8,9].

Es stellt sich daher die Frage, ob bereits freie Fettsäuren eine Wirkung an einem fern gelegenen Organ entfalten können. So konnten *Cao et al.* zeigen, dass es sich bei der einfach ungesättigten Fettsäure Palmitoleinsäure (C16:1n7) um ein sog. Lipokin handelt [10,11]. Ein Lipokin, oder Lipidhormon, ist eine Fettsäure, die hormonähnliche Wirkungen entfaltet [11]. Zudem geht aus einer Arbeit von *Riquelme et al.* hervor, dass freie Fettsäuren eine sog. physiologische Herzhypertrophie induzieren können [12]. Auch hier scheint C16:1n7 eine besondere Rolle einzunehmen, wie *Riquelme et al.* und *Foryst-Ludwig et al.* zeigen konnten [9,12].

1.2 Palmitoleinsäure (C16:1n7) und ihre Rolle im menschlichen Körper

C16:1n7 ist eine einfach ungesättigte Fettsäure mit einer Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 10 und ist Teil der Omega-7 Fettsäuren [13]. Sie kann als cis- oder trans-Isomer vorliegen [14]. Es handelt sich um eine nicht-essenzielle Fettsäure [10,15]. Somit kann sie sowohl endogen synthetisiert als auch über die Nahrung aufgenommen werden [10,15].

C16:1n7 wird im Körper v. a. im Fettgewebe gespeichert und ist an verschiedenen Stellen im Körper in unterschiedlichen Konzentrationen angereichert. Es gibt jedoch geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der Verteilung der Fettsäure [16–20]. So ist mehr C16:1n7 im subkutanen Fettgewebe als im perirenal Fettgewebe zu finden [21]. Besonders reich an der Fettsäure sind die Fettdepots im Oberarm und Oberschenkel [22]. Das gluteofemorale Fettgewebe scheint eine Schlüsselrolle in der Freisetzung und Synthese von C16:1n7 zu erfüllen, wie *Pinnick et al.* im Menschen zeigen konnten [19]. Zudem nimmt die Konzentration von C16:1n7 im Fettgewebe im Alter ab [17,18]. Da Frauen insgesamt mehr C16:1n7 im Fettgewebe speichern als Männer, scheint es zudem geschlechtsspezifische Unterschiede in der Speicherung dieser Fettsäure zu geben [19,20].

Eine Möglichkeit, die endogenen Spiegel an C16:1n7 zu beeinflussen, ist die diätätische Zuführung der Fettsäure [23]. Insbesondere Macadamianüsse, Lachs und Sanddorn enthalten hohe Konzentrationen an C16:1n7 [16,24,25]. *Griel et al.* konnten in einer Cross-Over Studie mit kontrollierter Nahrungsaufnahme mit einer macadamianusreichen Diät zeigen, dass die Serumkonzentration von C16:1n7 durch die Nahrung beeinflusst werden kann [23]. Da die Aufnahme über die Nahrung jedoch recht gering ist und die Konzentration von C16:1n7 im Gewebe und Plasma deutlich höher [26], scheint es zusätzlich zu einer endogenen Synthese zu kommen [16]. Diese Synthese erfolgt hauptsächlich über das Enzym Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) in der Leber und im Fettgewebe [27,28]. Es katalysiert die Einführung der cis-Doppelbindung in Fettsäuren [28,29] und nutzt Palmitinsäure (C16:0) oder Stearinsäure (C18:0) als Substrat [26]. Der Quotient von C16:1n7 zu C16:0, der sogenannte Saturaseindex, ist proportional zur Aktivität der SCD1 [28]. So konnten *Emken et al.* mittels radioaktiv markiertem C16:0 in Probanden zeigen, dass etwa 4 % des C16:0 im Plasma innerhalb einer Woche in C16:1n7 umgewandelt wird [15].

Die Konzentration von an Lipoproteine gebundenem C16:1n7 im Plasma kann durch die Aufnahme von Kohlenhydraten über *de novo* Lipogenese gesteuert werden, wie *Aarsland et al.* mittels einer viertägigen Hyperalimentation mit Kohlenhydraten von gesunden Männern zeigen konnten [30]. Bei der *de novo* Lipogenese kommt es zur Synthese von Lipiden aus Kohlenhydraten [31]. Die Zunahme von C16:1n7 im Plasma durch die Zufuhr von Kohlenhydraten über *de novo* Lipogenese konnten *Volk et al.* in Patienten mit metabolischem Syndrom bestätigen [32].

1.3 Die Auswirkungen von C16:1n7 auf Krankheitsentitäten im Menschen

Es existieren bereits zahlreiche Vorarbeiten zu der Rolle von C16:1n7 in Gesundheit und Krankheit im Menschen. Eine Suche der Datenbank PubMed (Stand am 28.10.2019) nach: *“Palmitoleic Acid“ OR „Palmitoleate“*

mit den Filtern „Mensch“ und „lesbarer Abstrakt“ erbrachte allein 521 Treffer.

In vielen Erkrankungen wurde bereits ein Zusammenhang mit C16:1n7 als freier Fettsäure oder gebunden an andere Lipidspezies festgestellt. Beispielsweise ist die Konzentration von C16:1n7 in Erythrozyten von Patienten mit Duchennesyndrom erniedrigt [33], in Patienten mit zystischer Fibrose mit Pankreasinsuffizienz ist die Konzentration von C16:1n7 in Erythrozyten hingegen erhöht [34]. Die Erkrankungen, mit denen C16:1n7 meist in Verbindung gebracht wird, sind jedoch maligne Neoplasien, nicht-alkoholische Steatosis hepatis, Adipositas, Typ II Diabetes mellitus Typ II (T2DM) und verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen.

So ist C16:1n7, gebunden an unterschiedliche Lipidspezies, in verschiedenen Tumorgeweben angereichert, wie z. B. in Adenokarzinomen der Mamma und der Prostata [35,36]. *Chavarro et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln an C16:1n7 im Blut und der Inzidenz eines Prostatakarzinoms feststellen, die sie auf eine erhöhte Aktivität der SCD1 im Tumorgewebe und damit der *de novo* Lipogenese zurückführten [37]. Da die SCD1 wichtig für die Zellproliferation ist und anti-apoptotisch wirkt [38], scheint die erhöhte Menge an C16:1n7 hauptsächlich auf die Aktivität des Enzyms zurückzuführen zu sein [37].

Die nicht-alkoholische Steatosis hepatis ist eine Folgeerkrankung von Adipositas [39]. Bei dieser Lebererkrankung ist der Gehalt an C16:1n7 in der Leber erhöht, was ebenfalls auf eine erhöhte Aktivität der SCD1 zurückgeführt wird [40]. Durch die SCD1 kommt es mittels *de novo* Lipogenese zu mehr Substrat für die hepatische

Triglyceridsynthese, wie *Allard et al.* zeigen konnten, und damit zu einer vermehrten Einlagerung von Lipidspezies [40].

C16:1n7 und Adipositas

Ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist Adipositas, die nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO als Body-Mass-Index über 30 kg/m² definiert ist [39]. Auch die Inzidenz für eine weitere, für das kardiovaskuläre System negative Erkrankung, der T2DM, ist unter adipösen Patienten erhöht [39].

In einer Fall-Kontrollstudie von *Aglago et al.* mit 372 Frauen konnten eine positive Assoziation zu Adipositas und Serumphospholipid-C16:1n7, als Surrogat für SCD-Aktivität, nachgewiesen werden [41]. *Garaulet et al.* und *Pickens et al.* konnten in Kohortenstudien ebenfalls einen Zusammenhang des BMI mit der Konzentration von C16:1n7 und der SCD-Aktivität nachweisen [42,43]. *Ni et al.* konnten demonstrieren, dass die Konzentration von C16:1n7 damit korrelierte, ob sich ein metabolisches Syndrom in den untersuchten Probanden entwickeln würde [44]. *Gong et al.* und *Mozaffarian et al.* konnten zeigen, dass die Konzentration von C16:1n7 im Fettgewebe [45] bzw. zirkulierende Level von Phospholipid-C16:1n7 [46] mit der Entwicklung von Adipositas assoziiert sind. Durch Gewichtsreduktion konnte in adipösen Patienten zwar die Konzentration von C16:1n7 im Plasma reduziert werden [44,47–49], das Ausmaß der Körpergewichtsabnahme war jedoch negativ mit der Ausgangs-C16:1n7-Konzentration im Fettgewebe assoziiert [50].

Ob nun C16:1n7 selbst oder als Surrogat für die Aktivität der SCD1 für das Auftreten von Adipositas und metabolischem Syndrom verantwortlich ist, bleibt unklar. *Paillard et al.* postulieren, dass die erhöhten C16:1n7-Werte bei Adipositas lediglich die Aktivität der SCD widerspiegeln [51]. *Frigolet et al.* stellen hingegen die Hypothese auf, dass die positiven metabolischen Eigenschaften von C16:1n7 mit Zunahme der Konzentration verloren gehen, wie dies bereits bei anderen Adipokinen beobachtet werden konnte [52,53]. Somit können erhöhte Spiegel von C16:1n7 bei erhöhtem Körpergewicht (KG) keinen positiven metabolischen Effekt mehr ausüben [52].

C16:1n7 und T2DM

Eine weitere Krankheit, die mit einem erhöhten kardiometabolischen Risiko verbunden ist, ist T2DM. T2DM ist u. a. gekennzeichnet durch erhöhte Blutzuckerspiegel und eine

periphere Insulinresistenz [39]. Die Ursachen dieser Krankheit und die Pathomechanismen sind komplex, weshalb im Folgenden von einem stark vereinfachten Konzept ausgegangen werden soll: Während zu Beginn der Krankheit die periphere Insulinresistenz im Vordergrund steht, kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Hyperglykämie, da die Überproduktion von Insulin im Pankreas aufgrund des Untergangs der β -Zellen abnimmt [54]. Im Weiteren muss zudem zwischen den Auswirkungen von trans-C16:1n7 und cis-C16:1n7 auf T2DM unterschieden werden.

In einer Metaanalyse von *de Souza et al.* war trans-C16:1n7 invers mit dem Auftreten von T2DM assoziiert [55]. Erhöhte Spiegel von trans-C16:1n7 konnten mit einer verminderten Inzidenz von T2DM in Zusammenhang gebracht werden, wie aus einer Metastudie von *Imamura et al.* hervorgeht [56]. In einem systematischen Review konnten *González-Becerra et al.* zeigen, dass C16:1n7 mit der Prävention von Insulinresistenz assoziiert war [57]. In einer Querschnittsstudie von *Liu et al.* konnte diese Assoziation jedoch nicht reproduziert werden [58]. Hier waren die Level an trans-C16:1n7 im Plasma nicht mit einer protektiven Wirkung assoziiert, sondern deuteten auf einen gestörten Glukosemetabolismus hin, gemessen an u. a. HbA1c und Nüchternblutglukose [58].

Während die Daten für trans-C16:1n7 als protektiver Faktor gegen T2DM recht robust sind, ist die Datenlage für cis-C16:1n7 nicht so eindeutig. Wie bereits bei den vorherigen Krankheitsbildern steht cis-C16:1n7, im Rahmen des Saturaseindexes, mit dem Auftreten von T2DM in Verbindung, wie *Qureshi et al.* und *Forouhi et al.* zeigen konnten [59,60]. In einer finnischen Bevölkerungsstudie mit gesunden Männern wurde das Auftreten von Hyperglykämie und T2DM fünf Jahre nach der ersten Vorstellung untersucht [61]. Hier zeigten *Mehendran et al.*, dass erhöhte Spiegel von cis-C16:1n7 in der Erythrozytenmembran und der Saturaseindex das Verschlechtern einer Hyperglykämie sowie das Auftreten von T2DM vorhersagen konnten [61].

In einer prospektiven Kohortenstudie untersuchten *Mozafarian et al.* das Phospholipidprofil von 3630 Probanden [46]. Hier korrelierten höhere Mengen von cis-C16:1n7 mit einem erhöhten BMI, jedoch auch mit niedrigerem *Low Density Lipoprotein* (LDL)- und höherem *High Density Lipoprotein* (HDL)-Cholesterol [46]. Zwar war cis-C16:1n7 nicht mit dem Auftreten von Diabetes assoziiert, allerdings wurde in einer Subgruppenanalyse der Männer eine Assoziation von Insulinresistenz

mit C16:1n7 festgestellt [46]. Dieser Zusammenhang konnte in einer Subgruppenanalyse der weiblichen Probanden nicht nachgewiesen werden [46].

Stefan et al. konnten hingegen zeigen, dass hohe zirkulierende Level von cis-C16:1n7 mit einer Verbesserung der Insulinresistenz nach einer Lifestyleintervention einhergehen [62]. Zudem fand man eine positive Assoziation zwischen C16:1n7 und Insulinsensitivität [62]. Dies konnte auch durch *Pinnick et al.* bestätigt werden [19].

Zusammenfassend gibt es Hinweise darauf, dass C16:1n7 im Menschen vor Diabetes schützen und die Insulinsensitivität verbessern kann, auch wenn es in der Literatur je nach Kollektiv und Studiendesign widersprüchliche Ergebnisse gibt.

Bedeutung von C16:1n7 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Betrachtet man die Daten aus der Literatur zu dem Einfluss von endogenen C16:1n7-Spiegeln auf die kardiovaskuläre Mortalität, scheint die Fettsäure geringe Auswirkungen zu haben. In einer Metaanalyse von Kohortenstudien von *de Souza et al.* wurden die Auswirkungen der Zufuhr von trans-C16:1n7 durch die Nahrung auf die Gesamtmortalität, die Inzidenz sowie Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen betrachtet [55]. Auf keinen dieser Parameter hatte die Konzentration von trans-C16:1n7, gemessen im Plasma, Serum, Adipozytengewebe und in Erythrozytenmembranen, eine Auswirkung [55]. Diese Ergebnisse konnten durch *Liang et al.* in einer Metaanalyse von prospektiven Kohortenstudien bestätigt werden [63]. Im Folgenden sollen nun die Auswirkungen von C16:1n7 auf die ischämische Herzerkrankung (KHK), als Auslöser einer Herzinsuffizienz (HI), sowie auf HI an sich getrennt voneinander betrachtet werden.

In Analysen, die den Effekt von C16:1n7 auf KHK betrachten, kommt man zu unterschiedlichen Schlüssen. So konnten *Wu et al.* in einer Analyse der *Cardiovascular Health Study* keine Auswirkung von C16:1n7, gebunden an Phospholipide im Plasma, auf KHK nachweisen [64]. *Merino et al.* konnten ebenfalls keine Assoziation zwischen Serum-C16:1n7 und Atherosklerose in einer Querschnittsstudie finden [65]. *Djoussé et al.* hingegen, die in einer Untersuchung der Kohortenstudie *Physician's Health Study* die Konzentration von cis-C16:1n7 in der Membran von Erythrozyten maßen, konnten einen protektiven Effekt von C16:1n7 für die Inzidenz von KHK in Männern zeigen [66]. Diese Ergebnisse konnten von *Kleber et al.* für KHK-Patienten in einer prospektiven Kohortenstudie für die Endpunkte

negatives kardiales Ereignis und Mortalität bestätigt werden [67]. Hier wurde trans-C16:1n7 in der Erythrozytenmembran gemessen [67].

Betrachtet man arteriellen Hypertonus als kardiovaskulären Risikofaktor, so scheint C16:1n7 einen eher negativen Einfluss auf diesen zu haben. So konnten *Yang et al.* und *Pezeshkian et al.* zeigen, dass erhöhter Blutdruck mit höheren Konzentrationen von C16:1n7 sowohl im Plasma als auch im epikardialen Fettgewebe einhergehen [68,69]. Ob diese Assoziation jedoch kausal ist oder die höhere Aktivität der SCD bei Übergewichtigen widerspiegelt [68], ist schwer zu differenzieren.

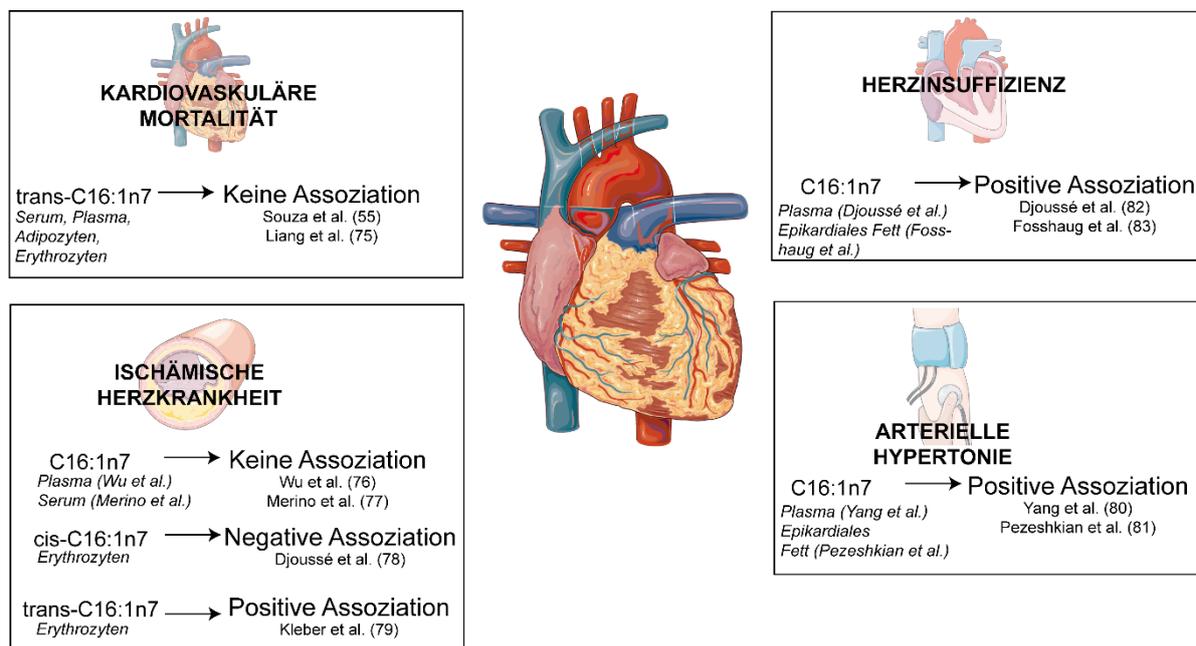


Abb. 1.1 Die Auswirkungen von Palmitoleinsäure auf kardiovaskuläre Erkrankungen im Menschen. Erklärungen im Text zu Kapitel 1.4 „Bedeutung von C16:1n7 bei kardiovaskulären Erkrankungen“
 Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure.

Eine Folgeerkrankung des arteriellen Hypertonus und KHK ist die HI [70]. Hier konnten *Djoussé et al.* in einer Analyse der *Physician's Health Study* zeigen, dass erhöhte Level von cis-C16:1n7 im Serum mit einer erhöhten Inzidenz von HI bei Männern einhergeht [71]. In einer kleinen Studie von *Fosshaug et al.*, die Patienten mit HI im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersuchten, konnte gezeigt werden, dass es zu erhöhten Spiegeln von C16:1n7 in epikardialen Fett bei HI kommt [72]. Zudem korrelierten die C16:1n7-Level mit dem N-terminalen-pro-B-natriuretischen Peptid (NT-pro-BNP) und einem vergrößerten linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser [72]. Diese Veränderungen konnten nicht auf eine Erhöhung der SCD-Aktivität zurückgeführt

werden [72]. Ob jedoch C16:1n7 im Rahmen einer kompensatorischen Aktivität bei HI erhöht war oder zu dieser führte, kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

1.4 Herzinsuffizienz als kardiovaskuläre Erkrankung

Epidemiologie und Ätiologie der Herzinsuffizienz

Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2017 ist die HI die fünfthäufigste Todesursache in Deutschland [73]. Während 2016 2,1 % weniger Patienten als 2014 an Herz-Kreislauf-Erkrankungen verstorben sind, so ist die Prävalenz der HI um 3,7 % angestiegen [74]. Die Hospitalisierungsrate aufgrund von HI nimmt seit 2010 stetig zu [74] (Abb. 1.2). Somit ist die HI mit etwa 1,8 Mio. Patienten eine häufige, lebensbedrohliche und wirtschaftlich bedeutende Erkrankung [74].

Viele Erkrankungen können in einer HI resultieren. In der *Framingham* Studie von 1970 wurden der arteriellen Hypertonie das höchste attributable Risiko (also die Fälle von HI, die diesem Risikofaktor zugeschrieben werden können) zur Entwicklung einer HI attestiert [75]. In der großen US-Amerikanischen Studie wurden der KHK, Rauchen und arteriellem Hypertonus das höchste attributable Risiko zugerechnet [76]. Auch gibt es seltene bzw. schwer zu diagnostizierenden Ursachen der HI. So konnten *Felker et al.* bei 1230 Patienten mit einer initial unklaren Ursache der Herzinsuffizienz Myokarditis und KHK als häufigste Ursache aufdecken, wenngleich 50 % der Patienten weiterhin als idiopathisch galten [77].

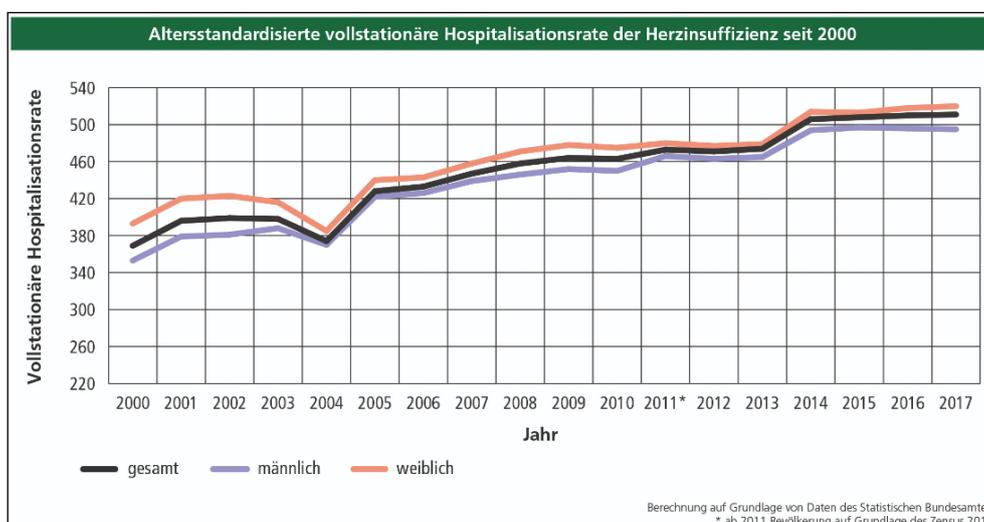


Abb. 1.2 Hospitalisationsrate der Herzinsuffizienz seit 2000 gesamt und nach Geschlecht.

Copyright: Deutscher Herzbericht 2018 / Deutsch Herzstiftung (Hg.).

Definition und Diagnose der Herzinsuffizienz

Die HI ist laut der *European Society of Cardiology* als klinisches Syndrom definiert, das durch die verminderte Pumpfunktion des Herzens bedingt ist [70]. Typische Symptome sind Atemlosigkeit in Ruhe oder bei Belastung [70]. Hinzu kommen klinische Zeichen wie erhöhter Jugularvenendruck oder ein vermehrter hepatojugulärer Reflux, die durch eine strukturelle und/oder funktionelle Abnormalität des Herzens verursacht werden, die in einem reduzierten kardialen Auswurf und/oder erhöhtem intrakardialen Druck resultieren [70] (Abb. 1.3). Um das klinische Syndrom besser zu klassifizieren, wird die *New York Heart Association* (NYHA) Klassifizierung verwendet [70] (Abb. 1.3).

Es ist wichtig, zwei Manifestationen der HI zu unterscheiden: Die HI mit erhaltener Ejektionsfraktion (*Heart Failure with Preserved Ejection Fraction* (HFpEF)) und die HI mit eingeschränkter Ejektionsfraktion (*Heart Failure with Reserved Ejection Fraction* (HFrEF)), da diese Krankheitsentitäten verschiedenen Ätiologien, Ko-Morbiditäten, Therapieansätze und klinische Ergebnisse aufweisen [78]. Zudem gibt es noch die Zwischenausprägung, die HI mit mäßig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF) [70]. Diese wird hauptsächlich im Rahmen von Therapiestudien genutzt [79], weshalb nicht weiter auf sie eingegangen werden soll.

Bei der HFrEF kommt es klassischerweise zu einer Einschränkung der systolischen Funktion des Herzens, die mittels der Ejektionsfraktion (EF) (echokardiographisch) gemessen wird. Definitionsgemäß beginnt die HFrEF bei einer linksventrikulären EF $\leq 40\%$ (Normwert: $\geq 50\%$) [70].

Die HFpEF, die eher mit einer diastolischen Dysfunktion einhergeht, ist schwerer zu diagnostizieren, da diese Form keine EF-Einschränkung aufweisen. Die EF liegt also über bzw. bei 50 %. Zur Diagnosestellung werden echokardiographische Parameter zu Rate gezogen, u. a. die linksventrikuläre Wanddicke oder der Nachweis einer verlangsamten ventrikulären Relaxation mit diastolischer Steifigkeit mittels Dopplerechokardiographie [70]. Eine neue Methode zum Nachweis der diastolischen Dysfunktion ist die *Speckle Tracking* Echokardiographie [80,81].

Je nach Studie macht die HFpEF etwa 24–47,6 % der hospitalisierten HF-Patienten aus [82,83]. Die Krankenhausmortalität der HFpEF-Patienten lag bei beiden Studien bei 2,9 bzw. 3 %, die 60–90 Tage bei 9,3 % sowie die 6-Monatsmortalität bei 14 % [82,83]. Bei HFrEF liegt die Mortalität hingegen deutlich höher [70].

KRITERIEN		HFpEF	HFrEF
		Symptome / Zeichen	Atemlosigkeit Orthopnoe Paroxysmale nächtliche Dyspnoe Reduzierte Trainingsstoleranz Fatigue Geschwollene Knöchel Erhöhter Jugularvenendruck Dritter Herzton (Galloprrhythmus) Hepatojugulärer Reflux u.v.m.
	LVEF	≥ 50%	< 40%
	Zusätzlich	Erhöhte Spiegel an natriuretischen Peptiden +Min 1: ▪ Diastolische Dysfunktion ▪ Strukturelle Herzerkrankung (LVH ± LuAE)	-

KLASSIFIKATION	NYHA-STADIUM	SUBJEKTIVE BESCHWERDEN
	I	Herzkrankheit ohne körperliche Limitation
	II	Beschwerden bei mindestens mittelschwerer körperlicher Belastung
	III	Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung
	IV	Beschwerden in Ruhe

Abb. 1.3 Diagnosekriterien und Klassifikation der Herzinsuffizienz.

Beschriftung: HFpEF Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, HFrEF Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, LuAE Lungenarterienembolie, LVEF Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVH Linksventrikuläre Hypertrophie, NYHA New York Heart Association. Modifiziert nach [70].

Therapie der HI

Während es für HFrEF verschiedene pharmakologische und nicht-pharmakologische Therapiemöglichkeiten gibt, ist die Auswahl der Medikamente, die zu einer Symptomlinderung und Lebensverlängerung führen, bei HFpEF beschränkt [70].

Für die HFrEF kommen je nach NYHA-Stadium verschiedene medikamentöse Therapien in Frage [70], so u. a. Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitoren und Angiotensin-II Rezeptor Subtyp 1 Antagonisten (ARB), β -Blocker/Ivabradin, Mineralokortikoidrezeptorantagonisten, Diuretika, Nephilysin-Inhibitoren und Digitalisglykoside [70]. Nicht-medikamentöse Therapien sind die Implantation eines Kardioverters/Defibrillators oder eine kardiale Re-Synchronisationstherapie [70].

Für HFpEF hingegen gibt es aktuell noch keine lebensverlängernde Therapieoption, wenngleich aktuell in Studien nach einer möglichen Verbesserung der Erkrankung durch Medikamente gesucht wird [70]. Lediglich der Einsatz von Diuretika zur Symptomkontrolle wird empfohlen [70].

1.5 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) als nukleäre Hormonrezeptoren

Die PPAR sind Teil der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (NH) [84]. NH haben als Transkriptionsfaktoren die Fähigkeit, Signale von extra- und intrazellulär in den Zellkern zu transportieren und dadurch die Genexpression der Zelle zu beeinflussen. Zu dieser Gruppe von Hormonrezeptoren gehören beispielsweise Steroidrezeptoren, Retinoid-X-Rezeptoren oder Thyroidhormonrezeptoren [85]. Die PPAR haben ihren Namen dadurch erhalten, dass sie bei ihrer Aktivierung zu einer Zunahme von Peroxisomen in der Leber und in der Niere führen [86].

Bei NH-Liganden handelt es sich meist um Hormone, jedoch können auch Fettsäuren, Fettsäurenmetabolite und synthetische Agonisten NH bzw. PPAR aktivieren [84,85,87,88]. Bei Bindung eines Liganden verändern NH ihre Konformation, sodass sie Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren binden können [85]. Diese Ko-Regulatoren können die biologischen Effekte der NH modulieren [85].

PPAR-Rezeptoren haben eine für NH typische Struktur: Sie bestehen aus einer ersten aktivierenden Region, die zur Transaktivierung dient, der DNA-bindenden Domäne (DBD), einer flexiblen Scharnierregion, einer Liganden-bindenden Domäne (LBD) und schließlich einer zweiten Region, die ebenfalls zur Transaktivierung, Dimerisierung und zur Rekrutierung von Ko-Aktivatoren dient [89] (Abb. 1.4). Insbesondere die Struktur der LBD und DBD sind hochkonserviert und wichtig für die Funktion der PPAR [90]. Bei Bindung eines Liganden dimerisieren die PPAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bilden einen sog. Heterodimer, der an eine spezifische DNA-Sequenz (= *Peroxisome Proliferator Response Element* (PPRE)) bindet [88] (Abb. 1.4).

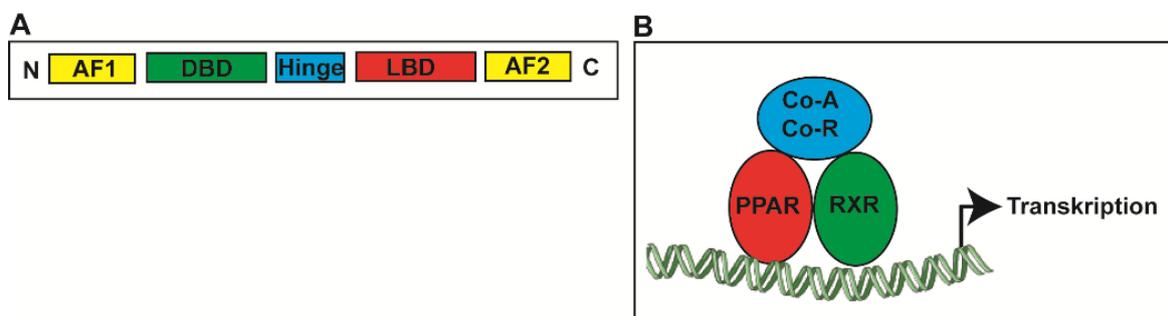


Abb. 1.4 Aufbau des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors.

A Aufbau des Rezeptors. **B** Schema der Dimerisierung mit dem Retinoid-Rezeptor X. Adaptiert von [91] (A) und [88] (B). *Beschriftung:* AF Aktivierende Region, Co-A Ko-Aktivator, Co-R Ko-Repressor, DBD DNA-bindende Region, Hinge Scharnierregion, LBD Liganden-bindende Region.

Insgesamt gibt es drei Untergruppen der PPAR-Familie mit verschiedenen Aufgaben und Expression im Gewebe: PPAR α , PPAR β/δ (PPAR δ) und PPAR γ [90]. Von diesen drei Rezeptoren ist PPAR γ der phylogenetisch älteste Rezeptor, aus dem sich die anderen beiden im Verlauf der Zeit entwickelt haben [90]. PPAR γ wird im Gewebe ubiquitär exprimiert, insbesondere in Fettgewebe, Milz, Dickdarm und Herz [88,92] (Abb. 1.5, Abb. 1.6). Er reguliert Adipogenese, Lipid- und Glukosestoffwechsel sowie Signalwege, die mit Inflammation assoziiert sind [88,92]. Dieser Rezeptor kann durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren und deren Metaboliten aktiviert werden [87] sowie durch synthetische Liganden, u. a. durch die Gruppe der Thiazolidindione, zu denen Rosiglitazon gehört [93].

PPAR α spielt eine wichtige Rolle bei Oxidierung von Fettsäuren und ist deshalb in Organen exprimiert, die Fettsäuren als Hauptsubstrat ihrer Energiegewinnung nutzen, wie Herz, Skelettmuskel und braunes Fettgewebe [92] (Abb. 1.5, Abb. 1.6). Aktiviert werden kann dieser Rezeptor durch Fettsäuren und deren Metaboliten, wie z. B. C16:1n7 [87]. Einen synthetischen Agonisten stellt z. B. Fenofibrat dar [94].

PPAR δ wird im Herzen stark exprimiert, aber auch im Fett und im Gastrointestinaltrakt [84] (Abb. 1.5, Abb. 1.6). Der Rezeptor kann durch Fettsäuren, wie z. B. C16:1n7, aktiviert werden [87]. Synthetische Liganden sind z. B. GW0472 [95,96], GW501516 [97] oder GW610742 [98,99]. Bei Aktivierung führt PPAR δ zu einer Vielzahl von Wirkungen, u. a. Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen [97,100], Blastozytenimplantation [101], Energiehomöostase [102] und hat Einfluss auf den Wnt-Signalweg [103].

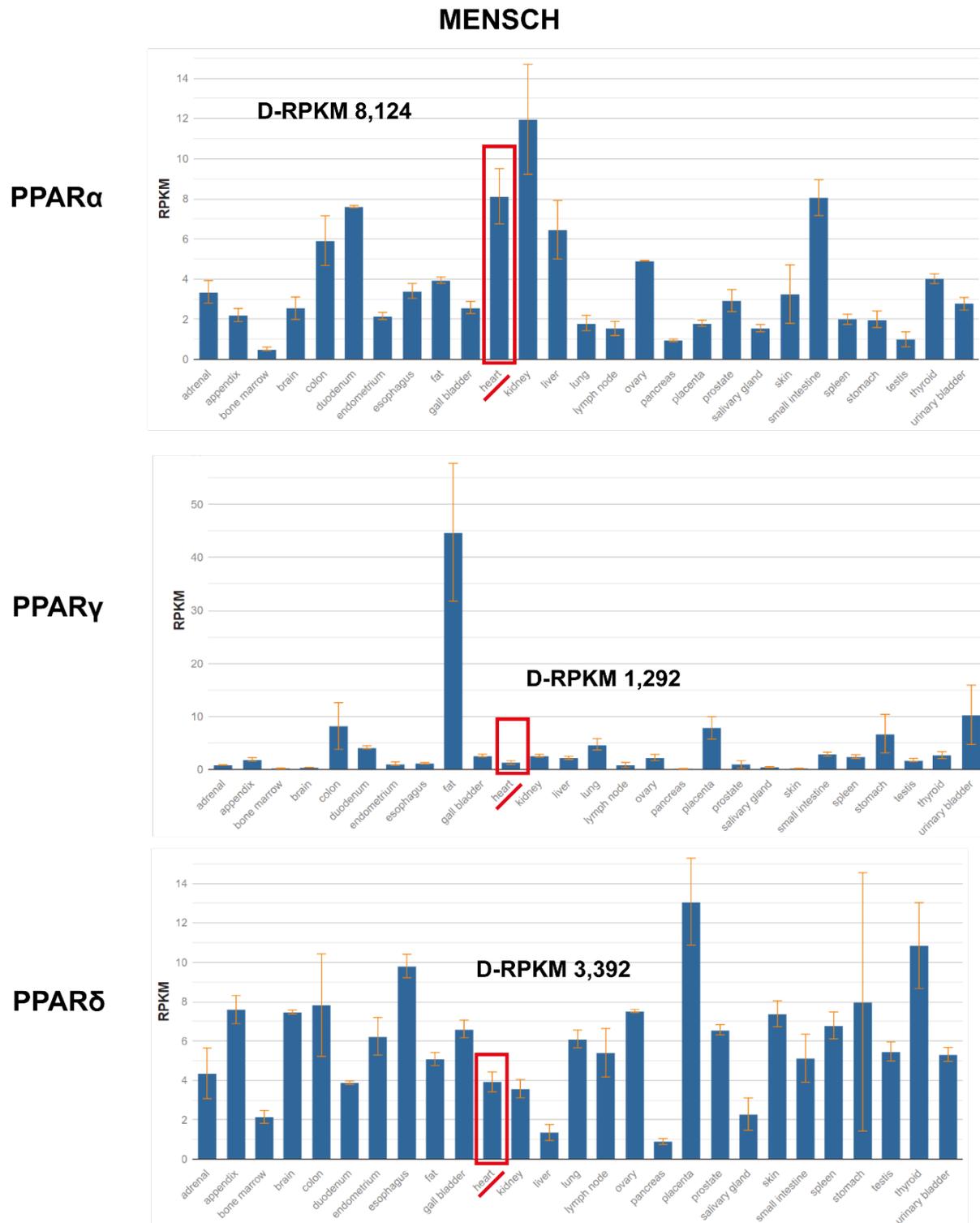


Abb. 1.5 PPAR-Expression in verschiedenen Geweben im Menschen.

Beschriftung: D-RPKM Durchschnittliche Reads Per Kilo base per Million mapped reads

Adaptiert von [104].

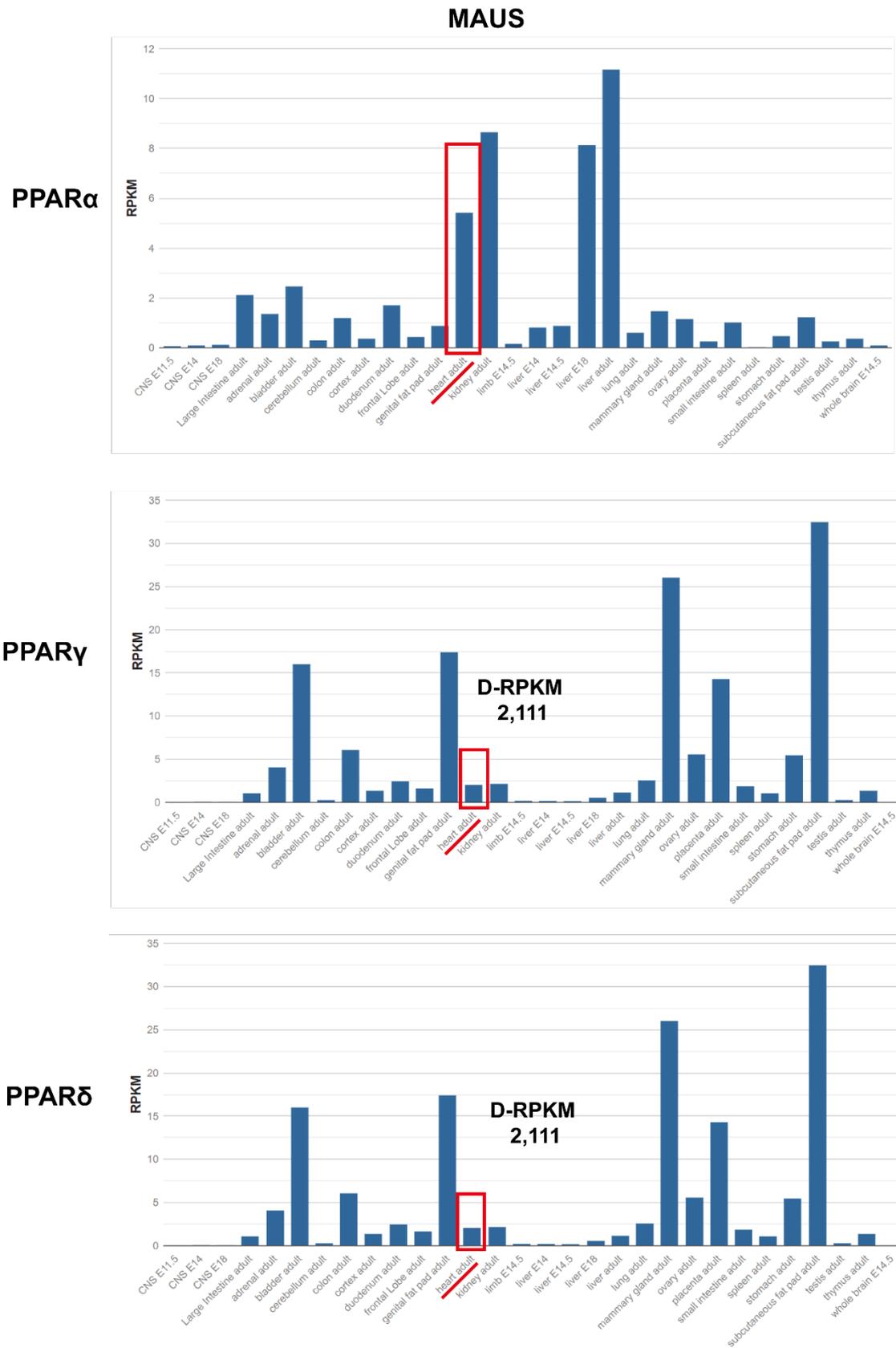


Abb. 1.6 PPAR-Expression in verschiedenen Geweben in der Maus.

Beschriftung: D-RPKM Durchschnittliche Reads Per Kilo base per Million mapped reads

Adaptiert von [105].

1.6 PPAR-Aktivierung als Therapieoption für Herzinsuffizienz

Die Daten zur Bedeutung von PPAR bei Herzinsuffizienz sind vielfältig und teils widersprüchlich. Im Menschen konnte von *Goldenberg et al.* gezeigt werden, dass die Einnahme des pan-PPAR-Agonist Bezafibrat [106] zu einer moderaten Reduktion der Gesamtmortalität nach 16 Jahren führte [107]. In einem Mausmodell des Barth-Syndroms konnte ebenfalls durch die Gabe von Bezafibrat die systolische Funktion erhalten und die Entwicklung einer Kardiomyopathie verhindert werden [108]. Beim Barth-Syndrom handelt es sich um eine Mutation im Taffazin-Gen, die zu in einer dilatativen Kardiomyopathie führt [108].

Für die Aktivierung von PPAR γ durch Thiazolidindione ist die Datenlage widersprüchlich [109–111]. In einer Meta-Analyse von *Lago et al.* konnte gezeigt werden, dass sowohl Pioglitazone als auch Rosiglitazone das Risiko einer Exazerbation der Herzinsuffizienz erhöhen können, aber nicht zu einer vermehrten kardiovaskulären Mortalität führen [110]. Dieser Effekt wurde hauptsächlich durch eine vermehrte Flüssigkeitseinlagerung im Körper erklärt [110]. In einer randomisierten, kontrollierten Studie von *Bhatt et al.* mit metabolischem-Syndrom-Patienten konnte die Gabe von Rosiglitazone innerhalb von zwölf Monaten die kardiovaskuläre Mortalität nicht verbessern, jedoch kam es auch zu keinem Fall einer akuten Dekompensation der Herzinsuffizienz [111]. In einer kleinen Studie von *van de Meer et al.* konnte zudem gezeigt werden, dass die Gabe von Pioglitazone zu einer Verbesserung der linksventrikulären diastolischen Funktion sowie zu einer verbesserten Glukoseaufnahme führte [109].

Obwohl es aktuell laut *clinicaltrials.gov* keine klinischen Studien zum Einsatz von PPAR α -Agonisten bei Herzinsuffizienz gibt [112], werden Medikamente mit einer Wirkung an diesem Rezeptor doch seit Jahren zur Lipidsenkung in Form von Fibraten eingesetzt [113]. In einer *Cochrane*-Metanalyse konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Fibraten die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten gesenkt werden konnte [114]. In einer anderen Metaanalyse war die kardiovaskuläre Mortalität durch Fibrate allerdings erhöht [115]. Nach dem Ausschluss von Clofibrat aus der Analyse konnte keine erhöhte Mortalität durch Fibrate mehr festgestellt werden, aber auch keine Verbesserung [115].

Insbesondere ist zu der Rolle von PPAR δ bei Herzinsuffizienz im Menschen wenig bekannt. Einen Hinweis auf eine positive Wirkung konnte in einer kleinen Studie mit

Patienten, die unter einer diabetischen Kardiomyopathie litten, durch die Gabe von Telmisartan gezeigt werden [116]. Telmisartan ist ein ARB, der einen Teilagonismus am PPAR δ -Rezeptor aufweist [116]. Durch die Gabe dieses Medikaments konnte eine Verbesserung von echokardiographischen Parameter erreicht werden [116].

1.7 ISO-vermitteltes kardiales Remodeling

Ein wichtiger Mechanismus bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz sind kardiales Umbauvorgänge, das sog. Remodeling. Der Begriff wurde bereits 1982 von *Hochman et al.* genutzt, um kardiales Prozesse nach einem Myokardinfarkt zu beschreiben, die zur Ausdünnung und Dilatation des Myokards führen [117]. Heutzutage wird der Begriff breiter genutzt und bezeichnet eine Vielzahl von Veränderungen im Herzen [118]. Dazu gehören u. a. die Ausbildung von Fibrose, Inflammation und Hypertrophie, Störungen im Kalzium-Signaling der Kardiomyozyten, Zellapoptose/-nekrose oder die Veränderung der Herzarchitektur und geometrischen Konfiguration, wie z. B. Dilatation [119,120].

Im Weiteren soll nun auf kardiales Remodelingprozesse eingegangen werden, die insbesondere im Modell des ISO induzierten Schadens eine Rolle spielen.

Inflammation

Eine kardiales Entzündungsreaktion (= Inflammation) kann zu Fibrose und Hypertrophie im Herzen und schließlich zu Herzinsuffizienz führen. Aus diesem Grund kann die Entstehung der kardialen Hypertrophie als eine komplexe Inflammationsreaktion verstanden werden [121]. Durch eine Schädigung des Herzens, z. B. durch Drucküberladung, kommt es zu einer vermehrten Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) im Herzgewebe [122].

Dies führt zur Aktivierung und Mobilisierung von Immunzellen, wie z. B. Makrophagen. Die TNF α -Produktion wird zu einem großen Teil von diesen übernommen, jedoch kann die Stimulation mit TNF α zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen führen [123]. Zudem kann das Ausmaß der Makrophageninvasion als Surrogat für den Inflammationsstatus eines Gewebes dienen [124], da eine vermehrte Schädigung des Herzens zu einer verstärkten Invasion führt [125].

Kann diese Inflammationsreaktion nicht ausreichend aufgelöst werden, kommt es schließlich zu einer dauerhaften Schädigung des Herzens, z. B. in Form von Fibrose

und kardialer Dysfunktion [126]. Die kurzfristige Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen ist allerdings wesentlich für die initiale Heilung des Herzens [127], erst die chronische Aktivierung führt zu negativen Umbauprozessen [128].

PPAR haben einen Einfluss auf Inflammation im Herzen. So konnten *Devchand et al.* zeigen, dass PPAR α -Knock-Out-Mäuse (KO) eine ausgeprägtere Inflammationsreaktion zeigen als Wildtyp-Mäuse (WT), vermittelt über den Leukotrien-B4-Signalweg [129]. Durch die Gabe von Fenofibrat konnten kardiale Inflammationsmarker, wie z. B. Vascular-Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) oder IL-6, in unterschiedlichen Mausmodellen gesenkt werden [130,131].

Durch die Gabe eines PPAR γ -Agonisten kann eine Inflammationsreaktion und daraus resultierende Hypertrophie in Kardiomyozyten über den Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Signalweg abgemildert werden, wie *Yamamoto et al.* zeigen konnten [132]. Es gibt jedoch Studien, die eine pro-inflammatorische Wirkung von PPAR γ insbesondere auf Makrophagen und die Produktion von Interleukinen (IL) hinweisen [133].

Schließlich konnten für PPAR δ -Aktivierung ebenfalls anti-inflammatorische Eigenschaften gezeigt werden [134,135]. *Planavila et al.* konnten zeigen, dass PPAR δ und NF- κ B miteinander interagieren [134]. Zudem kann PPAR δ die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von TNF α in isolierten Kardiomyozyten über den NF- κ B Signalweg abschwächen [135].

Fibrose

Eine anhaltende inflammatorischen Reaktion kann schließlich zu einer dauerhaften Schädigung des Herzens in Form von Fibrose führen [126]. Als kardiale Fibrose wird die Akkumulation von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, wie z. B. Kollagene, Fibronectin oder Matrixmetalloproteinase, beschrieben. Das neu gebildete Gewebe verliert an Funktion und kann als eine Art „Narbe“ im Herzen betrachtet werden [136]. Zudem kommt es zu einem Untergang von Kardiomyozyten [136]. Bei der Herzinsuffizienz im Menschen, insbesondere bei der HFpEF, spielt die Entstehung von Fibrose ebenfalls eine wegweisende Rolle. Das Ausmaß der Fibrose korreliert mit der Schwere der HFpEF und kann bereits bei Patienten mit erhöhtem Risiko für diese Erkrankung nachgewiesen werden [137]. Somit kann Fibrose schon vor Diagnosestellung auf eine HFpEF hindeuten [137].

Insbesondere Kollagene tragen eine wesentliche Rolle bei diesen Umbauvorgängen und können interstitiell, also zwischen den Kardiomyozyten, oder perivaskulär angereichert sein [136]. Dies resultiert schließlich in einer vermehrten Steifigkeit des Herzens und dadurch zu einem Funktionsverlust sowohl beim Füllungs- als auch beim Auswurfvorgang des Herzens [118]. Zudem kommt es zu einer gestörten Reizweiterleitung, was die Wahrscheinlichkeit für Arrhythmien erhöht [138]. Schließlich kann eine erhöhte Menge an Extrazellulärmatrixproteinen zu einer Verschiebung der Kardiomyozyten führen und zur Abnahme der Muskelschichten, was schließlich zu einer Dilatation des Ventrikels führen kann [136].

Viele Faktoren tragen zu der Fibroseentwicklung im Herzen bei, wie z. B. chronische Inflammation, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [97] oder aber ein Ungleichgewicht von Matrixmetalloproteinasen zu deren Inhibitoren [118]. Wichtige Signalwege, die an der Entstehung von kardialer Fibrose beteiligt sind, sind u. a. der Transforming Growth Factor β (TGF β) und Wnt (*Wingless* und *Int-1*) Signalweg [139–143]. Bei der Aktivierung des TGF β -Rezeptors kommt es zu einer Bindung und Phosphorylierung verschiedener Smad-Proteine [141]. Diese binden an eine spezifische Sequenz im Nucleus und aktivieren die Transkription von pro-fibrotischen Zielgenen [141]. Der ebenfalls an Fibrose beteiligte Wnt-Signalweg stellt eine komplexe Signalkaskade mit vielfältigen Regulationsmöglichkeiten dar [141–143]. Stark vereinfacht bedingt die Bindung von Wnt an seinem Rezeptor Frizzled eine Phosphorylierung von *Low-Density-Lipoprotein-Receptor-Related Proteins* (LRPs) [141]. Diese LRPs führen zu einem Ausbleiben einer Phosphorylierung, Stabilisierung und damit Akkumulation von β -Catenin im Nucleus, was schließlich zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt [141]. Die TGF β - und Wnt-Signalwege sind eng miteinander verbunden, weshalb die Inaktivierung eines der Wege meist nicht zu einem vollständigen Stopp der Fibroseentstehung führt [141].

PPAR-Agonisten können ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Entwicklung kardialer Fibrose haben. So konnten *Zhang et al.* in einem Rattenmodell mit Angiotensin-Converting Enzyme 2 Deletion zeigen, dass durch die Gabe von Irbesartan, das agonistisch am PPAR γ -Rezeptor wirkt, eine anti-fibrotische Wirkung entfaltet werden kann [144]. Dieser Mechanismus wurde über eine Hemmung des TGF β -Signalweges durch den PPAR γ -Agonismus erklärt [144]. Die Aktivierung des PPAR α/γ -Signalweges durch Fenofibrat hatte ebenfalls anti-fibrotische Wirkung in

einem Angiotensin-II-Infusionsmodell über eine Verminderung der Inflammation [130]. Zudem konnte in einem Modell mit einer herzspezifischen Überexpression von PPAR α gezeigt werden, dass PPAR α in einem transversen Aortenkonstriktions Modell (TAC) anti-fibrotische Wirkungen hat. Bei diesem Modell wird die Aorta zwischen der linken und rechten Arteria subclavia mit einem Faden ligiert und dadurch eine druckvermittelte kardiale Hypertrophie induziert. Durch die Gabe eines PPAR α -Liganden, Wy-14643, konnten anti-fibrotische Effekte beobachtet werden [145]. Die herzspezifische Überexpression von PPAR δ wirkt ebenfalls anti-fibrotisch, wie *Liu et al.* zeigen konnten [146].

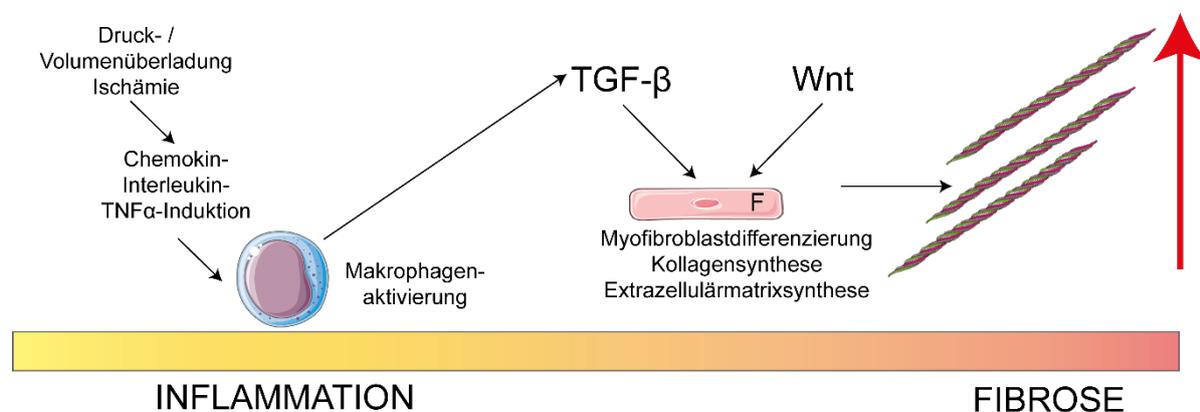


Abb. 1.7 Schema der Fibroseentstehung.

Beschriftung: F Fibroblasten, TGF- β Transforming Growth Factor β . Adaptiert von [136].

Pathologische Hypertrophie

Ein weiterer Mechanismus, der zum kardialen Remodeling im Rahmen des ISO-induzierten kardialen Schadens gerechnet wird, ist die Herzhypertrophie. Dabei kommt es zu einer Zunahme nicht nur des Kardiomyozytendurchmessers, sondern auch zu einer Zunahme der Größe der Herzwände und -masse insgesamt. Eine Zunahme der linksventrikulären Masse geht mit einem erhöhten Risiko einher, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben [147]. Es gibt zwei Phänotypen, die voneinander unterschieden werden müssen: Die pathologische und physiologische Hypertrophie [148].

Bei der pathologischen Hypertrophie kommt es neben der Größenzunahme auch zu einem Untergang von Kardiomyozyten sowie im Verlauf zur Ausbildung von Fibrose [148]. Zudem nutzt das Herz als Energiequelle statt der oxidativen Phosphorylierung von Fettsäuren vermehrt Glukose als Hauptsubstrat [149]. Des

Weiteren kommt es zur Aktivierung des sog. „fetalen Genprogrammes“ und damit zur Sezernierung von atrialem natriuretischen Peptid (ANP), natriuretisches Peptid Typ B (BNP) sowie der fetalen Variante der schweren Kette der Myosine (*β Myosin Heavy Chain* (β -MHC)) [148]. Schließlich ist diese Art der Hypertrophie nicht/kaum reversibel und es kann im Verlauf zu einer Dilatation des Ventrikels kommen [148]. Zwei Arten der pathologischen Hypertrophie können unterscheiden werden: Die konzentrische Hypertrophie, die klassischerweise mit einer Druckbelastung des Ventrikels in Verbindung gebracht wird (z. B. durch Hypertonie) sowie die exzentrische Hypertrophie, die eher mit einer Volumenbelastung assoziiert wird (z. B. durch eine Klappenerkrankung) [150].

1.8 Induktion von physiologischer kardialer Hypertrophie durch C16:1n7

Abzugrenzen von der pathologischen Hypertrophie ist die physiologische Hypertrophie. Hier kann es ebenfalls zu einer exzentrischen oder konzentrischen Größenzunahme kommen, jedoch ist diese mit Verschwinden des Stimulus reversibel [151]. Auslöser einer physiologischen Hypertrophie im Menschen sind beispielsweise Schwangerschaft, Kraft- oder Ausdauersport. Zudem kommt es zu keiner bis geringfügigen Einschränkung oder sogar Verbesserung der Herzleistung durch diese Hypertrophieform [151,152]. Es kommt zu keiner vermehrten Produktion von ANP, BNP oder β -MHC [148,153] und das Herz nutzt weiter Fettsäuren als Hauptenergiequelle [154]. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal ist jedoch, dass es durch die physiologische Hypertrophie nicht zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität kommt [155].

Auch durch die molekularen Mechanismen, die durch die jeweilige Hypertrophieform ausgelöst werden, können die beiden Hypertrophieformen voneinander abgegrenzt werden. Da es zu der Beeinflussung einer Vielzahl von Signalwegen kommt (wie z. B. gp130/JAK/STAT, Heat Shock Transcription Factor 1), soll auf einen spezifisch hingewiesen werden, der essentiell für die physiologische Hypertrophie ist: Den Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1) Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Akt mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (IGF-1/PI3K/Akt/mTOR) Signalweg [148]. Bei dem IGF-1/PI3K/Akt/mTOR Signalweg wird zuerst der IGF-1-Rezeptor, der in der Lipidmembran der Zelle lokalisiert ist, durch IGF-1 aktiviert. IGF-1 ist ein aus der Leber stammendes Hormon und führt zu einem Wachstum der Zelle bzw. des Zielorgans. Dieser Rezeptor

aktiviert das Enzym PI3K, das schließlich Akt phosphoryliert, ein Kennzeichen der physiologischen Hypertrophie [156]. Im Anschluss phosphoryliert Akt zudem noch mTOR. Zusammengenommen führt die Aktivierung dieses Signalweges zu einer verstärkten Proteinsynthese und einer Zunahme der Zellgröße [12,148].

Auch C16:1n7 ist mit der Entstehung von physiologischer kardialer Hypertrophie assoziiert, wie Publikationen von *Riquelme et al.* und *Foryst-Ludwig et al.* zeigen konnten [9,12].

Riquelme et al. untersuchten den Einfluss von freien Fettsäuren im Plasma in einem Tigerpython-Modell der kardialen Hypertrophie [12]. Bei der Nahrungsaufnahme, die nur selten erfolgt, entwickelt der Tigerpython eine ausgeprägte, reversible kardiale Hypertrophie [12]. Es kommt u. a. zur Phosphorylierung von Akt und mTOR, was auf eine vermehrte Proteinsynthese schließen lässt [12]. Zudem kommt es zu einem 52-fachen Anstieg der Triglyceride und 3-fachem Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma des Python ohne Anzeichen einer verstärkten Einlagerung oder Lipotoxizität im Herzen [12].

Das Plasma des gefütterten Pythons wurde auf neonatale Rattenkardiomyozyten gegeben, die ebenfalls eine Hypertrophie ausbilden, ohne vermehrte Expression von Genen, die mit pathologischer Hypertrophie assoziiert sind [12]. Diese Ergebnisse konnten anschließend durch einen Fettsäurenmix mit C16:1n7, C16:0 sowie Myristinsäure (C14:0) reproduziert werden [12]. Da insbesondere C16:0 einen negativen Effekt auf das Herzen hat, schlussfolgerten die Autoren, dass die protektiven Eigenschaften hauptsächlich auf C16:1n7 zurückzuführen sind [12]. Schließlich wurde dieser Fettsäurenmix Mäusen für sieben Tage infundiert, die daraufhin ebenfalls eine kardiale Hypertrophie ohne Aktivierung des fetalen Genprogrammes, Fibrose oder vermehrter Lipidspeicherung entwickelten [12].

Foryst-Ludwig et al. konnten die Beteiligung der Fettsäure C16:1n7 an der Entstehung von physiologischer Hypertrophie bestätigen [9]. Mäuse mit einem fettkörperspezifischen KO der Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (*Atgl*), einem der Schlüsselenzyme der Lipolyse und somit verantwortlich für die Freisetzung von freien Fettsäuren ins Plasma, wurden einem 4-wöchigen Laufbandtraining zur Induktion von physiologischer Hypertrophie unterzogen [9]. Die KO-Mäuse zeigten eine verminderte Freisetzung von freien Fettsäuren nach dem Training sowie eine verminderte

Hypertrophie des Herzens. Zudem war auch die Fettsäureaufnahme im Herzen in den KO-Tieren stark vermindert [9].

Der von *Riquelme et al.* publizierte Fettsäuremix wurde auf die HL-1 Zelllinie gegeben, in der dadurch ebenfalls eine Hypertrophie induziert werden konnte [9]. Durch die Gabe von ausschließlich C16:1n7 konnte eine Größenzunahme induziert werden [9]. Wurde C16:1n7 aus diesem Mix entfernt, so blieb diese aus [9]. In einer Lipidomanalyse des Plasmas der Mäuse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zeigte nur C16:1n7 eine signifikante Regulation, die auch mit den biologischen Effekten korrelierte [9].

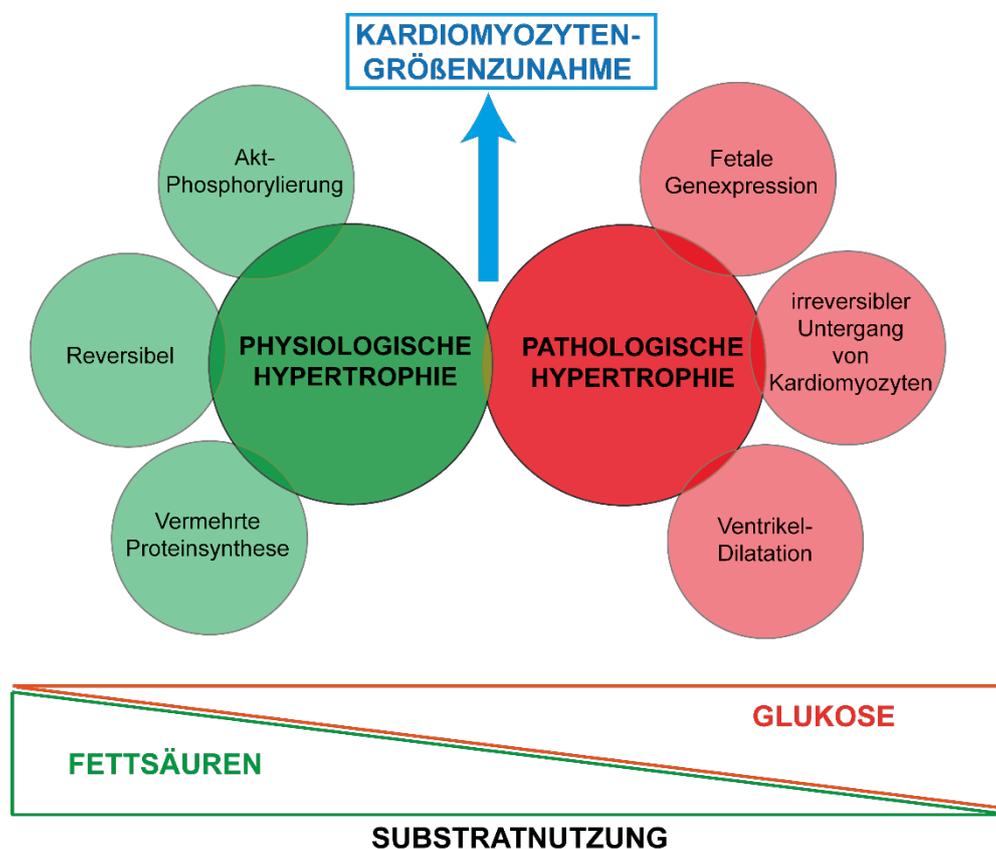


Abb. 1.8 Übersicht über Veränderungen während physiologischer und pathologischer Hypertrophie. Adaptiert von [157].

1.9 Hypothese und Zielsetzung

C16:1n7 ist in unterschiedlichen experimentellen Modellen an der Entstehung einer physiologischen Hypertrophie beteiligt. Diese scheint u. a. über dem IGF-1/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelt zu sein. Welche weiteren Signalwege jedoch aktiviert werden, ist bislang unklar. Des Weiteren ist bisher nicht untersucht, ob die Fettsäure C16:1n7 die Fähigkeit hat, vor der Entstehung eines pathologischen Remodeling des Herzens, das von Inflammation, Fibrose und Hypertrophie begleitet ist, zu schützen.

Das Ziel der Arbeit war es, die Effekte einer Stimulation mit C16:1n7 in primären murinen Kardiomyozyten *in vitro* auf transkriptioneller Ebene zu charakterisieren. Mit diesen Daten sollten Vorhersagen getroffen werden, wie eine Stimulation mit C16:1n7 protektive Effekte *in vivo* ausüben könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit C16:1n7 das Expressionsprofil von primären Kardiomyozyten beeinflusst. Aufgrund der Sequenzierungsergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Fettsäure anti-fibrotisch am Herzen wirkt. Dies wurde im ISO-Modell, einem *in vivo* kardialen Schädigungsmodell, das mit einer ausgeprägten subendokardialen Fibroseausbildung einhergeht, untersucht. In einem letzten Schritt wurden die *in vitro* identifizierten Signalwege *in vivo* am Herzen überprüft. Als sekundärer Endpunkt wurde aufgrund der publizierten Ergebnisse zur Rolle von C16:1n7 in der physiologischen Hypertrophie die Ausbildung von pathologischer Hypertrophie im ISO-Modell untersucht.

2 Material

2.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
-80 °C Gefrierschrank	Electrolux (Stockholm, SWE)
Badthermostat Lauda Alpha A6	Lauda Dr. R. Wobser (Lauda-Königshofen, D)
cBot™ 2 Cluster Generation System	Illumina Inc. (San Diego, USA)
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Curix 60 Processor	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, B)
Emmi 20 HC Ultraschallreinigungsgerät	EMAG GmbH & Co. KG (Salach, D)
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Feinwaage Analytic AC 210 P	Sartorius Ag (Göttingen, D)
Galaxy Mini Tischzentrifuge	VWR (Radnor, USA)
Heizkissen	Sanitas (Uttenweiler, D)
Homogenisator Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Illumina HiSeq® 1000	Illumina Inc. (San Diego, USA)
Inkubator Heracell™ 150	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott AG (Mainz, D)
Klappbares Thermometer	Omnilab Laborzentrum (Bremen, D)
Laborabzug 2-453-DXNO	Köttermann GmbH (Uetze/Hänigsen, D)
Laminar Airflow Clean Bench (Holten)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Magnetrührer MST basic C	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Mikroskop CK40	Olympus (Tokyo, J)
Mikroskop Fluorescence Biorevo BZ-9000	Keyence Corp. (Osaka, J)
Mikroskop MZ12.5	Leica (Biberach, D)
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss (Oberkochen, D)
Multipipette® Stream	Eppendorf AG (Hamburg, D)
MX400 Ultrahochfrequenz Linear-Array Schallkopf	FUJIFILM Visualsonics (Toronto, CAN)
Nanodrop® ND-1000 Spektrophotometer	Peq-Lab, Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Neo Accupette 3-9905	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, D)
Pannoramic MIDI II Slide Scanner	3DHistech (Budapest, HUN)
pH-Meter pH211	Hanna Instruments (Vöhringen, D)
PowerPac™ 300 Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Schlauchpumpe Reglo	IDEX Corporation (Lake Forest, USA)
Schwingschüttler KS 260 basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
SIL 06 - Infrarotlampe	Sanitas (Uttenweiler, D)
SpeedMill Plus Homogenisator	Analytik Jena AG (Jena, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Tierkäfig Typ II IVC	Ehret Labor- und Pharmatechnik (Wandlitz, D)
Tierwaage	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Vevo 3100 Imaging Plattform	FUJIFILM Visualsonics (Toronto, CAN)
Vortex-Genie® 2T	Scientiis (Baltimore, USA)
Waage BL 150 S	Sartorius Ag (Göttingen, D)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich (Kirchlengern, D)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich (Kirchlengern, D)
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich (Kirchlengern, D)

2.2 Laborequipment

Equipment	Hersteller
„Standard Pattern“ Pinzette, versch. Größen	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)

20 G Kanüle, modifiziert (abgestumpft; Einkerbung nach 2mm zum Faden befestigen)	B. Braun Melsungen (Melsungen, D)
Amersham Hybond PVDF	GE Healthcare (Chicago, D)
Bechergläser und andere Glaswaren versch. Größen	Schott AG (Mainz, D)
Chir. Schere, 41 mm Schneidekante, l = 12 cm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Criterion™ Blotter	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Criterion™ Empty Cassettes	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Criterion™ Sample Loading Guide	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Criterion™ Vertical Electrophoresis Cel	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Deckgläser, rund	VWR (Radnor, USA)
Descosept®	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)
Doppelwandige Glastrichter	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Einwegpipetten 5ml	VWR International (Radnor, USA)
Gehärtete Schere, 24 mm Schneidekante, 8,5 cm Länge	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Glasheizspirale	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Glass Pasteurpipetten	VWR International (Radnor, USA)
Glass Proteasereservoir	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Graefe Pinzette, 0,8 mm gebogene Spitze	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Irispinzette, Spitzenbreite 0,6 mm, l = 7 cm, gerade, verzahnt	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Irisschere, 13 mm Schneidekante, l = 8,5 cm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Kanülen, Spritzen	B. Braun Melsungen (Melsungen, D)
Kryo Tubes	Nunc (Roskilde, DK)
Luftblasenfalle	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Mersilene Ligatur geflochten Sutupak 3-0	Ethicon Inc. (Somerville, USA)
Metallständer mit Klammern	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Mikrotiterplatte	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Mikrotiterplatte	Corning Inc. (New York, USA)
Moria Irispinzette, Spitzenbreite 0,5 mm, l = 10cm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D)
Mr. Frosty™ Einfriercontainer	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Objektträger	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Parafilm® M Barrier Film	SPI supplies (West Chester, USA)
Pipetierhilfe für Pipetboy, 1–50 ml	VWR International (Radnor, USA)
Polyester Siebgewebe 200 µm	Klein & Wieler oHG
RNaseZap™	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Rotilabo® Spritzenfilter	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tygon Schläuche versch. Größen	Havard Apparatus GmbH (March-Hugstetten, D)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Inc. (New York, USA)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Zentrifugationsröhrchen, Pipetten, Pipettenspitzen, Mikroreaktionsgefäß	BD, Sarstedt, Eppendorf, VWR, Falcon

2.3 Lösungen, Medien, Kits

Lösung, Medium, Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Amersham Hyperfilm ECL und ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Chicago, USA)
BCA Protein Assay Reagenz	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)

Dako fluoreszierendes Befestigungsmedium	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (PBS)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Fetal Bovine Serum #TMS-016	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
G153A+B Entwickler	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, B)
G354 Rapid Fixierer	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, B)
innuSPEED Lysis Tube P	Analytik Jena AG (Jena, D)
M-MLV Reverse Transcriptase # M1701	Promega Corp. (Fitchburg, USA)
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus # M3681	Promega Corp. (Fitchburg, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #26619 und #26616	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, D)
Proteinase K	Qiagen (Hilden, D)
QIAshredder Spin Column	Qiagen (Hilden, D)
QIAzol	Qiagen (Hilden, D)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
RNase-freies DNase Set	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy® MicroKit	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy® MiniKit	Qiagen (Hilden, D)
Transparenter Nagellack	Essence Global (London, GB)
TruSeq™ RNA and DNA Library Preparation Kits	Illumina Inc. (San Diego, USA)
Trypanblau Lösung 0,4 %	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Trypsin/EDTA (T/E)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom AG (Berlin, D)
Acrylamid/bis (30 %)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
Albumin (BSA)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Albumin (fettsäurefrei)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Aquasonic 100 Ultraschallgel	Parker Laboratories, Inc. (Fairfield, USA)
Bepanthen	Bayer AG (Leverkusen, D)
Bromphenolblau Natrium Salz	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
Calciumchlorid (CaCl)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor	Roche Holding AG (Basel, CH)
D-Glukose	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Diacetymonoxim (BDM)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O)	Hepta-Hydrat Merck KGaA (Darmstadt, D)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
Eselserum	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ethanol 96 %	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Fibronektin	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Forene 100 % (Isofluran)	Abbott (Chicago, USA)

Formaldehyd	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Gelatine aus Rinderhaut	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Glycin	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Heparin-Natrium 25.000 IE/5 ml	Ratiopharm (Ulm, D)
Isopropanol, ≥ 99.5 % Reinheit	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Isoproterenol Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogencarbonat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Kollagenase Typ II #LS004176, Lot-#45A15450 265 U	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA)
Laminin	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ * 7H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Methanol	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
NaCl 0,9 % ad injectionem	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, D)
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumdisulfat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumfluorid (NaF)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Noradrenalin [(±) Arterenol]	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Nukleosidtriphosphat (dNTP)	Promega Corp. (Fitchburg, USA)
PageRuler™ Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Palmitoleinsäure (C16:1n7)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
PhosSTOP Inhibitor Tabletten	Roche Holding AG (Basel, CH)
Pikro-Siriusrot Färbung	Morphisto (Frankfurt am Main, D)
Power SYBR® Green PCR Mastermix	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Random Primer	Promega Corp. (Fitchburg, USA)
Reinstwasser (dd H ₂ O)	Biochrom AG (Berlin, D)
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega Corp. (Fitchburg, USA)
Spektra 360 Elektrodengel	Parker Laboratories, Inc. (Fairfield, USA)
Taurin	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Tris-Base	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Trypsin-Inhibitor Typ I-S, aus der Sojabohne	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Tween 20®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Veet Haarentfernungscreme	Reckitt Benckiser (Slough, UK)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)

2.5 Zell- und Mauslinien

Die HL-1 wurde bereitgestellt durch W. C. Claycomb (ehemals Louisiana State University, LA). Die PMK wurden aus C57BL/6JRj Mäusen (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, F) isoliert. Für den Tierversuch wurden 129/Sv Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, F) genutzt.

2.6 Lösungen und Puffer

HL-1 Zellkultur

Alle Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers [158] und unter einer Sterilbank nach hygienischer Händedesinfektion hergestellt.

Gelatine-Fibronektin-Lösung	0,1 g	Gelatine
	2,5 ml	Fibronektin
	0,5 l	ddH ₂ O
Es werden 0,1 g Gelatine in eine mit 500ml ddH ₂ O gefüllte Glasflasche gegeben und autoklaviert. In diese 0,02 % Stammlösung werden 2,5 ml Fibronektin gegeben und aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
10 mM Noradrenalin-Stammlösung (steril filtriert)	0,59 g	Ascorbinsäure
	0,080 g	Noradrenalin
	100 ml	ddH ₂ O
In 100 ml ddH ₂ O werden 0,59 g Ascorbinsäure und 0,080 g Noradrenalin gegeben, mit einem 0,2 µm Spritzenfilter steril filtriert und aliquotiert. Lagerung bei -20 °C gelagert, monatlich frisch herstellen.		
Claycomb-Medium+	87 ml	Claycomb-Medium
	10 ml	FBS
	1 ml	Penicillin/Streptomycin
	1 ml	L-Glutamin (200 mM)
	1 ml	10 mM Noradrenalin-stammlösung
Die Reagenzien zusammengenommen und bei 4 °C für max. 2 Wochen in lichtgeschützt gelagert.		
Claycomb-Medium- (Claycomb-Hungermedium)	87 ml	Claycomb-Medium
	0,5 ml	FBS
	1 ml	Penicillin/Streptomycin
	1 ml	L-Glutamin (200 mM)
Die Reagenzien zusammengenommen und bei 4 °C, max. 2 Wochen lichtgeschützt lagern.		
BSA-Stammlösung	1 mg	Fettsäurefreies Albumin
	10 ml	PBS
Das fettsäurefreie Albumin wurde in PBS gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
C16:1n7-Stammlösung	100 mg	Palmitoleinsäure
	1 ml	1M NaOH
	9 ml	BSA Stammlösung
Das NaOH wird auf 70 °C erwärmt und das C16:1n7 hinzugegeben. Die Lösung zügig in die BSA Stammlösung überführen und im Wasserbad bei 55 °C für 15–30 min sonifizieren, bis sich die Fettsäure komplett löst. Dann die C16:1n7 Stammlösung unter einer Sterilbank steril filtrieren, den Schaum verwerfen, aliquotieren und bei -20 °C für 6 Monate verwenden.		

PMK-Zellkultur

Perfusions-Stammlösung	7,884 g	Natriumchlorid
	0,351 g	Kaliumchlorid
	0,082 g	Kaliumdihydrogenphosphat

	0,161 g	Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat
	0,296 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
	2,383 g	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
	3,753 g	Taurin
	1 l	dd H ₂ O
Alle Reagenzien in dd H ₂ O geben und rühren, bis die festen Inhaltsstoffe vollständig gelöst sind. Die Lösung in Reaktionsgefäße abfüllen und für max. 1 Monat bei -4 °C lagern.		
Perfusionslösung (PL)	400 ml	Perfusions-Stammlösung
	0,242 g	Diacetylmonoxim
	0,4 g	D-Glukose
Die PL für jede Isolation frisch zubereiten. Die Stammlösung auftauen und die Reagenzien unter Rühren langsam zugeben. PH auf 7,46 einstellen und die PL gekühlt aufbewahren.		
Kollagenaselösung	70 ml	PL
	70 mg	Kollagenase Typ II
	0,7 µg	1 M Kalziumstammlösung
Die Lösungen und die Kollagenase mischen, vor Licht schützen und bis zur Verwendung kühlen.		
Stopplösung	2,25 ml	PL
	0,25 ml	FBS
	3,12 µl	1 M Kalziumstammlösung
Die PL mit dem FBS mischen und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung lagern.		
Lamininlösung	1 ml	PL (steril filtriert)
	25 µl	Laminin
Das Laminin in PL lösen und auf mit Deckgläschen gefüllte Mikrotiterplatte geben und 1 h inkubieren.		

Western Blot

RIPA-Puffer (= <i>Radioimmuno-precipitation assay buffer</i>)	5 ml	1 M Tris-HCL pH 8,0
	17,5 ml	4 M NaCl
	5 g	10 % SDS
	2 ml	250 mM EDTA pH 7,4
	1 ml	250 mM EGTA pH 8,0
	419,9 mg	200 mM NaF
	2,5 ml	200 mM Na ₃ VO ₄
	5 ml	Triton x-100
	0,5 g	Na-Deoxycholat
	49,65 ml	d H ₂ O
Tris-HCl (6,055 g in 50 ml), NaCl (11,688 g in 50 ml), SDS (5 g in 50 ml), EDTA (930,6 mg für 10 ml), EGTA (951 mg in 10 ml), NaF (83,98 mg in 10 ml), Na ₃ VO ₄ (367,82 mg in 10 ml) in Wasser lösen. Die restlichen Reagenzien hinzufügen und bei -20 °C lagern.		
	50 ml	RIPA-Puffer

RIPA-Puffer+ (= mit Proteasen- und Phosphataseninhibitor)	1 Tablette	cOmplete™, Mini Protease Inhibitor
	5 Tabletten	PhosSTOP Inhibitor
Die Tabletten im RIPA-Puffer lösen und bei -20 °C lagern.		
Sammelgelpuffer	6,0 g	Tris-Base
	0,1 l	d H ₂ O
Wasser hinzugeben und mit HCl auf pH = 6,8 einstellen.		
Trenngelpuffer	36,3 g	Tris-Base
	0,2 l	d H ₂ O
Wasser hinzugeben und mit HCl auf pH = 8,8 einstellen.		
Trenngel (10 %)	9,07 ml	d H ₂ O
	5 ml	Trenngelpuffer
	200 µl	10 % SDS
	6,6 ml	Acrylamid BIS 30 %
	100 µl	10 % APS
	10 µl	TEMED
Alle Reagenzien zusammengeben. In ein mit Alkohol gereinigte, abgedichtete Glasplatten in einer Einspannvorrichtung luftblasenfrei geben und unter Isopropanol aushärten.		
Sammelgel	6,1 ml	d H ₂ O
	2,5 ml	Sammelgelpuffer
	100 µl	10 % SDS
	1,3 ml	Acrylamid/BIS
	100 µl	10 % APS
	12 µl	TEMED
Alle Reagenzien zusammengeben. Auf das ausgehärtete Trenngel geben und den Probenkamm einsetzen. Nach dem Aushärten in feuchte Tücher und Alufolie wickeln und max. 24 h bei 4 °C lagern.		
6x Probenpuffer	7 ml	1 M Tris-HCl Ph = 6,8
	1 g	SDS
	3 ml	Glycerol
	0,93 g	Dithiothreitol
	60 µl	Bromphenolblau 2 %
Alle Reagenzien zusammengeben, aliquotieren und bei -20 °C lagern.		
Elektrophoresepuffer	3,03 g	Tris-Base
	14,4 g	Glycin
	10 ml	10 % SDS
	1 l	dd H ₂ O
Alle Reagenzien in Wasser zusammengeben und bei Raumtemperatur lagern.		
Towbin-Puffer	3,03 g	Tris-Base
	14,4 g	Glycin
	5 ml	10 % SDS
	0,2 l	Methanol
	0,8 l	d H ₂ O

In Wasser lösen und pH = 9,0 einstellen.		
TBST (= Tris-buffered saline with Tween)	2,42 g	Tris-Base
	8,0 g	NaCl
	1 ml	Tween 20®
	1 l	dd H ₂ O
Wasser hinzugeben und mit HCl auf pH = 8,8 einstellen.		

2.7 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Artikelnummer	Ursprung	Dilution	Hersteller
Anti-ACSL1	#4047	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-CD31	#ab28364	Kaninchen	1:200	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-CPT1B	#SAB1300662	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-Desmin	#4024	Kaninchen	1:200	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-PPAR δ	#sc-74517	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)
Anti-Vimentin	#ab92547	Kaninchen	1:200	Abcam (Cambridge, UK)
Anti- α -Actinin	#A7811	Maus	1:2500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti- β -Actin	#sc-81178	Maus	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)

Sekundäre Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Artikelnummer	Ursprung	Dilution	Hersteller
AlexaFluor488-anti-Maus	# A-11001	Esel	1:400	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	#62248	Ø	1:1000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
AlexaFluor488-anti-Kaninchen	# A-11008	Esel	1:400	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
AlexaFluor594-anti-Kaninchen	# A-11012	Esel	1:200	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Anti-Maus, verknüpft mit Meerrettich-peroxidase	#7076	Esel	1:1000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-Kaninchen, verknüpft mit Meerrettichperoxidase	#7074	Esel	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Cyanin3-Anti-Kaninchen	#A10520	Esel	1:100	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

2.8 Primer

Alle Primer wurden von TIB Molbiol (Berlin, D) bezogen.

Gen	Protein	Sequenz
<i>Acs1</i>	Acyl-CoA Synthetase-1	For 5' – CTC ACC ACC TTC Tgg TAT gC Rev 5' – AgC CAT CgT ACA Tgg TTC Tg
<i>Actb</i>	β -Actin	For 5' – gAC Agg ATg CAg AAg gAg ATT ACT g Rev 5' – gCT gAT CCA CAT CTg CTg gAA

<i>Angptl4</i>	Angiopoetin like Faktor 4	For 5' – AgC TCA TTg gCT TgA CTC CC Rev 5' – gAA gTC CAC AgA gCC gTT CA
<i>Cd68</i>	Cluster of Differentiation 68	For 5' – AAT gTg TCC TTC CCA CAg gCA g Rev 5' – AgA gCA ggT CAA ggT gAA CAg C
<i>Col1a1</i>	Kollagen Typ I, $\alpha 1$	For 5' – CTg ACg CAT ggC CAA gAA gA Rev 5' – ATA CCT Cgg gTT TCC ACg TC
<i>Col4a1</i>	Kollagen Typ IV, $\alpha 1$	For 5' – CTg gCA CAA AAg ggA CgA g Rev 5' – ACg Tgg CCg AgA ATT TCA CC
<i>Cpt1b</i>	Carnitine Palmitoyltransferase 1B	For 5' - CCC ATg TgC TCC TAC CAg AT Rev 5' – CCT TgA AgA AgC gAC CTT Tg
<i>Hilpda</i>	Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated	For 5' – CgT gCA ggA TCT AgC AgC A Rev 5' – Cag Tgg gCT CTC Cag TAA gC
<i>Nppa (Anf)</i>	Atriales natriuretisches Peptid	For 5' – Agg AgA AgA TgC Cgg TAg AAg A Rev 5' – gCT TCC TCA gTC TgC TCA CTC A
<i>Pdk4</i>	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4	For 5' – AAA CCg TCC TTC CTT gAC CC Rev 5' – AAA CCA gCC AAA ggg gCA TT

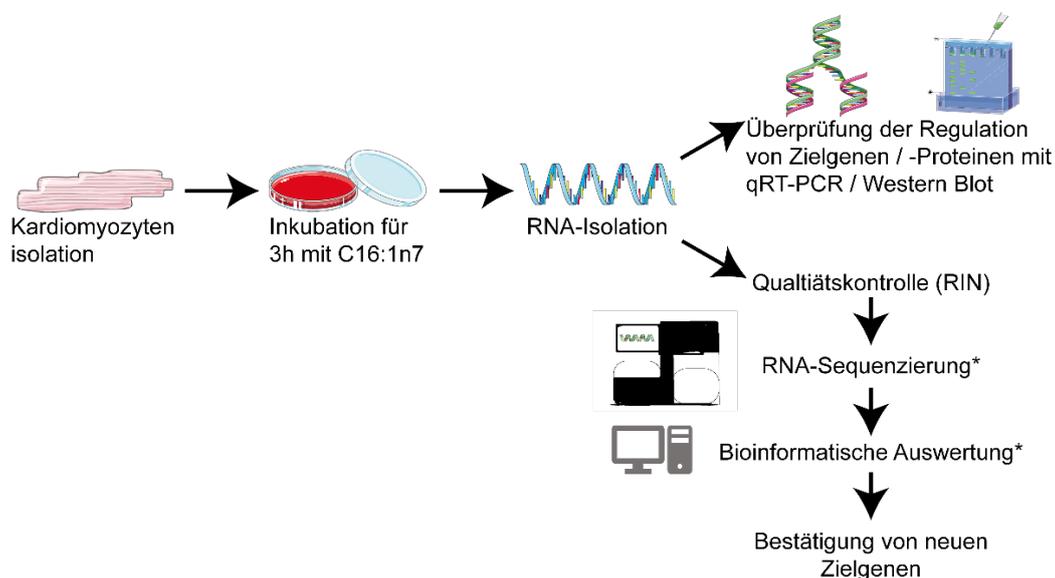
2.9 Computerprogramme

Software/Tools	Hersteller
Adobe Illustrator CC 2017	Adobe Inc. (San Jose, USA)
Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
BZ-II Analyzer Software	Keyence Corp. (Osaka, J)
Case Viewer Version 2.3	3DHistech (Budapest, HUN)
ConsensusPath DB (CPDB) [159]	Max Planck Institute for Molecular Genetics (München, D)
Graph Pad Prism © 6	GraphPad (San Diego, USA)
IBM SPSS Statistics 25	IBM Corp. (Armonk, USA)
ImageJ [160]	National Institutes of Health (USA)
Primer-BLAST [161]	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
R Studio Version 3.3.3 [162]	The R Foundation for Statistical Computing
Vevo 3100 Imaging System	FUJIFILM Visualsonics (Toronto, CAN)
VevoLAB Version 3.1.0	FUJIFILM Visualsonics (Toronto, CAN)
VevoStrain	FUJIFILM Visualsonics (Toronto, CAN)
Windows Office © 2013, 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media (Fairfax, USA)

3 Methoden

3.1 *in vitro* Methoden

Untersucht wurde der Effekt der Fettsäure C16:1n7 auf die transkriptionelle Regulation des Herzens mittels einer Zellkultur von primären murinen Kardiomyozyten (PMK). Die transkriptionellen Veränderungen wurden mit einer RNA-Sequenzierung untersucht und in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum München durchgeführt (Prof. Dr. Henriette Uhlenhaut, Arbeitsgruppe „Molekulare Endokrinologie“ am Institut für Diabetes und Adipositas des Helmholtz-Zentrum München). Zur Validierung wurden Vor- und Bestätigungsversuche an HL-1 Zellen und PMK durchgeführt.



* In Kooperation mit dem Helmholtzzentrum München

Abb. 3.1 Versuchsaufbau des *in vitro* Teils.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, qRT-PCR Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion, RIN RNA Integrity Number.

3.1.1 Zellkulturen

Alle Experimente erfolgten in einem Labor mit der Sicherheitsstufe S1. Die Arbeitsschritte fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die verwendeten Chemikalien und Materialien wurden autoklaviert. Nicht autoklavierbare Gegenstände wurden mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (offenes System bei 5 % CO₂, 37 °C, Luftfeuchtigkeit 95 %). Die Primärzellkultur der PMK erfolgte getrennt von der Sekundärzellkultur der HL-1 Zellen.

3.1.2 HL-1 Zelllinie

Bei der HL-1 Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte Zellkultur aus einem atrialen Maustumor. Die Zellen zeichnen sich unter anderem durch ihre Kontraktions- und Passagierfähigkeit aus. Ihre Ultrastruktur ähnelt zudem der von Kardiomyozyten aus dem Vorhof und sie weisen eine ähnliche Genexpression von herzspezifischen Genen auf [163]. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass C16:1n7 einen Effekt auf HL-1 Zellen hat, der der *in vivo* Situation ähnelt [9]. Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie für Vor- und Bestätigungsversuche genutzt.

Kultivierung

Die Handhabung der Zellen entspricht den Empfehlungen des Herstellers [158]. Zu Beginn wurden die bei -80 °C gelagerten HL-1 Zellen in eine vorgewärmte, mit Claycomb-Medium+ befüllte Kulturflasche gegeben. Nach etwa 3 h wurde das Medium gewechselt und die eigentliche Kultivierung wurde begonnen. Die Kultivierung der HL-1 Zellen erfolgte in auf 37 °C erwärmtes Claycomb-Medium+. Die Kulturgefäße wurden mit Gelatine-Fibronektin-Lösung beschichtet. Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz passagiert und das Medium regelmäßig gewechselt.

Das Passagieren erfolgte durch Waschen der Zellen in erwärmtem PBS (37 °C), Zugabe von 1 mL 0,05 % T/E und Inkubation für 2 min. Das alte T/E-Medium wurde abgesaugt, die Trypsinierung mit frischem T/E-Medium wiederholt und schließlich durch die Zugabe von 1 mL Sojabohnen-Trypsininhibitorlösung (0,025 g/100 mL ddH₂O, sterilfiltriert) beendet. Die Suspension wurde in einem Zentrifugationsröhrchen bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Claycomb-Medium+ resuspendiert und in Kulturgefäße je nach Zweck aufgeteilt und weiter kultiviert. Das Einfrieren der Zellen erfolgt analog zum Passagieren. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in Einfriermedium aus FBS mit 10 % DMSO. Die Zellsuspension wurde in ein Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Stimulation

Zur Stimulation wurden die Zellen wie in Punkt „Kultivierung“ beschrieben passagiert und das erhaltene Zellpellet wurde in Claycomb-Medium+ resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Mikrotiterplatte verteilt, je 1 mL pro Well. Die Kultivierung wurde fortgesetzt, bis die Zellen eine Konfluenz von 70 % erreichten. Um

eine Beeinflussung durch das FBS vorzubeugen, wurden das Kulturmedium Claycomb-Medium+ durch Claycomb-Medium- über Nacht ausgetauscht. Die Vitalität der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch beurteilt. Die C16:1n7- und BSA-Stammlösung (Kontrolle) wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (470 μM) der Stammlösungen wurden in jedes Well mit frischen Hungermedium gegeben und für 3,6 oder 24 h stimuliert. Nach Beendigung der Stimulationszeit wurden die Platten bis zur weiteren Verarbeitung mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis gelagert.

3.1.3 Primäre Maus-Kardiomyozyten (PMK)

Die weiteren Stimulationsexperimente wurden mit PMK durchgeführt. Hierbei handelt es sich um adulte Zellen, die frisch aus dem Herzen isoliert werden. Aus diesem Grund ist ihre Ultrastruktur sowie die Genexpression der *in vivo* Situation noch ähnlicher [164]. Zudem können sowohl ventrikuläre wie atriale Kardiomyozyten verwendet werden [164–167]. Die Isolation der PMK erfolgte nach einem Ethikvotum des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (Antrag G0234/15) sowie in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetzes. Alle Prozeduren waren in Übereinstimmung mit der „Charité-Tierschutz-Richtlinie“ der Charité Universitätsmedizin Berlin [168].

Aufbau der retrograden Perfusionsapparatur

Die PMK wurden mittels einer retrograden Perfusionsmethode, auch Langendorff-Isolation genannt [166], isoliert. Es wurde ein modifiziertes Protokoll einer publizierten Isolationsmethode verwendet [169]. Für die Perfusion wurden zwei Glastrichter, die mit PL oder Kollagenaselösung befüllt waren, genutzt.

Da die Kollagenase II lichtempfindlich ist, wurde dieser Trichter mittels Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt. Durch das Abklemmen der ableitenden Schläuche konnten die beiden Lösungen getrennt voneinander abgeleitet werden. Um sicherzustellen, dass keine Luftblasen in den Lösungen verbleiben, wurden die Lösungen durch eine gläserne Luftblasenfalle geleitet. Zusätzlich wurden die Lösungen erwärmt und durch das konstante Wärmen aller Glasteile der Apparatur auf ca. 37 °C gehalten. Zur Isolation wurde das kanülierte Herz am Ende der Apparatur mit beiden enzymhaltigen Lösungen durchströmt. Dabei löst sich der Gewebeverband

des intakten Herzens und es wurden Kardiomyozyten gewonnen. Vor und nach jeder Isolation wurde die Langendoff-Apparatur mit Alkohol (70 % EtOH) und destilliertem Wasser zur Reinigung gespült. Anschließend wurden die Flüssigkeit in ein letztes gläsernes Reservoir weitertransportiert, an das das kanülierte Herz angehängt werden konnte. Vor und nach jeder Isolation wurde die Apparatur mit Alkohol und destilliertem Wasser gereinigt.

Isolation

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 8 Wochen alte männliche C57BL/6JRj Mäuse, die in einem 12 h Hell- Dunkel Zyklus in einem temperaturkontrollierten Trakt bei 25 °C gehalten wurden. Die Mäuse erhielten eine Standarddiät (Zusammensetzung: 58 % kcal aus Kohlenhydraten, 33 % kcal aus Proteinen, 9 % kcal aus Fetten, Hersteller: Ssniff) und Leitungswasser ad libitum.

Die Isolationen fanden immer morgens zwischen 8:00 und 10:00 Uhr statt, um zirkadiane Effekte zu minimieren. Die Mäuse erhielten 100 IE Heparin intraperitoneal 10 min vor der Tötung durch Isoflurannarkose und zervikaler Dislokation. Nach der Tötung erfolgte eine zügige Entnahme des Herzens. Nach grober Entfernung des umgebenden Fett- und Lungengewebes wurde das Herz in eiskalte Kanülierungslösung (PL mit 0,1 mM Ca) gegeben und anschließend unter dem Mikroskop weiter präpariert. Schließlich wurde die Aorta kanüliert und mit einem Prolene-Faden fixiert. Abschließend wurde das Herz luftblasenfrei mit Kanülierungslösung durch die Kanüle gespült, an der es fixiert wurde.

Danach wurde das Herz an die retrograden Perfusionsapparatur angehängt, ca. 9 min bei einem Tropfen pro Sekunde mit PL gespült und danach mit der Kollagenaselösung verdaut, bis es weich und blass war. Der Verdau erfolgte durch die retrograde Perfusion sowie von außen durch Eintauchen des Herzens in ein mit Kollagenaselösung gefülltes Becherglas.

Das Herz wurde schließlich auf Klappenebene von der Kanüle abgetrennt und in ein Becherglas mit Stopplösung gegeben. Das Herz wurde anschließend mittels Schere zerkleinert und mit Pasteurpipetten in Einzelzellsuspension gebracht. Schließlich wurde die Suspension durch ein Sieb in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, die Zellen sedimentierten und der Überstand wurde verworfen. Unter dem Mikroskop bei

40-facher Vergrößerung wurde die Quantität der stabförmigen Kardiomyozyten überprüft, anschließend wurde mit dem Kalziumaufbau begonnen.

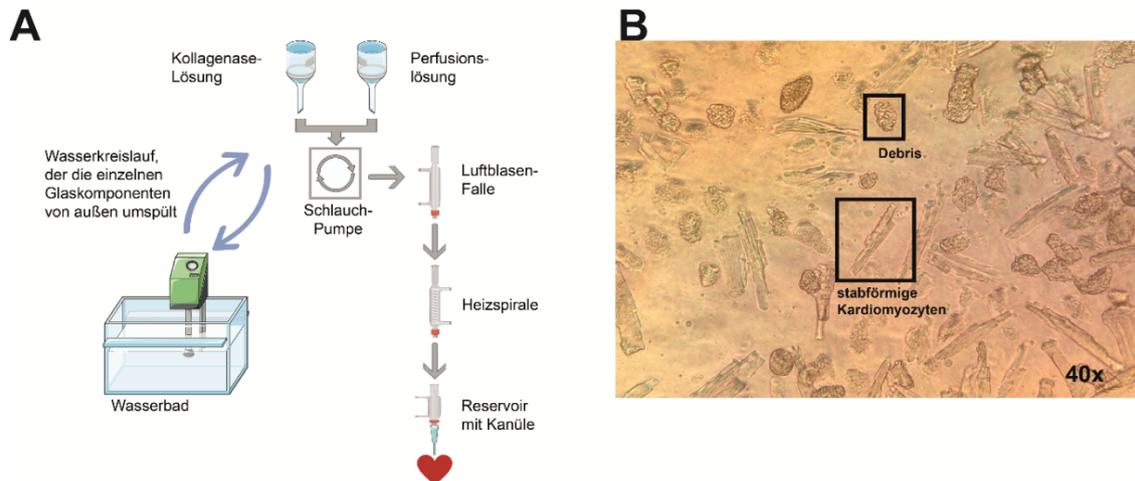


Abb. 3.2 Isolation der primären murinen Kardiomyozyten (PMK).

A Aufbau der retrograden Perfusionsapparatur. **B** Lichtmikroskopische Aufnahme der PMK in Medium bei 40-facher Vergrößerung.

Kalziumaufbau, Stimulation und Ernte

Der Kalziumaufbau bestand aus drei Schritten und erfolgte unter einer Sterilbank. Für alle Schritte wurde die isolierte PMK-Zellsuspension für 2 min bei 32 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in dem entsprechenden Medium resuspendiert, 10 min inkubiert, zentrifugiert und schließlich im nächsthöheren Schritt resuspendiert. Im 1. Schritt wurde das Zellpellet in 0,1 mM Kalzium-PL mit 10 % FBS resuspendiert, dann in 0,5 mM ohne FBS (2. Schritt) und abschließend in 1 mM (3. Schritt) Kalzium-PL ohne FBS resuspendiert.

Die Zellzahl wurde nach Schritt 3 mittels Neubauerzählkammer und Trypanblaufärbung (1:1 Verdünnung) anhand der Formel in Abbildung 3.3 bestimmt.

$$\frac{\text{Zellen in allen neun Quadraten}}{9} \times 10^4 \times 2 = \text{Zellzahl pro ml}$$

Abb. 3.3 Formel zur Berechnung der Zellzahl mit Neubauerzählkammer.

Zur Stimulation wurde eine beschichtete Mikrotiterplatte genutzt und mindestens 500.000 Zellen pro Nöpfchen in 37 °C vorgewärmtes Claycomb-Medium mit entweder

12 µl/ml C16:1n7- (entspricht 470µM) oder BSA-Stammlösung (Kontrolle) ausgesät. Aufgrund der geringen Zellausbeute bei den Isolationen konnten keine Triplikate gebildet werden. Anschließend wurden die PMK für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Die Vitalität der PMK wurde nach Beendigung der 3h Inkubation mikroskopisch beurteilt. Die Ernte erfolgte durch Überführung der PMK mit Medium in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis. Nach Zentrifugation für 2 min bei 125 g und 4 °C und Verwerfen des Überstands wurden die Zellen mit 0,5 mL PBS unter einer Sterilbank gewaschen. Das Zentrifugieren (2 min, 125 g, 4 °C) wurde wiederholt, der PBS-Überstand verworfen und das PMK-Pellet bei -80 °C weggefroren.

3.1.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die PMK wurden nach dem 3. Kalziumaufbauschritt auf mit Lamininlösung beschichtete Deckgläschen in eine Mikrotiterplatte gegeben und in Claycomb-Medium+ für 18 h inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und für 10 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung für 5 min mit PBS-T (0,1 % Triton-X in PBS) und anschließend wurden die PMK in 10 % Eseserum (1 ml Eseserum auf 9 ml PBS) über Nacht geblockt.

Nach dem Blocken wurde der primäre Antikörper (Konzentration s. Kapitel 2.8) in 10 % Eseserum für 1 h auf die permeabilisierten PMK gegeben und anschließend mit PBS dreimal für 15 min gewaschen. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers in 10 % Eseserum wurde dieser für 1 h inkubiert und die Waschschriffe danach wiederholt. Abschließend wurde die Zellen 10 min mit DAPI-Farbstoff für eine Zellkernfärbung inkubiert und wie oben beschrieben gewaschen.

Die Deckgläschen mit den angefärbten PMK wurden mittels fluoreszierendem Befestigungsmedium (1 Tropfen) auf einem Objektträger befestigt und nach Trocknung an den Rändern mit Nagellack fixiert.

3.1.5 Western Blot

Probenvorbereitung

Die HL-1 Zellen bzw. PMK wurden analog zu dem beschriebenen Protokoll kultiviert und geerntet (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Die Zellen wurden in RIPA-Puffer+

suspendiert und direkt bei -20 °C gefroren (PMK) oder mit dem Zellschaber abgeschabt (HL-1) und dann ebenfalls gefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 30 sec bei 40–50 % sonifiziert und für 30 min bei 4 °C bei 20160 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels *BCA Protein Assay Reagent Kit* nach Herstellerprotokoll gemessen [170]. Zur Eichung erfolgte die Messung einer Verdünnungsreihe und die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm. Die für die Proben bestimmten Proteinkonzentrationen wurden hinzugegeben, um die Proben mit RIPA-Puffer und 6-fachem Puffer so zu verdünnen, dass alle Proben das gleiche Volumen und die gleichen Menge Protein enthielten. Anschließend wurden die Proben durchmischt, 1 min bei 20160 g und Raumtemperatur zentrifugiert, bei 95 °C für 5 min denaturiert und bei -20 °C weggefroren.

Gelherstellung, Elektrophorese mittels diskontinuierlicher SDS-Page (= sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), Tank-Blotting, Immunodetektion und Auswertung

Das Herstellen der Acrylamid-Trenn- und Sammelgele erfolgte ein Tag vor der Elektrophorese, um sicherzustellen das die Polymerisierungsreaktion abgeschlossen war. Mittels Probenkämme wurden Taschen im Gel gebildet, in die die Proben später pipettiert wurden. Die Proben wurden vorsichtig in die vorbereiteten Probenaschen im Sammelgel pipettiert und zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proben ein passender *Ladder* mitgeführt.

Dem Sammeln der Proben bei 100 V für 10–20 min folgte das Auftrennen nach Größe bei 150 V. Nach ausreichender Bandentrennung wurden die Proteinbanden vom Gel auf eine PVDF-Membran überführt (*Blotting*). Hierzu wurde das Gel auf die in Methanol aktivierte Membran gegeben und in eine Criterion™-Vorrichtung gespannt. In gekühltem Towbinpuffer erfolgte das *Blotting* bei 100 Volt für 60 min.

Anschließend wurde die Membran in 5 % BSA in TBST (5 g BSA auf 100 ml TBST) für 3 h auf einem Schüttler geblockt, um unerwünschte Proteinbindungen zu vermeiden. Nach dem Blocken wurde der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Waschschrift (3 x 15 min) mit TBST erfolgte die Zugabe eines passenden sekundären Antikörpers. Dieser wurde für 1 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und es folgte ein weiterer

Waschschritt. Die PVDF-Membran wurde mit chemilumineszenter Lösung (ECL) behandelt. Die ECL wurde aus Lösungen 1 und 2 1:1 hergestellt. Die Detektion des Proteinsignal erfolgte mittels Filmprozessor in einer Dunkelkammer.

Auf dem entwickelten Film wurde die gesuchte Proteinband gesucht und densitometrisch mittels dem Programm ImageJ ausgewertet. Der Film wurde eingescannt und mittels ImageJ 8-bit Modus in ein schwarz-weißes Bild konvertiert. Mit der Rechteck-Auswahl wurde ein Rechteck generiert, dass die Proteinbande eng umrandet. Mit der Gelanalysefunktion wurde dieses Rechteck vervielfältigt und jede Bande umrandet. Mit der *Plot Lanes* und der *Magic Wand* Funktion wurden die Banden schließlich quantifiziert. Um das Hintergrundrauschen bei der Quantifizierung zu berücksichtigen, wurde das Rauschen manuell abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Normalisierung zu dem Referenzprotein β -Actin.

3.1.6 RNA-Isolation

Die Aufarbeitung der HL-1 Zellen gelöst in Qiazol erfolgte nach Herstelleranweisung des RNeasy® Mini Kits von Qiagen mit RNase-freiem DNase-Set.

Das PMK-Pellet wurde in mit β -Mercaptoethanol zugewetztem Puffer gelöst und in QIAshredder Gefäßen zentrifugiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde das Lysat mit einem RNeasy® Microkits mit RNase-freiem DNase Set und Proteinase K Verdau weiterverarbeitet.

Das Herz wurde in mit β -Mercaptoethanol versetztem Puffer gelöst, in Lysegefäßen mit Keramikperlen gefüllt und in einem Homogenisator (30 sec bei 1500 RPM) aufgeschlossen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit einem RNeasy® Microkits mit RNase-freiem DNase Set und Proteinase K Verdau nach Herstellerangaben.

Am Ende jeder RNA-Isolation wurden die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gefroren.

3.1.7 cDNA Synthese

Die Qualität und Menge der RNA wurde vor der cDNA-Synthese spektralphotometrisch mittels NanoDrop gemessen. Pro Mikroreaktionsgefäß wurde genau die Menge an RNA gegeben um nach der cDNA-Synthese eine Konzentration von 20 ng/ μ L cDNA zu erhalten. Die RNA wurde zusammen mit ddH₂O und *Random Primer* bei 70 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe ein Mastermix aus

Ribonukleaseinhibitor, ddH₂O, dNTP, reverse Transkriptase bzw. ddH₂O (als Kontrolle) und dem zur reversen Transkriptase passenden Puffer angesetzt und zu den Proben zugegeben. Die Mikroreaktionsgefäße wurden bei 37 °C für 60 min inkubiert und die Proben 1:4 mit ddH₂O verdünnt, um eine Endkonzentration von 5 ng/µl zu erhalten, und bei -20 °C gelagert.

3.1.8 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur quantitativen Bestimmung der Genexpression der verschiedenen Zielgene wurde die qRT-PCR mit dem Cyaninfarbstoff SYBR-Green genutzt. Für alle Messungen wurden technische Triplikate jeder Probe erstellt und das gleiche Thermalprofil verwendet (2 min 50 °C, 10 min 95 °C, dann 40-fach 30 sec 95°C, 30 sec 60 °C, 30 sec 72 °C). Zur Detektion von Kontamination durch Nukleinsäuren wurde Wasser als *non-template control* (NTC) mitgeführt und zur Detektion von DNA-Kontamination wurden RNA Proben ohne reverse Transkriptase quantifiziert

Als Referenzgen wurde β-Actin gewählt, da es in Vorversuchen in HL-1 Zellen und Mausproben stabil exprimiert wurde und zudem in der Literatur für Mausmodelle der Herzinsuffizienz als geeignet angesehen wird [171]. Zur Bestimmung der relativen Veränderungen der Genexpression wurde die 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode angewendet [172].

3.1.9 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Henriette Uhlenhaut (jetzt LMU München) am Institute for Diabetes and Obesity des Helmholtz-Zentrums München (Garching, D) durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Franziska Greulich, Institute for Diabetes and Obesity des Helmholtz-Zentrums München (Garching, D).

Initiale Qualitätskontrolle

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels RNA Integrity Number (RIN) am Agilent2100 Bioanalyser beurteilt. Durch Validierung in Vorversuchen wurde ein RIN-Wert über 8,5 als akzeptabel festgelegt. Es wurde eine RNA-Menge von über 500 ng pro Probe (spektralphotometrisch am NanoDrop gemessen) angestrebt. Nach der Qualitätskontrolle wurden alle Proben auf Trockeneis nach München zur RNA-Sequenzierung verschickt.

RNA Sequenzierung und bioinformatische Auswertung

Durch das Helmholtz-Zentrum München wurde eine RNA-Sequenzierungs-*Library* mit einem *Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit* nach Angaben des Herstellers erstellt [173]. Die Qualitätskontrollen der einzelnen Schritte erfolgte durch einen Illumina HiSeq®. Die *Library* wurde schließlich auf einem Illumina HiSeq® 1000 sequenziert und im Anschluss von Dr. Franziska Greulich mittels R ausgewertet. Nach dem Mapping mit dem Referenzmausgenom erfolgte eine Hauptkomponentenanalyse sowie ein paarweiser Vergleich der Proben.

3.1.10 Overrepresentation-Analyse mittels ConsensusPath DB (CPDB)

Damit die in der Sequenzierung regulierten Gene den zugehörigen Signalwegen zugeordnet werden können, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit der Online Anwendung CPDB ausgewertet. Hierfür wurde das Protokoll 2B für die *Overrepresentation Analysis* von *Herwig et al.* verwendet [174].

Folgende Einstellungen wurden für die Analyse festgelegt: Als Hintergrund wurde *mouse* (Maus) ausgewählt und eine Liste der differentiell regulierten Gene eingegeben. Anschließend wurden die gedoppelten *Enriched Pathway Based Sets* (auf angereicherten Pfaden basierende Sets) entfernt. Dies ist nötig, da dieses Tool mehrere gleiche Signalwege (z. B. TNF) aus verschiedenen Datenbanken (z. B. KEGG und Wikipathways) untersucht.

Danach wurde auf der Seite *Functional annotation of a gene list* (funktionelle Annotation einer Genliste) ein direkter Nachbar der sog. *Network neighborhood-based entity sets (NESTs)* gewählt und die *Gene Ontology Level 2*-NESTs werden aus einem zentralen Protein mit seinen direkten Netzwerknachbarn gebildet. Sie enthalten vier verschiedene Typen von „Nachbarschaft“, bestehend aus entweder Protein-Protein-, biochemischer, genregulatorischer oder genetischer Interaktion [174]. Schließlich wurde das Set visualisiert und manuell angeordnet.

3.2 in vivo Methoden

3.2.1 Versuchsaufbau des Isoproterenol (ISO) Herzfibrosemodells

Der Tierversuch erfolgte nach Ethikvotum des Landesamtes für Gesundheit und Soziales unter dem Antrag G0136/16 und in Übereinstimmung dem deutschen

Tierschutzgesetzes. Alle Prozeduren folgten zudem der „Charité-Tierschutz-Richtlinie“ der Charité Universitätsmedizin Berlin [168].

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 6 Wochen alte 129sv Mäuse. Die Haltebedingungen waren wie folgt: 12 h Hell-Dunkel-Zyklus in einem 25 °C warmen Tierstall bei Standarddiät (Zusammensetzung: 58 % kcal aus Kohlenhydraten, 33 % kcal aus Proteinen, 9 % kcal aus Fetten; Hersteller: Ssniff) sowie Leitungswasser ad libitum. Vor Beginn des Versuches wurden die Tiere 7 Tage im Tierstall akklimatisiert. Die Induktion des kardialen Schadens mit ISO erfolgte nach einem bereits etablierten Protokoll unserer Gruppe [175], das sich an einem anderen publizierten Protokoll orientiert [176].

Es wurden männliche Tiere genutzt, da Vorversuche in diesen Tieren erfolgreich waren [175,177]. Zudem sind geschlechtsspezifische Unterschiede im kardialen Remodeling bekannt [178] und Männchen weisen eine ausgeprägtere kardiale Schädigung auf [179]. Die 129sv Mäuse wurden gewählt, da nicht alle Mausstämme gleich auf ISO-Gabe reagieren [180,181].

Publikationen zeigen, dass das Ausmaß des kardialen Schadens durch die Katecholaminerhöhung vom Alter der Tiere abhängt [182,183]. Da das Alter der Tiere mit dem Gewicht korreliert, wurden die Tiere zu Beginn des Versuches aufgrund der großen Varianz des KG in „schwere“ (= ältere) und „leichte“ (= jüngere) Tiere aufgeteilt. Die „schweren“ Tiere wurden innerhalb der Behandlungsgruppe mit ISO und die „leichten“ innerhalb der Kontrollgruppe mit Wasser randomisiert.

Alle Tiere wurden in identischen Käfigen mit gleicher Ausstattung und in Gruppen von 3–4 Mäusen gehalten. Die ISO- und Kontroll-Tiere (KON) wurden getrennt voneinander gehalten, um Verletzungen durch andere Mäuse während der ISO-Behandlung zu minimieren. Die Tiere der Behandlungsgruppen mit Wasser (H₂O) und C16:1n7 waren innerhalb der Käfige gemischt. Aufgrund der täglichen Behandlungen waren die Tiere für die Behandler während des Versuches nicht verblindet.

Abbruchkriterien für die Tiere wurden vor Beginn festgelegt. Je nach Schweregrad wurde der Tierarzt verständigt, ein Analgetikum (Rimadyl: 5 mg/kgKG s. c.) verabreicht oder die sofortige Tötung veranlasst. Kriterien zur sofortigen Tötung waren Apathie, schwere Atemnot und Gewichtsverlust über 20 % KG. Kriterien zur Tierarztverständigung bzw. Analgetikagabe waren gekrümmte Haltung, leichte

Atembeschwerden, Ödeme, stehende Hautfalten, Zyanose, Entzündungen, Traumata oder Gewichtsverlust >10 % KG.

Die Behandlungsgruppen wurden in zwei Arme eingeteilt, ein kurzer (11 Tage) und ein langer (22 Tage). Während der gesamten Behandlung (11 bzw. 22 Tage) erhielten die Versuchstiere am Morgen entweder H₂O oder C16:1n7 per os (p. o.) für insgesamt 22 bzw. 11 Tage. An Tag 6 erfolgte für 4 Tage die tägliche Injektion mit 25 mg/kgKG/d ISO oder Wasser (KON) subkutan (s. c.), jeweils zur gleichen Tageszeit 3 h nach der C16:1n7-/H₂O-Gabe.

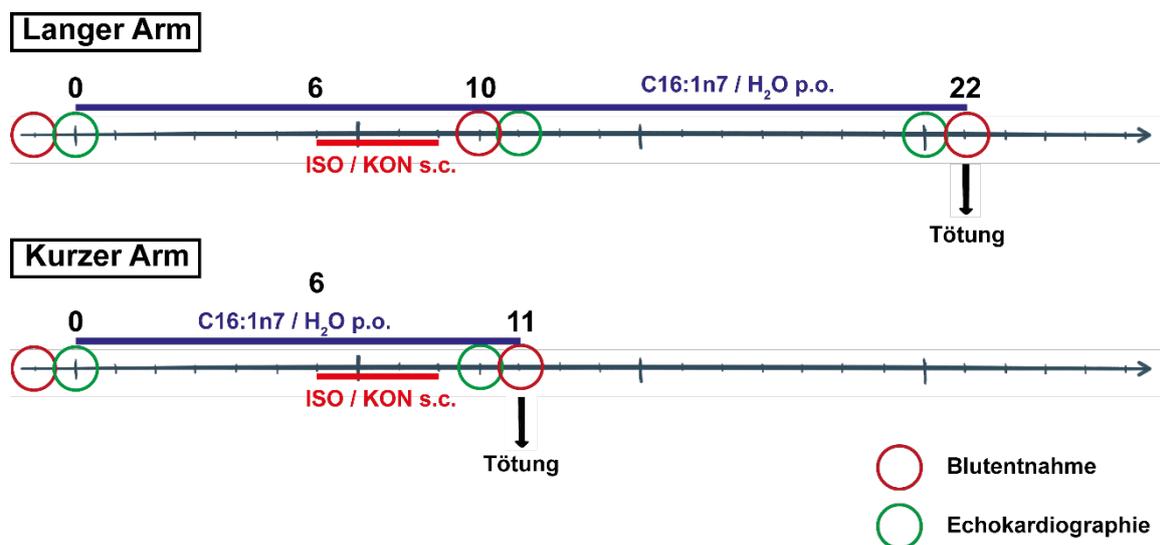


Abb. 3.4 Versuchsaufbau des Modells der Isoproterenol-induzierten kardialen Schädigung.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, H₂O Wasser, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe.

Transthorakale Echokardiographien in Narkose wurden im langen Arm an Tag 0, 11 und 21 und im kurzen Arm an Tag 0 und 10 durchgeführt. Zusätzlich erfolgten retrobulbäre Blutentnahmen in Narkose an Tag -1, 10 und an Tag 22 und im kurzen Arm der Tiere an Tag -1 und 11. Die Tötung erfolgte im langen Arm an Tag 22, im kurzen Arm an Tag 11. Hierzu erhielten die Tiere eine subletale Dosis Isofluran, es erfolgte eine Blutentnahme und schließlich die Tötung mittels zervikaler Disklokation.

3.2.2 Erhebung von Körpergewicht und Organentnahme

Das Gewicht der Tiere wurde mittels Tierwaage zu Beginn des Versuches, wöchentlich und vor jeder Echokardiographie bestimmt.

An Tag 22/11 erfolgte die Organentnahme. Hierzu wurde den Tieren 30 min vor der Tötung eine letzte Gabe H₂O oder C16:1n7 p. o. verabreicht. Nach der Tötung wurden

die Organe durch erfahrene Präparatoren entnommen und präpariert. Die Organe, insbesondere das Herzgewicht (HG) wurden auf einer Feinwaage gewogen. Die Herzspitze wurde für die RNA-Gewinnung genutzt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Ein Herzring für die Histologie wurde kurz unterhalb der Klappenebene gewonnen und in Formalin eingelegt. Das restliche Material wurde für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff asserviert.

3.2.3 Echokardiographie

Bildakquise

Mindestens 22 h nach der letzten ISO-Gabe wurde eine Echokardiographie nach standardisiertem Protokoll durchgeführt [175]. Vor Beginn wurden die Versuchstiere gewogen sowie unter einer Rotlichtlampe gewärmt. Die Wärme wurde nach der Messung fortgesetzt, bis die Tiere sich vollständig erholt hatten. Die Anästhesie wurde in einer luftdichten Kammer mit 3 % Isofluran und einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 80 % eingeleitet. Mit der Echokardiographie wurde begonnen, wenn der Aufrichtreflex der Tiere erloschen war.

Danach wurden sie in Rückenlage auf die beheizte Echokardiographieplattform gelegt, die Extremitäten an die EKG-Elektroden fixiert und die Isoflurannarkose mit einer Isoflurankonzentration von durchschnittlich 1 % aufrechterhalten. Um die Narkosetiefe zu optimieren wurde die Konzentration des Isoflurans kurzzeitig hoch- (ca. 3 %) oder herunterreguliert (aus). Damit wurde eine HF von durchschnittlich 391 bpm ($\pm 33,4$ bpm) erreicht.

Nach Behandlung des Versuchstieres mit einer Enthaarungscreme wurde auf den Thorax vorgewärmtes Sonographiegel gegeben und der Sektorschallkopf auf die Brust der Maus aufgesetzt. Sobald sich die HF stabilisiert hatte, wurden die Aufnahmen in der langen Achse (LAX) erhoben. Hierzu wurde der Tisch um ca. 30° nach links gekippt und der Schallkopf parasternal aufgesetzt, bis der gesamte linke Ventrikel inkl. Aortenwurzel dargestellt werden konnte. Aus diesen B-Mode-Bildern wurden die *Strain*-Werte globaler longitudinaler *Strain* (= *Global Longitudinal Strain* = GLS), der globale radiale *Strain* (= *Global Radial Strain* = GRS) und die dazugehörigen *Strain*-Raten berechnet.

Anschließend wurde der Schallkopf um 90° im Uhrzeigersinn gedreht und auf Höhe der größten linksventrikulären Ausbreitung die Aufnahmen der kurzen Achse (SAX)

erhoben. Aus diesen M-Mode-Bildern wurde die Auswurffraktion (= *Ejection Fraction* = EF), die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (= *Fractional Shortening* = FS), der linksventrikuläre Durchmesser der anterioren Wand (= *Left Ventricular Anterior Wall Diameter* = LVAW), der linksventrikuläre Durchmesser der posterioren Wand (= *Left Ventricular Posterior Wall Diameter* = LVPW), die linksventrikuläre Masse (= LVM) und der linksventrikuläre innere Durchmesser (= *Left Ventricular Inner Diameter* = LVID) berechnet. Aus den B-Mode-Bildern wurde der globale zirkumferentielle *Strain* (= *Global Circumferentiell Strain* = GCS) und die *Strain-Rate* (= *Global Circumferentiell Strain Rate* = GCSR) erhoben. Abschließend wurde die Isoflurannarkose beendet, die Brust der Versuchstiere mit einer Wundsalbe behandelt und die Tiere wurden zurück in den gewärmten Käfig gesetzt.

Bildauswertung

Die Auswertung des Bildmaterials erfolgte unter Verwendung der Software *VevoLab*. Die Berechnung der echokardiographischen Daten erfolgte automatisiert durch das Programm auf Grundlage der Formeln der *American Society of Echocardiography* [184]. Die zweidimensionale *Speckle-Tracking* Echokardiographie wurde mittels des von Visualsonics bereitgestellten Software-Pakets *VevoStrain* ausgewertet.

Zur Auswertung der *Speckle Tracking*-Echokardiographie wurde ein qualitativ hochwertiges B-Mode-Bild (Bildrate > 200 Bilder pro Minute) der LAX verwendet und ein sog. *Tracing* erstellt. Das Endokard wurde dazu manuell markiert und das Epikard durch die Software semiautomatisch nachgezeichnet. Der Beginn des manuellen *Tracings* erfolgte auf midbasalem Niveau des LAX-Bildes, was etwa dem basalen Ende des rechten Ventrikels entspricht (Abb. 3.5 A+B). Die Software errechnete daraus dann Werte für den GLS und den GRS mit *Strain*-Raten über drei Herzaktionen (entspricht drei R-R-Abständen). Für die weitere Auswertung wurden jeweils der sog. *Peak Strain* aus der *Time to Peak*-Analyse der *VevoStrain*-Software verwendet. Pro Versuchstier wurden drei dieser *Tracing*-Analysen angefertigt und Mittelwerte gebildet. Die Analyse des GCS und den GCSR erfolgte analog in einem B-Mode-Bild der SAX. Hierzu wurde das Endokard ebenfalls unter Aussparung der Papillarmuskeln nachgezeichnet und das Epikard anschließend ergänzt (Abb. 3.5 C+D).

Für die HF wurden die aus dem LAX-B-Mode-Bild ermittelten Werte verwendet, für die LVM, EF, FS, LVPW und LVAW wurden M-Mode-Bilder der SAX genutzt. Es wurden

pro Bild mindestens 3 Herzaktionen mittels des *VevoLab-Tools LV-Trace* nachgezeichnet. Anschließend wurde das *Tracing* in zwei weiteren M-Mode-Bildern wiederholt und aus den ermittelten Werten Mittelwerte gebildet (Abb. 3.6).

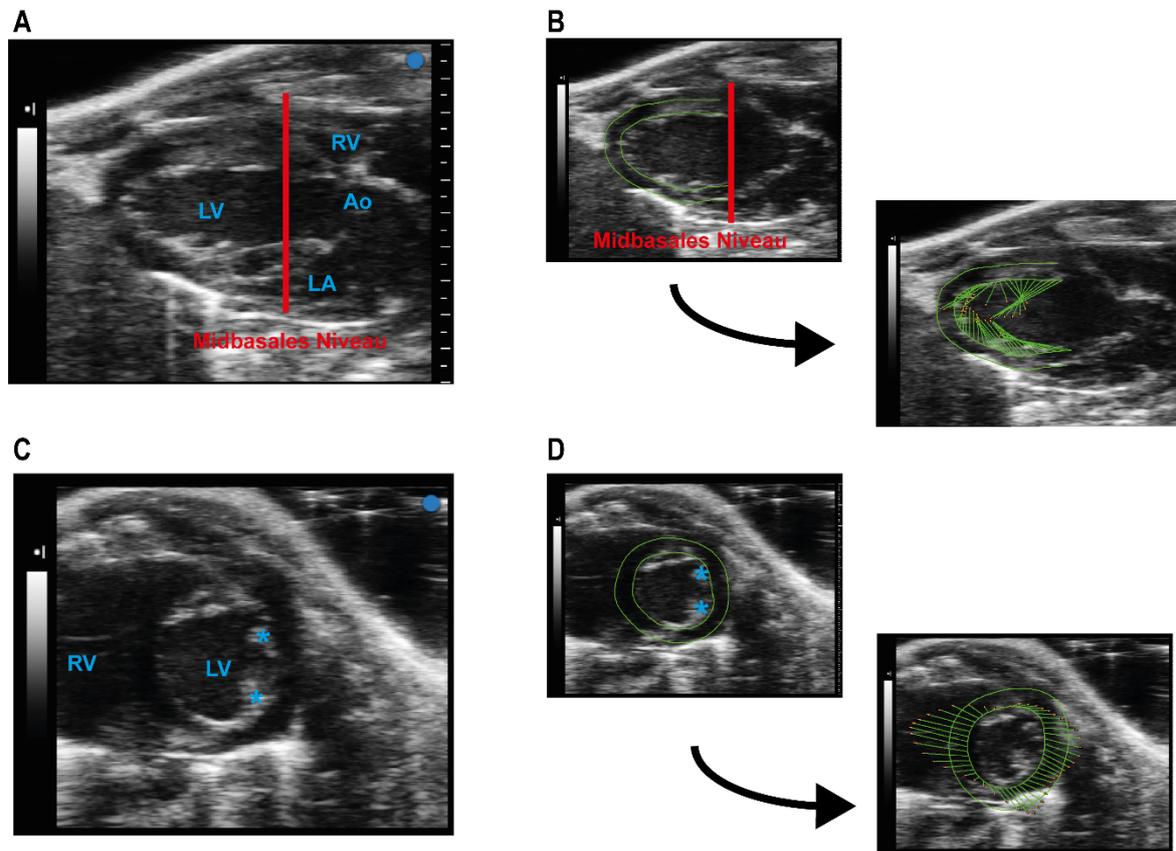


Abb. 3.5 Auswertung der B-Mode Bilder für die *Speckle Tracking*-Echokardiographie.

A Beispielaufnahme aus der langen Achse (LAX) mit midbasalem Niveau. Beschriftung nach [184] und [175]. **B** Beispiel-*Tracing* mit Beginn auf midbasalem Niveau und fertiges *Speckle Tracking*-Bild mit eingezeichneten Vektoren der LAX. **C** Beispielaufnahme der kurzen Achse (SAX). Beschriftung nach [184] und [175]. **D** Beispiel-*Tracing* aus der SAX mit *Speckle-Tracking* Bild mit Vektoren.

Beschriftung: * Papillarmuskeln, Ao Aorta, LA Linkes Atrium, LV Linker Ventrikel, RV Rechter Ventrikel.

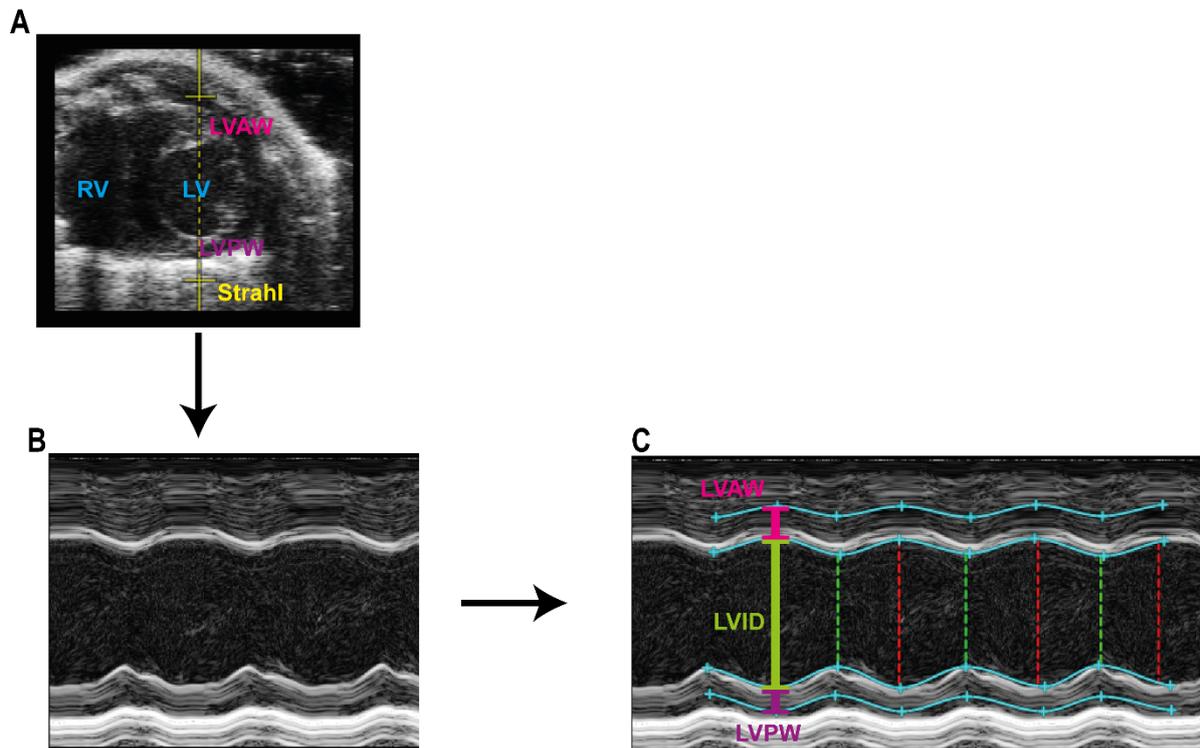


Abb. 3.6 Auswertung der M-Mode Bilder für die konventionelle Echokardiographie.

A Beispielaufnahme aus der kurzen Achse (SAX) mit Beschriftung nach [184]. Eingezeichnet ist ebenfalls der Strahl, der durch die SAX gelegt wird, um das M-Mode-Bild über die Zeit aufzunehmen. **B** Beispiel M-Mode-Bild, das aus A gewonnen wird. **C** Repräsentatives *Tracing* eines M-Mode-Bildes mit Beschriftung nach [184].

Beschriftung: LV Linker Ventrikel, LVAW Linksventrikulärer Durchmesser der anterioren Wand, LVID Linksventrikulärer innerer Durchmesser, LVPW Linksventrikulärer Durchmesser der posterioren Wand RV Rechter Ventrikel.

3.2.4 Histologie

Die Färbung der Gewebeproben erfolgte in Kooperation mit Prof. Robert Klopffleisch am Tierpathologischen Institut der Freien Universität Berlin (Berlin, D). Nach Einbettung erfolgten eine HE und Piko-Siriusrot-Färbung des Herzringes. Die Piko-Siriusrot-Färbung färbt verschiedene Kollagene im Gewebe, insbesondere die Kollagen I und III [185], und diente damit als Maß für den fibrotischen Umbau der Herzen. Die HE-Färbung wurde zur groben Quantifizierung der Herzhypertrophie und als Übersichtsfärbung gewählt.

Die Quantifikation der Fibrose erfolgte mittels Keyence Mikroskop und ImageJ. Hierfür wurden sechs zufällige Bildausschnitte des Endo- und Epikards ausgewählt. Da die Piko-Siriusrot-Färbung unterschiedliche Farbqualitäten aufwies, wurden die Werte des Endokards zum Epikard normalisiert. Dies erfolgte da wir zeigen konnten, dass

das Epikard durch ISO nicht fibrotisch umgebaut wird (41). Die anschließende Quantifizierung der Fibrose erfolgte durch das Programm ImageJ. Die Proben für die histologischen Quantifikation wurden nicht innerhalb einer Gruppe ausgewertet und die Untersucherin war zur Behandlung der Versuchstiere verblindet.

Die HE-Bilder wurden mit einem Panoramic MIDI II Slide Scanner aufgenommen und mit der Software CaseViewer ausgewertet.

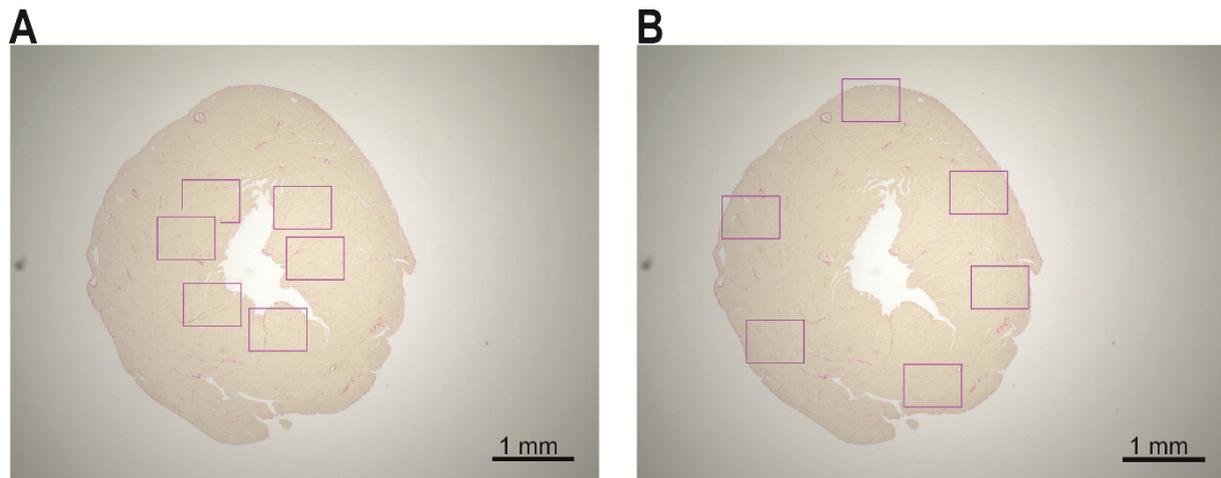


Abb. 3.7 Histologiequantifizierung.

A Anordnung der Bildausschnitte für die Histologiequantifizierung einer Piko-Siriusrot-Färbung am Endokard am Beispiel eines Kontrolltieres und **B** am Epikard.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Die Ergebnisse der *in vivo* Daten werden als Punktwolke mit Mittelwert dargestellt. Die Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte als Min-Max-Boxplot mit Median, 25. und 75. Perzentile. Für die Western Blot Quantifikation wurden Balkendiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung (SD) genutzt. Die Anzahl der Einzelwerte wurde als n angegeben und die Anzahl der Wiederholungen des Experiments als N. Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte visuell mittels Punktwolken und zusätzlich abhängig von der n mittels D'Agostino-Pearson-Test ($n \geq 8$), Shapiro-Wilk-Test ($n = 7$) oder Kolmogorov-Smirnov-Test ($n = 5-6$) (jeweils $\alpha = 0,05$). Ausreißer wurden mit dem Grubbs Test ($\alpha = 0,05$) identifiziert.

Bei Normalverteilung wurde anschließend für Vergleiche zwischen zwei Gruppen ohne zusätzliche Einflussfaktoren ein ungepaarter *t*-Test verwendet, bei fehlender Normalverteilung erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test.

Bei weiteren Einflussfaktoren wurde eine zweifache Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey bzw. Test auf kleinsten signifikanten Unterschied (LSD) posthoc-Test verwendet. Waren die Datenpunkte nicht normalverteilt, wurde zur Varianzanalyse ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's posthoc-Test verwendet.

Zum Ausschluss des Einflusses von Gewicht auf den GLS wurde SPSS und die darin enthaltene univariate Varianzanalyse genutzt.

Die Auswertung der RNA-Sequenzierungs Ergebnisse erfolgte als paarweiser Vergleich mit einem *fold change* (FC) von 1,5. Anschließend wurden alle Gene ausgeschlossen, die nicht mindestens eine durchschnittliche Basisexpression von 100 *reads* aufwiesen. Eine FDR-Korrektur konnte aufgrund der hohen Variabilität der Proben und damit geringen Anzahl von differentiell exprimierten Genen nicht durchgeführt werden. Die Analyse inkl. Hauptkomponentenanalyse erfolgte durch das Helmholtz-Zentrum München. Für die CPDB-Analyse wurde zum Berechnen des Signifikanzniveaus ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet [174].

Ein Signifikanzniveau (P) von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die verschiedenen P-Werten entsprachen: *P $< 0,05$, **P $< 0,01$, ***P $< 0,001$ und ****P. Genaue Ausschlusskriterien einzelner Proben bzw. Tiere zu den einzelnen Abbildungen können dem Abbildungsverzeichnis entnommen werden.

Für die Auswertung und Erstellung der Graphen wurde die Software GraphPadPrism 6 und für die RNA-Sequenzierung R verwendet.

4 Ergebnisse

Ziel der Experimente war die Identifizierung neuer C16:1n7 abhängiger Signalwege in Kardiomyozyten *in vitro* und ihre Bedeutung *in vivo*.

In einem ersten Schritt wurden die durch C16:1n7 beeinflussten Gene in PMK mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Anschließend wurde deren Regulation in der HL-1-Zellkultur und in PMK überprüft. Mittels CPDB *Overrepresentation*-Analyse wurden die einzelnen Gene aus der Sequenzierung bioinformatisch in verschiedene regulierte Signalwege eingegliedert. Daraus wurde die Hypothese einer anti-fibrotischen Wirkung *in vivo* generiert.

Um schließlich diese Ergebnisse *in vivo* zu validieren, wurde die Wirkung einer oralen C16:1n7-Supplementation im ISO-Modell überprüft. Primär erfolgte die Analyse der kardialen Fibrose mittels echokardiographischer und histologischer Methoden. Zudem wurde die Wirkung von C16:1n7 auf Hypertrophie als weiteren Endpunkt überprüft. Zuletzt wurden die Regulation von vorher *in vitro* charakterisierten Signalwege *in vivo* am Herzen gemessen.

4.1 Identifizierung neuer Signalwege induziert durch C16:1n7

4.1.1 Etablierung der PMK-Kultur

Zunächst wurden Vorversuche zur Etablierung der PMK-Kultur durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Zeitabstände zum Präparieren, der Spülung mit der PL, des Kollagenaseverdaus sowie Durchflusstemperaturen evaluiert. Abschließend wurde die geerntete Zellzahl nach dem letzten Kalziumschritt sowie die RIN-Zahl und RNA-Menge nach einer 3 h Stimulationsdauer bestimmt.

Hier zeigte sich eine kurze Präparation als entscheidender Faktor für die Qualität der Isolation. Eine Zellzahl von etwa 250.000–500.000 PMKs pro Well war optimal für die Kultur. Um sicherzustellen, dass die isolierten Zellen Kardiomyozyten sind, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit entsprechenden zelltypischen Markern durchgeführt (Abb. 4.1 A). Hierzu wurden PMKs mit Anti- α -Actinin- [186] und Anti-Desmin-Antikörpern [187] gefärbt. Zudem wurde CD31 als Marker für endotheliale Zellen bzw. Gefäße [188] und Vimentin für mesenchymale Zellen [189] gefärbt.

Es zeigte sich, dass hauptsächlich Kardiomyozyten isoliert wurden. Sowohl die Positivkontrollen Desmin als α -Actinin wurden stark angefärbt. Die Negativkontrollen CD31 und Vimentin produzierten hingegen ein schwaches Signal.

4.1.2 Stimulationsdauer

Für die RNA-Sequenzierung musste zunächst eine optimale C16:1n7-Stimulationsdauer festgelegt werden. Hierfür wurde auf Grundlage von unpublizierten Vorexperimenten die PPAR α -Zielgene *Acs11* (Acyl-CoA Synthetase-1) [9] und *Cpt1b* (Carnitine Palmitoyltransferase 1B) [190] gewählt.

Bereits nach 3 h Stimulation mit C16:1n7 zeigte sich in HL-1 Zellen eine Hochregulation der Gene verglichen zur Kontrolle (BSA). Nach 6 h war dieser Effekt stärker ausgeprägt (Abb. 4.1 B, C links und mittig). Nach 24 h war der Effekt nur noch gering und nur *Cpt1b* war statistisch signifikant reguliert (Abb. 4.1 B, C rechts). Zudem wurde ein Western Blot durchgeführt, um die Regulation der C16:1n7 regulierten PPAR α -Ziele auf Proteinebene zu bestätigen. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg von CPT1B nach 3 h. Dieser war im Zeitverlauf bei 6 h und 24 h nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.1 D, F). ACSL1 war nicht reguliert (Abb. 4.1 D, E).

Zusammenfassend zeigte sich, dass auf mRNA-Ebene eine Regulation der genannten PPAR-Zielgene nach 3 und 6 h C16:1n7 Stimulation festzustellen ist. Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse jedoch nur teilweise bestätigt werden.

Aufgrund des schlechten Überlebens der PMK in Kultur nach 6 h wurde schließlich 3 h als Zeitpunkt gewählt, da hier bereits die ersten Veränderungen auf mRNA-Ebene in HL-1 Zellen beobachtet werden konnten (Abb. 4.1 B–F).

Schließlich wurden die PMK isoliert und für 3 h mit C16:1n7 oder BSA als Kontrolle stimuliert. Nach der Ernte und Isolation der RNA wurde diese auf ihre Qualität untersucht und die RNA-Menge bestimmt (Tab. 4. 1). Für die Sequenzierung war eine hohe Reinheit der Proben, gemessen an der RIN, ausschlaggebend. Hier wurde ein RIN von über 8,5 als ausreichend angesehen. Diese Proben wurden anschließend an das Helmholtz-Zentrum München gesendet.

PROBEN	T APPARATUR	T LÖSUNGEN		RIN	RNA MENGE
Probenpaar #1	U: 20,8 °C, WB: 41,3 °C Fluss: 11	37,1 °C	Herz-P: 18 min Kollagenase: 6 min	8,5/8,5	2422/2618 ng
Probenpaar #2	U: 23,0 °C, WB: 40,8 °C Fluss: 11	37 °C	Herz-P: 22 min Kollagenase: 6,5 min	9,1/9,1	798/1680 ng
Probenpaar #3	U: 23,0 °C, WB: 40,8 °C Fluss: 11	37 °C	Herz-P: 20 min Kollagenase: 6,5 min	9,4/9,4	1988/1232 ng

Tab. 4. 1 PMK-Isolationscharakteristika der Proben für die Sequenzierung.

Beschriftung: T Temperatur, U Umgebung, P Präparation WB Wasserbad, RIN RNA Integritätsnummer.

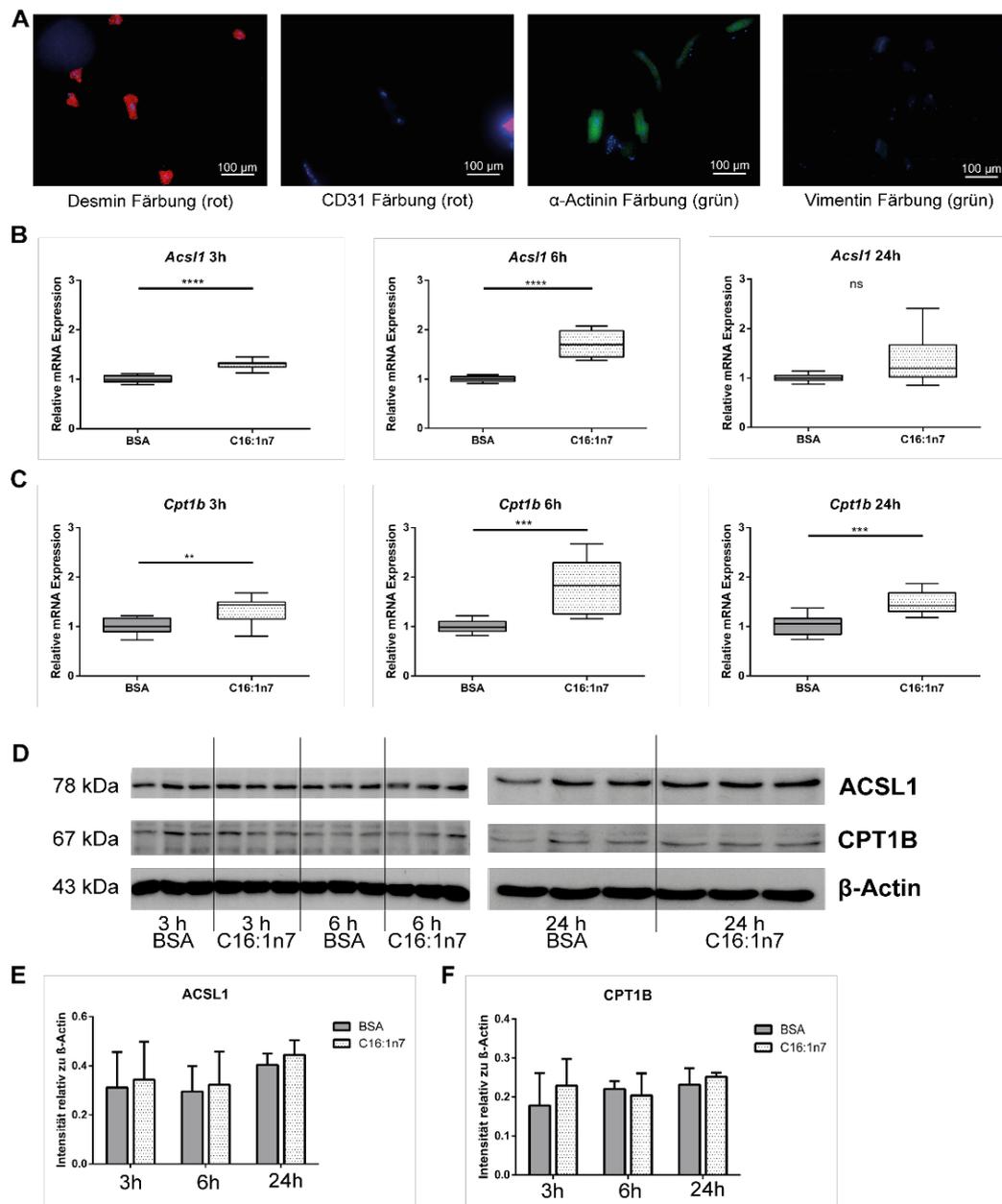


Abb. 4.1 Etablierung der primären Kardiomyozyten (PMK) Isolation und Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer.

A Immunfluoreszenzbilder der PMK. **B** Relative mRNA-Expression von Acyl-CoA Synthetase-1 (*Acs1*) und **C** Carnitine Palmitoyltransferase 1B (*Cpt1b*) nach 3, 6 und 24 h in HL-1 Zellen. **D** Repräsentative Western Blots von ACSL, CPT1B und β -Actin nach 3, 6 und 24 h Stimulation mit C16:1n7 oder BSA in HL-1 Zellen. **E** Densitometrie aller Western Blots von ACSL1 und **F** CPT1B. Die Werte werden in Relation zum β -Actin Signal (Referenzprotein) dargestellt.

n-Zahl: **B–F**: Jeweils N = 3, n = 3; B 3 h: N = 3, n = 2, **D–F** 24 h, hier N = 2, n = 3; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Statistik: **B+C**: *t*-Tests; ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$.

Beschriftung: *Acs1* Acyl-CoA Synthetase-1, BSA Bovines Serumalbumin (= Kontrolle), C16:1n7 Palmitoleinsäure, *Cpt1b* Carnitine Palmitoyltransferase 1B.

4.1.3 C16:1n7 reguliert PPAR δ und α Zielgene auf mRNA Ebene

Es erfolgte die Erstellung der *Library* mittels Hersteller-Kit und anschließende RNA-Sequenzierung auf einem Illumina HiSeq® 1000 am Helmholtz-Zentrum München und eine bioinformatische Analyse mit R. Es erfolgte eine statistische Auswertung mittels paarweisem Vergleich der Proben.

Nach der Sequenzierung konnten etwa 75 % der *reads* dem Mausreferenzgenom zugeordnet werden. In der Hauptkomponentenanalyse (*Principal component = PC*) zeigte sich ein ausgeprägter Chargenunterschied zwischen Probenpaar #1 (Proben 35, 36) und #2/3 (Proben 41–42/43–33) (Abb. 4.2 A), was zu einer stark eingeschränkten Anzahl an differentiell regulierten Genen führte. Lediglich 3 % der Varianz der Sequenzierung konnte auf die Behandlung zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde ein paarweiser Vergleich zwischen #1 und #2/3 durchgeführt. Ein durchschnittlicher FC (*mean Fold Change = mFC*) von 1,5 wurde als biologisch relevant betrachtet. Dies führte schließlich zu 317 differentiell regulierten Genen zwischen C16:1n7 und BSA (Abb. 4.2 B). Um diese Gene weiter auf biologisch besonders Relevante einzugrenzen, wurden nur die Gene berücksichtigt, die mindestens eine durchschnittliche Basisexpression von 100 *reads* aufwiesen. Schließlich konnten 129 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden (Abb. 4.2 C). Das am stärksten hochregulierte Gen war Angiopoetin-like 4 (*Angptl4*) (mFC = 3,836), ein PPAR δ -Zielgen (47, 54, 55), das auch anti-fibrotische Eigenschaften aufweist [95,124,193]. Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (*Pdk4*), ebenfalls ein PPAR δ -Zielgen, war auch verstärkt exprimiert [191] (mFC = 1,806). Zudem war das PPAR α -Zielgen *hypoxia inducible lipid droplet associated (Hilpda)* [194,195] (mFC = 2,542) differentiell exprimiert (Abb. 4.2 D).

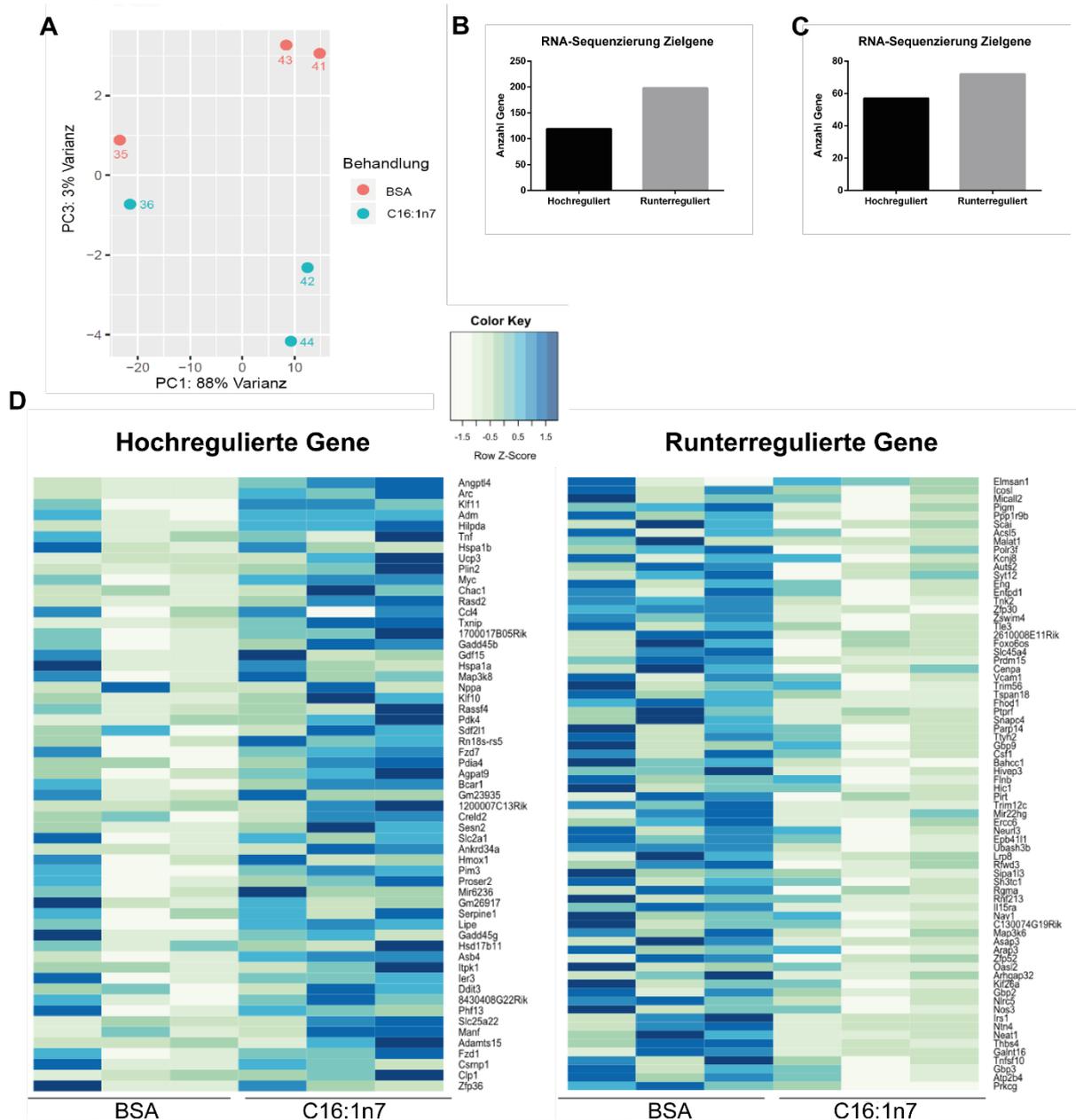


Abb. 4.2 Ergebnisse der RNA-Sequenzierung.

A Hauptkomponentenanalyse. Die PC zeigt die Genexpressionslevel über alle Proben und gruppiert die Proben anhand ihrer Varianz zueinander. PC1 zeigt die Chargenunterschiede, PC2 die Unterschiede durch die Behandlung mit C16:1n7. **B** Anzahl differenziell exprimierter Gene vor Ausschluss der Gene, die eine geringe Expression in der Sequenzierung aufwiesen. **C** Differenziell exprimierte Gene mit einer Basisexpression von über 100 reads. **D** Heatmap der differenziell exprimierten Gene aus C.

n-Zahl: **A–D:** $n = 3$, $N = 1$; *Statistik:* **D:** Paarweiser Vergleich sowie $FC \geq 1,5$; es wurden nur Gene berichtet, die mindestens eine Basisexpression von 100 reads pro Probe aufwiesen.

Beschriftung: BSA Bovines Serumalbumin (= Kontrolle), C16:1n7 Palmitoleinsäure, PC Principal Component.

4.1.4 Bestätigung der PPAR-Zielgene

Im nächsten Schritt wurden die identifizierten Gene in der HL-1-Kultur und in den PMK mittels qRT-PCR untersucht. Hierfür wurden HL-1-Zellen für 3 h mit 16:1n7 oder BSA als Kontrolle stimuliert und danach die Genexpressionslevel der PPAR δ -Gene *Angptl4*, *Pdk4* sowie des PPAR α -Gens *Hilpda* untersucht.

Es zeigte sich bei allen drei Genen eine verstärkte signifikante Expression in HL-1-Zellen unter C16:1n7 Stimulation, allerdings stärker ausgeprägt bei *Angptl4* und *Pdk4* im Vergleich zu *Hilpda* (Abb. 4.3 A). Aufgrund der deutlicheren C16:1n7-vermittelten Regulation der PPAR δ -Zielgene, im Vergleich zu den PPAR α -Zielgenen, *Acs1l*, *Cpt1b* und *Hilpda* (Abb. 4.1 B+C), konzentrierten wir die weiteren Experimente auf die Analyse von PPAR δ -Zielgenen.

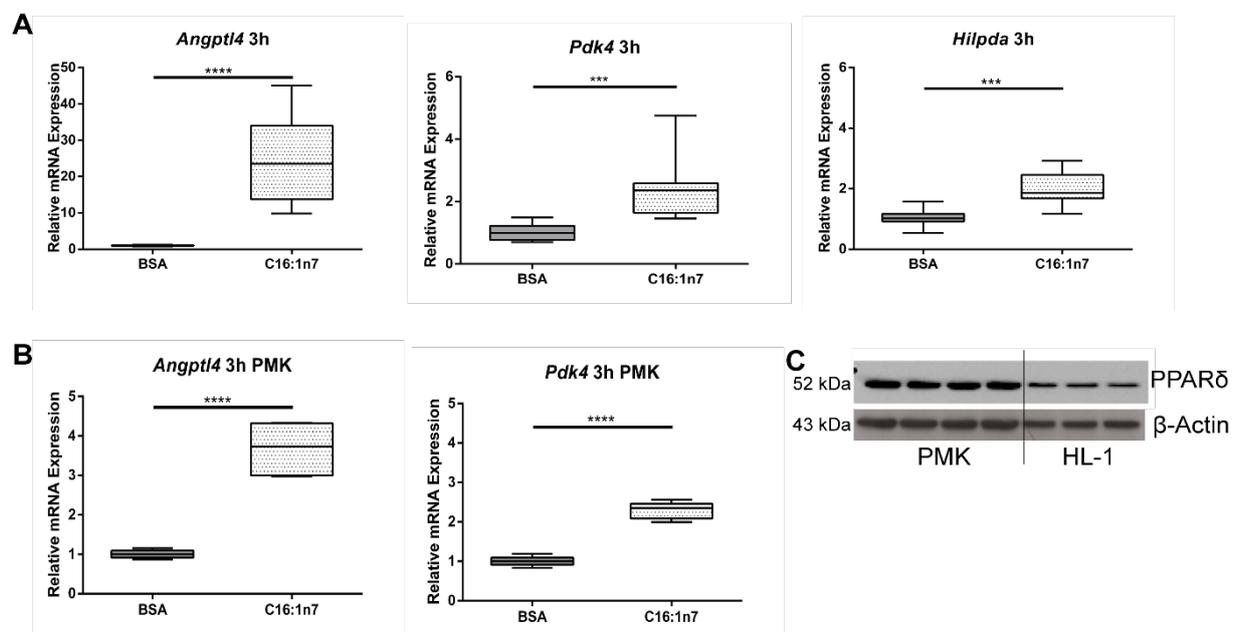


Abb. 4.3 Differentielle Genexpression von PPAR δ - und - α -Zielgenen nach 3 h gemessen mittels quantitativer Real Time-Polymerasekettenreaktion.

A Expression der PPAR δ -Zielgene Angiopoetin like factor 4 (*Angptl4*) und Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (*Pdk4*) sowie des PPAR- α -Zielgens hypoxia inducible lipid droplet associated (*Hilpda*) nach 3 h Stimulation mit C16:1n7 oder BSA in HL-1 Zellen und **B** in primären Kardiomyozyten (PMK). **C** Western Blot von PPAR δ in PMK und HL-1 Zellen.

n-Zahl: **A**: N = 4, n = 3; **B**: N = 3, n = 2, **C**: N = 1, PMK n = 4, HL-1 n = 3.

Statistik: **A+B**: *t*-Test; *** = P < 0,001; **** = P < 0,0001.

Beschriftung: *Angptl4* Angiopoetin like factor 4, BSA Bovines Serumalbumin (= Kontrolle), C16:1n7 Palmitoleinsäure, *Hilpda* Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated, *Pdk4* Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4, PMK Primäre Kardiomyozyten.

Hierzu passend konnte die Expression von PPAR δ sowohl in PMK als auch in HL-1 stabil auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 4.3 C).

Nach 3 h Stimulation mit C16:1n7 zeigten sich in den PMK signifikant höhere mRNA-Level von *Angptl4* und *Pdk4* im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4.3 B).

Zusammenfassend konnten verschiedene in der Sequenzierung identifizierte Gene in HL-1 Zellen und PMK bestätigt werden und es zeigte sich eine stärkere Stimulation von PPAR δ - als PPAR α -Zielgenen.

4.1.5 Regulation von PPAR δ -Zielgenen im Zeitverlauf

Um weitere Informationen über die Regulation der PPAR δ -Zielgene im Zeitverlauf unter C16:1n7 Stimulation zu erhalten, wurde eine längere Stimulationsperiode über 6 und 24 h in HL-1 Zellen gewählt. Aus der Literatur wurde zusätzlich die Lipoproteinlipase (*Lpl*), als ein Gen *upstream* von *Angptl4*, identifiziert und im folgenden mituntersucht. Hier wurde erwartet, dass die *Lpl Expression* durch *Angptl4* im Verlauf supprimiert wird. Ein Prozess der normalerweise die Zelle vor ausgeprägter Lipidaufnahme und -akkumulation schützen soll [124].

Lpl war nach 3 h nicht differentiell reguliert (Abb. 4.4 A). Nach 6 h zeigte sich jedoch eine signifikante Herabregulation, die nach 24 h nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.4 B+C).

Angptl4 und *Pdk4* waren beide sowohl nach 6 als auch 24 h stark hochreguliert (Abb. 4.4 D–G). Insbesondere bei *Angptl4* zeigte sich eine ausgeprägte Standardabweichung, was auf einen hochvariablen Effekt hindeutet (Abb. 4.4 D).

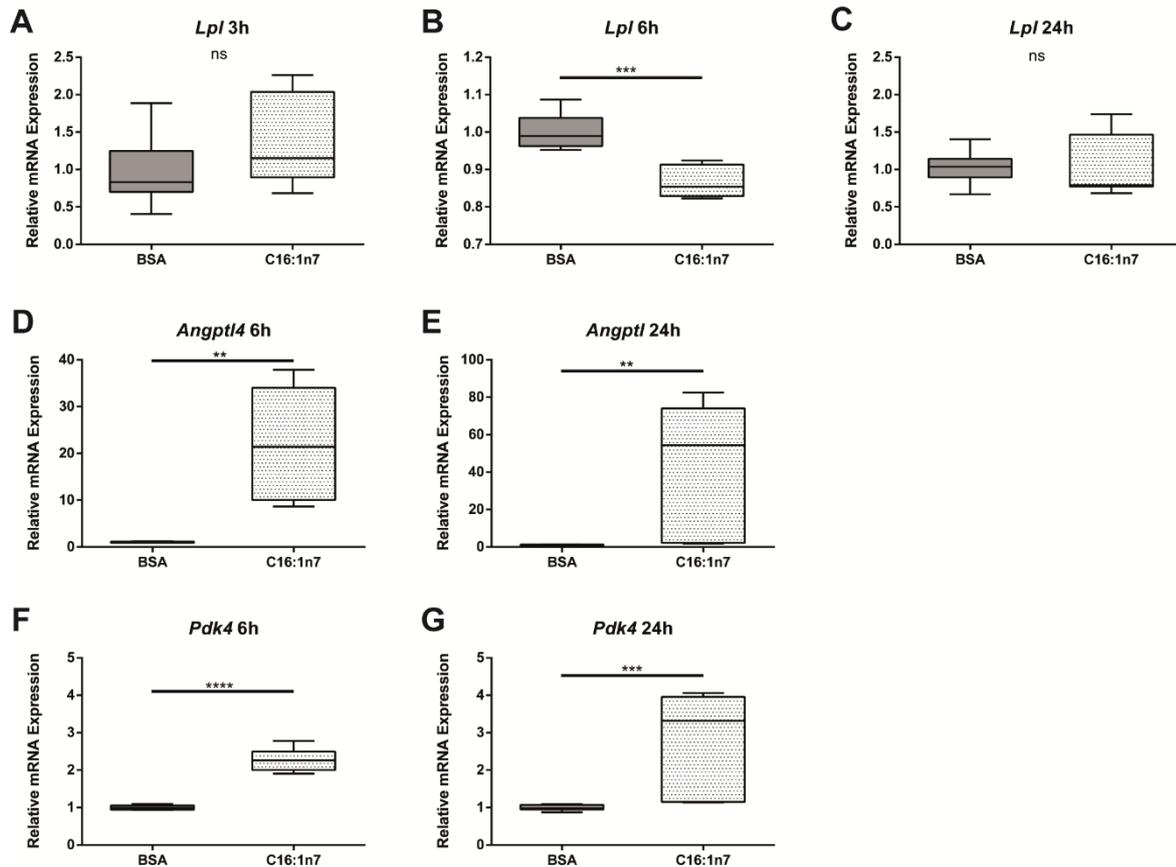


Abb. 4.4 Zeitverlaufsexperiment mit Messung der differentiellen Genexpression von PPAR δ -Zielgenen in HL-1 Zellen unter Stimulation mit C16:1n7 gemessen mittel qRT-PCR.

A Lipoproteinlipase (*Lpl*) mRNA-Expression nach 3 h, **B** 6 h und **C** 24 h. **C** Angiopoetin-like factor 4 (*Angptl4*) mRNA-Expression nach 6 h **D** und **E** 24 h. **F** Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (*Pdk4*) mRNA-Expression nach 6 h und **G** 24 h.

n-Zahl: **A+C+E+G** N = 3, n = 3; **B+D+F**: N = 2, n = 3; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Statistik: **A-G**: *t*-Tests; ns = P > 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; **** = P < 0,0001

Beschriftung: *Angptl4* Angiopoetin-like factor 4, *BSA* Bovines Serumalbumin, *C16:1n7* Palmitoleinsäure, *Lpl* Lipoproteinlipase, *Pdk4* Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4.

4.1.6 Consensus Path DB (CPDB) Overrepresentation-Analyse

Zur weiteren systematischen Analyse der 129 in der RNA-Sequenzierung differentiell exprimierten Gene wurde das Webtool CPDB eingesetzt. Mittels *Overrepresentation-Analyse* wurden die differentiell regulierten Gene spezifischen Signalwegen zugeordnet.

Es ergaben sich 20 mit der C16:1n7-Stimulation assoziierte Signalwege (Abb. 4.5). Es zeigte sich eine Assoziation mit Signalwegen des Zellwachstums, -überlebens und -proliferation. Zudem war NF- κ -B, ein mit Inflammation assoziierter Weg, metabolische Signalwege sowie hämostatische Vorgänge reguliert.

Von geringer biologischer Relevanz wurden die unter „Verschiedenes“ subsummierten Signalwege angesehen. Hierbei handelt es sich um durch rein bioinformatische Berechnungen vorhergesagte, oder andere zellbiologisch wichtige Signalwege bzw. Assoziationen, die schwer in die anderen Kategorien einzuordnen waren. Ebenfalls von geringer Relevanz wurden die Signalwege unter „Inflammation, Infektion“ gewertet, da hier die Assoziation hauptsächlich durch einzelne Gene, beispielsweise TNF oder IL, verursacht war.

Von besonderem Interesse waren die unter „Fibrose“ zusammengefassten Signalwege von TNF und TGF- β , da diese ebenfalls mit der kardialen Fibroseentstehung im verwendeten ISO-Modell assoziiert sind [196,197], sowie der Wnt-Signalweg, der mit TGF- β eng an der Fibroseentwicklung beteiligt ist [141].

Es zeigte sich in der CPDB-Auswertung im Wesentlichen eine Assoziation der C16:1n7-Stimulation mit Signalwegen zugehörig zu Fibroseentstehung, Inflammation, Zellwachstum, -überleben und -proliferation.

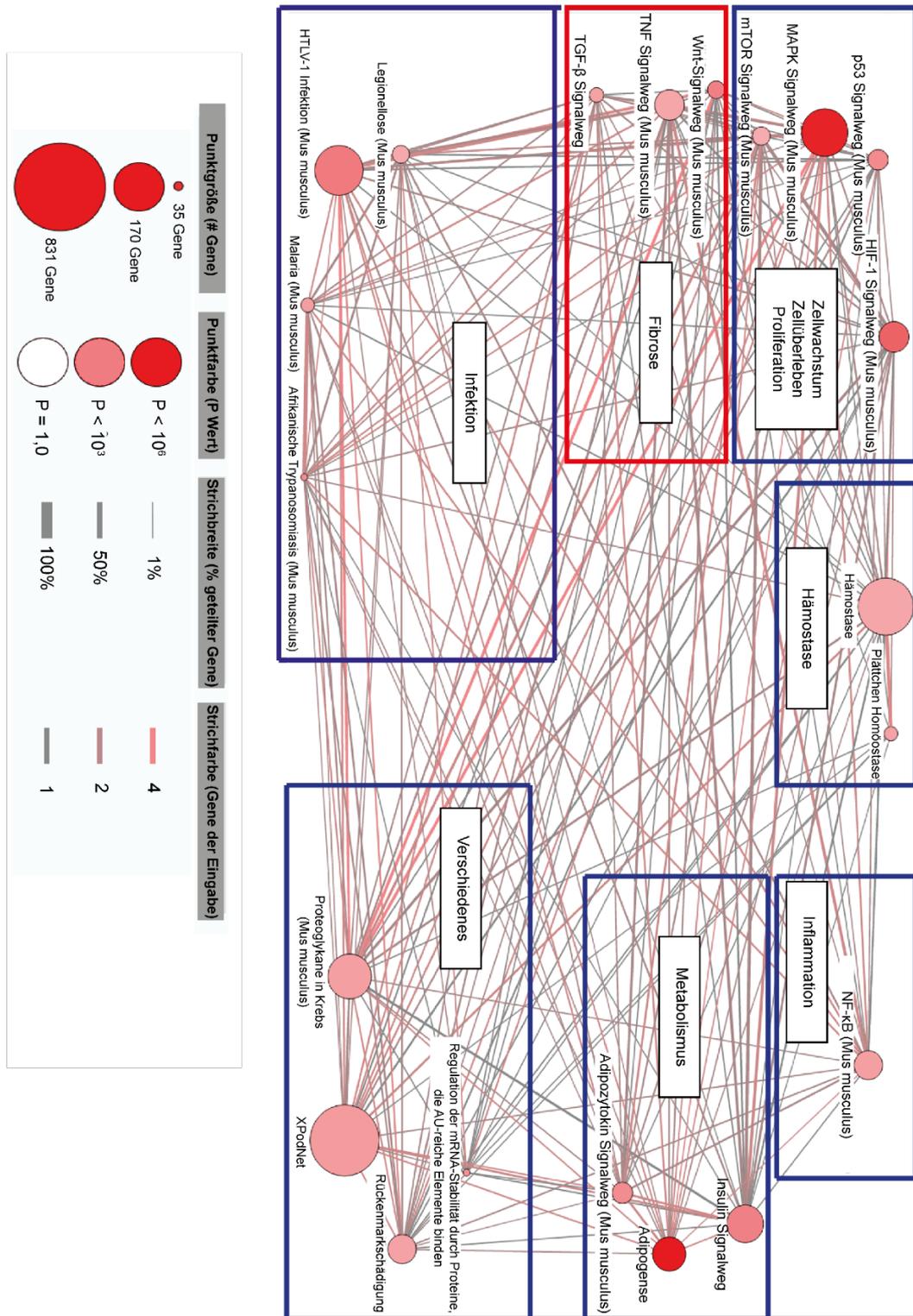


Abb. 4.5 CPDB Overrepresentation-Analyse.

Gezeigt werden mit der C16:1n7 Stimulation-assoziierte Signalwege im PMK (3 h-Stimulation). Die Größe der Punkte zeigt die Anzahl der Gene in einem Signalweg an, die Farbe die statistische Signifikanz. Die Stärke der Verbindungslinien repräsentiert die Anzahl der Gene, die Signalwege insgesamt miteinander teilen. Die Farbe der Striche steht für die Anzahl der Gene der jeweils eingelesenen Genliste.

4.2 Effekte von C16:1n7 auf die ISO-induzierte kardiale Fibrose im Mausmodell

Zusammenfassend ergaben sich aus den bisherigen Daten Hinweise darauf, dass C16:1n7 anti-fibrotische Eigenschaften aufweisen könnte. Diese These beruht auf der C16:1n7-vermittelten Regulation von PPAR δ -Zielgenen, die laut Literatur über ihre anti-inflammatorische Wirkung auch Fibrose beeinflussen können [198,199]. Zudem spricht die Hochregulation von *Angpt4*, einem parakrin wirkenden Protein [200], das nachweislich in einem experimentellen Modell der Rechtsherz-hypertrophie vor Fibrose schützt [95] und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt [124], für einen anti-fibrotischen Effekt von C16:1n7. Darüber hinaus konnte in der CPDB *Overrepresentation*-Analyse gezeigt werden, dass mehrere mit Fibrose assoziierte Signalwege durch die C16:1n7-Stimulation reguliert waren.

Um potentielle anti-fibrotische Effekte von C16:1n7 *in vivo* zu untersuchen, wurde das ISO-Modell verwendet. Die subchronische ISO-Applikation in Mäusen ist ein etabliertes Modell [176,177,185,201,202]. Es entsteht dosisabhängig [203,204] eine kardiale Schädigung mit zunächst subendokardialer Fibrose und Zelluntergang [205], Ischämie [206], Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie des gesamten Herzens [201] und schließlich HI [182] bis hin zum Tod [207].

4.2.1 Grundliniencharakteristika der Mäuse

Die Gruppengrößen können Tab. 4.2 entnommen werden. Diese beruhen auf einer Gruppengrößenberechnung, die in Zusammenarbeit mit dem Charité Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie durchgeführt wurde.

Gruppe	LANGER ARM			KURZER ARM		
	n Start	n Ende	verstorben	n Start	n Ende	verstorben
KON-H ₂ O	9	9	1 (Echokardiographie)	5	5	∅
KON-C16:1n7	10	10	∅	5	5	∅
ISO-H ₂ O	12	10	2 (ISO-Behandlung)	7	6	1 (ISO-Behandlung)
ISO-C16:1n7	12	9	3 (ISO-Behandlung)	7	7	∅

Tab. 4.2 Gruppengröße des ISO-Versuches mit Anzahl der verstorbenen Tiere.

Der lange Arm entspricht dem Zeitpunkt an Tag 22, 13 Tage nach der letzten ISO-Gabe, der kurze Arm Zeitpunkt Tag 11, einen Tag nach der ISO-Gabe.

C16:1n7 Palmitoleinsäure, H₂O Wasser, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe.

Zwei Tiere verstarben bei der ersten Blutentnahme vor Beginn des Versuches an Tag -1. Insgesamt verstarben drei ISO-Vehikel (H₂O) und drei ISO-C16:1n7-Tiere während der Behandlung. Ein Tier aus der Kontrollgruppe (KON-H₂O) verstarb nach der letzten Echokardiographie aus ungeklärten Ursachen, wurde aber in alle Analysen eingeschlossen.

Wie bereits im Methodenteil beschrieben war das KG zu Beginn und zu Ende des Versuches in beiden Armen unterschiedlich, selbst wenn es, isoliert im kurzen Arm betrachtet, statistisch nicht signifikant unterschiedlich war (Tab. 4.3).

Der GLS war zu Beginn des Versuches als primärer Endpunkt in den Behandlungsgruppen nicht unterschiedlich reguliert. In der statistischen Untersuchung, ob das KG einen signifikanten Einfluss auf die Variable GLS hat, konnte mittels der univariaten Analyse gezeigt werden, dass der GLS nicht durch die Unterschiede im KG beeinflusst wurde ($P > 0,05$).

Andere *Strain*-Parameter (GLSR, GRS, GRSR) unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant (Tab. 4.3).

	KON-H ₂ O	KON-C16:1n7	ISO-H ₂ O	ISO-C16:1n7
KG (g)	25,41 ± 1,25	25,59 ± 0,825	27,49 ± 1,84 **	27,45 ± 1,44 ++
BZ (mg/dl)	155,7 ± 19,4	162,1 ± 22,6	160,9 ± 23,18	154,8 ± 17,32
HF (bpm)	418,6 ± 21,8	420,3 ± 16,2	429,3 ± 24,1	415,8 ± 23,4
GLS (%)	-17,67 ± 1,73	-17,38 ± 1,45	-17,55 ± 2,12	-16,39 ± 1,60
GLSR (s⁻¹)	-5,645 ± 1,24	-5,310 ± 1,04	-6,804 ± 2,88	-5,84 ± 1,52
GRS (%)	29,97 ± 6,27	27,73 ± 4,82	26,63 ± 6,51	28,97 ± 4,38
GRSR (s⁻¹)	7,124 ± 1,75	6,554 ± 0,958	6,459 ± 1,23	6,907 ± 0,988

Tab. 4.3 Grundliniencharakteristika der behandelten Tiere an Tag 0.

n-Zahl: **KG, BZ**: KON-H₂O *n* = 14, KON-C16:1n7 *n* = 15, ISO-H₂O *n* = 16, ISO-C16:1n7 *n* = 16; **HF, GLS, GLSR, GRS, GRSR**: KON-H₂O *n* = 9, KON-C16:1n7 *n* = 10, ISO-H₂O *n* = 10, ISO-C16:1n7 *n* = 9 (GLS: *n* = 8).

Statistik: **KG, BZ, HF, GRS, GRSR, GLS** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; **GLSR** Einfache Varianzanalyse (Kruskal-Wallis) (nicht-normal verteilt). Mittelwerte mit Standardabweichung. ns = $P > 0,05$; ** = $P < 0,01$, KON-H₂O VS ISO-H₂O; ++ KON-C16:1n7 VS ISO-C16:1n7.

Beschriftung: **BZ** Blutzucker, **C16:1n7** Palmitoleinsäure, **H₂O** Wasser, **HF** Herzfrequenz, **ISO** Isoproterenolgruppe, **KG** Körpergewicht, **KON** Kontrollgruppe, **GLS** Globaler longitudinaler *Strain*, **GLSR** Globale longitudinale *Strain Rate*, **GRS** Globaler radialer *Strain*, **GRSR** Globale longitudinale *Strain Rate*.

4.2.2 C16:1n7 reduziert die ISO-induzierte kardiale Fibrose an Tag 22

Wie im Methodenteil beschrieben erhielten die Tiere ab Tag 0 C16:1n7/H₂O p. o. An Tag 6–9 erfolgte die Applikation von ISO/H₂O (= KON) s. c. Es gab zwei Versuchsarme: Einen „langen Arm“, in dem die Tiere an Tag 10 (post-ISO) und an Tag 21 echokardiographisch untersucht und schließlich an Tag 22 getötet wurden. In einem kleineren, „kurzen Arm“ erfolgte die Echokardiographie auch an Tag 10 (post-ISO) und die Tiere wurden an Tag 11 getötet.

Als Korrelat zur endokardialen Fibrose erfolgte die echokardiographische Untersuchung von *Strain*-Parametern [175] an Tag 21 und eine Pikro-Siriusrot-Färbung des Herzens an Tag 22.

Bei den Basiswerten der Tiere zur Echokardiographie zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, bis auf die bereits zu Beginn bestehenden KG-Unterschiede in den KON- und ISO-Gruppen (Tab. 4.4). Hier war der GLS ebenfalls nicht signifikant vom KG beeinflusst (Univariate Varianzanalyse, $P > 0,05$).

Um echokardiographisch das Ausmaß der subendokardialen Fibrose zu beurteilen, wurden die *Strain*-Parameter GLS, GRS und GCS sowie die dazugehörigen *Strain*-Raten untersucht. Diese korrelieren mit dem Ausmaß der subendokardialer Fibrose, insbesondere bei frühem Schaden am Herzen [175,177].

In der ISO Gruppe konnte ein signifikanter Abfall des GLS dokumentiert werden, der durch C16:1n7-Gabe verbessert wurde (Abb. 4.6 A). Im longitudinalen Vergleich der Einzeltiere (Tag 0 zu Tag 21), beobachteten wir ebenfalls eine signifikante Verschlechterung des relativen GLS (Abb. 4.6 B) und der GLSR (Abb. 4.6 C) in den unbehandelten ISO-Vehikel Tieren. Im Gegensatz dazu verhinderte die C16:1n7 Behandlung die Reduktion des GLS und der GLSR. Die Absolutwerte der GLSR wiesen zwar den gleichen Trend auf wie die vorher gezeigten Daten, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 4.6 D). In einem auf das KG korrigierten Modell blieb die Behandlung mit C16:1n7 in den ISO-Tieren statistisch signifikant (Univariate Varianzanalyse, $P = 0,042$). Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eine Verbesserung des GLS/GLSR unter C16:1n7, die auf eine Abmilderung der subendokardialen Fibrose hinweisen kann.

Im Einklang mit der Literatur [175,177] veränderten sich die anderen *Strain*-Parameter GRS, GCS sowie GRSR und GCSR durch die ISO-Gabe nicht. Die Fütterung mit C16:1n7 hatte ebenfalls keinen Einfluss (Abb. 4.6 E–H).

In der longitudinalen Betrachtung des GLS (Tag 0, Tag 10 [post-ISO], Tag 22) zeigt sich ein vergleichbarer Abfall in der C16:1n7- und der Vehikel H₂O-Gruppe direkt nach der letzten ISO-Gabe. Allerdings erholt sich der GLS der C16:1n7 Tiere 13 Tage nach der ISO-Gabe wieder auf ein mit den Kontrollgruppen und Ausgangsniveau vergleichbaren Wert (Abb. 4.6 I), wohingegen die Vehikel (H₂O)- ISO-Gruppe einen anhaltend eingeschränkten GLS aufweist. Insgesamt deuten diese Daten auf einen Prozess in den mit C16:1n7 behandelten Tieren hin, der insbesondere nach der letzten ISO-Applikation zu einer Verbesserung führt.

Im nächsten Schritt wurde die kardiale Fibrose in der Histologie mittels Picro-Siriusrot-Färbung quantifiziert. Hier zeigte sich eine ausgeprägte subendokardiale Fibrose durch die Gabe von ISO, die mittels oraler Gabe von C16:1n7 signifikant reduziert werden konnte (Abb. 4.6 J–L). In den Kontrollgruppen kam es zu keiner Fibroseausbildung (Abb. 4.6 J–L).

Somit korrelierten die GLS-Werte aus der Echokardiographie, die mit der subendokardialen Fibrose zusammenhängen [175], auch mit den histologischen Ergebnissen. (Abb. 4.6 J–L). Zusammenfassend deutet dies auf einen anti-fibrotischen Effekt der Fettsäure C16:1n7 hin.

	KON-H ₂ O	KON-C16:1n7	ISO-H ₂ O	ISO-C16:1n7
BZ (mg/dl)	152,0 ± 34,0	154,2 ± 23,7	147,8 ± 22,3	135,3 ± 21,9
KG (g)	26,04 ± 1,35	26,83 ± 1,41	29,2 ± 2,00 ***	28,82 ± 1,33 +
KG Zunahme (g)	0,800 ± 0,738	1,270 ± 1,60	1,540 ± 1,06	1,463 ± 0,504
HF (bpm)	390,2 ± 34,2	390,4 ± 16,9	375,4 ± 34,3	361,0 ± 30,8

Tab. 4.4 BZ-, KG-, und HF-Werte bei der letzten Echokardiographie am Endpunkt Tag 21.

n-Zahl: **BZ, KG:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1n7 n = 10, ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1n7 n = 9; **KG Zunahme:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1n7 n = 10, ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1n7 n = 8; **HF:** KON- H₂O n = 9, KON-C16:1n7 n = 9, ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1n7 n = 9.

Statistik: Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc Test. Mittelwerte mit Standardabweichung; ns = P > 0,05; + = P < 0,05 KON-C16:1n7 VS ISO-C16:1n7; *** = P < 0,001 KON-H₂O VS ISO-H₂O.

Beschriftung: BZ Blutzucker, C16:1n7 Palmitoleinsäure, H₂O Wasser, HF Herzfrequenz, ISO Isoproterenolgruppe, KG Körpergewicht, KON Kontrollgruppe.

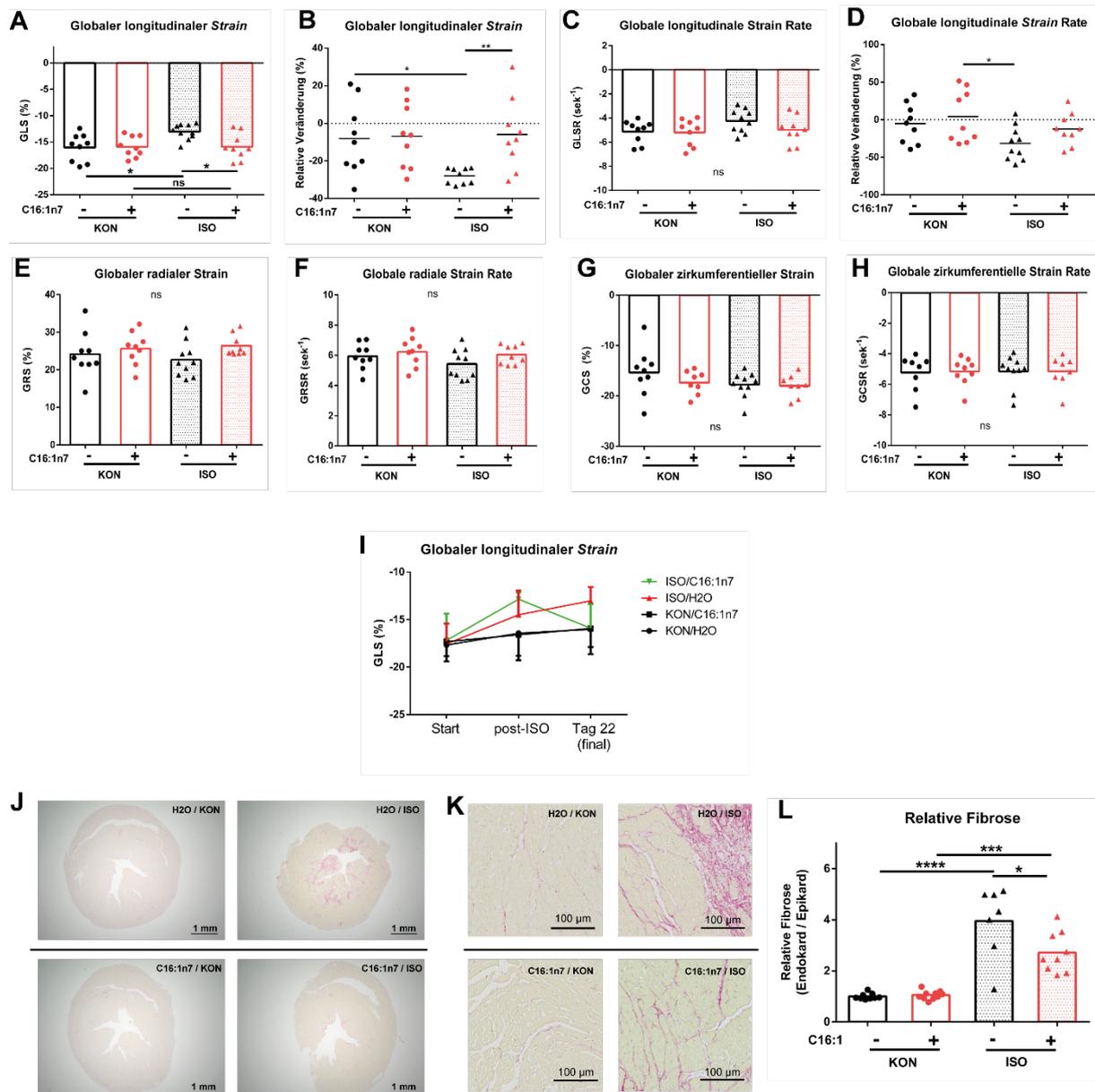


Abb. 4.6 Echokardiographie- und Histologieergebnisse am finalen Endpunkt (Tag 21/22).

A Globaler longitudinaler *Strain* in Absolutwerten (links) und **B** als relative Veränderung im Vergleich zu Tag 0 (rechts). **C+D** Wie **A** nur mit globaler longitudinaler *Strain*-Rate. **E** Ergebnisse des globalen radialen *Strains* und **F** *Strain*-Rate. **G** Ergebnisse des globalen zirkumferentiellen *Strains* und **H** *Strain*-Rate. **I** Veränderung der Absolutwerte des globalen longitudinalen *Strains* über die Zeit des Versuches mit den Zeitpunkten Tag 0 (Start des Experiments), einen Tag nach der letzten Isoproterenol-Gabe und (post-ISO) und an Tag 22 (finaler Zeitpunkt). **J** Beispielhistologiebilder der Piko-Siriusrot-Färbung der Herzen als Übersicht und **K** im Subendokard in der Vergrößerung. **L** Quantitative Auswertung der Piko-Siriusrot-Färbung. Relative Werte im Vergleich zum Epikard.

Statistik: **A links, C–I, L:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc Test; **B:** Zweifache Varianzanalyse mit unkorrigiertem Fisher's LSD posthoc Test; ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$.

n-Zahl: **A, C–F, I:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 9; ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1 n = 9; **B:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 9; ISO-H₂O n = 9, ISO-C16:1 n = 9; **G+H:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 8; ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1 n = 9; **L:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 10; ISO-H₂O n = 7, ISO-C16:1 n = 9. Weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, GCS Globaler zirkumferentieller Strain, GCSR Globale zirkumferentielle Strain Rate, GLS Globaler longitudinaler Strain, GLSR Globale longitudinale Strain Rate, GRS Globaler radialer Strain, GRSSR Globale radiale Strain Rate, H₂O Wasser, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe.

4.2.3 C16:1n7 hat keine Auswirkung auf Marker des kardialen fibrotischen Umbaus an Tag 11

Um mehr über das Ausmaß des fibrotischen Umbaus des Herzens nach der letzten ISO Gabe zu erfahren, wurde eine Echokardiographie an Tag 10 sowie in einer Subgruppe eine Piko-Siriusrot-Färbung an Tag 11 des Experimentes durchgeführt. Blutzucker (BZ), Herzfrequenz (HF) und KG der Tiere in den verschiedenen Gruppen waren erneut, bis auf das KG, vergleichbar (Tab. 4.5). Der GLS war erneut nicht durch das KG beeinflusst (Univariate Varianzanalyse, $P > 0,05$).

	KON-H ₂ O	KON-C16:1n7	ISO-H ₂ O	ISO-C16:1n7
BZ (mg/dl)	150,6 ± 16,6	151,1 ± 21,2	165,4 ± 21,7	158,8 ± 35,9
KG (g)	25,33 ± 1,22	25,31 ± 1,12	27,86 ± 2,07 ***	27,59 ± 1,58 ***
KG Zunahme (g)	0,171 ± 0,802	-0,09 ± 1,01	0,55 ± 1,11	0,61 ± 0,768
HF (bpm)	400,9 ± 25,6	396,5 ± 20,1	393,5 ± 31,5	389,7 ± 22,2

Tab. 4.5 BZ-, KG-, und HF-Werte der Tiere zur Echokardiographie einen Tag nach der letzten ISO Gabe (Tag 10/11).

n-Zahl: **BZ, KG:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1n7 n = 15, ISO-H₂O n = 16, ISO-C16:1n7 n = 16; **KG Zunahme:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1n7 n = 15, ISO-H₂O n = 16, ISO-C16:1n7 n = 15; **HF:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1n7 n = 14, ISO-H₂O n = 15, ISO-C16:1n7 n = 16.

Statistik: Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test. Mittelwerte mit Standardabweichung; ns = $P > 0,05$; *** = $P < 0,001$ KON-H₂O VS ISO-H₂O, +++ $P < 0,001$ KON-C16:1n7 VS ISO-C16:1n7.

Beschriftung: BZ Blutzucker, C16:1n7 Palmitoleinsäure, H₂O Wasser, HF Herzfrequenz, ISO Isoproterenolgruppe, KG Körpergewicht, KON Kontrollgruppe.

Wie in Abb. 4.7 A zu sehen, war der GLS bereits einen Tag nach der letzten ISO-Applikation signifikant schlechter in den ISO-Gruppen im Vergleich zu den KON-Gruppen. Im Gegensatz zu Tag 22 zeigte sich hier jedoch noch kein Einfluss von C16:1n7. Die GLSR war erneut nicht signifikant reguliert (Abb. 4.7 D).

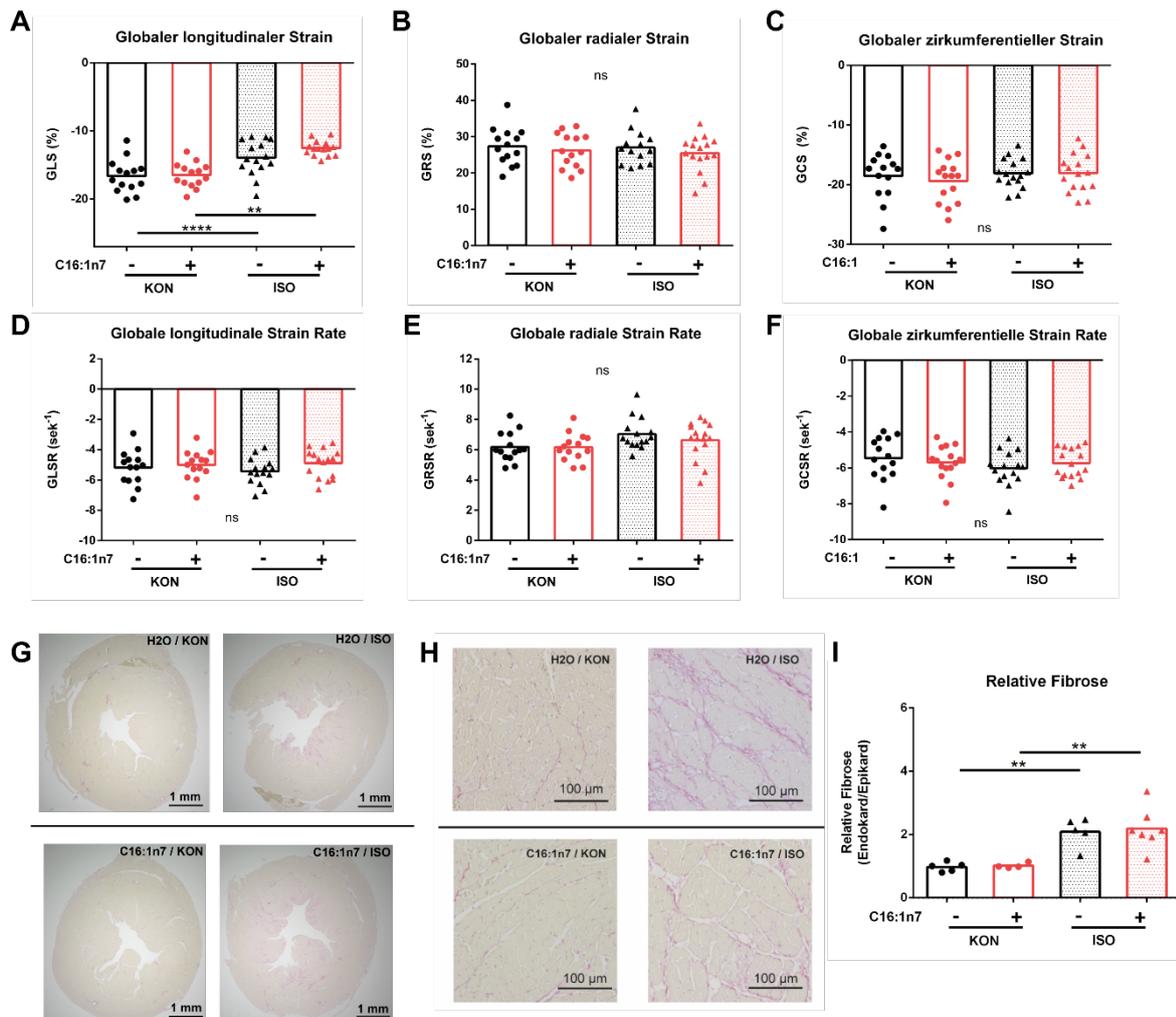


Abb. 4.7 Speckle Tracking Echokardiographie- und Histologieergebnisse an Tag 10/11.

A Absolutwerte des globaler longitudinalen *Strains* und **D** der *Strain*-Rate. **B** Absolutwerte des globaler radialen *Strains* und **E** der *Strain*-Rate. **C** Absolutwerte des zirkadialen radialen *Strains* und **F** der *Strain*-Rate. **G** Histologiebeispielbilder der Herzen zwei Tage nach der letzten ISO-Gabe gefärbt mit Pikro-Siriusrot in der Übersicht und **H** in der Vergrößerung und mit der dazugehörigen **I** Quantifizierung.

Statistik: **A–F, I:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; ns = $P > 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$.

n-Zahl: **A:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1 n = 14; ISO-H₂O n = 15, ISO-C16:1 n = 15; **B, D, E:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1 n = 14; ISO-H₂O n = 15, ISO-C16:1 n = 16; **C+F:** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1 n = 15; ISO-H₂O n = 16, ISO-C16:1 n = 16; **I:** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 4; ISO-H₂O n = 5, ISO-C16:1 n = 7; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, H₂O Wasser, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe, GCS Globaler zirkumferentieller *Strain*, GCSR Globale zirkumferentielle *Strain*-Rate, GLS Globaler longitudinaler *Strain*, GLSR Globale longitudinale *Strain*-Rate, GRS Globaler radialer *Strain*, GRSR Globale radiale *Strain*-Rate.

In der Histologie konnte dieses Ergebnis bestätigt werden: Der Kollagenanteil ist im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht, allerdings zeigte sich kein Behandlungseffekt von C16:1n7 (Abb. 4.7 G–I). Die übrigen *Speckle Tracking*-Parameter waren nicht signifikant reguliert (Abb. 4.7 B–C, E–F).

Zusammenfassend zeigt sich der pro-fibrotische Effekt von ISO bereits wenige Tage nach der letzten Applikation. Im Gegensatz zum langen Arm (Tag 22), konnte jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt keine signifikante Wirkung von C16:1n7 detektiert werden.

4.2.4 ISO induziert geringe kardiale Hypertrophie an Tag 22

Da es im ISO-Modell laut Literatur auch zu hypertrophen Veränderungen im Rahmen des kardialen Remodeling kommen kann [201] und C16:1n7 in Zusammenhang mit der Induktion einer physiologischen Hypertrophie im Herzen steht [9,12], wurden echokardiographische und histologische Veränderungen untersucht, die auf eine Größenzunahme des Herzens hindeuten. Hierzu wurden die sog. konventionellen Echoparameter aus dem M-Mode betrachtet, sowie makroskopische Daten der Tiere und eine HE-Färbung im langen Arm des Versuches analysiert.

Ein wichtiger echokardiographischer Parameter zur Beurteilung der Herzinsuffizienz, die EF, war durch die ISO-Gabe nicht verändert (Abb. 4.8 A), ebenso das FS (Tab. 4.6). Dies steht im Einklang mit der Literatur zum ISO-Modell [175,208].

Als Zeichen der linksventrikulären (LV) Hypertrophie wurden die Wanddicke des LV mittels konventioneller Echokardiographie bestimmt. Weder im Bereich der anterioren (LVAW), noch der posterioren (LVPW) LV-Wand induzierte ISO eine Größenzunahme (Tab. 4.6). Bei Betrachtung der gesamten LVM, die sich aus der LVAW, LVID und LVPW errechnet [184], wurde lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend zur LV-Hypertrophie in den ISO behandelten Tieren beobachtet (Tab. 4.6). Nur bei der LVID zeigte sich eine Größenzunahme unter ISO, diese erreicht nur in der C16:1n7 behandelten Gruppe statistische Signifikanz (Tab. 4.6).

Nach Normalisierung der LVM auf die Tibiallänge (TL) der Tiere stellte sich keine signifikante Veränderung mehr dar (Abb. 4.8 B). Bündelt man die verschiedenen Behandlungsgruppen, sodass nur noch der Unterschied zwischen allen KON- und ISO-Gruppen verglichen wird, so sieht man eine signifikante LVM/TL-Zunahme unter ISO-Gabe (Abb. 4.8 C).

Das gleiche gilt für die Betrachtung des gravimetrischen HG bei der Tötung. Sowohl die Absolutwerte als auch die Relativwerte in Bezug auf die TL unterschieden sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen (Abb. 4.8 D). Bündelt man die Behandlungsgruppen, zeigt sich eine moderate Herzhypertrophie (Abb. 4.8 E).

In der Makroskopie lässt sich dieser Unterschied nur schwer bzw. nicht erkennen (Abb. 4.8 F). In der HE-Färbung stellten sich orientierend keine deutlichen Veränderungen dar (Abb. 4.8 G, H). Da in den vorherigen Analysen bereits keine Unterschiede durch C16:1n7 erkennbar waren, wurde von einer weiteren Quantifizierung abgesehen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es an Tag 21/22 im ISO-Modell zu einer schwachen Zunahme der LVM/TL sowie des HG/TL kam, die jedoch nicht durch C16:1n7 beeinflusst wurde.

	KON-H ₂ O	KON-C16:1n7	ISO-H ₂ O	ISO-C16:1n7
LVAW;d (mm)	0,6613 ± 0,048	0,6488 ± 0,068	0,6817 ± 0,095	0,6191 ± 0,083
LVPW;d (mm)	0,5818 ± 0,073	0,5626 ± 0,063	0,5639 ± 0,061	0,5567 ± 0,055
LVID;d (mm)	3,717 ± 0,202	3,602 ± 0,207	3,882 ± 0,174	3,890 ± 0,209 *
FS (%)	26,12 ± 5,92	26,67 ± 5,89	24,85 ± 3,87	26,26 ± 2,33
LVM (mg)	74,65 ± 10,9	72,60 ± 5,46	80,92 ± 13,11	81,88 ± 7,51
HG (mg)	113,8 ± 5,95	113,7 ± 10,1	122,6 ± 8,63	121,3 ± 5,72

Tab. 4.6 Echokardiographische Parameter und gravimetrisches Herzgewicht an Tag 21/22.

n-Zahl: **LVAW;d, LVPW;d, LVID;d, FS, LVM:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1n7 n = 9, ISO-H₂O n = 10 (FS: n = 9), ISO-C16:1n7 n = 8; **HG:** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1n7 n = 10, ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1n7 n = 9

Statistik: Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; ns = P > 0,05; * = P < 0,05 C16:1n7-KON VS C16:1n7-ISO

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, d in der Diastole, FS Linksventrikuläre Verkürzungsfraction, H₂O Wasser, HG Herzgewicht bei der Tötung, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe, LVAW Linksventrikulärer Durchmesser der anterioren Wand, LVID Linksventrikulärer innerer Durchmesser, LVM Linksventrikuläre Masse, LVPW Linksventrikulärer Durchmesser der posterioren Wand.

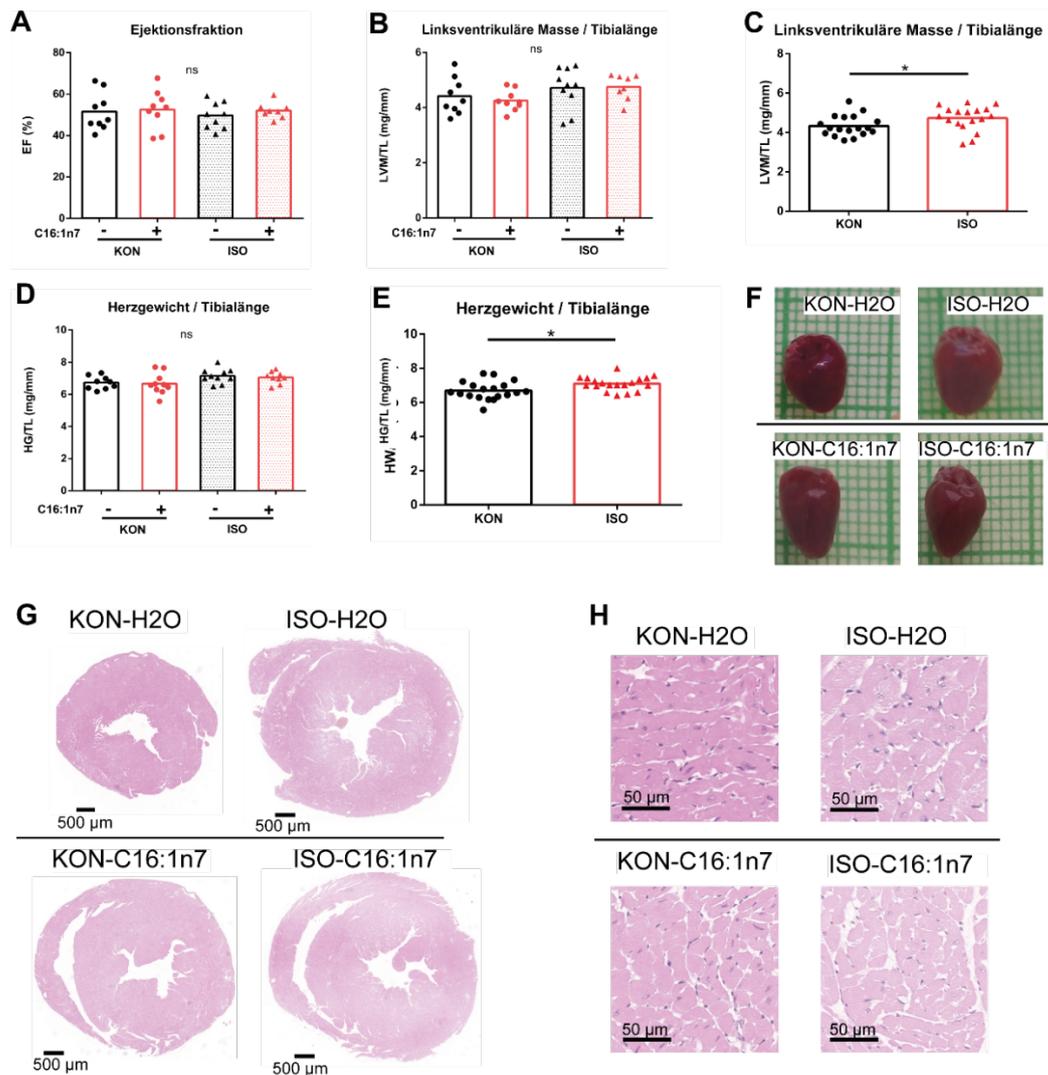


Abb. 4.8 Ergebnisse der konventionellen Echokardiographie, Histologie und Makroskopie der Herzen in Bezug auf Parameter der Hypertrophie an Tag 21/22.

A Ejektionsfraktion gemessen in der konventionellen M-Mode-Auswertung. **B** Linksventrikuläre Masse gemessen im M-Mode-Bild in Relation zur Tibialänge der Mäuse in allen vier Gruppen und **C** gepoolt in den Kontroll- (KON) und Isoproterenol- (ISO) Tieren. **D** Gewogenes Herzgewicht bei Tötung in Relation zur Tibialänge der Mäuse in allen vier Gruppen und **E** gepoolt in den KON- und ISO-Tieren. **F** Photoaufnahme der Herzen der Tiere bei der Tötung. Ein kleines grünes Quadrat entspricht 1 x 1 mm. **G** Übersicht der Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung der Herzen und **H** Nahaufnahme.

Statistik: **A–E:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc Test; ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$.

n-Zahl: **A** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 9; ISO-H₂O n = 9, ISO-C16:1 n = 8; **B** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 9; ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1 n = 8; **C** KON n = 18, ISO-C16:1 n = 18; **D** KON-H₂O n = 9, KON-C16:1 n = 10; ISO-H₂O n = 10, ISO-C16:1 n = 9; **E** KON n = 19, ISO-C16:1 n = 19; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, EF Ejektionsfraktion, H₂O Wasser, HG Herzgewicht bei der Tötung, HG/TL Herzgewicht in Relation zur Tibialänge, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe, LVM Linksventrikuläre Masse, LVM/TL Linksventrikuläre Masse in Relation in Tibialänge.

4.2.5 C16:1n7 hat keine Auswirkungen auf kardiale Hypertrophie direkt nach der ISO Gabe (Tag 10/11)

Nachdem zum finalen Zeitpunkt an Tag 22 lediglich eine geringe ISO-induzierte kardiale Hypertrophie gezeigt werden konnte, sollte diese mit den gleichen Methoden zum Zeitpunkt direkt nach der letzten ISO Gabe (Tag 10/11) untersucht werden.

Bei Betrachtung der EF zeigte sich eine Zunahme unter ISO (Tab. 4.7), die wahrscheinlich durch die β -adrenerge Stimulation bedingt ist [209]. Diese spiegelte sich ebenfalls in der FS wider (Tab. 4.7). Allerdings erreicht diese Veränderung nur in der C16:1n7 Gruppe statistische Signifikanz (Tab. 4.7).

Betrachtet man nun die Echokardiographie, so kann man eine signifikante Dickenzunahme der LVAW sowie der LVPW unter ISO Gabe sowohl bei den mit C16:1n7, als auch mit H₂O behandelten Tieren beobachten (Tab. 4.7). Die Veränderungen des LVID und der LVM waren nicht statistisch signifikant (Tab. 4.7). Betrachtet man dann das Produkt dieser Parameter, die LVM, so ist diese nicht signifikant unter ISO in beiden Behandlungsgruppen erhöht (Tab. 4.7). Nach Normalisierung der LVM zum KG (in beiden Armen) bzw. zur TL (im kurzen Arm), zeigt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 4.9 A+B).

Im Gegensatz dazu erkennt man in den Absolutwerten des gravimetrischen Herzgewichtes sowie nach Normalisierung zur TL und in der Makroskopie eine Größenzunahme in den mit ISO behandelten Gruppen (Tab. 4.7, Abb. 4.9 C+D). Histologisch deutet sich diese Zunahme ebenfalls an (Abb. 4.9 E+F).

Insgesamt stehen die Daten zur kardialen Hypertrophie gemessen mittels Organgewichten oder Echokardiographie im Widerspruch. Festhalten lässt sich jedoch, dass zu diesem Zeitpunkt ebenfalls kein Effekt von C16:1n7 erkennbar ist.

	KON-H ₂ O	KON-C16:1n7	ISO-H ₂ O	ISO-C16:1n7
LVAW;d (mm)	0,6602 ± 0,053	0,6912 ± 0,053	0,7546 ± 0,060 ***	0,7736 ± 0,083 ++
LVPW;d (mm)	0,5931 ± 0,075	0,6146 ± 0,063	0,6762 ± 0,081 *	0,6939 ± 0,088 +
LVID;d (mm)	3,780 ± 0,186	3,792 ± 0,307	3,594 ± 0,243	3,614 ± 0,209
FS (%)	27,94 ± 2,67	27,225 ± 3,00	30,37 ± 4,04	31,13 ± 4,03 +
EF (%)	54,75 ± 4,10	53,64 ± 4,82	58,49 ± 6,25	59,60 ± 5,97 +
LVM (mg)	77,72 ± 10,89	82,07 ± 9,54	85,46 ± 15,92	88,33 ± 7,75
HG (mg) (kurzer Arm)	108,6 ± 7,57	110,0 ± 6,56	136,0 ± 11,4 **	134,9 ± 12,02 ++

Tab. 4.7 Basiswerte der konventionellen Echokardiographie sowie Herzgewicht der Makroskopie an Tag 10/11.

n-Zahl: **LVAW;d, LVPW;d, LVID;d, FS, EF, LVM**: KON-H₂O n = 14, KON-C16:1n7 n = 15, ISO-H₂O n = 16, ISO-C16:1n7 n = 15; **HG**: KON-H₂O n = 5, KON-C16:1n7 n = 5, ISO-H₂O n = 6, ISO-C16:1n7 n = 7.

Statistik: Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; ns = P > 0,05; * = P < 0,05 KON-H₂O VS ISO-H₂O; + = P < 0,05 KON-C16:1n7 VS ISO-C16:1n7; ** = P < 0,01 KON-H₂O VS ISO-H₂O; ++ = P < 0,01 KON-C16:1n7 VS ISO-C16:1n7; *** = P < 0,001 KON-H₂O VS ISO-H₂O.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, d in der Diastole, EF Ejektionsfraktion, FS Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion, H₂O Wasser, HG Herzgewicht bei der Tötung, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe, LVAW Linksventrikulärer Durchmesser der anterioren Wand, LVID Linksventrikulärer innerer Durchmesser, LVM Linksventrikuläre Masse, LVPW Linksventrikulärer Durchmesser der posterioren Wand.

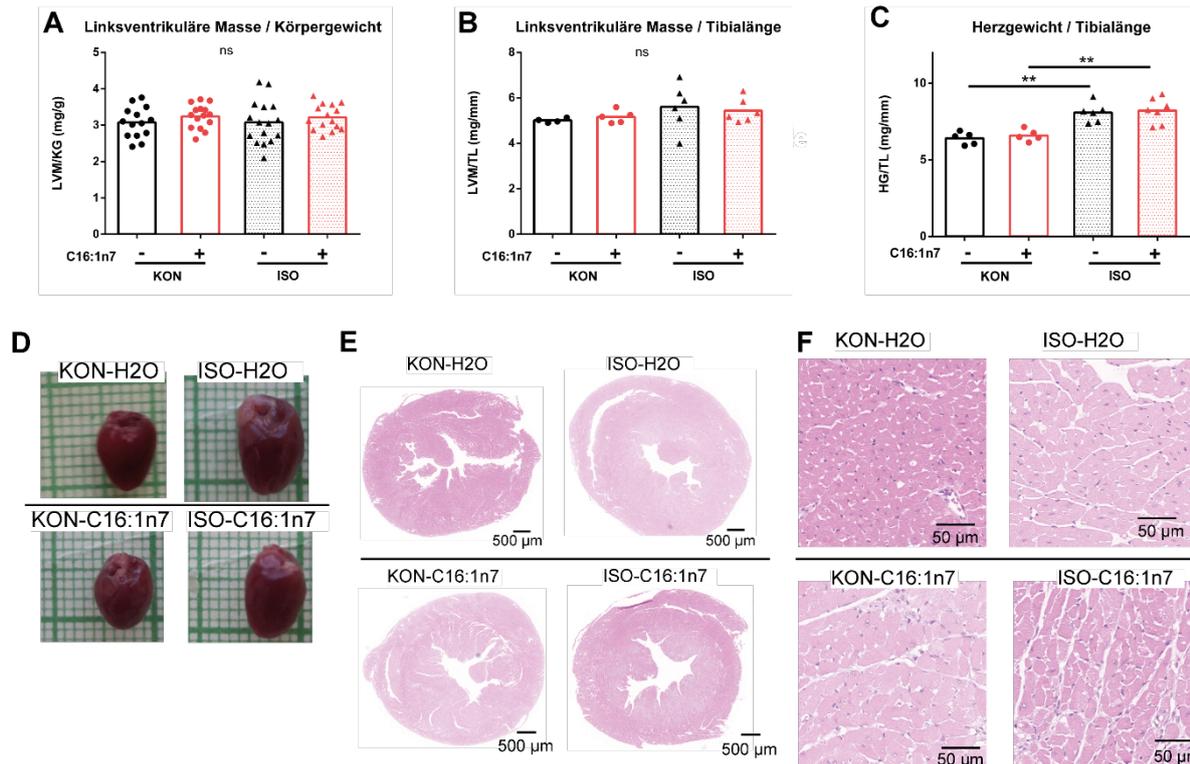


Abb. 4.9 Hypertrophieparameter in der Echokardiographie, in der Makroskopie und Histologie an Tag 10/11.

A Linksventrikuläre Masse (LVM) gemessen im M-Mode Bild in Relation zum Körpergewicht aus beiden Armen. **B** LVM gemessen im M-Mode Bild in Relation zur Tibiallänge (TL) des kurzen Arms. **C** Gewogenes Herzgewicht bei Tötung in Relation zur TL im kurzen Arm. **D** Photoaufnahme der Herzen. Ein kleines Quadrat entspricht 1 x 1 mm. **E** Übersicht der Hämatoxylin-Eosin Färbung der Herzen und **F** Nahaufnahme.

Statistik: **A–C:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; ns = $P > 0,05$; ** = $P < 0,01$.

n-Zahl: **A** KON-H₂O n = 14, KON-C16:1 n = 15; ISO-H₂O n = 16, ISO-C16:1 n = 15; **B** KON-H₂O n = 4, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 6, ISO-C16:1 n = 6; **C** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 6, ISO-C16:1 n = 7; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: C16:1n7 Palmitoleinsäure, EF Ejektionsfraktion, H₂O Wasser, HG Herzgewicht bei der Tötung, HG/TL Herzgewicht in Relation zur Tibiallänge, ISO Isoproterenolgruppe, KON Kontrollgruppe, LVM Linksventrikuläre Masse, LVM/TL Linksventrikuläre Masse in Relation in Tibiallänge.

4.2.6 Expressionsanalyse verschiedener Markergene für kardiales Remodeling und kardialen Schaden

Zur Bestätigung der Effekte von C16:1n7 im ISO-Modell wurde die Expression von Genen, die mit kardialem Schaden und Remodeling assoziiert sind, mittels qRT-PCR untersucht.

Es wurde *Nppa* gemessen, das Teil des fetalen Genprogrammes bei pathologischer kardialer Hypertrophie ist [148]. Zudem wurden die Kollagene *Col1a1* und *Col4a1* untersucht, die durch ihre Akkumulation im Extrazellulärraum mit der Entstehung von Fibrose im Herzen in Zusammenhang stehen [210].

Wenn man zunächst den Endpunkt an Tag 22 betrachtet, so kann man sehen, dass es bei *Nppa* nur in der mit C16:1n7 und ISO behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zu C16:1n7-Kontrolle ohne ISO kam. Diese Daten sind jedoch nur eingeschränkt zu beurteilen, da in dem meisten Gruppen eine ausgeprägte Streuung der Einzelwerte detektiert wurde (Abb. 4.10 A).

Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei der *Col1a1*-mRNA Expression. ISO führte nur in der C16:1n7 Gruppe zu einem statistisch signifikantem Anstieg, allerdings gibt es keinen statistischen signifikanten Unterschied zwischen der ISO-C16:1n7 und ISO-H₂O Gruppe (Abb. 4.10 B).

An Tag 11 des ISO-Modells zeigte sich eine signifikante Hochregulation von *Nppa* und *Col1a1* sowohl in der ISO-C16:1n7 als auch in der ISO-H₂O-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4.10 C+D). Ein anderes mit dem TGF- β -Signalweg assoziiertes Gen, *Col4a1*, zeigt zudem eine Hochregulation in der ISO-H₂O-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle, die in der mit C16:1n7 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr vorhanden ist (Abb. 4.10 E).

Aufgrund der Hinweise auf anti-inflammatorische Eigenschaften von C16:1n7 in der CPDB-Analyse wurde der Makrophagenmarker [211] *Cd68* untersucht. Die Expression von *Cd68* korreliert mit der Makrophagenakkumulation und -aktivierung im Gewebe [212] und dient als ein Surrogat für Inflammation [124]. Die *Cd68*-Expression wird im langen Arm des Versuches (Tag 22) durch C16:1n7 in Ab- und Anwesenheit von ISO reduziert (Abb. 4.10 G). Allerdings wird *Cd68* in beiden Gruppen (-/+ C16:1n7) post-ISO durch ISO induziert, was darauf hindeutet, dass *Cd68* und Makrophageninvasion eine Rolle bei der Entstehung des Schadens in diesem Modell spielen (Abb. 4.10 F).

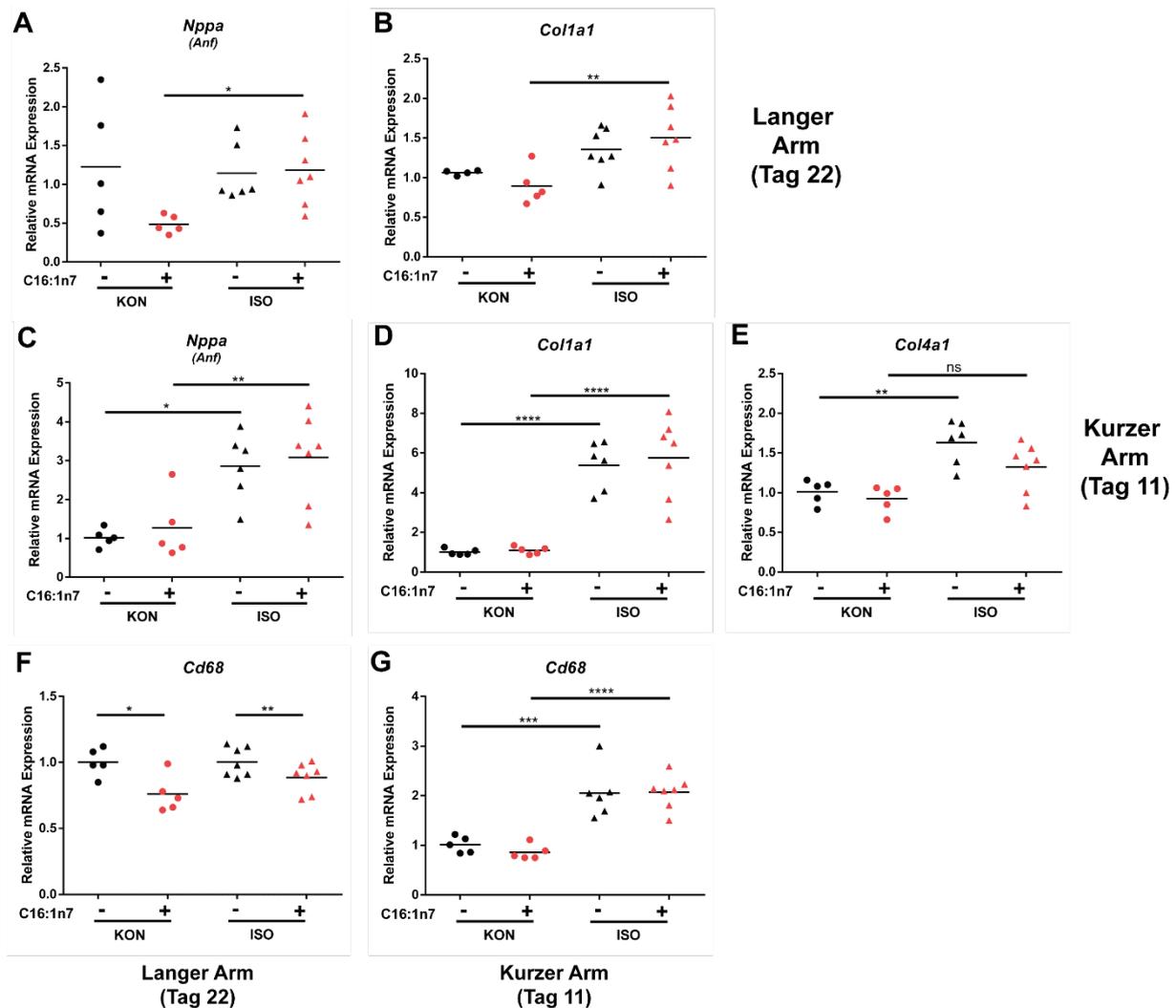


Abb. 4.10 Genexpressionsprofil gemessen mit quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion verschiedener mit kardialem Schaden assoziierter Gene aus Herzgewebe.

A Relative mRNA-Expression von atrialem natriuretischem Peptid (*Anf*) und **B** Kollagen 1a1 (*Col1a1*) im langen Arm der Tiere (Tötung Tag 22). **C** Relative mRNA-Expression von *Anf*, **D** *Col1a1* und **E** Kollagen 4 (*Col4a1*) im kurzen Arm der Tiere (Tötung Tag 11). **F** Relative mRNA-Expression von Cluster of Differentiation 68 (*Cd68*) im langen Arm und **G** im kurzen Arm.

Statistik: **A–G:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test; ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$.

n-Zahl: **A** KON-H₂O n = 8, KON-C16:1 n = 9; ISO-H₂O n = 8, ISO-C16:1 n = 9; **B–E; G** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 6, ISO-C16:1 n = 7; **F** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 7, ISO-C16:1 n = 7; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: *Anf* Atriales natriuretisches Peptid, *C16:1n7* Palmitoleinsäure, *Cd68* Cluster of Differentiation 68, *Col1a1* Kollagen I Typ 1, *Col4a1* Kollagen IV, Typ 1, *H2O* Wasser, *KON* Kontrollgruppe, *ISO* Isoproterenolgruppe.

4.2.7 Kardiale Regulation von PPAR-Zielgenen im ISO-Modell

Schließlich wurde die Regulation von PPAR δ - und PPAR α -Zielgenen im Herzgewebe des ISO-Modells untersucht, da diese aufgrund der RNA-Seq-Daten als potentielle anti-fibrotisch wirksame Ziele von C16:1n7 fungieren könnten.

Im langen Arm des Versuches an Tag 22 konnte keine signifikante Regulation der PPAR δ -Zielgene *Angptl4* und *Pdk4* festgestellt werden (Abb. 4.11 A+B). An Tag 11 im kurzen ISO-Arm zeigte sich signifikante Herabregulation von *Angptl4* durch ISO in der mit C16:1n7 behandelten Gruppe (Abb. 4.11 E). Im Trend war diese Regulation durch ISO ebenfalls in der H₂O-KON-Gruppe zu erkennen (Abb. 4.11 E). Interessanterweise beobachteten wir am Trend der Mittelwerte sowohl in KON- als auch in ISO-Tieren eine erhöhte Expression von *Angptl4* in C16:1n7-behandelten Mäusen (Abb. 4.11 E). *Pdk4* hingegen war im kurzen Arm nicht reguliert (Abb. 4.11 F).

Betrachtet man die stärker von PPAR α regulierten Gene, *Acs1* und *Cpt1b*, so ist *Acs1* zu keinem Zeitpunkt differentiell reguliert (Abb. 4.11 C–D + G–H). *Cpt1b* ist in der Kontrollgruppe unter ISO-Gabe im kurzen Arm weniger stark exprimiert (Abb. 4.11 H). Dieser Effekt ist ebenfalls in der C16:1n7 Gruppe erkennbar, erreicht aber keine statistische Signifikanz. Im langen Arm des Versuches ist jedoch keine signifikante Regulation nachweisbar (Abb. 4.11 D)

In Zusammenschau ist *Angptl4* nur im kurzen Arm in der C16:1n7 Gruppe reguliert. Zu den anderen Zeitpunkten ist keines der PPAR δ -Zielgene differentiell exprimiert. Die PPAR α Zielgene sind nicht durch die Gabe von C16:1n7 beeinflussbar. Lediglich *Cpt1b* zeigt im kurzen Arm eine Herabregulation durch die Gabe von ISO.

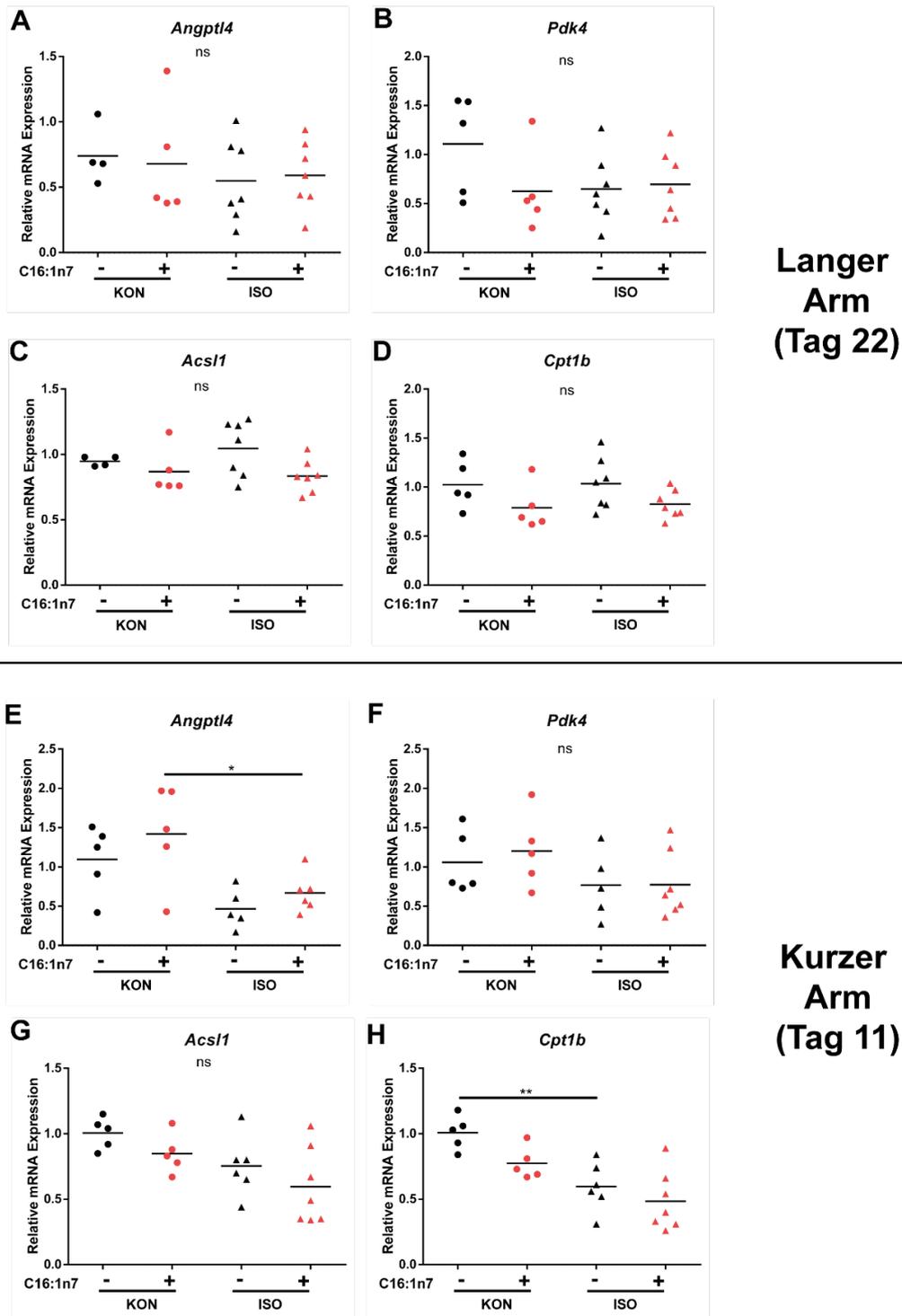


Abb. 4.11 Genexpressionsprofil verschiedener PPAR α - und - δ -Zielgene im Herz.

A Relative mRNA-Expression von PPAR δ -Zielgen Angiopoetin like factor 4 (*Angptl4*) und **B** Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (*Pdk4*) im langen Arm der Tiere (Tötung Tag 22) und **C+D** im kurzen Arm der Tiere (Tötung Tag 11). **E** Relative mRNA-Expression von PPAR α -Zielgen Carnitin Palmitoyltransferase 1B (*Cpt1b*) und **F** Acyl-CoA Synthetase-1 (*Acs1*) im langen Arm der Tiere (Tötung Tag 22) und **G+H** im kurzen Arm der Tiere (Tötung Tag 11).

Statistik: **A–H:** Zweifache Varianzanalyse mit Tukey posthoc-Test.

n-Zahl: **A+E** KON-H₂O n = 4, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 7, ISO-C16:1 n = 7; **B+F** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 7, ISO-C16:1 n = 7; **C** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 5, ISO-C16:1 n = 6; **D** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 5, ISO-C16:1 n = 7; **G+H** KON-H₂O n = 5, KON-C16:1 n = 5; ISO-H₂O n = 6, ISO-C16:1 n = 7; weitere Details im Abbildungsverzeichnis.

Beschriftung: *Acs1* Acyl-CoA Synthetase-1, *Angptl4* Angiopoetin like factor 4; *C16:1n7* Palmitoleinsäure, *Cpt1b* Carnitin Palmitoyltransferase 1B; *H2O* Wasser, *KON* Kontrollgruppe, *ISO* Isoproterenolgruppe, *Pdk4* Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4.

5 Diskussion

Diese Studie lieferte zum ersten Mal den Hinweis, dass die einfach ungesättigte Fettsäure C16:1n7 einen protektiven Effekt auf die Entstehung von kardialer Fibrose im ISO-Mausmodell hat. Die anti-inflammatorische Wirkung von C16:1n7 könnte als möglicher Mechanismus den beobachteten anti-fibrotischen Effekten zugrunde liegen. Des Weiteren konnte eine Aktivierung verschiedener PPAR-Signalwege durch C16:1n7, insbesondere des PPAR δ -Weges, gezeigt werden.

Das erste Ziel dieser Studie war, durch C16:1n7 induzierte Signalwege mittels eines RNA-Sequenzierungsansatzes zu identifizieren. Hierzu wurde eine PMK-Zellkultur etabliert und diese für 3 h mit C16:1n7 stimuliert. Hier zeigte sich das bekannte PPAR δ -Zielgen *Angptl4* als stärkstes durch C16:1n7 hochreguliertes Gen. Ein weiteres PPAR δ -Zielgen, *Pdk4*, war ebenfalls reguliert. Diese Gene wurden anschließend in einem Bestätigungsversuch in HL-1 Zellen und PMK gemessen und ihre Regulation konnte verifiziert werden. Im Gegensatz dazu wiesen die PPAR α -Gene *Acs1*, *Cpt1b* und *Hilpda* eine weniger starke Regulation in den mit C16:1n7 stimulierten HL-1 Zellen auf.

Schließlich wurden die Sequenzierungsergebnisse mittels CPDB weiter ausgewertet, um Signalwege zu identifizieren, die eine Auswirkung auf kardiales Remodeling *in vivo* haben könnten. Hier stellte sich eine Assoziation der C16:1n7-Stimulation mit den Signalwegen Wnt, TNF und TGF- β dar. Diese Signalwege stehen im engen Zusammenhang mit Fibroseentstehung im Herzen.

Im nächsten Schritt wurde ein Mausmodell des subendokardialen fibrotischen Schadens gewählt, das durch eine prolongierte Gabe von ISO induziert wird. Dieses Modell wurde gewählt, um einen ausgeprägten fibrotischen Phänotyp im Herzen zu induzieren. Während eines verlängerten Beobachtungszeitraums (22 Tage) führte die orale Supplementation von C16:1n7 zur signifikanten Verbesserung des echokardiographisch gemessenen GLS und der kardialen Fibrose in der Histologie. Diese Veränderung konnte direkt nach Ende der ISO Gabe an Tag 10/11 noch nicht beobachtet werden. Die Gabe von C16:1n7 hatte im ISO-Modell zu keinem der Zeitpunkte eine Auswirkung auf die Herzhypertrophie, dem sekundären Endpunkt der Untersuchung, wobei sie insgesamt nur schwach ausgeprägt war.

Allerdings konnten die in den Herzproben der Tiere keine Regulation von PPAR-Zielgenen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, die initial als Wirkmechanismus

postuliert wurden. Als Hinweis auf mögliche Mechanismen der protektiven C16:1n7-Effekte könnte die beobachtete Regulation von *Cd68* in der qRT-PCR dienen, welche auf verminderte Inflammation in den Herzen der Tiere hindeutet.

5.1 PMK zur Untersuchung von pharmakologischen Fragestellungen

Als erster Schritt in der hier vorliegenden Arbeit sollte die Zellisolation und -kultur der PMK als Grundlage für die weiteren Versuche etabliert werden.

Wir entschieden uns, primäre Kardiomyozyten zu nutzen, da in Vorarbeiten [9,12] vor allem eine Beeinflussung der kardialen/kardiomyozytären Hypertrophie durch C16:1n7 gesehen wurde. Zudem macht dieser Zelltyp einen Großteil der Gesamtzusammensetzung des Herzens aus (ca. 56 % [213]) und die Größenzunahme von Kardiomyozyten trägt den größten Teil zur Gesamtherzhypertrophie bei [214]. Alternativ hätte eine andere primäre Zellkultur etabliert werden können, wie z. B. Fibroblasten. Jedoch hatten wir zu diesem Zeitpunkt des Projektes noch keinen Hinweis auf anti-fibrotische bzw. anti-inflammatorische kardiale Effekte, weshalb wir uns auf eine Zellart konzentrierten, bei der davon ausgegangen werden konnte, dass die Stimulation mit C16:1n7 zu Veränderungen führt.

Zudem eignen sich isolierte Kardiomyozyten als Modellsystem besonders, um Mechanismen der physiologischen Hypertrophie im Herzen zu untersuchen [215]. Zusätzlich können durch die Betrachtung eines einzelnen Zelltyps auch parakrine Effekte aufgedeckt werden, die z. B. von Kardiomyozyten auf andere Zelltypen ausgehen. So sind Kardiomyozyten ebenfalls an der Entstehung von Fibrose beteiligt, beispielsweise über die Induktion bzw. Steuerung von inflammatorischen Prozessen [216]. Alternativ hätte auch das gesamte Herzgewebe nach einer p. o. Gabe von C16:1n7 untersucht werden können. Wir wählten jedoch diesen Ansatz, um mit einem vereinfachten Untersuchungsmodell arbeiten zu können, welches mechanistische Analysen erleichtert.

Eine Alternative zu Versuchen in einer primären Zellkultur wäre die Durchführung der Experimente in einer sekundären Zellkulturlinie gewesen. Hier stehen verschiedene Kulturen zur Verfügung, zum einen aus atrialem Gewebe wie die HL-1- [163] oder AT-1- [163] Zellkultur sowie die H9C2-Zelllinie aus embryonalem Ventrikelgewebe von Ratten [217]. Diese sekundären Kulturen ähneln allerdings nur bedingt der *in vivo* Situation. So exprimiert die HL-1-Linie beispielsweise eine veränderte

Connexinstruktur im Vergleich zu differenzierten Zellen [218]. Auf den H9C2-Zellen sind u. a. nicht-herzspezifische Kalziumkanäle zu finden [219] und die Zellen müssen erst in einem zusätzlichen Schritt von Myoblasten zu der eigentlichen herzähnlichen Zelllinie differenziert werden [219]. Da wir aber der *in vivo* Situation so nah wie möglich kommen wollten, waren diese Optionen eher ungeeignet.

Ein großer Vorteil der PMK ist die Möglichkeit, nahe an der *in vivo* Situation experimentelle Settings zu simulieren. So ähnelt ihre Ultrastruktur der von Kardiomyozyten, die sich noch im Zellverband befinden [167], sie können kontrahieren [165] und haben eine ähnliche Expression von herzspezifischen Genen [164]. Der Einsatz von PMK wird jedoch dadurch limitiert, dass diese Zellen sehr schwer in Kultur zu halten sind [164–167]. Sie ändern beispielsweise innerhalb von Stunden ihren Phänotyp [167] und die Zellzahl kann sich aufgrund von Zelluntergang innerhalb von kurzer Zeit massiv vermindern [164,166,167].

Aufgrund der geringen Zellviabilität der PMK in Kultur konnten bei den gezeigten Experimenten, insbesondere für die Sequenzierung, keine Triplikate hergestellt werden. Zusätzlich war die Stimulationsdauer auf 3 h limitiert. Eine Möglichkeit der Verbesserung der Viabilität der Zellen wäre die Zugabe von Blebbistatin [220] oder Diacetymonoxim im Medium gewesen. Zudem könnte die Verwendung eines anderen Zellkulturmediums als das von uns genutzte Claycomb-Medium zu einer Verbesserung des Überlebens der PMK führen. So konnten *Zhou et al.* einen Mediumeffekt auf die Zellviabilität der PMK zeigen [167]. Jedoch haben diese Zusätze auch Nachteile, welche die Interpretation von experimentellen Analysen erschwert. So hat Blebbistatin u. a. Einfluss auf die Kalziumsensitivität von isolierten Papillarmuskeln [221]. Diacetymonoxim wirkt als chemische Phosphatase und hat damit einen Einfluss auf verschiedene Ionenkanäle am Herzen [222].

Darüber hinaus wären neonatale Kardiomyozyten als Zellmodell denkbar gewesen. Ein Vorteil dieser Zellen für dieses Experiment wäre gewesen, dass die Haltung dieser Zellen über längere Zeit in Kultur möglich ist [214]. Alternativ wären pluripotente Stammzellen, die zu Kardiomyozyten differenziert werden [186], oder humane adulte Kardiomyozyten [223] möglich gewesen. Sie stellen eine interessante Option für weitere Experimente dar.

Zusammengefasst stellten PMK einen guten Kompromiss aus vielen Faktoren dar, die nahe genug die *in vivo* Situation abbilden, jedoch auch ein vereinfachtes

Stimulationsmodell darstellen. Aus diesem Grund wurden die Stimulation der PMK für die RNA-Seq-Analysen als Modell genutzt.

5.2 Methodische Evaluation der RNA-Expressionsanalyse

In dem vorliegenden Experiment wurde schließlich, aufgrund einer Regulation auf mRNA- und Proteinebene von PPAR α -Zielgenen und einer erfolgreichen Kultivierung bis zu diesem Zeitpunkt, ein Stimulationszeitraum von 3 h für die PMK gewählt und schließlich eine mRNA-Sequenzierung durchgeführt.

Die Qualität der zu sequenzierenden Proben war zufriedenstellend, wenn gleich die RNA-Menge sich drastisch zwischen den Proben unterschied. Aufgrund der aufwendigen Isolation, Kultur und Stimulation der empfindlichen PMK konnten nicht alle Probenpaare am gleichen Tag generiert werden, weshalb ein Paar zwar von gleichaltrigen Mäusen, aber wenige Tage später zur gleichen Tageszeit isoliert wurde. Dies führte unweigerlich zur Veränderung verschiedener, schwer beeinflussbarer Parameter, wie z. B. Luftfeuchtigkeit und Temperatur des Raumes, Dauer und Durchführung der Präparation usw., von denen ausgegangen werden muss, dass sie einen Einfluss auf die Zellen haben könnten.

Dies resultierte schließlich in einem ausgeprägten Chargenunterschied zwischen den Proben #1 und #2/#3, wie aus der Principal Component-Analyse hervorging. Mit 129 differentiell regulierten Genen muss die Anzahl an regulierten Genen im Vergleich zu anderen publizierten Sequenzierungsstudien als eher gering eingestuft werden. *Georgiadi et. al.* konnten im Kontrast hierzu zeigen, dass die einmalige p. o. Gabe von verschiedenen Fettsäuren, u. a. α -Linolensäure (C18:3), in Mäusen 6 h nach der Applikation zu einer differentiellen Regulation von knapp 800 Genen im Herzen führte [224].

Letztlich ist es schwer zu klären, ob die geringe Anzahl von differentiell regulierten Genen auf die Chargenunterschiede zurückzuführen ist, oder ob es an anderen Faktoren liegen könnte. Hierzu könnte die mit 3 h eher kurze Stimulationsperiode zählen. *Foryst-Ludwig et al.* beobachteten eine Veränderung der Zellgröße von HL-1 Zellen nach einer 6-stündigen C16:1n7-Stimulation, sowie eine Akt-Phosphorylierung nach 30 min [9]. Dementsprechend scheint es nicht ausgeschlossen, dass C16:1n7 bereits nach kurzer Zeit einen Einfluss auf Zellen hat. Schließlich geben die

Vorexperimente in diesem Projekt, welche eine Regulation der mRNA-Expression von *Cpt1b* und *Acs11* nach bereits 3 h gezeigt haben, einen Hinweis hierfür.

Ein Vorteil der geringen Anzahl von durch C16:1n7 regulierten Genen ist, dass es sich hierbei um stark ausgeprägte und vermutlich stabile Effekte handelte. Die Unterschiede waren trotz der starken Chargenunterschiede signifikant messbar. Die drei identifizierten PPAR-Gene, *Angptl4*, *Pdk4* und *Hilpda*, ließen sich gut in verschiedenen Zellkulturen und über verschiedene Stimulationszeiträume mit C16:1n7 reproduzieren. Zudem zeigte sich das *Angptl4* vorgeschaltete Gen *Lpl* in der Zellkultur nach 6 h differentiell reguliert.

Aus diesen Gründen ist die Sequenzierung trotz methodischer Probleme als erfolgreich und übertragbar zu betrachten. Obwohl vermutlich einige differentiell regulierte Signalwege nicht abgebildet wurden, konnten die nachgewiesenen Genregulationen stabil reproduziert werden.

5.3 Aktivierung von PPAR-Signalwegen durch C16:1n7

Zusammenfassend konnte in der Sequenzierung und in den Bestätigungsversuchen eine Aktivierung von PPAR-Zielgenen unter C16:1n7-Stimulation gezeigt werden.

Alle drei Isoformen von PPAR können im Herzen von Mäusen detektiert werden, wobei vor allem PPAR α und - δ exprimiert werden [84,92]. Zudem ist bekannt, dass Fettsäuren verschiedene PPAR Unterformen aktivieren können [87,192,224]. Wir konnten zeigen, dass insbesondere PPAR δ zugeordnete Zielgene, nämlich *Angptl4* [124,191,192], *Lpl* [191] und *Pdk4* [124], durch C16:1n7 reguliert waren. Im Gegensatz hierzu waren die eher PPAR α zugeordneten Gene *Acs11* und *Cpt1b* schwächer reguliert.

Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass C16:1n7 mehrere PPAR-Signalwege aktiviert. Da es zu einer ausgeprägten Hochregulation von *Angptl4* kam, kann von einer stärkeren δ - als α -/ γ -Aktivierung ausgegangen werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der PPAR kann es zu einer simultanen Aktivierung mehrerer Rezeptoren kommen, beispielsweise durch Fettsäuren [87]. Zudem gibt es – insbesondere bei PPAR α und - δ – Überlappungen im Genaktivierungsmuster [225].

Entgegengesetzt zu dieser Hypothese zeigten *Xu et al.* mittels Scintillation Proximity Assay, dass C16:1n7 stärker an PPAR α und - γ als - δ binden müsste [87]. Wir konnten ebenfalls eine Aktivierung von PPAR α zugeordneten Genen, *Acs11* [9] und

Cpt1b [190], zeigen. Diese waren jedoch im Vergleich zu *Angptl4* und *Pdk4* schwächer reguliert. Wenngleich mit den vorliegenden Daten nicht abschließend zu klären ist, ob es eher zu einer PPAR δ - oder α -Aktivierung kommt, so liefert die Regulation von *Lpl* in diesem Experiment einen weiteren Hinweis auf eine PPAR δ -vermittelte Regulation. Durch die Gabe von Fibraten kommt es u. a. zu einer Aktivierung von PPAR α , was in der Leber und im Fettgewebe zu einer verstärkten Expression von *Lpl* führt [226,227]. Wir konnten in unseren Versuchen jedoch zeigen, dass die *Lpl* Expression – nach 6 h Stimulation mit C16:1n7 – supprimiert wird. Dies passt eher zu einer PPAR δ -vermittelten Aktivierung von *Angptl4*, das als Zielgen *Lpl* herabreguliert [192]. Entgegengesetzt hierzu konnten *Carrol et al.* zeigen, dass *Lpl* auch durch eine PPAR α -Aktivierung in isolierten Rattenkardiomyozyten herabreguliert werden kann [228].

Lpl ist ein Transmembranprotein, dessen Expression durch das intrazelluläre Protein *Angptl4* reguliert wird [192]. Als membrangebundenes Enzym und führt es im Serum zur Hydrolyse von Triacylglycerid-haltigen Lipoproteinen zu freien Fettsäuren [229]. Damit stellt es ein Schlüsselenzym zur Aufnahme von Fettsäuren in den Kardiomyozyten dar [124,192]. Eine verstärkte Expression von *Angptl4* führt zu einer Herabregulation von *Lpl* in einer PPAR δ -vermittelten Weise [192].

Bei *Angptl4* handelt es sich um ein spezifisches Gen des PPAR δ -Signalweges. So konnten *Georgiadi et al.* mittels Gabe unterschiedlicher Fettsäuren in einem Mausmodell zeigen, dass diese insbesondere die *Angptl4*-Expression verstärken [192]. Anschließend wurde das Experiment in PPAR α -KO- und PPAR δ -KO-Mäusen wiederholt. Hier konnte in den PPAR δ -KO-Mäusen nach der Fettsäurengabe keine Induktion von *Angptl4* beobachtet werden, wohingegen in den PPAR α -KO-Mäusen noch eine schwache Regulation stattfand [192]. Im Einklang mit diesen Daten konnten *Catoire et al.* in humanen Skelettmuskelzellen zeigen, dass Fettsäuren insbesondere *Angptl4* induzieren [191]. Zudem wurde die Expression des PPAR δ -Zielgens *Pdk4* durch die Gabe der Fettsäure Ölsäure (C18:1) verstärkt [191]. Dieser Effekt konnte in einer Muskelzelllinie reproduziert werden, wie *Nahlé et al.* zeigen konnten [230]. Durch die Zugabe von Ölsäure, einem PPAR δ -Liganden, konnte die mRNA- und Proteinexpression von PDK4 erhöht werden. Zudem konnte die Induktion von *Pdk4* im Diaphragma durch Fasten in WT-Mäusen ausgelöst werden, jedoch nicht in den PPAR δ -KO-Mäusen [230]. Dementsprechend scheint PDK4 ebenfalls ein PPAR δ -Zielgen zu sein [230].

Jedoch scheint die PPAR-Aktivierung kein C16:1n7-spezifischer Effekt zu sein. Vermutlich kommt es hauptsächlich auf das Muster der PPAR-Aktivierung an. Aus diesem Grund wäre eine Kontrolle mit einer anderen Fettsäure in unserem Modell interessant gewesen, um Effekte, die insgesamt durch Fettsäuren ausgelöst werden, von den C16:1n7-spezifischen Wirkungen abzugrenzen. Hierzu könnten z. B. leicht verschiedene Zellkulturversuche mit beispielsweise Ölsäure (C18:1) und Stearinsäure (C18:0) durchgeführt werden.

Jedoch ist die These, dass C16:1n7 PPAR δ stärker aktiviert als PPAR α und γ , durch die Messung der Zielgen-mRNA nicht abschließend bestätigt. Um zu klären, welche PPAR-Isoform durch C16:1n7 stimuliert wird, könnte die Aktivität der PPAR nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten bestimmt werden. Mithilfe von Luciferase-basierten Transaktivierungsassays [231] kann direkt die Aktivierung der Ligandenbindungsdomänen unterschiedlicher PPAR-Isoformen gemessen werden [232]. Die Anwendung von C16:1n7 und spezifischer synthetischer Agonisten für die einzelnen PPAR-Isoformen könnten dann die Spezifität von C16:1n7 aufklären. Somit kann die Frage, ob es *in vitro* eher zu einer PPAR δ -, α oder γ -Aktivierung kommt, nicht vollständig geklärt werden. Vermutlich kommt es zu einer balancierten Aktivierung aller Rezeptoren. Insbesondere durch die Reproduzierbarkeit in anderen Zelllinien ist jedoch davon auszugehen, dass die PPAR δ zugeordneten Zielgene nach einer einmaligen 3 h Stimulation reguliert sind. Da die PPAR δ -Aktivierung überwiegt, soll nun insbesondere die Auswirkungen der PPAR δ -Aktivierung im Herzen bei Inflammation und Fibrose betrachtet werden.

5.4 Vermittlung von anti-fibrotischen Effekten durch die Beeinflussung von Wnt/TGF- β , PPARs und Angptl4

Schließlich konnte die *in vitro* Hypothese, dass C16:1n7 einen anti-fibrotischen Effekt hat, *in vivo* übertragen werden. In der CPDB-*Overrepresentation-Analysis* zeigte sich, dass die Stimulation mit C16:1n7 zur Regulation verschiedener, an der Fibroseentstehung beteiligter Signalwege führt, insbesondere TNF, NF- κ B, Wnt und TGF- β . Zusätzlich konnten wir im ISO-Modell dokumentieren, dass C16:1n7 eine signifikante GLS-Verbesserung und eine Reduktion der kardialen Fibrose induziert.

Unsere initiale Annahme war, dass durch PPAR-Aktivierung, hauptsächlich durch PPAR δ sowie dem parakrin wirkenden Protein ANGPTL4 [200,233], eine anti-

fibrotische Wirkung im Herzen entfaltet werden kann [95]. Dies äußert sich schließlich in einer Beeinflussung des TNF-, NF- κ B-, Wnt- und TGF- β -Signalweges.

Vermittlung der anti-fibrotischen Effekte durch Beeinflussung des Wnt-Signalweges mittels PPAR-Aktivierung

Der Wnt- und TGF- β -, wie auch der TNF- und NF- κ B-Signalweg, sind mit Fibroseentstehung und Inflammation, u. a. im Herzen, assoziiert [122,135,146,234]. So führt die Aktivierung von TGF- β in der Haut via Stimulation von Wnt zu einer erhöhten *in vitro* Aktivität von Fibroblasten sowie zu einer *in vivo* Fibroseentstehung, wie *Akhmetshina et al.* zeigen konnten [234]. In fibrotischen Herzen kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität von Wnt, wie *Liu et al.* bei Patienten mit chronischem Nierenversagen beobachteten [235].

Dass PPAR γ -Agonisten, wie z. B. Pioglitazon, die β -Catenin-vermittelte Transdifferenzierung von kardialen Fibroblasten unterdrücken können, wurde von *Guo et al.* gezeigt [236]. Pioglitazon konnte in einem *in vitro* Modell die Angiotensin-II-vermittelte Transdifferenzierung über einen Sirtuin-3-vermittelten Signalweg verhindern [236]. *In vivo* konnte Pioglitazon die Entwicklung von kardialer Fibrose bei Dahl salzsensitiven Ratten reduzieren, was von *Kamimura et al.* ebenfalls auf die Hemmung des Wnt-Signalweges zurückgeführt wurde [237]. Außerdem konnten *Gao et al.* eine Verbesserung der vaskulären Fibrose in spontan-hypertensiven Ratten durch Pioglitazon feststellen, wobei dies nicht auf eine Beeinflussung der TGF- β -/Wnt-/ β -Catenin-Achse zurückführen war [238].

Während die Wirkung der PPAR γ -Aktivierung im Herzen auf den Wnt-Signalweg bereits untersucht wurde, gibt es kaum Daten zur PPAR δ -Aktivierung. *Scholtyssek et al.* demonstrierten, dass im Knochen das Wnt-Signaling durch PPAR δ reguliert wird [103]. Im Vergleich zur Stimulation mit PPAR γ -Agonisten kam es unter dem PPAR δ -Agonisten GW501516 zu einer stärkeren Aktivierung des Wnt-Signalweges in primären Osteoblasten [103]. Da es sich hier um eine Regulation handelt, die im Herzgewebe nicht mit unseren Daten im Einklang steht, sind diese Erkenntnisse eventuell nur begrenzt bzw. nicht übertragbar. So würde gemäß dieser Literatur die verstärkte Aktivierung von Wnt durch PPAR δ eher zu einer vermehrten Fibroseentstehung im Herzen führen.

Interessanterweise kommt es bei der post-translationalen Modifikation von Wnt zu einer Bindung an C16:1n7 im endoplasmatischen Reticulum, der sog. Lipidierung [239,240]. Diese Modifikation ist essenziell für die Funktion der Wnt-Proteine, insbesondere für ihre Bindung an ihren Rezeptor *Frizzled* [239]. Diese Modifikation kommt, so weit bekannt, bei keinem anderen Protein vor [240].

Inwieweit die Stimulation mit C16:1n7 einen Einfluss auf das Wnt-Signalling hat, wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht, wäre jedoch interessant für weitere Experimente. So könnte man beispielsweise verschiedene Wnt-Liganden auf mRNA-Ebene in den Herzproben der ISO-Tiere messen, wie *Wnt1-3*, oder β -Catenin auf Proteinebene quantifizieren [241]. In einem Microarray könnte zudem eine umfassende Messung von Wnt- und TGF- β -Zielgenen durchgeführt werden.

Die PPAR δ -Aktivierung übt direkt eine anti-fibrotische Wirkung aus

Wir konnten durch unsere *in vitro* Daten zeigen, dass es zu einer Aktivierung von PPAR δ -Zielgenen durch C16:1n7 kommt und stellten auf Grundlage der Literatur die Hypothese auf, dass es u. a. dadurch zu einer Verminderung von kardialer Fibrose im ISO-Modell kommen sollte. Diese Hypothese wird durch vorpublizierte Untersuchungen gestützt.

So konnten *Teunissen et al.* einen anti-fibrotischen Effekt verschiedener PPAR-Agonisten auf neonatale Rattenfibroblasten nachweisen [97]. Hier konnte insbesondere der PPAR δ -Ligand GW501516 im Gegensatz zu dem PPAR α -Agonisten Wy-14,643 und PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon die Fibroblastenproliferation, -transdifferenzierung und Kollagensynthese reduzieren [97]. Des Weiteren führte eine PPAR δ -Aktivierung mittels transgener Überexpression in einem TAC-Modell zu einer verminderten Fibroseausbildung im Herzen, wie *Liu et al.* zeigen konnten [146]. In dieser Studie wurde die mittels Tamoxifen induzierbare Überexpression von PPAR δ spezifisch im Herzen genutzt [146]. Durch die induzierte kardiale PPAR δ -Überexpression konnte die Herzfunktion der Mäuse 14 Tage nach TAC verbessert werden [146]. Parallel kam es zu einer verstärkten Expression von β -Oxidationsgenen als Zeichen einer vermehrten Nutzung von Fettsäuren, die mit der verminderten Fibroseausbildung im Herzen einherging [146].

Im Gegensatz zu diesen Versuchen steht das Modell von *Park et al.*, in dem der PPAR δ -Agonist GW610742 keine Verbesserung von echokardiographischen

Parametern nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt sowie eine vermehrte Fibrose kurz nach Schadensinduktion auslöste [98]. Im weiteren Verlauf besserte sich die Wundheilung im infarzierten Gebiet, jedoch ohne positive Beeinflussung funktioneller Parameter in der Echokardiographie [98]. *Jucker et al.* konnten ebenfalls in einem experimentellen Modell des Myokardinfarktes in Ratten keinen positiven Einfluss des PPAR δ -Agonisten GW610742 auf die LV-Funktion erkennen, wenngleich es zu einer deutlichen Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion kam [99]. Im Kontrast hierzu stehen die Ergebnisse von *Magadum et al.*, die in einem Mausmodell des Myokardinfarktes einen positiven Effekt des PPAR δ -Agonisten GW0742 auf die Narbenbildung, auf kardiale Funktionsparameter, sowie auf die kurz- und langfristige Proliferation von Kardiomyozyten hatte [100].

Laut Studienlage ist also nicht eindeutig, ob eine PPAR δ -Aktivierung zu positiven Effekten in Modellen der Fibrose, der kardialen Hypertrophie oder der Herzinsuffizienz führt. Ein Grund hierfür könnte die Vielzahl der genutzten Modelle (TAC, Myokardinfarkt) und Versuchstiere (Maus, Ratte) sein. Eine andere Erklärung könnten die verwendeten Agonisten liefern. Nicht jeder PPAR-Agonist aktiviert die Rezeptoren gleich stark, teilweise kommt es auch zu einer gemischten Aktivierung mehrere Rezeptoren wie beispielsweise bei Bezafibrat [106]. So beträgt die mittlere effektive Konzentration, also die Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird [242], des PPAR δ -Agonisten GW501516 am PPAR δ -Rezeptor 0,001 μ M, allerdings auch 0,704 μ M am PPAR α - und 0,839 am PPAR γ -Rezeptor [243]. Bei einem anderen PPAR δ -Agonisten, GW0742, beträgt die mittlere effektive Konzentration hingegen 0,001 μ M an PPAR δ , 1,1 μ M an PPAR α und 2,0 μ M an PPAR γ [244]. Zudem ähneln sich die drei PPAR stark in ihrer dreidimensionalen Anordnung der ligandenbindenden Domäne, weshalb es häufig zu einem gemischten Agonismus an mehreren Rezeptoren kommt [245].

Eventuell kommt es also auf das richtige Maß der Aktivierung bzw. das PPAR-Stimulationsmuster an den verschiedenen PPAR-Rezeptoren an, um positive Effekte auf das Herz und die verminderte Ausbildung von Fibrose nachweisen zu können. Letztlich konnten wir in unserem ISO-Modell zeigen, dass es durch C16:1n7 zu einer verminderten Fibrose bei einer *in vitro* nachgewiesenen Induktion von zu verschiedenen PPAR-Signalwegen gehörenden Zielgenen kommt.

Die verstärkte Expression von ANGPTL4 bietet einen Schutz vor Fibrose durch Verminderung der Lipotoxizität im ISO-Modell

Schließlich konnten wir *in vitro* eine statistisch signifikante Induktion von *Angptl4* in C16:1n7-behandelten PMK zeigen. Dieser Effekte entsprach *in vivo* einer statistisch nicht signifikanten Induktion der kardialen *Angptl4*-Expression durch C16:1n7 im kurzen Versuchsaarm des ISO-Modell.

Bereits die verstärkte Expression von *Angptl4* kann die Entstehung von Fibrose beeinflussen [95,193]. In Maus- und Rattenmodellen der Wundheilung konnten *Teo et al.* zeigen, dass *Angptl4* mittels eines parakrinen Mechanismus β -Catenin beeinflusste und zu einer schnelleren Heilung und funktionell besseren Hautnarben führte [193]. Schließlich konnten diese Ergebnisse in humanen Fibroblasten reproduziert werden, was auf einen zwischen den Spezies konservierten Mechanismus hindeutet [193]. Der PPAR δ -Agonist GW0742 konnte ebenfalls in einem experimentellen Modell der Rechtsherzhypertrophie mittels Abbinden einer Pulmonalarterie vor Fibrose schützen und verminderte die rechtsventrikuläre Hypertrophie, wie *Kojonazarov et al.* zeigen konnten [95]. Das Gen, das am stärksten durch den PPAR δ -Agonisten beeinflusst war, war *Angptl4* [95].

Yu et al. und *Yau et al.* konnten zeigen, dass *Angptl4*, als Zielgen von PPAR δ , die Aktivität von *Lpl* u. a. im Herzen hemmt [200,246]. Durch die verminderte *Lpl*-Aktivität wurde ein Anstieg von freien Fettsäuren und Triglyceriden im Plasma induziert [247]. Diese Daten entsprechen anderen Studien, in denen *Angptl4* über die Reduktion der *Lpl*-Aktivität zu einer verminderten kardiale Lipidaufnahme führt und somit vor oxidativem Stress schützt [192]. Die ISO-Stimulation führt zu einem Anstieg von freien Fettsäuren und deren Aufnahme ins Herzgewebe sowie einem verstärkten Abbau von Triglyceriden zu Fettsäuren [248]. Schließlich kommt es zu einer vermehrten zellulären Einlagerung von Lipiden und Lipotoxizität, wie *Shao et al.* in einem Mausmodell mittels Oil Red O-Färbung zeigen konnten [249]. Somit wäre ein möglicher Wirkmechanismen der PPAR δ -Aktivierung und nachfolgender *Angptl4*-Induktion im ISO-Modell, dass die verstärkte kardiale Expression von *Angptl4* die Aktivität von *Lpl* vermindert und damit eine verstärkte Fettsäureaufnahme und damit verbundene Lipotoxizität während der ISO-Gabe reduziert.

Cheng et al. zeigten in einem herzspezifischen PPAR δ -KO-Mausmodell, dass es bereits bei normaler Diät der Mäuse zu einer vermehrten Lipidakkumulation im Herzen

im Alter von 9 Monaten kommt [250]. Da die anderen PPAR-Isoformen im Herzen intakt waren, kann darauf zurückgeschlossen werden, dass insbesondere das Fehlen von PPAR δ verantwortlich für die Lipidakkumulation war [250]. Zudem entwickelten die Tiere bereits im Alter von 4 Monaten eine schwere Herzinsuffizienz mit Herzhypertrophie und Fibrose [250]. Außerdem waren Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels herabreguliert [250]. All dies deutet darauf hin, dass PPAR δ eine Schlüsselrolle im Fettstoffwechsel des Herzens einnimmt.

Weiterhin ist zu bemerken, dass PPAR δ eine Schlüsselrolle im Fettstoffwechsel des Herzens und der Pathogenese der Herzfibrose und -insuffizienz einnimmt. Über die beschriebene Aktivierung der *Angptl4-Lpl*-Achse mit einhergehender Protektion vor kardialer Lipotoxizität könnten diese Prozesse auch eine bedeutende Rolle für die C16:1n7-Effekte in unserem Modell spielen.

5.5 Protektive Auswirkungen auf kardiale Fibrose durch C16:1n7 im ISO-Modell

In der hier vorliegenden Studie konnte ein Effekt von C16:1n7 *in vivo* auf kardiale Fibrose nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Verbesserung des GLS, der sich allerdings erst 12 bzw. 13 Tage nach der letzten ISO-Applikation ausbildete (Tag 21/22). Der GLS korreliert mit dem Ausmaß der subendokardialen fibrotischen Schädigung im ISO-Modell, wie *Beyhoff et al.* zeigen konnten [175]. Dieser Effekt wurde durch die Histologie mit der kardialen Picro-Siriusrot-Färbung im langen Studienarm unterstützt.

Im Gegensatz zu den klaren Ergebnissen der Histologie und Echokardiographie stehen in dieser Arbeit die Analyse der Genexpression verschiedener an der Fibroseentstehung beteiligter Gene. Ein Grund hierfür könnte sein, dass, wenn der pathologische Stimulus, in diesem Fall die Gabe von ISO, wegfällt, sich auch die Kollagen-mRNA-Expression über die Zeit ändert und letztendlich keine Veränderung mehr anzeigt. Zudem wird die Kollagenexpression auf mRNA-Ebene nicht immer in ISO-Studien gemessen bzw. berichtet [175,176,181,196,251,252] (Publikationen nach 2010), weshalb es wenige Daten zur deren Veränderung zu dem von uns untersuchten späteren Zeitpunkt gibt. So berichten *Yin et al.* direkt, bzw. 24 h nach der letzten ISO-Gabe in Ratten einen Effekt auf *Col1* und *Col3* [253], genau wie *Wang et al.* und *Challa et al.* in Mäusen [254,255]. Lediglich *Grune et al.* berichteten in einem Protokoll wie in der hier vorliegenden Studie einen Effekt auf die mRNA-Expression von *Col1a1* 14

Tage nach der letzten ISO-Applikation [177]. Es scheint also, dass die Dynamik der Expression von Kollagenen auf mRNA-Ebene im ISO-Modell ein wichtiger Parameter ist. Die Induktion der Kollagen-mRNA geht der Entstehung der histologischen Fibrose voraus. Ein weiterer Faktor ist, dass nur bestimmte Kollagene, z. B. *Col4a1*, durch die C16:1n7-Gabe beeinflusst wurden.

Alternativ könnte die histologische Untersuchung methodischen Schwankungen unterliegen. Zwar wurde bei der Präparation des Herzens erfahrene Präparatoren eingesetzt, jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Entnahme des Herzringes auf geringgradig unterschiedlichen LV-Ebenen stattfand. Die Gabe von ISO führt insbesondere in den apikalen LV-Abschnitten zu einem ausgeprägteren Schaden [196,203,251,256], weshalb die Schnitthöhe bzw. Schnittrichtung einen Einfluss auf die histologische Auswertung haben kann.

Die Echokardiographie zeigte eine Verbesserung des GLS durch C16:1n7 zum finalen Zeitpunkt. Dies korreliert nach Literatur ebenfalls mit dem Ausmaß an subendokardialer Fibrose im ISO-Modell [175]. Die *Speckle Tracking*-Echokardiographie wird jedoch auch von kardialer Hypertrophie beeinflusst, wie *An et al.* zeigen konnten [257]. Da in unserem Versuch jedoch das Ausmaß der Herzhypertrophie sehr gering war und in beiden ISO-Gruppen vorlag, ist davon auszugehen, dass dies keinen größeren Einfluss auf den GLS in unseren Experimenten hatte. Auffällig ist jedoch, dass die GLSR nicht signifikant reguliert war, obwohl dies in der Literatur häufig beschrieben ist. *Beyhoff et al.* konnten eine Regulation der GLSR im ISO-Modell nach 14 Tagen beobachten [175]. *An et al.* konnte dies zwar nicht 3 Tage, aber 7 Tage nach der ISO-Gabe nachweisen [257]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die GLSR aufgrund der hohen Standardabweichung die statistische Signifikanz knapp nicht erreicht. Im Gegensatz zum GLS beschreibt die GLSR den *Strain*, also die Deformation eines Objektes in Relation zu seiner ursprünglichen Form, im Verhältnis zur Zeit [258]. Zwar war die Herzfrequenz nicht signifikant unterschiedlich in den Gruppen, jedoch ist sie – isoliert betrachtet in der ISO- und KON-Gruppe – niedriger in der ISO-Gruppe, was mit der Gabe von ISO zusammenhängt [259]. Geringe Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Herzfrequenz könnten die GLSR beeinflusst haben, sodass dieser Parameter in der untersuchten Studienkohorte nicht signifikant reguliert wurde.

Festzuhalten bleibt, dass der anti-fibrotische Effekt von C16:1n7 im langen Arm dieser Studie mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich verhinderte C16:1n7 die ISO-vermittelte Induktion *Col4a1* zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 11) im Versuchsverlauf. Es ist also in der Gesamtschau der Daten von einem anti-fibrotischen Effekt von C16:1n7 auszugehen.

5.6 Kardiale Hypertrophie im ISO-Modell kann nicht durch C16:1n7 beeinflusst werden

Laut Literatur induziert die chronische Gabe von ISO neben kardialer Fibrose auch Hypertrophie [175,176,201]. In dieser Studie konnte nur eine schwach ausgeprägte Hypertrophie im langen Arm und im kurzen Arm nur eine gravimetrische Gewichtszunahme des Herzens nachgewiesen werden. Zu keinem der beiden Zeitpunkte hatte die Gabe von C16:1n7 einen Einfluss auf die Hypertrophieausbildung. Da es sich bei der Hypertrophie im ISO-Modell um eine transiente Hypertrophie handelt [175], könnte das der Grund sein, warum im langen Arm an Tag 22 keine Größenzunahme des Herzens nachweisbar ist. Im kurzen Arm zeigte sich eine Größen- und Gewichtszunahme des Herzens, die jedoch nicht in der Echokardiographie nachweisbar war. Wir mussten jedoch eine große Streubreite der echokardiographisch erhobenen Werte feststellen, was daraufhin deuten könnte, dass sich der hypertrophe Effekt zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig in allen Tieren ausgebildet hatte. Die makroskopischen Untersuchungen fanden einen Tag nach der Echokardiographie statt. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich die kardiale Hypertrophie gut gravimetrisch nachweisen. Da hier allerdings kein C16:1n7-Effekt sichtbar war, wurde auf eine weitere Untersuchung der Hypertrophie verzichtet.

Des Weiteren ist das Ausmaß des Schadens im ISO-Modell dosisabhängig [203,204]. Das von uns verwendete Modell nutzt eine, verglichen mit anderen Protokollen, niedrige Dosis, um die Mortalität der Versuchstiere gering zu halten, da diese ebenfalls dosisabhängig ist. So starben von unseren Versuchstieren bei einer kumulativen Dosis von 100 mg/kgKG ISO s. c. 15,8 % der Tiere. In einer Publikation von *Grimm et al.* mit einem Protokoll an Ratten und mit einer Gabe von insgesamt 150 mg/kgKG s. c. lag die Mortalität der ISO-Gruppe bei 50 % [207].

Wichtig zu bedenken bei der Untersuchung von kardialer Hypertrophie ist, dass diese u. a. KG-abhängig ist. Zu Beginn unseres Tierversuches zeigten sich Unterschiede im

KG der Mäuse. Da das Ausmaß des durch ISO-induzierten Schadens zudem vom Alter der Tiere abhängt [182,183] und das KG der Mäuse unter normalen Haltungsbedingungen mit deren Alter bis zum Erreichen der Adoleszenz zunimmt, wurden die Tiere zu Beginn nach dem KG gestaffelt und dann innerhalb der Gruppen randomisiert. Da das KG auch einen Einfluss auf das Herzgewicht hat [260,261], könnte dieser Faktor auch Bedeutung für unsere Analysen haben. Die Gabe von ISO beeinflusst außerdem das KG und es nimmt je nach Publikation zu [176] bzw. ab [207]. Zwar sollte es durch eine Normalisierung zum KG relativiert werden, der Goldstandard ist jedoch trotzdem die TL. Im kurzen Arm konnte jedoch nicht auf diese normalisiert werden, da der Versuch nach der Echokardiographie fortgesetzt wurde. Dies könnte ein weiterer Grund für die divergenten Ergebnisse in der Echokardiographie und der gravimetrischen Messung sein.

Im Einklang mit der Literatur hatte auch in unserem Modell ISO keinen Einfluss auf die EF, es handelte sich also um ein Modell der Herzinsuffizienz mit erhaltener EF [175,177,208]. Lediglich im kurzen Arm ließ sich eine erhöhte EF erkennen, was wahrscheinlich mit der β -adrenergen Stimulation im Zusammenhang steht [209]. Auf Genexpressionsebene konnte im kurzen Arm in beiden Behandlungsgruppen ein Effekt auf das mit pathologischer Hypertrophie assoziierte Gen *Nppa* nachgewiesen werden. Im langen Arm war keine statistisch signifikante Regulation mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der ausgeprägten Standardabweichung in der KON-H₂O Gruppe schwer zu interpretieren.

Eventuell ist das hier gewählte ISO-Modell, mit seiner transienten Hypertrophie, nicht dafür geeignet, Effekte auf kardiale pathologische Hypertrophie zu untersuchen. Etablierte Modelle, die mit einer ausgeprägten Herzhypertrophie einhergehen, wären beispielsweise das Modell der TAC [262]. Ein weiteres Hypertrophie-Modell, das volumenvermittelt ist, stellt der aortokavale Shunt dar. Hierbei wird eine Fistel zwischen Aorta und Vena cava gebildet und es kommt zur kardialen Volumenbelastung [263].

Zusammenfassend lässt sich kein Effekt von C16:1n7 auf pathologische kardiale Hypertrophie im ISO-Modell erkennen. Zum sicheren Ausschluss der C16:1n7-Wirkung auf die kardiale Hypertrophie sollten dessen Effekte in zukünftigen Experimenten noch in alternativen Hypertrophie-Modellen analysiert werden.

5.7 Fehlende *in vivo* PPAR-Aktivierung im Herzen durch C16:1n7

In der vorliegenden Studie konnte die postulierte PPAR-Aktivierung als Grund für die anti-fibrotischen Effekte von C16:1n7 im Herzen *in vivo* nicht bestätigt werden. Weder die PPAR α Zielgene *Acs11* und *Cpt1b*, noch die PPAR δ -Gene *Pdk4* und *Angptl4* waren durch C16:1n7 in Gesamtherzproben differenziell reguliert. *Cpt1b* war lediglich in der Kontrollgruppe unter ISO-Gabe herabreguliert, ein Effekt, der auf eine verminderte Fettsäureoxidation und pathologisches kardiales Remodeling hindeutet [154,264].

Die kardiale Expression von *Angptl4* wurde in der C16:1n7-Gruppe signifikant durch ISO im kurzen Arm reduziert. Eventuell könnte dies mit einer Art Gewöhnungseffekt durch die regelmäßige Gabe der Fettsäure in Zusammenhang stehen, der im Laufe der 11 bzw. 22 Tage des Experimentes eingetreten ist. So konnten *Catoire et al.* zeigen, dass es durch Ausdauersport zu einer Induktion von ANGPTL4 im Plasma kam, die vermutlich durch die vermehrte Freisetzung von freien Fettsäuren während des Sportes zustande kam. Dieser Effekt konnte jedoch nach intensivem Ausdauertraining bereits nach 2 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Induktion von ANGPTL4 insbesondere eine akute Reaktion darstellt [191]. Durch die zusätzliche Belastung mit freien Fettsäuren nach der ISO-Injektion könnte es somit zu einer früheren Adaptation und Herabregulation von *Angptl4* gekommen sein.

Potentielle Gründe für die fehlende Regulation sind vielfältig. Zum einen könnte eine Aktivierung des PPAR-Signalweges durch C16:1n7 keine Relevanz *in vivo* haben. Wenngleich diese Option nicht völlig auszuschließen ist, so deuten die reproduzierbaren *in vitro* Ergebnisse in eine andere Richtung. Zudem konnte eine PPAR-Aktivierung im Herzen durch die p. o. Gabe anderer Fettsäuren *in vivo* bereits nachgewiesen werden, wie *Georgiadi et al.* zeigen konnten [192,224]. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Faktor ist die Anzahl der in der qRT-PCR gemessenen Herzproben. Im kurzen Arm sieht man eine statistisch nicht signifikante Induktion von *Angptl4* sowohl in den mit C16:1n7 behandelten Kontroll- als auch ISO-Tieren. Um dieses Phänomen zu bestätigen oder zu widerlegen, hätte die n-Zahl der Versuchstiere erhöht werden müssen.

Ein alternativer Erklärungsansatz für die nicht nachweisbare PPAR-Aktivierung ist im Tötungszeitpunkt bzw. im Zeitpunkt der Gewebeprobensammlung zu suchen. Die Mäuse wurden bereits 30 min nach der letzten Applikation von C16:1n7 getötet. Diese

Zeit zwischen Fütterung und Tötung könnte zu kurz gewesen sein, da Fettsäuren mindestens 1 h benötigen, um in die Blutzirkulation zu gelangen, und dort dann etwa 4 h verweilen [224]. Eventuell ist der PPAR-agonistische Effekt von C16:1n7 nicht über 24 h stabil, sondern tritt lediglich nach der Gabe akut im Herzen auf. So könnte C16:1n7 seine protektive funktionelle und anti-fibrotische Wirkung bei der ISO-Gabe ausüben, jedoch ist diese nicht auf mRNA-Expressionsniveau 30 min nach der oralen Gabe bezüglich der PPAR-Aktivierung nachweisbar.

Eine weitere Hypothese ist, dass es durchaus zu einer Induktion von *Angptl4* durch C16:1n7 kommt, jedoch nicht im Herzen. So könnte das Protein in einem anderen Organ gebildet werden und im Blut zum Herzen transportiert werden [265]. Denn *Angptl4* kann nicht nur im Herzen gebildet werden, sondern lässt sich auch im Fettgewebe und in der Leber nachweisen [266]. Dementsprechend würde *Angptl4* in einem anderen Organ synthetisiert und eine kardiale Regulation wäre nicht nachweisbar. Zum Nachweis dieses Prozesses würde es sich in weiteren Experimenten anbieten, ANGPTL4 im Blut nachzuweisen, beispielsweise mittels ELISA [265], oder die Expression von *Angptl4* in der Leber oder im Fettgewebe zu messen. Zusätzlich könnte die Messung des Lipidoms bzw. von freien Fettsäuren im Blut das Vorhandensein von C16:1n7 zum Zeitpunkt der Tötung verifizieren bzw. eine Erhöhung von freien Fettsäuren nachweisen.

Zudem wurden in unserem *in vivo* Experiment Gesamtherzproben untersucht, die nicht ausschließlich Kardiomyozyten enthalten, im Gegensatz zu dem *in vitro* Teil. So könnte es zu einer Induktion von PPAR-Genen in den Kardiomyozyten dieser Proben gekommen sein. Dieser Effekt könnte aber durch eine verringerte Expression in anderen Zelltypen des Herzens, wie z. B. Endothelzellen oder Fibroblasten, unterdrückt worden sein, sodass es zu keiner verstärkten Expression im Gesamtherzgewebe gekommen ist.

Insgesamt konnten wir im ISO-Versuch die Induktion von PPAR-Zielgenen im LV-Gewebe nicht nachweisen. Lediglich *Angptl4* zeigte im kurzen Arm eine statistisch nicht signifikante höhere Expression, die letztlich nur durch neue Experimente belegt oder widerlegt werden könnte. Insbesondere der kurze Abstand zwischen der letzten Fettsäurengabe und der Tötung der Tiere könnte ein Grund sein, warum die stabile *in vitro* Regulation nicht *in vivo* nachweisbar war. Alternativ könnte *Angptl4* auch in einem anderen Organ gebildet werden und zum Herzen über das Blut transportiert werden.

Weitere Experimente, in denen z. B. ausschließlich Kardiomyozyten aus den ISO-stimulierten Tieren untersucht werden, könnten weitere Ergebnisse liefern, ob die PPAR-Regulation in unserem *in vivo* Experiment funktionell zu der anti-fibrotischen und anti-inflammatorischen Wirkung von C16:1n7 beigetragen hat.

5.8 Anti-inflammatorische Eigenschaften von C16:1n7

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für die anti-fibrotische Wirkung von C16:1n7 könnte die Regulation von *Cd68* und damit der Hinweis auf anti-inflammatorische Eigenschaften sein. Bereits in der CPDB-Analyse ergaben sich durch den Nachweis der Beeinflussung des TNF- und NF- κ B-Signalweges Hinweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung von C16:1n7, die sich *in vivo* bestätigten.

So war *Cd68* nach der akuten Schädigung im kurzen Arm noch sowohl in der ISO-Vehikel- (H₂O) als auch in der ISO-C16:1n7-Gruppe gleich stark erhöht. Im langen Arm zeigte sich dann eine signifikante Herabregulation von der *Cd68*-Genexpression im Gesamtherzgewebe durch die Gabe von C16:1n7 in der ISO-Gruppe. CD68 gilt als Makrophagenmarker [267] und Surrogat für eine Inflammationsreaktion [124]. Die Inhibierung der *Cd68*-Induktion durch C16:1n7 deutet demnach auf einen protektiven Effekt hin, der insbesondere im langen Arm des Versuches und somit gleichzeitig mit einer anti-fibrotischen Wirkung auftrat.

Dieser Effekt könnte auf eine verminderte Inflammationsreaktion im Herzen hindeuten. Ein Grund hierfür könnte eine durch ANGPTL4 potentiell verminderte Lipotoxizität und damit verbesserte Heilung mit geringer ausgeprägter kardialer Inflammationsreaktion sein. So konnten *Lichtenstein et al.* in einem *Angptl4*-KO-Mausmodell zeigen, dass eine Stimulation mit gesättigten Fettsäuren im Rahmen einer Hochfettdiät zu einer ausgeprägten bis hin letalen systemischen inflammatorischen Reaktion führte, die aus den mesenterialen Lymphknoten hervorging [124]. In einem *in vitro* Ansatz konnte anschließend nachgewiesen werden, dass durch die *Angptl4*-vermittelte Inhibition von *Lpl* die mesenterialen Lymphknoten und insbesondere die darin enthaltenen Makrophagen vor der durch die Hochfettdiät induzierten Lipotoxizität geschützt werden [124]. Im ISO-Modell kommt es durch die Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren zu einer exzessiven Freisetzung von freien Fettsäuren [248] und dadurch zu einer Lipotoxizität [249], die durch *Angptl4* im Herzen abgefangen werden könnte [192] und somit die Inflammationsreaktion unterdrückt.

C16:1n7 selbst besitzt ebenfalls anti-inflammatorische Eigenschaften. So konnten *Bernstein et al.* in einer doppelblinden, randomisierten Studie mit 30 Teilnehmern mit Dyslipidämie zeigen, dass eine 30-tägige Supplementation mit C16:1n7 das akute Phase Protein „hochsensitives C-reaktives Protein“ (hs-CRP) senkte und die Dyslipidämie verbesserte [268]. Im Gegensatz dazu stehen die populationsbasierten Studien von *Stryjecki et al.* und *Peterson et al.*, die dokumentieren, dass C16:1n7 mit einer verstärkten Inflammationsreaktion, gemessen mittels CRP, im Menschen assoziiert ist [269,270].

Des Weiteren konnten *Cao et al.* in einem Mausmodell nachweisen, dass C16:1n7 eine Steatosis hepatis positiv beeinflussen konnte. Zudem führte C16:1n7 zur Reduktion der hepatischen SCD1-Aktivität [11], die mit Adipositas und Fettleber im Menschen assoziiert ist [40,51]. Diese Daten wurden unterstützt durch *Yang et al.* In einem Mausmodell mit Adipositas und T2DM reduzierte C16:1n7 hier ebenfalls deutlich die Lipidakkumulation in der Leber [271]. Darüber hinaus konnten pro-inflammatorische Adipokine, wie TNF- α , im weißen Fettgewebe gesenkt werden [271]. In einer Niedrigfettdiät supplementiert mit C16:1n7 konnten *Guo et al.* demonstrieren, dass zwar in Mauslebern durch die Fettsäure mehr Fette eingelagert werden, jedoch weniger Makrophagen und Kupffer-Zellen nachzuweisen waren [272]. Zudem unterdrückte C16:1n7 eine Inflammation und reduzierte mRNA-Level der pro-inflammatorischen Gene TNF- α sowie IL-6 in der Leber [272]. Zusätzlich reduzierte C16:1n7 die Phosphorylierung von NF- κ B im Lebergewebe, was auf einen direkten anti-inflammatorischen Effekt der Fettsäure hindeutet [272].

Weitere Studien stützen diesen anti-inflammatorischen Effekte von C16:1n7. *Souza et al.* beobachteten in isolierten Makrophagen aus WT- und PPAR α -KO-Mäusen, dass C16:1n7 zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort gemessen an *Il-6*- (WT), *Tnf- α* - (KO) sowie *Nf- κ -B*- und *Il-1 β* -Genexpression in den mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierten Makrophagen führte [211]. Dieser Effekt war PPAR- und AMPK-unabhängig, was ebenfalls auf einen direkten anti-inflammatorischen Effekt von C16:1n7 hindeutet [211]. Auf einen AMPK-vermittelten anti-inflammatorischen Effekt von C16:1n7 auf Makrophagen weisen *Chan et al.* hin [273]. Isolierte Makrophagen von Mäusen, die eine Hochfettdiät erhielten, konnten in dieser Studie ihren pro-inflammatorischen Phänotyp sogar *in vitro* lange Zeit beibehalten [273]. Eine kurze Inkubation mit C16:1n7 für 6 h resultierte bereits in einem Genprofil, welches eher anti-

inflammatorischen M2-Makrophagen entsprach [273]. Eine Inkubation mit der gesättigten Fettsäure Palmitat (C16:0) hingegen führte zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp, der durch die Gabe von C16:1n7 zu einem anti-inflammatorischen gewandelt werden konnte [273].

Auch *Çimen et al.* konnten eine verminderte Produktion von IL-1 β in mit C16:1n7 und LPS-stimulierten Makrophagen im Vergleich zu LPS allein nachweisen [274]. Dieser Effekt wurde *in vivo* in hyperlipidämischen Mäusen bestätigt [274]. C16:1n7 reduzierte zudem die systemische Produktion von IL-1 β [274]. Als Mechanismus wird eine Vermeidung von endoplasmatischem Retikulumsstress in Makrophagen durch C16:1n7 postuliert [274].

Schließlich kann ohne weiterführende Versuche nicht abschließend geklärt werden, ob C16:1n7 selbst, vermittelt über eine PPAR-Aktivierung oder einen anderen Mechanismus anti-inflammatorisch wirkt. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob die weniger starke Entzündungsreaktion der Grund für die verminderte Fibrose im Herzen ist oder ob die verminderte Entzündungsreaktion ein Zeichen für verbessertes kardiales Remodeling aus anderen Gründen ist. Weitere interessante Experimente, um diese Fragestellung fortzuführen, wären eine Untersuchung von Makrophagen isoliert aus den mit ISO und C16:1n7 behandelten Tieren *in vitro*, um mehr über die anti-inflammatorische Wirkung von C16:1n7 zu erfahren. Zudem wäre eine histologische Färbung des Herzens, die Makrophagen nachweist, von großem Interesse, um diesen Befund weiter zu untermauern.

5.9 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Es bleibt die Frage, inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Relevanz im Menschen haben. Zwar lassen sich die Daten aus diesem Versuch nicht ohne Weiteres übertragen, jedoch gibt es Anhaltspunkte, die eventuell auf positive Effekte im Menschen hindeuten.

So sind die verschiedenen PPAR-Rezeptoren in ihrer Organisation und Funktion in der Gruppe der Vertebraten hoch konserviert [89]. Sowohl PPAR α [245] als auch PPAR δ [104] werden im menschlichen Herzen exprimiert. Zudem wird PPAR α im Menschen bei Herzinsuffizienz herabreguliert, wie *Karbowska et al.* anhand von Herzbiopsien von gesunden Spendern und herztransplantierten Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen konnten [275]. Das legt eine Funktion von PPARs bei Herzinsuffizienz im Menschen nahe. In einer sehr kleinen Studie mit Patienten, die unter einer diabetischen Kardiomyopathie litten, konnten *Chang et al.* zeigen, dass die Aktivierung von PPAR δ positive Effekte auf diese Erkrankung hatte [116]. Durch die Gabe von Telmisartan, einem Angiotensin-Typ-1-Rezeptor-Antagonist, welcher als partieller Agonist auch an PPAR δ und PPAR γ bindet, kam es zu einer Verbesserung des GLS und GCS in der Echokardiographie nach 3 Monaten [116]. In einem Rattenmodell der diabetischen Kardiomyopathie konnte anschließend gezeigt werden, dass der anti-fibrotische Effekt von Telmisartan durch die Zugabe eines PPAR δ -Antagonisten reduziert wird [116].

Aktuell laufen laut clinicaltrials.gov 43 klinische Studien, in denen die Wirkung verschiedener PPAR-Agonisten im Menschen untersucht wird. 26 davon sind bereits abgeschlossen und 9 stehen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen [276]. Somit besteht die Möglichkeit, dass demnächst mehr über den Einfluss von PPAR-Agonisten, insbesondere PPAR δ -Agonisten, auf verschiedene kardiovaskuläre Krankheiten im Menschen, u. a. Herzinsuffizienz, in Erfahrung gebracht wird.

Während es schon Evidenz über die Auswirkung einer PPAR-Aktivierung auf das menschliche Herz gibt, ist über die positiven Auswirkungen der C16:1n7-Supplementation noch recht wenig bekannt. *Griel et al.* beobachtete in einer kleinen randomisierten, *crossover* Studie über 5 Wochen, dass die Supplementation von C16:1n7 in Form von Macadamianüssen einen positiven Effekt auf das Plasmalipidprofil von leicht hypercholesterinämischen Patienten hat [23]. *Djoussé et al.* konnten in einer Kohortenstudie demonstrieren, dass zirkulierende Level von cis-C16:1n7 positiv mit dem Risiko von Herzinsuffizienz assoziiert sind [277]. Ob allerdings

cis-C16:1n7 die Herzinsuffizienz bedingt oder aufgrund dieser hochreguliert war, geht aus dieser Untersuchung nicht hervor [277]. Im Kontrast dazu zeigten *De Souza et al.* in einer Metaanalyse von 12 prospektiven Kohortenstudien, dass alimentäres trans-C16:1n7 einen protektiven Effekt bei T2DM aufweist, wenngleich die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Risikoprofil nicht abschließend geklärt werden konnten [55]. Als weiterer Ausblick der vorliegenden präklinischen Studie wäre also von Interesse, ob eine Supplementation von C16:1n7 auch im Menschen positive Effekte aufweist. In diesem Kontext wäre insbesondere eine Supplementation von C16:1n7, z. B. in Form von Macadamianüssen oder Fisch, eine interessante Intervention bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil, HFpEF oder HFrEF.

Insbesondere bei HFpEF sind aktuell nur symptomatische Therapien vorhanden [70]. Gerade die Vorbeugung der Ausbildung von Fibrose wäre ein wichtiger Ansatz, um Patienten mit einem erhöhten Risikoprofil für HFpEF, wie z. B. Diabetiker oder Patienten mit metabolischem Syndrom, zu schützen, da aktuell keine kausalen Therapien zur Verfügung stehen [70]. Eventuell könnte C16:1n7 hier durch seine anti-inflammatorischen und anti-fibrotischen Eigenschaften eine vielversprechende Präventionsstrategie darstellen. Um dies jedoch zu verifizieren, wären weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere eine randomisierte kontrollierte Studie. Die vorliegende Studie bietet somit die präklinische Grundlage für zukünftige klinische Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkungen von C16:1n7.

5.10 Zusammenfassung und vorgeschlagener Mechanismus

Es konnte die Regulation von wichtigen PPAR-Zielgenen *in vitro* durch C16:1n7 nachgewiesen werden. Hier zeigten sich PPAR δ -Zielgene stärker reguliert als PPAR α -Gene. Insbesondere das PPAR δ -Zielgen *Angptl4* war stark induziert und das Gen *Lpl* herabreguliert, was möglicherweise zu einem Schutz der Kardiomyozyten vor Lipotoxizität führen könnte. Des Weiteren konnten durch eine bioinformatische Analyse verschiedene, mit Inflammation und Fibrose assoziierte Signalwege identifiziert werden.

In vivo bestätigte sich die Hypothese, dass C16:1n7 anti-fibrotisch wirksam ist. Dieser Effekt ließ sich sowohl histologisch als auch durch echokardiographische Korrelate nachweisen. Als zugrundeliegender Mechanismus könnte die vermehrte Expression von *Angptl4* durch C16:1n7 und eine damit einhergehende Reduktion der kardialen *Lpl*-Aktivität genannt werden. Dieser protektive C16:1n7-Effekt könnte vor einer exzessiven kardialen Fettsäureaufnahme schützen, die durch die β -adrenerge Stimulation im ISO-Modell und folgender Induktion der systemischen Lipolyse mit Freisetzung freier Fettsäuren hervorgerufen wird. Der Schutz vor kardialer Lipidakkumulation durch C16:1n7 würde zu vermindertem oxidativen Stress führen. Diese potentielle anti-oxidative Wirkung hat geringeren kardialen Zelluntergang und die Hemmung inflammatorischer Reaktionen und Makrophagenaktivierung zur Folge. Ein Hinweis darauf liefert die geringere Expression von *Cd68* im Herzen der mit C16:1n7 behandelten Tiere.

Wir konnten zeigen, dass C16:1n7 *in vitro* PPAR-Zielgene, insbesondere zum PPAR δ -Signalweg gehörend, reguliert. *In vivo* übt C16:1n7 einen anti-fibrotischen Effekt aus. Diese Studie liefert einen Hinweis darauf, dass diätetische Interventionen mit C16:1n7 einen schützenden Effekt vor der Entwicklung von kardialer Fibrose, z. B. bei Herzinsuffizienz, vermitteln könnte.

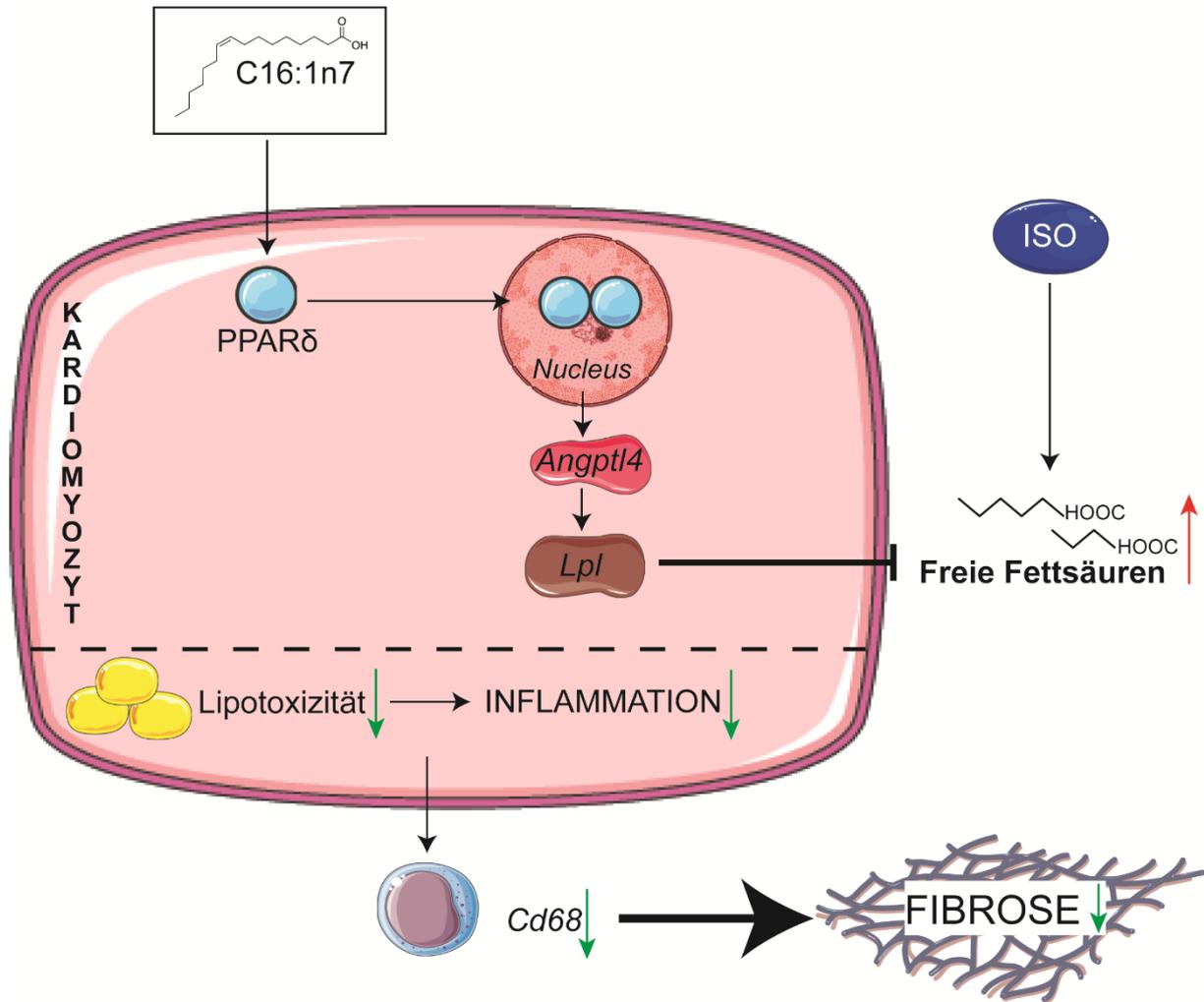


Abb. 5.1 Möglicher Wirkmechanismus von C16:1n7 im Herzen. Erklärung im Text zu Kapitel 5.10.

Beschriftung: *Angptl4* Angiopoetin like factor 4; *C16:1n7* Palmitoleinsäure; *Cd68* Cluster of Differentiation 68; *Lpl* Lipoproteinlipase; *ISO* Isoproterenol.

6 Literaturverzeichnis

1. IUPAC - fatty acids (F02330) [Internet]. [zitiert 1. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <http://goldbook.iupac.org/terms/view/F02330>
 2. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev.* 1. Januar 1995;75(1):47–76. (Übersichtsarbeit)
 3. Renne MF, de Kroon AIPM. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes. *Febs Lett.* April 2018;592(8):1330–45. (Übersichtsarbeit)
 4. Mahley W, Innerarity L, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25:1277–94. (Übersichtsarbeit)
 5. Blanco A, Blanco G. Chapter 26 - Biochemical Bases of Endocrinology (II) Hormones and Other Chemical Intermediates. In: *Medical Biochemistry.* Academic Press; 2017. S. 72.
 6. Pschyrembel Online | hormon [Internet]. [zitiert 12. November 2019]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/hormon/K0A1S/doc/>
 7. Harizi H, Corcuff J-B, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med.* Oktober 2008;14(10):461–9. (Übersichtsarbeit)
 8. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 1. März 2013;27(5):459–84. (Übersichtsarbeit)
 9. Foryst-Ludwig A, Kreissl MC, Benz V, Brix S, Smeir E, Ban Z, Januszewicz E, Salatzki J, Grune J, Schwanstecher A-K, others. Adipose Tissue Lipolysis Promotes Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy Involving the Lipokine C16: 1n7-Palmitoleate. *J Biol Chem.* 2015;jbc-M115.
 10. Rhee SK, Kayani AJ, Ciszek A, Brenna JT. Desaturation and interconversion of dietary stearic and palmitic acids in human plasma and lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* Februar 1997;65(2):451–8.
 11. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell.* September 2008;134(6):933–44.
 12. Riquelme CA, Magida JA, Harrison BC, Wall CE, Marr TG, Secor SM, Leinwand LA. Fatty Acids Identified in the Burmese Python Promote Beneficial Cardiac Growth. *Science.* 28. Oktober 2011;334(6055):528–31.
 13. Bhagavan N. Chapter 18 - Lipids I - Fatty Acids and Eicosanoids. In: *Medical Biochemistry.* 4. Auflage. HARCOURT/ACADEMIC PRESS; 2002. S. 35.
 14. Jaudszus A, Kramer R, Pfeuffer M, Roth A, Jahreis G, Kuhnt K. trans Palmitoleic acid arises endogenously from dietary vaccenic acid. *Am J Clin Nutr.* 1. März 2014;99(3):431–5.
 15. Emken EA, Adlof RO, Rohwedder WK, Gulley RM. Influence of linoleic acid on desaturation and uptake of deuterium-labeled palmitic and stearic acids in humans. *Biochim Biophys Acta.* 13. Oktober 1993;1170(2):173–81.
 16. Hodson L, Karpe F. Is there something special about palmitoleate?: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* März 2013;16(2):225–31. (Übersichtsarbeit)
 17. McLaren DS, Ajans ZA, Awdeh Z. Composition of human adipose tissue, with special reference to site and age differences. *Am J Clin Nutr.* September 1965;17(3):171–6.
 18. Hirsch J, Farquhar JW, Ahrens EH, Peterson ML, Stoffel W. Studies of adipose tissue in man. A microtechnic for sampling and analysis. *Am J Clin Nutr.* August 1960;8:499–511.
-

19. Pinnick KE, Neville MJ, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F, Hodson L. Gluteofemoral Adipose Tissue Plays a Major Role in Production of the Lipokine Palmitoleate in Humans. *Diabetes*. 1. Juni 2012;61(6):1399–403.
 20. Bolton-Smith C, Woodward M, Tavendale R. Evidence for age-related differences in the fatty acid composition of human adipose tissue, independent of diet. *Eur J Clin Nutr*. September 1997;51(9):619–24.
 21. Malcom GT, Bhattacharyya AK, Velez-Duran M, Guzman MA, Oalman MC, Strong JP. Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites. *Am J Clin Nutr*. 1. August 1989;50(2):288–91.
 22. Phinney SD, Stern JS, Burke KE, Tang AB, Miller G, Holman RT. Human subcutaneous adipose tissue shows site-specific differences in fatty acid composition. *Am J Clin Nutr*. November 1994;60(5):725–9.
 23. Griel AE, Cao Y, Bagshaw DD, Cifelli AM, Holub B, Kris-Etherton PM. A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. *J Nutr*. 2008;138(4):761–767.
 24. Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr*. Mai 2004;55(3):171–8.
 25. Fatima T, Snyder CL, Schroeder WR, Cram D, Datla R, Wishart D, Weselake RJ, Krishna P. Fatty Acid Composition of Developing Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berry and the Transcriptome of the Mature Seed. *PLoS ONE*. 27. April 2012;7(4).
 26. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res*. September 2008;47(5):348–80. (Übersichtsarbeit)
 27. Hodson L, Fielding BA. Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res*. Januar 2013;52(1):15–42. (Übersichtsarbeit)
 28. Attie AD, Krauss RM, Gray-Keller MP, Brownlie A, Miyazaki M, Kastelein JJ, Lusa AJ, Stalenhoef AFH, Stoehr JP, Hayden MR, Ntambi JM. Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. November 2002;43(11):1899–907.
 29. Enoch HG, Catalá A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*. 25. August 1976;251(16):5095–103.
 30. Aarsland A, Wolfe RR. Hepatic secretion of VLDL fatty acids during stimulated lipogenesis in men. *J Lipid Res*. Juni 1998;39(6):1280–6.
 31. Hellerstein M. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr*. April 1999;53(S1):s53–65. (Übersichtsarbeit)
 32. Volk BM, Kunces LJ, Freidenreich DJ, Kupchak BR, Saenz C, Artistizabal JC, Fernandez ML, Bruno RS, Maresh CM, Kraemer WJ, Phinney SD, Volek JS. Effects of Step-Wise Increases in Dietary Carbohydrate on Circulating Saturated Fatty Acids and Palmitoleic Acid in Adults with Metabolic Syndrome. *PLoS ONE*. 21. November 2014;9(11).
 33. Howland JL, Iyer SL. Erythrocyte lipids in heterozygous carriers of duchenne muscular dystrophy. *Science*. 21. Oktober 1977;198(4314):309–10.
-

34. Hubbard VS, Dunn GD. Fatty acid composition of erythrocyte phospholipids from patients with cystic fibrosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 14. März 1980;102(1):115–8.
35. Itoh K, Nakamura M, Akino T. Comparison of phospholipid profiles of primary adenocarcinoma in the lung and other organs. *Lipids.* Dezember 1981;16(12):876–80.
36. Mamalakis G, Kafatos A, Kalogeropoulos N, Andrikopoulos N, Daskalopoulos G, Kranidis A. Prostate cancer vs hyperplasia: relationships with prostatic and adipose tissue fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Juni 2002;66(5–6):467–77.
37. Chavarro JE, Kenfield SA, Stampfer MJ, Loda M, Campos H, Sesso HD, Ma J. Blood levels of saturated and monounsaturated fatty acids as markers of de novo lipogenesis and risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol.* 15. Oktober 2013;178(8):1246–55.
38. Hess D, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of StearoylCoA Desaturase Activity Blocks Cell Cycle Progression and Induces Programmed Cell Death in Lung Cancer Cells. *PLoS ONE.* 30. Juni 2010;5(6).
39. World Health Organization, Herausgeber. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization; 2000. 253 S. (WHO technical report series).
40. Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM, Jalali P, Kandasamy T, Prayitno N, Sherman M, Guindi M, Ma DWL, Heathcote JE. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *J Hepatol.* Februar 2008;48(2):300–7.
41. Aglago EK, Biessy C, Torres-Mejía G, Angeles-Llerenas A, Gunter MJ, Romieu I, Chajès V. Association between serum phospholipid fatty acid levels and adiposity in Mexican women. *J Lipid Res.* Juli 2017;58(7):1462–70.
42. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Tebar FJ, Zamora S. Relation between degree of obesity and site-specific adipose tissue fatty acid composition in a Mediterranean population. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* Februar 2011;27(2):170–6.
43. Pickens CA, Sordillo LM, Comstock SS, Harris WS, Hortos K, Kovan B, Fenton JI. Plasma phospholipids, non-esterified plasma polyunsaturated fatty acids and oxylipids are associated with BMI. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* April 2015;95:31–40.
44. Ni Y, Zhao L, Yu H, Ma X, Bao Y, Rajani C, Loo LWM, Shvetsov YB, Yu H, Chen T, Zhang Y, Wang C, Hu C, Su M, Xie G, Zhao A, Jia W, Jia W. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals. *EBioMedicine.* 6. September 2015;2(10):1513–22.
45. Gong J, Campos H, McGarvey S, Wu Z, Goldberg R, Baylin A. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr.* 1. Januar 2011;93(1):186–91. (Übersichtsarbeit)
46. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligil GS. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *Am J Clin Nutr.* Dezember 2010;92(6):1350–8.
47. Rondanelli M, Klersy C, Perna S, Faliva MA, Montorfano G, Roderi P, Colombo I, Corsetto PA, Fioravanti M, Solerte SB, Rizzo AM. Effects of two-months balanced diet in metabolically healthy obesity: lipid correlations with gender and BMI-related differences. *Lipids Health Dis.* 29. Oktober 2015;14:139.
48. Lee YJ, Lee A, Yoo HJ, Kim M, Kim M, Jee SH, Shin DY, Lee JH. Effect of weight loss on circulating fatty acid profiles in overweight subjects with high visceral fat area: a 12-week randomized controlled trial. *Nutr J.* 22 2018;17(1):28.
-

49. Kunesová M, Braunerová R, Hlavatý P, Tvrzická E, Stanková B, Skrha J, Hilgertová J, Hill M, Kopecký J, Wagenknecht M, Hainer V, Matoulek M, Parízková J, Zák A, Svacina S. The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol Res*. 2006;55(1):63–72.
50. Kunešová M, Hlavatý P, Tvrzická E, Staňková B, Kalousková P, Viguerie N, Larsen TM, van Baak MA, Jebb SA, Martinez JA, Pfeiffer AFH, Kafatos A, Handjieva-Darlenska T, Hill M, Langin D, Zák A, Astrup A, Saris WHM. Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weight loss and weight maintenance: the DIOGENES study. *Physiol Res*. 2012;61(6):597–607.
51. Paillard F, Catheline D, Duff FL, Bouriel M, Deugnier Y, Pouchard M, Daubert J-C, Legrand P. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. Juli 2008;18(6):436–40.
52. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The Role of the Novel Lipokine Palmitoleic Acid in Health and Disease. *Adv Nutr Int Rev J*. Januar 2017;8(1):173S-181S. (Übersichtsarbeit)
53. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*. November 2008;39(8):715–28. (Übersichtsarbeit)
54. Nunes E, Rafacho A. Implications of Palmitoleic Acid (Palmitoleate) On Glucose Homeostasis, Insulin Resistance and Diabetes. *Curr Drug Targets*. 30. März 2017;18(6):619–28. (Übersichtsarbeit)
55. de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, Uleryk E, Budyłowski P, Schünemann H, Beyene J, Anand SS. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 11. August 2015;h3978.
56. Imamura F, Fretts A, Marklund M, Ardisson Korat AV, Yang W-S, Lankinen M, Qureshi W, Helmer C, Chen T-A, Wong K, Bassett JK, Murphy R, Tintle N, Yu CI, Brouwer IA, Chien K-L, Frazier-Wood AC, del Gobbo LC, Djoussé L, Geleijnse JM, Giles GG, de Goede J, Gudnason V, Harris WS, Hodge A, Hu F, Koulman A, Laakso M, Lind L, Lin H-J, McKnight B, Rajaobelina K, Risérus U, Robinson JG, Samieri C, Siscovick DS, Soedamah-Muthu SS, Sotoodehnia N, Sun Q, Tsai MY, Uusitupa M, Wagenknecht LE, Wareham NJ, Wu JH, Micha R, Forouhi NG, Lemaitre RN, Mozaffarian D. Fatty acid biomarkers of dairy fat consumption and incidence of type 2 diabetes: A pooled analysis of prospective cohort studies. *PLoS Med*. 10. Oktober 2018;15(10).
57. González-Becerra K, Ramos-Lopez O, Barrón-Cabrera E, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martínez-López E, Martínez JA. Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids Health Dis*. 15. Oktober 2019;18. (Übersichtsarbeit)
58. Liu B, Sun Y, Snetselaar LG, Sun Q, Yang Q, Zhang Z, Liu L, Hu FB, Bao W. Association between Plasma trans-Fatty Acid Concentrations and Diabetes in a Nationally Representative Sample of U.S. Adults. *J Diabetes*. August 2018;10(8):653–64.
59. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB, Crowe FL, Huerta JM, Guevara M, Beulens JW, van Woudenberg GJ, Wang L, Summerhill K, Griffin JL, Feskens EJ, Amiano P, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Dartois L, Fagherazzi G, Franks PW, Gonzalez C, Jakobsen MU, Kaaks R, Key TJ, Khaw K-T, Kühn T, Mattiello A, Nilsson PM, Overvad K, Pala V, Palli D, Quirós JR, Rolandsson O, Roswall N, Sacerdote C, Sánchez M-J, Slimani N, Spijkerman AM, Tjønneland A, Tormo M-J, Tumino R, van der A DL, van der Schouw YT, Langenberg C, Riboli E, Wareham NJ. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. Oktober 2014;2(10):810–8.
-

60. Qureshi W, Santaren ID, Hanley AJ, Watkins SM, Lorenzo C, Wagenknecht LE. Risk of diabetes associated with fatty acids in the de novo lipogenesis pathway is independent of insulin sensitivity and response: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *BMJ Open Diabetes Res Care*. 4. September 2019;7(1).
61. Mahendran Y, Ågren J, Uusitupa M, Cederberg H, Vangipurapu J, Stančáková A, Schwab U, Kuusisto J, Laakso M. Association of erythrocyte membrane fatty acids with changes in glycemia and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. Januar 2014;99(1):79–85.
62. Stefan N, Kantartzis K, Celebi N, Staiger H, Machann J, Schick F, Cegan A, Elcnerova M, Schleicher E, Fritsche A, Häring H-U. Circulating Palmitoleate Strongly and Independently Predicts Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes Care*. Februar 2010;33(2):405–7.
63. Liang J, Zhou Q, Kwame Amakye W, Su Y, Zhang Z. Biomarkers of dairy fat intake and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta analysis of prospective studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 3. Mai 2018;58(7):1122–30.
64. Wu JH, Lemaitre RN, Imamura F, King IB, Song X, Spiegelman D, Siscovick DS, Mozaffarian D. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study123. *Am J Clin Nutr*. August 2011;94(2):431–8.
65. Merino J, Sala-Vila A, Plana N, Girona J, Vallve JC, Ibarretxe D, Ros E, Ferré R, Heras M, Masana L. Serum palmitoleate acts as a lipokine in subjects at high cardiometabolic risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. März 2016;26(3):261–7.
66. Djoussé L, Matthan NR, Lichtenstein AH, Gaziano JM. Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 15. August 2012;110(4):539–44.
67. Kleber ME, Delgado GE, Lorkowski S, März W, von Schacky C. Trans -fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J*. 1. April 2016;37(13):1072–8.
68. Yang B, Ding F, Wang F-L, Yu W, Li D. Inverse Association of Serum Docosahexaenoic Acid With Newly Diagnosed Hypertension. *Medicine (Baltimore)* Februar 2016; 95(5):e2329.
69. Pezeshkian M, Noori M, Najjarpour-Jabbari H, Abolfathi A, Darabi M, Darabi M, Shaaker M, Shahmohammadi G. Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab Syndr Relat Disord*. April 2009;7(2):125–31.
70. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 14. Juli 2016;37(27):2129–200.
71. Djousse L, Weir NL, Hanson NQ, Tsai MY, Gaziano JM. Plasma Phospholipid Concentration of Cis-Palmitoleic Acid and Risk of Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 1. November 2012;5(6):703–9.
72. Fosshaug LE, Dahl CP, Risnes I, Bohov P, Berge RK, Nymo S, Geiran O, Yndestad A, Gullestad L, Aukrust P, Vinge LE, Øie E. Altered Levels of Fatty Acids and Inflammatory and Metabolic Mediators in Epicardial Adipose Tissue in Patients With Systolic Heart Failure. *J Card Fail*. November 2015;21(11):916–23.
73. Spezifikation für Indikator 516 - Sterbefälle für die 10 20 50 100 häufigsten Todesursachen [Internet]. [zitiert 31. Oktober 2019]. Verfügbar unter: <http://www.gbe-bund.de/oowa921->
-

install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=97881317&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=50984665

74. Deutsche Herzstiftung e.V., Herausgeber. Deutscher Herzbericht 2018. Frankfurt am Main: Deutsche Herzstiftung e.V.; 2018. 256 S.

75. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 22. Mai 1996;275(20):1557–62. (Übersichtsarbeit)

76. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk Factors for Congestive Heart Failure in US Men and Women: NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Arch Intern Med*. 9. April 2001;161(7):996.

77. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 13. April 2000;342(15):1077–84.

78. Butler J, Fonarow GC, Zile MR, Lam CS, Roessig L, Schelbert EB, Shah SJ, Ahmed A, Bonow RO, Cleland JG, Cody RJ, Chioncel O, Collins SP, Dunnmon P, Filippatos G, Lefkowitz MP, Marti CN, McMurray JJ, Misselwitz F, Nodari S, O'Connor C, Pfeiffer MA, Pieske B, Pitt B, Rosano G, Sabbah HN, Senni M, Solomon SD, Stockbridge N, Teerlink JR, Georgiopoulou VV, Gheorghiade M. Developing Therapies for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Current State and Future Directions. *JACC Heart Fail*. April 2014;2(2):97–112. (Übersichtsarbeit)

79. Laufs U, Anker SD, Falk V, Pieske B, Baldus S, Perings CA, Birner C. Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Kardiologe*. Juni 2017;11(3):183–92. (Übersichtsarbeit)

80. Kraigher-Krainer E, Shah AM, Gupta DK, Santos A, Claggett B, Pieske B, Zile MR, Voors AA, Lefkowitz MP, Packer M, McMurray JJV, Solomon SD, PARAMOUNT Investigators. Impaired systolic function by strain imaging in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 11. Februar 2014;63(5):447–56.

81. Pieske B, Tschöpe C, de Boer RA, Fraser AG, Anker SD, Donal E, Edelmann F, Fu M, Guazzi M, Lam CSP, Lancellotti P, Melenovsky V, Morris DA, Nagel E, Pieske-Kraigher E, Ponikowski P, Solomon SD, Vasan RS, Rutten FH, Voors AA, Ruschitzka F, Paulus WJ, Seferovic P, Filippatos G. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 21. Oktober 2019;40(40):3297–317.

82. Philbin EF, Rocco TA, Lindenmuth NW, Ulrich K, Jenkins PL. Systolic versus diastolic heart failure in community practice: clinical features, outcomes, and the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med*. 1. Dezember 2000;109(8):605–13.

83. Fonarow GC, Stough WG, Abraham WT, Albert NM, Gheorghiade M, Greenberg BH, O'Connor CM, Sun JL, Yancy CW, Young JB, OPTIMIZE-HF Investigators and Hospitals. Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J Am Coll Cardiol*. 21. August 2007;50(8):768–77.

84. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19. Juli 1994;91(15):7355–9.

85. Zhang Z. Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome. *Genome Res*. 1. April 2004;14(4):580–90. (Übersichtsarbeit)

86. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. Oktober 1990;347(6294):645–50.

87. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV. Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Mol Cell*. :7.
88. Berger J, Moller DE. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med*. Februar 2002;53(1):409–35. (Übersichtsarbeit)
89. Shiue Y-L, Chen L-R, Tsai C-J, Yeh C-Y, Huang C-T. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the pituitary gland in female reproduction. *Biomark Genomic Med*. März 2013;5(1–2):1–11.
90. Zhou T, Yan X, Wang G, Liu H, Gan X, Zhang T, Wang J, Li L. Evolutionary Pattern and Regulation Analysis to Support Why Diversity Functions Existed within PPAR Gene Family Members. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1–11.
91. Kumar R, Litwack G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*. November 2009;74(12):877–83. (Übersichtsarbeit)
92. Khuchua Z, Glukhov AI, Strauss AW, Javadov S. Elucidating the Beneficial Role of PPAR Agonists in Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci*. 4. November 2018;19(11). (Übersichtsarbeit)
93. Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG, Leibowitz MD. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*. Oktober 1996;137(10):4189–95.
94. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery †. *J Med Chem*. Februar 2000;43(4):527–50. (Übersichtsarbeit)
95. Kojonazarov B, Luitel H, Sydykov A, Dahal BK, Paul-Clark MJ, Bonvini S, Reed A, Schermuly RT, Mitchell JA. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 has direct protective effects on right heart hypertrophy. *Pulm Circ*. Dezember 2013;3(4):926–35.
96. Paola RD, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Galuppo M, Cuzzocrea S. GW0742, a selective PPAR- β/δ agonist, contributes to the resolution of inflammation after gut ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):291–301.
97. Teunissen BEJ, Smeets PJH, Willemsen PHM, Windt D, J L, Vusse V der, J G, Van Bilsen M. Activation of PPAR δ inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1. August 2007;75(3):519–29.
98. Park JR, Ahn JH, Jung MH, Koh J-S, Park Y, Hwang S-J, Jeong Y-H, Kwak CH, Lee YS, Seo HG, Kim JH, Hwang J-Y. Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Agonist on Cardiac Healing after Myocardial Infarction. *Makishima M, Herausgeber. PLOS ONE*. 10. Februar 2016;11(2):e0148510.
99. Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, Olzinski AR, Maniscalco K, Williams C, Hu TC-C, Lenhard SC, Costell M, Bernard R, Sarov-Blat L, Steplewski K, Willette RN. PPARdelta activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. Juli 2007;50(1):25–34.
100. Magadam A, Ding Y, He L, Kim T, Vasudevarao MD, Long Q, Yang K, Wickramasinghe N, Renikunta HV, Dubois N, Weidinger G, Yang Q, Engel FB. Live cell screening platform identifies PPAR δ as a regulator of cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Res*. August 2017;27(8):1002–19.
101. Lim H, Dey SK. PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab TEM*. Juni 2000;11(4):137–42.
-

-
102. Lamichane S, Dahal Lamichane B, Kwon S-M. Pivotal Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Their Signal Cascade for Cellular and Whole-Body Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 22. März 2018;19(4). (Übersichtsarbeit)
103. Scholtyssek C, Katzenbeisser J, Fu H, Uderhardt S, Ipseiz N, Stoll C, Zaiss MM, Stock M, Donhauser L, Böhm C, Kleyer A, Hess A, Engelke K, David J-P, Djouad F, Tuckermann JP, Desvergne B, Schett G, Krönke G. PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat Med.* Mai 2013;19(5):608–13.
104. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA-K, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson Å, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP.* Februar 2014;13(2):397–406.
105. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul R, Rynes E, Kirilusha A, Marinov GK, Williams BA, Trout D, Amrhein H, Fisher-Aylor K, Antoshechkin I, DeSalvo G, See L-H, Fastuca M, Drenkow J, Zaleski C, Dobin A, Prieto P, Lagarde J, Bussotti G, Tanzer A, Denas O, Li K, Bender MA, Zhang M, Byron R, Groudine MT, McCleary D, Pham L, Ye Z, Kuan S, Edsall L, Wu Y-C, Rasmussen MD, Bansal MS, Kellis M, Keller CA, Morrissey CS, Mishra T, Jain D, Dogan N, Harris RS, Cayting P, Kawli T, Boyle AP, Euskirchen G, Kundaje A, Lin S, Lin Y, Jansen C, Malladi VS, Cline MS, Erickson DT, Kirkup VM, Learned K, Sloan CA, Rosenbloom KR, Lacerda de Sousa B, Beal K, Pignatelli M, Flicek P, Lian J, Kahveci T, Lee D, Kent WJ, Ramalho Santos M, Herrero J, Notredame C, Johnson A, Vong S, Lee K, Bates D, Neri F, Diegel M, Canfield T, Sabo PJ, Wilken MS, Reh TA, Giste E, Shafer A, Kutayavin T, Haugen E, Dunn D, Reynolds AP, Neph S, Humbert R, Hansen RS, De Bruijn M, Selleri L, Rudensky A, Josefowicz S, Samstein R, Eichler EE, Orkin SH, Levasseur D, Papayannopoulou T, Chang K-H, Skoutchi A, Gosh S, Disteche C, Treuting P, Wang Y, Weiss MJ, Blobel GA, Cao X, Zhong S, Wang T, Good PJ, Lowdon RF, Adams LB, Zhou X-Q, Pazin MJ, Feingold EA, Wold B, Taylor J, Mortazavi A, Weissman SM, Stamatoyannopoulos JA, Snyder MP, Guigo R, Gingeras TR, Gilbert DM, Hardison RC, Beer MA, Ren B, Mouse ENCODE Consortium. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature.* 20. November 2014;515(7527):355–64.
106. Tenenbaum A, Fisman EZ. Balanced pan-PPAR activator bezafibrate in combination with statin: comprehensive lipids control and diabetes prevention? *Cardiovasc Diabetol.* 14. November 2012;11:140.
107. Goldenberg I, Boyko V, Tennenbaum A, Tanne D, Behar S, Guetta V. Long-term Benefit of High-Density Lipoprotein Cholesterol-Raising Therapy With Bezafibrate: 16-Year Mortality Follow-up of the Bezafibrate Infarction Prevention Trial. *Arch Intern Med.* 9. März 2009;169(5):508.
108. Huang Y, Powers C, Moore V, Schafer C, Ren M, Phoon CKL, James JF, Glukhov AV, Javadov S, Vaz FM, Jefferies JL, Strauss AW, Khuchua Z. The PPAR pan-agonist bezafibrate ameliorates cardiomyopathy in a mouse model of Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 09 2017;12(1):49.
109. van der Meer RW, Rijzewijk LJ, de Jong HWAM, Lamb HJ, Lubberink M, Romijn JA, Bax JJ, de Roos A, Kamp O, Paulus WJ, Heine RJ, Lammertsma AA, Smit JWA, Diamant M. Pioglitazone Improves Cardiac Function and Alters Myocardial Substrate Metabolism Without Affecting Cardiac Triglyceride Accumulation and High-Energy Phosphate Metabolism in Patients With Well-Controlled Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation.* 21. April 2009;119(15):2069–77.
110. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *The Lancet.* September 2007;370(9593):1129–36.
111. Bhatt DL, Chew DP, Grines C, Mukherjee D, Leeser M, Gilchrist IC, Corbelli JC, Blankenship JC, Eres A, Steinhubl S, Tan WA, Resar JR, AlMahameed A, Abdel-Latif A, Tang WHW, Tang HW, Brennan
-

D, McErlean E, Hazen SL, Topol EJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists for the Prevention of Adverse events following percutaneous coronary Revascularization--results of the PPAR study. *Am Heart J.* Juli 2007;154(1):137–43.

112. Search of: PPAR agonists | Heart Failure - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [zitiert 4. November 2019]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Heart+Failure&term=PPAR+agonists&cntry=&state=&city=&dist=>

113. Sarma S, Ardehali H, Gheorghide M. Enhancing the metabolic substrate: PPAR-alpha agonists in heart failure. *Heart Fail Rev.* Januar 2012;17(1):35–43. (Übersichtsarbeit)

114. Jakob T, Nordmann AJ, Schandelmaier S, Ferreira-González I, Briel M. Fibrates for primary prevention of cardiovascular disease events. *Cochrane Database Syst Rev.* 16. November 2016;2016(11).

115. Saha SA, Kizhakepunnur LG, Bahekar A, Arora RR. The role of fibrates in the prevention of cardiovascular disease--a pooled meta-analysis of long-term randomized placebo-controlled clinical trials. *Am Heart J.* November 2007;154(5):943–53.

116. Chang W-T, Cheng J-T, Chen Z-C. Telmisartan improves cardiac fibrosis in diabetes through peroxisome proliferator activated receptor δ (PPAR δ): from bedside to bench. *Cardiovasc Diabetol.* 12. August 2016;15.

117. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation.* Juni 1982;65(7):1446–50.

118. Schirone L, Forte M, Palmerio S, Yee D, Nocella C, Angelini F, Pagano F, Schiavon S, Bordin A, Carrizzo A, Vecchione C, Valenti V, Chimenti I, De Falco E, Sciarretta S, Frati G. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017. (Übersichtsarbeit)

119. Aimo A, Gaggin HK, Barison A, Emdin M, Januzzi JL. Imaging, Biomarker, and Clinical Predictors of Cardiac Remodeling in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* September 2019;7(9):782–94. (Übersichtsarbeit)

120. Senni M, Paulus WJ, Gavazzi A, Fraser AG, Díez J, Solomon SD, Smiseth OA, Guazzi M, Lam CSP, Maggioni AP, Tschöpe C, Metra M, Hummel SL, Edelmann F, Ambrosio G, Stewart Coats AJ, Filippatos GS, Gheorghide M, Anker SD, Levy D, Pfeffer MA, Stough WG, Pieske BM. New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes. *Eur Heart J.* 21. Oktober 2014;35(40):2797–815. (Übersichtsarbeit)

121. Blum A, Miller H. Role of cytokines in heart failure. *Am Heart J.* Februar 1998;135(2 Pt 1):181–6. (Übersichtsarbeit)

122. Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-Dependent and -Independent Regulation of Proinflammatory Cytokine and Cytokine Receptor Gene Expression in the Adult Mammalian Heart. *Circulation.* 7. Mai 2002;105(18):2192–7.

123. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87–103. (Übersichtsarbeit)

124. Lichtenstein L, Mattijssen F, de Wit NJ, Georgiadi A, Hooiveld GJ, van der Meer R, He Y, Qi L, Köster A, Tamsma JT, Tan NS, Müller M, Kersten S. Angptl4 Protects against Severe Proinflammatory Effects of Saturated Fat by Inhibiting Fatty Acid Uptake into Mesenteric Lymph Node Macrophages. *Cell Metab.* Dezember 2010;12(6):580–92.

125. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama W, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 16. Januar 2014;40(1):91–104.
126. González GE, Rhaleb N-E, D'ambrosio MA, Nakagawa P, Liu Y, Leung P, Dai X, Yang X-P, Peterson EL, Carretero OA. Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens*. Januar 2015;33(1):144–52.
127. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 29. November 2002;91(11):988–98. (Übersichtsarbeit)
128. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: For whom the cell tolls. *Circ Res*. 29. April 2011;108(9):1133–45. (Übersichtsarbeit)
129. Devchand PR, Keller H, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene 8 4 pathway to inflammation control. 1996;384:5.
130. Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol*. Februar 2004;36(2):295–304.
131. Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yamaguchi I. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J Am Coll Cardiol*. 21. April 2004;43(8):1481–8.
132. Yamamoto Keiji, Ohki Ruri, Lee Richard T., Ikeda Uichi, Shimada Kazuyuki. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activators Inhibit Cardiac Hypertrophy in Cardiac Myocytes. *Circulation*. 2. Oktober 2001;104(14):1670–5.
133. Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Grand CBL, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Does Not Inhibit IL-6 or TNF- α Responses of Macrophages to Lipopolysaccharide In Vitro or In Vivo. *J Immunol*. 15. Januar 2000;164(2):1046–54.
134. Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Nuclear Factor- κ B Activation Leads to Down-regulation of Fatty Acid Oxidation during Cardiac Hypertrophy. *J Biol Chem*. 29. April 2005;280(17):17464–71.
135. Ding G, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. PPAR δ modulates lipopolysaccharide-induced TNF α inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Juni 2006;40(6):821–8.
136. Dobaczewski M, Frangogiannis NG. Chemokines and cardiac fibrosis. *Front Biosci Sch Ed*. 1. Juni 2009;1:391–405. (Übersichtsarbeit)
137. Schelbert EB, Fridman Y, Wong TC, Abu Daya H, Piehler KM, Kadakkal A, Miller CA, Ugander M, Maanja M, Kellman P, Shah DJ, Abebe KZ, Simon MA, Quarta G, Senni M, Butler J, Diez J, Redfield MM, Gheorghiu M. Temporal Relation Between Myocardial Fibrosis and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Association With Baseline Disease Severity and Subsequent Outcome. *JAMA Cardiol*. 01 2017;2(9):995–1006.
-

138. Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased Vulnerability to Atrial Fibrillation in Transgenic Mice With Selective Atrial Fibrosis Caused by Overexpression of TGF- β 1. *Circ Res*. 11. Juni 2004;94(11):1458–65.
139. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang X-F, Frangogiannis NG. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation*. 6. November 2007;116(19):2127–38. (Übersichtsarbeit)
140. Wang B, Omar A, Angelovska T, Drobic V, Rattan SG, Jones SC, Dixon IMC. Regulation of collagen synthesis by inhibitory Smad7 in cardiac myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. August 2007;293(2):H1282-1290.
141. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med*. 3. September 2015;2. (Übersichtsarbeit)
142. Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, Wilkes DC, Ge G, Grieskamp T, Yamada C, Liu T-C, Huang G, Basson CT, Kispert A, Greenspan DS, Sato TN. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol*. Januar 2009;11(1):46–55.
143. Duan J, Gherghe C, Liu D, Hamlett E, Srikantha L, Rodgers L, Regan JN, Rojas M, Willis M, Leask A, Majesky M, Deb A. Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *EMBO J*. 18. Januar 2012;31(2):429–42.
144. Zhang Z-Z, Shang Q-H, Jin H-Y, Song B, Oudit GY, Lu L, Zhou T, Xu Y-L, Gao P-J, Zhu D-L, Penninger JM, Zhong J-C. Cardiac protective effects of irbesartan via the PPAR-gamma signaling pathway in angiotensin-converting enzyme 2-deficient mice. *J Transl Med*. 25. September 2013;11:229.
145. Kaimoto S, Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Tateishi S, Ono K, Uchihashi M, Fukai K, Iwai-Kanai E, Matoba S. Activation of PPAR- α in the early stage of heart failure maintained myocardial function and energetics in pressure-overload heart failure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1. Februar 2017;312(2):H305–13.
146. Liu J, Wang P, Luo J, Huang Y, He L, Yang H, Li Q, Wu S, Zhelyabovska O, Yang Q. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Activation in Adult Hearts Facilitates Mitochondrial Function and Cardiac Performance Under Pressure-Overload Condition. *Hypertension*. 1. Februar 2011;57(2):223–30.
147. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 31. Mai 1990;322(22):1561–6.
148. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. Oktober 2010;128(1):191–227. (Übersichtsarbeit)
149. Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*. August 1994;267(2 Pt 2):H742-750.
150. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. Juli 1975;56(1):56–64.
151. Mone SM, Sanders SP, Colan SD. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation*. 15. August 1996;94(4):667–72.
152. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*. 25. Januar 2000;101(3):336–44.
-

153. Harrison BC, Roberts CR, Hood DB, Sweeney M, Gould JM, Bush EW, McKinsey TA. The CRM1 Nuclear Export Receptor Controls Pathological Cardiac Gene Expression. *Mol Cell Biol*. Dezember 2004;24(24):10636–49.
154. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I. Cardiac Hypertrophy by Hypertension and Exercise Training Exhibits Different Gene Expression of Enzymes in Energy Metabolism. *Hypertens Res*. 2003;26(10):829–37.
155. Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation*. 10. Oktober 2006;114(15):1633–44. (Übersichtsarbeit)
156. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Juli 2000;57(7):1050–93. (Übersichtsarbeit)
157. Dorn GW. The Fuzzy Logic of Physiological Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 5. Januar 2007;49(5):962–70. (Übersichtsarbeit)
158. HL-1 Cells [Internet]. Sigma-Aldrich. [zitiert 6. Juni 2019]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/hl-1-cells.html>
159. ConsensusPathDB [Internet]. [zitiert 7. Juni 2019]. Verfügbar unter: <http://cpdb.molgen.mpg.de/>
160. ImageJ [Internet]. [zitiert 7. Juni 2019]. Verfügbar unter: <https://imagej.nih.gov/ij/>
161. Primer designing tool [Internet]. [zitiert 7. Juni 2019]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
162. Open source and enterprise-ready professional software for data science - RStudio [Internet]. [zitiert 7. Juni 2019]. Verfügbar unter: <https://www.rstudio.com/>
163. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(6):2979–2984.
164. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*. September 2011;51(3):288–98. (Übersichtsarbeit)
165. Graham EL, Balla C, Franchino H, Melman Y, del Monte F, Das S. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Adult Mouse Cardiomyocytes. *J Vis Exp JoVE*. 24. September 2013;(79).
166. Judd J, Lovas J, Huang GN. Isolation, Culture and Transduction of Adult Mouse Cardiomyocytes. *J Vis Exp JoVE*. 28. August 2016;(114).
167. Zhou Y-Y, Wang S-Q, Zhu W-Z, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao R-P. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. Juli 2000;279(1):H429–36.
168. Animal_Welfare_Guideline_Charité_-_2017_-_DE-EN.pdf [Internet]. [zitiert 10. Juni 2019]. Verfügbar unter: https://tierschutz.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/tierschutz/Animal_Welfare_Guideline_Charit%C3%A9_-_2017_-_DE-EN.pdf
169. Bode D, Guthof T, Pieske BM, Heinzl FR, Hohendanner F. Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *J Vis Exp*. 26. Juli 2018;(137):57953.
-

-
170. MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf [Internet]. [zitiert 25. November 2019]. Verfügbar unter:
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
171. Li Q, Hu T, Chen L, Sun J, Xie J, Li R, Xu B. Selection of reference genes for normalization of quantitative polymerase chain reaction data in mouse models of heart failure. *Mol Med Rep*. Januar 2015;11(1):393–9.
172. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. Dezember 2001;25(4):402–8.
173. TruSeq RNA Library Prep Kit v2 | Simple libraries from total RNA [Internet]. [zitiert 17. Juni 2019]. Verfügbar unter:
<https://emea.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-rna-v2.html?langsel=/de/>
174. Herwig R, Hardt C, Lienhard M, Kamburov A. Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nat Protoc*. Oktober 2016;11(10):1889–907.
175. Beyhoff N, Brix S, Betz IR, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Krannich A, Stawowy P, Knebel F, Grune J, Kintscher U. Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *J Am Soc Echocardiogr*. Dezember 2017;30(12):1239-1250.e2.
176. Samuel CS, Bodaragama H, Chew JY, Widdop RE, Royce SG, Hewitson TD. Serelaxin Is a More Efficacious Antifibrotic Than Enalapril in an Experimental Model of Heart Disease. *Hypertension*. August 2014;64(2):315–22.
177. Grune J, Beyhoff N, Smeir E, Chudek R, Blumrich A, Ban Z, Brix S, Betz IR, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Stawowy P, Houtman R, Kolkhof P, Kintscher U. Selective Mineralocorticoid Receptor Cofactor Modulation as Molecular Basis for Finerenone's Antifibrotic Activity. *Hypertension*. April 2018;71(4):599–608.
178. Foryst-Ludwig A, Kreissl MC, Sprang C, Thalke B, Böhm C, Benz V, Gürgen D, Dragun D, Schubert C, Mai K, Stawowy P, Spranger J, Regitz-Zagrosek V, Unger T, Kintscher U. Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. Juli 2011;301(1):H115–22.
179. Du X-J, Fang L, Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: Experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther*. August 2006;111(2):434–75. (Übersichtsarbeit)
180. Kiper C, Grimes B, Van Zant G, Satin J. Mouse Strain Determines Cardiac Growth Potential. *PLoS ONE*. 5. August 2013;8(8).
181. Park S, Ranjbarvaziri S, Lay FD, Zhao P, Miller MJ, Dhaliwal JS, Huertas-Vazquez A, Wu X, Qiao R, Soffer JM, Mikkola HKA, Lusic AJ, Ardehali R. Genetic Regulation of Fibroblast Activation and Proliferation in Cardiac Fibrosis. *Circulation*. 18. September 2018;138(12):1224–35.
182. Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained β -adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev*. 18. April 2007;12(1):66–86. (Übersichtsarbeit)
183. Xu Q, Dalic A, Fang L, Kiriazis H, Ritchie R, Sim K, Gao X-M, Drummond G, Sarwar M, Zhang Y-Y, Dart A, Du X-J. Myocardial oxidative stress contributes to transgenic β 2-adrenoceptor activation-induced cardiomyopathy and heart failure: ROS mediates adverse cardiac β 2-AR signalling. *Br J Pharmacol*. März 2011;162(5):1012–28.
184. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of, Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. April 2016;17(4):412.
-

-
185. Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates. *Comp Med.* August 2009;59(4):339–43.
186. Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, Yae K, Kishino Y, Okada M, Hashimoto H, Takei M, Egashira T, Kodaira M, Kuroda Y, Tanaka A, Okata S, Suzuki T, Murata M, Fujita J, Fukuda K. Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes Derived from Human T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Johnson R, Herausgeber. PLoS ONE.* 21. Januar 2014;9(1):e85645.
187. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* Juni 2007;313(10):2063–76. (Übersichtsarbeit)
188. Newman P, Berndt M, Gorski J, White G, Lyman S, Paddock C, Muller W. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 9. März 1990;247(4947):1219–22.
189. Perreau J, Lilienbaum A, Vasseur M, Paulin D. Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cells. *Gene.* Februar 1988;62(1):7–16.
190. Kok BPC, Dyck JRB, Harris TE, Brindley DN. Differential regulation of the expressions of the PGC-1 α splice variants, lipins, and PPAR α in heart compared to liver. *J Lipid Res.* Juni 2013;54(6):1662–77.
191. Catoire M, Alex S, Paraskevopoulos N, Mattijssen F, Evers-van Gogh I, Schaart G, Jeppesen J, Kneppers A, Mensink M, Voshol PJ, Olivecrona G, Tan NS, Hesselink MKC, Berbée JF, Rensen PCN, Kalkhoven E, Schrauwen P, Kersten S. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18. März 2014;111(11):E1043–52.
192. Georgiadi A, Lichtenstein L, Degenhardt T, Boekschoten MV, van Bilsen M, Desvergne B, Muller M, Kersten S. Induction of Cardiac Angptl4 by Dietary Fatty Acids Is Mediated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Protects Against Fatty Acid-Induced Oxidative Stress. *Circ Res.* 11. Juni 2010;106(11):1712–21.
193. Teo Z, Chan JSK, Chong HC, Sng MK, Choo CC, Phua GZM, Teo DJR, Zhu P, Choong C, Wong MTC, Tan NS. Angiopoietin-like 4 induces a β -catenin-mediated upregulation of ID3 in fibroblasts to reduce scar collagen expression. *Sci Rep.* Dezember 2017;7(1).
194. de la Rosa Rodriguez MA, Kersten S. Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* Oktober 2017;1862(10):1212–20. (Übersichtsarbeit)
195. Mattijssen F, Georgiadi A, Andasarie T, Szalowska E, Zota A, Kronen-Herzig A, Heier C, Ratman D, De Bosscher K, Qi L, Zechner R, Herzig S, Kersten S. Hypoxia-inducible Lipid Droplet-associated (HILPDA) Is a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Target Involved in Hepatic Triglyceride Secretion. *J Biol Chem.* 11. Juli 2014;289(28):19279–93.
196. Willis BC, Salazar-Cantú A, Silva-Platas C, Fernández-Sada E, Villegas CA, Rios-Argaiz E, González-Serrano P, Sánchez LA, Guerrero-Beltrán CE, García N, Torre-Amione G, García-Rivas GJ, Altamirano J. Impaired oxidative metabolism and calcium mishandling underlie cardiac dysfunction in a rat model of post-acute isoproterenol-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 1. März 2015;308(5):H467–77.
197. Zhang W, Chang H, Zhang H, Zhang L. MiR-30e Attenuates Isoproterenol-induced Cardiac Fibrosis Through Suppressing Snai1/TGF- β Signaling. *J Cardiovasc Pharmacol.* Dezember 2017;70(6):362–8.
198. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* Dezember 2007;28(12):551–8. (Übersichtsarbeit)
-

199. Lee C-H. Transcriptional Repression of Atherogenic Inflammation: Modulation by PPAR. *Science*. 17. Oktober 2003;302(5644):453–7. (Übersichtsarbeit)
200. Yu X, Burgess SC, Ge H, Wong KK, Nasseem RH, Garry DJ, Sherry AD, Malloy CR, Berger JP, Li C. Inhibition of cardiac lipoprotein utilization by transgenic overexpression of Angptl4 in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1767–1772.
201. Galindo CL, Skinner MA, Errami M, Olson LD, Watson DA, Li J, McCormick JF, McIver LJ, Kumar NM, Pham TQ, Garner HR. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiol*. 9. Dezember 2009;9:23.
202. Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, Stankovicova T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. *Gen Physiol Biophys*. 2012;31(02):141–51. (Übersichtsarbeit)
203. Shao Y, Redfors B, Scharin Täng M, Möllmann H, Troidl C, Szardien S, Hamm C, Nef H, Borén J, Omerovic E. Novel rat model reveals important roles of β -adrenoreceptors in stress-induced cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 3. Oktober 2013;168(3):1943–50.
204. Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res*. Juli 1994;75(1):105–13.
205. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res*. September 1989;65(3):657–70.
206. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol*. April 1959;67(4):443–55.
207. Grimm D. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. *Cardiovasc Res*. 1998;37(1):91–100.
208. Beyhoff N, Lohr D, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Brix S, Grune J, Thiele A, Erfinanda L, Tabuchi A, Kuebler WM, Pieske B, Schreiber LM, Kintscher U. Characterization of Myocardial Microstructure and Function in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *Hypertens Dallas Tex* 1979. August 2019;74(2):295–304.
209. Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP, Vatner SF. Effects of Chronic α -Adrenergic Receptor Stimulation in Mice. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;(29):2735–46.
210. Sun M, Yu H, Zhang Y, Li Z, Gao W. MicroRNA-214 Mediates Isoproterenol-induced Proliferation and Collagen Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Sci Rep*. 22. Dezember 2015;5.
211. Souza CO, Teixeira AA, Biondo LA, Silveira LS, Calder PC, Rosa Neto JC. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF κ B, independently of PPARs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Mai 2017;44(5):566–75.
212. da Silva RP, Gordon S. Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J*. 15. März 1999;338(Pt 3):687–94.
213. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. September 2007;293(3):H1883–91.
214. Peter AK, Bjerke MA, Leinwand LA. Biology of the cardiac myocyte in heart disease. Drubin DG, Herausgeber. *Mol Biol Cell*. 15. Juli 2016;27(14):2149–60. (Übersichtsarbeit)
-

215. Diaz R, Wilson G. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovasc Res.* 1. Mai 2006;70(2):286–96. (Übersichtsarbeit)
216. Rohde D, Schön C, Boerries M, Didrihsone I, Ritterhoff J, Kubatzky KF, Völkens M, Herzog N, Mähler M, Tsoporis JN, Parker TG, Linke B, Giannitsis E, Gao E, Peppel K, Katus HA, Most P. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO Mol Med.* Juni 2014;6(6):778–94.
217. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 15. März 1976;98(2):367–81.
218. Dias P, Desplantez T, El-Harasis MA, Chowdhury RA, Ullrich ND, Cabestrero de Diego A, Peters NS, Severs NJ, MacLeod KT, Dupont E. Characterisation of Connexin Expression and Electrophysiological Properties in Stable Clones of the HL-1 Myocyte Cell Line. *Barnes S, Herausgeber. PLoS ONE.* 28. Februar 2014;9(2):e90266.
219. Ménard C, Pupier S, Mornet D, Kitzmann M, Nargeot J, Lory P. Modulation of L-type Calcium Channel Expression during Retinoic Acid-induced Differentiation of H9C2 Cardiac Cells. *J Biol Chem.* 8. Oktober 1999;274(41):29063–70.
220. Kabaeva Z, Zhao M, Michele DE. Blebbistatin extends culture life of adult mouse cardiac myocytes and allows efficient and stable transgene expression. *AJP Heart Circ Physiol.* 1. Februar 2008;294(4):H1667–74.
221. Dou Y, Arlock P, Arner A. Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* September 2007;293(3):C1148-1153.
222. Sellin LC, McArdle JJ. Multiple effects of 2,3-butanedione monoxime. *Pharmacol Toxicol.* Juni 1994;74(6):305–13.
223. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res.* November 1989;65(5):1441–9.
224. Georgiadi A, Boekschoten MV, Müller M, Kersten S. Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. *Physiol Genomics.* 15. März 2012;44(6):352–61.
225. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE. Fatty Acid Homeostasis and Induction of Lipid Regulatory Genes in Skeletal Muscles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α Knock-out Mice: Evidence for compensatory regulation by PPAR δ . *J Biol Chem.* 19. Juli 2002;277(29):26089–97.
226. Schäfer HL, Linz W, Falk E, Glien M, Glombik H, Korn M, Wendler W, Herling AW, Rütten H. AVE8134, a novel potent PPAR α agonist, improves lipid profile and glucose metabolism in dyslipidemic mice and type 2 diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin.* Januar 2012;33(1):82–90.
227. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 1. Oktober 1996;15(19):5336–48.
228. Carroll R, Severson DL. Peroxisome proliferator-activated receptor- α ligands inhibit cardiac lipoprotein lipase activity. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. August 2001;281(2):H888–94.
229. Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VEH, Rensen PCN, Pijl H, Romijn JA, Havekes LM. Contribution of Fatty Acids Released From Lipolysis of Plasma Triglycerides to Total Plasma Fatty Acid Flux and Tissue-Specific Fatty Acid Uptake. *Diabetes.* 1. März 2003;52(3):614–20.
-

-
230. Nahlé Z, Hsieh M, Pietka T, Coburn CT, Grimaldi PA, Zhang MQ, Das D, Abumrad NA. CD36-dependent Regulation of Muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR δ / β -mediated Adaptation to Metabolic Stress. *J Biol Chem.* 23. Mai 2008;283(21):14317–26.
231. Tsai F-Y, Cheng Y-T, Tsou T-C. A recombinant PPRE-driven luciferase bioassay for identification of potential PPAR agonists. *Vitam Horm.* 2014;94:427–35.
232. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activity. *Circulation.* 4. Mai 2004;109(17):2054–7.
233. Kim I, Moon S-O, Koh KN, Kim H, Uhm C-S, Kwak HJ, Kim N-G, Koh GY. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Angiopoietin-related Protein: Angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* 10. September 1999;274(37):26523–8.
234. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, Horn A, Kireva T, Beyer C, Zwerina J, Schneider H, Sadowski A, Riener M-O, MacDougald OA, Distler O, Schett G, Distler JHW. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun.* 13. März 2012;3:735.
235. Liu Q, Zhu L-J, Waaga-Gasser AM, Ding Y, Cao M, Jadhav SJ, Kirillos S, Shekar PS, Padera RF, Chang Y-C, Xu X, Zeisberg EM, Charytan DM, Hsiao L-L. The axis of local cardiac endogenous Klotho-TGF- β 1-Wnt signaling mediates cardiac fibrosis in human. *J Mol Cell Cardiol.* November 2019;136:113–24.
236. Guo X, Yan F, Shan X, Li J, Yang Y, Zhang J, Yan X, Bu P. SIRT3 inhibits Ang II-induced transdifferentiation of cardiac fibroblasts through β -catenin/PPAR- γ signaling. *Life Sci.* Oktober 2017;186:111–7.
237. Kamimura D, Uchino K, Ishigami T, Hall ME, Umemura S. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Prevents Development of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction; Inhibition of Wnt- β -catenin Signaling as a Possible Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol.* August 2016;68(2):155–61.
238. Gao D, Ning N, Hao G, Niu X. Pioglitazone attenuates vascular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *PPAR Res.* 2012;2012:856426.
239. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science.* 6. Juli 2012;337(6090):59–64.
240. Langton PF, Kakugawa S, Vincent J-P. Making, Exporting, and Modulating Wnts. *Trends Cell Biol.* Oktober 2016;26(10):756–65. (Übersichtsarbeit)
241. Zhao Y, Wang C, Wang C, Hong X, Miao J, Liao Y, Zhou L, Liu Y. An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. *Sci Rep.* 12. Juni 2018; 8(1):8996.
242. Pschyrembel Online | Mittlere effektive Konzentration [Internet]. [zitiert 2. Dezember 2019]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/Mittlere%20effektive%20Konzentration/B0GV0>
243. Da'adoosh B, Marcus D, Rayan A, King F, Che J, Goldblum A. Discovering highly selective and diverse PPAR-delta agonists by ligand based machine learning and structural modeling. *Sci Rep.* 31. Januar 2019; 9(1):1106.
244. Nandhikonda P, Yasgar A, Baranowski AM, Sidhu PS, McCallum MM, Pawlak AJ, Teske K, Feleke B, Yuan NY, Kevin C, Bikle DD, Ayers SD, Webb P, Rai G, Simeonov A, Jadhav A, Maloney D, Arnold LA. Peroxisome Proliferation-Activated Receptor δ Agonist GW0742 Interacts Weakly with Multiple Nuclear Receptors, Including the Vitamin D Receptor. *Biochemistry.* 18. Juni 2013;52(24):4193–203.
-

245. Oyama T, Toyota K, Waku T, Hirakawa Y, Nagasawa N, Kasuga J, Hashimoto Y, Miyachi H, Morikawa K. Adaptability and selectivity of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pan agonists revealed from crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1. August 2009;65(8):786–95.
246. Yau M, Wang Y, Lam KSL, Zhang J, Wu D, Xu A. A Highly Conserved Motif within the NH2-terminal Coiled-coil Domain of Angiotensin-like Protein 4 Confers Its Inhibitory Effects on Lipoprotein Lipase by Disrupting the Enzyme Dimerization. *J Biol Chem*. 1. Mai 2009;284(18):11942–52.
247. Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H. Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res*. November 2002;43(11):1770–2.
248. Almakdessi S, Andrieu J, Herilier H, Faucon G. Effect of isoproterenol on the metabolism of myocardial fatty acids. *J Mol Cell Cardiol*. Februar 1987;19(2):141–9.
249. Shao Y, Redfors B, Ståhlman M, Täng MS, Miljanovic A, Möllmann H, Troidl C, Szardien S, Hamm C, Nef H, Borén J, Omerovic E. A mouse model reveals an important role for catecholamine-induced lipotoxicity in the pathogenesis of stress-induced cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2013;15(1):9–22.
250. Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, Yang Q. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor- δ deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med*. November 2004;10(11):1245–50.
251. Sachdeva J, Dai W, Kloner RA. Functional and Histological Assessment of an Experimental Model of Takotsubo's Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 22. Mai 2014;3(3).
252. Song Y-H, Cai H, Gu N, Qian C-F, Cao S-P, Zhao Z-M. Icariin attenuates cardiac remodelling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure: Icariin ameliorates heart failure in rats. *J Pharm Pharmacol*. April 2011;63(4):541–9.
253. Yin Q, Lu H, Bai Y, Tian A, Yang Q, Wu J, Yang C, Fan T, Zhang Y, Zheng X, Zheng X, Li Z. A metabolite of Danshen formulae attenuates cardiac fibrosis induced by isoprenaline, via a NOX2/ROS/p38 pathway. *Br J Pharmacol*. Dezember 2015;172(23):5573–85.
254. Wang L, Yue Y, Yang X, Fan T, Mei B, Hou J, Liang M, Chen G, Wu Z. Platelet Derived Growth Factor Alpha (PDGFR α) Induces the Activation of Cardiac Fibroblasts by Activating c-Kit. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 6. August 2017;23:3808–16.
255. Challa AA, Vukmirovic M, Blackmon J, Stefanovic B. Withaferin-A Reduces Type I Collagen Expression In Vitro and Inhibits Development of Myocardial Fibrosis In Vivo. *Kocher O, Herausgeber. PLoS ONE*. 10. August 2012;7(8):e42989.
256. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. April 1985;17(4):291–306.
257. An X, Wang J, Li H, Lu Z, Bai Y, Xiao H, Zhang Y, Song Y. Speckle Tracking Based Strain Analysis Is Sensitive for Early Detection of Pathological Cardiac Hypertrophy. *Feng Y, Herausgeber. PLOS ONE*. 12. Februar 2016;11(2):e0149155.
258. Perk G, Tunick PA, Kronzon I. Non-Doppler Two-dimensional Strain Imaging by Echocardiography—From Technical Considerations to Clinical Applications. *J Am Soc Echocardiogr*. März 2007;20(3):234–43. (Übersichtsarbeit)
259. Li H, Lu Z-Z, Chen C, Song Y, Xiao H, Zhang Y-Y. Echocardiographic assessment of β -adrenoceptor stimulation-induced heart failure with reduced heart rate in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41(1):58–66.
-

260. Gray H. Heart-Weight and Body-Weight in Rodents. *J Mammal.* August 1945;26(3):285.
261. Kumar NT, Liestøl K, Løberg EM, Reims HM, Mæhlen J. Postmortem heart weight: relation to body size and effects of cardiovascular disease and cancer. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* Februar 2014;23(1):5–11.
262. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. September 1991;88(18):8277–81.
263. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuß L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Krüger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schäfer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G. Differential Cardiac Remodeling in Preload Versus Afterload. *Circulation.* 7. September 2010;122(10):993–1003.
264. Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol.* Juni 2009;46(6):952–9.
265. Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RLC, Xu JY, Chen B, Chow W-S, Tso AWK, Lam KSL. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26. April 2005;102(17):6086–91.
266. Kersten S, Lichtenstein L, Steenbergen E, Mudde K, Hendriks HFJ, Hesselink MK, Schrauwen P, Muller M. Caloric Restriction and Exercise Increase Plasma ANGPTL4 Levels in Humans via Elevated Free Fatty Acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1. Juni 2009;29(6):969–74.
267. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10. Oktober 1995;92(21):9580–4.
268. Bernstein AM, Roizen MF, Martinez L. Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. *J Clin Lipidol.* November 2014;8(6):612–7.
269. Stryjecki C, Roke K, Clarke S, Nielsen D, Badawi A, El-Sohehy A, Ma DWL, Mutch DM. Enzymatic activity and genetic variation in SCD1 modulate the relationship between fatty acids and inflammation. *Mol Genet Metab.* März 2012;105(3):421–7.
270. Petersson H, Basu S, Cederholm T, Risérus U. Serum fatty acid composition and indices of stearoyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. *Br J Nutr.* Juni 2008;99(6):1186–9.
271. Yang Z-H, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 2011;10(1):120.
272. Guo X, Li H, Xu H, Halim V, Zhang W, Wang H, Ong KT, Woo S-L, Walzem RL, Mashek DG, Dong H, Lu F, Wei L, Huo Y, Wu C. Palmitoleate Induces Hepatic Steatosis but Suppresses Liver Inflammatory Response in Mice. *PLoS ONE.* 29. Juni 2012;7(6):e39286.
273. Chan KL, Pillon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Thérêt M, Chazaud B, Klip A. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem.* 3. Juli 2015;290(27):16979–88.
-

274. Çimen I, Kocatürk B, Koyuncu S, Tufanlı Ö, Onat UI, Yıldırım AD, Apaydın O, Demirsoy Ş, Aykut ZG, Nguyen UT, Watkins SM, Hotamışlıgil GS, Erbay E. Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation. *Sci Transl Med*. 28. September 2016;8(358):358ra126-358ra126.

275. Karbowska J, Kochan Z, Smoleński RT. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is downregulated in the failing human heart. *Cell Mol Biol Lett*. 2003;8(1):49–53.

276. Search of: PPAR agonists - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [zitiert 24. Oktober 2019]. Verfügbar unter:
https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=PPAR+agonists&Search=Clear&age_v=&gndr=&type=&rslt=

277. Djoussé L, Weir NL, Hanson NQ, Tsai MY, Gaziano JM. Plasma Phospholipid Concentration of Cis Palmitoleic Acid and Risk of Heart Failure. *Circ Heart Fail*. November 2012;5(6):703–9.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Iris Rosa Betz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Palmitoleinsäure (C16:1n7) auf kardiales Remodeling vermittelt durch den nukleären Hormonrezeptor PPAR-delta“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, der 02.07.2020

(Iris Rosa Betz)

(PD Dr. rer. nat Anna Foryst-Ludwig)

8 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Iris Betz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: Beyhoff, N., Brix, S., Betz, I.R., Klopffleisch, R., Foryst-Ludwig, A., Krannich, A., Stawowy, P., Knebel, F., Grune, J., and Kintscher, U. (2017). Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. Journal of the American Society of Echocardiography 30, 1239–1250.e2.

Beitrag im Einzelnen:

- Teile der Kontrollgruppe des ISO-Versuches aus der Dissertation wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die n-Zahl der Kontroll- und ISO-Gruppe des Papers zu erhöhen.
- Planung eines Teils der Experimente zusammen mit Dr. med. Niklas Beyhoff, Dr. rer. nat. Jana Grune, Dr. rer. nat. Sarah Brix, Prof. Dr. med Ulrich Kintscher und PD Dr. rer. nat. Anna Foryst-Ludwig (Tab. 1, Tab. 3)
- Durchführung der ISO-Gabe und Versorgung der Tiere mit Frau Beata Höft, Dr. med. Niklas Beyhoff, Dr. rer. nat. Sarah Brix, Dr. rer. nat. Jana Grune und PD Dr. rer. nat. Anna Foryst-Ludwig (Tab. 1 + 2, Fig. 3, Tab. 3, Fig. 4 - 6, Tab. 4)
- Durchführung der Echokardiographie bei einem Teil der Tiere sowie Teile der dazugehörigen Analysen mit Dr. med. Niklas Beyhoff, Dr. rer. nat. Sarah Brix und Dr. rer. nat. Jana Grune (Tab. 1 + 2, Fig. 3, Tab. 3, Fig. 4 - 6, Tab. 4)
- Präparation, Wiegen und Fixierung der Organe sowie Anfertigung der histologischen Schnitte mit Frau Beata Höft, Dr. med. Niklas Beyhoff, Dr. rer. nat. Sarah Brix, Dr. rer. nat. Jana Grune und PD Dr. rer. nat. Anna Foryst-Ludwig (Tab. 1 + 2, Fig. 3, Fig. 6)
- Durchführung der histologischen Analysen bei einem Teil der Tiere (Fig. 3, Tab. 3, Fig. 6)
- Auswertung des TIMP-1 ELISAs zusammen mit Dr. med Niklas Beyhoff und PD Dr. rer. nat. Anna Foryst-Ludwig (Tab. 2 - 4, Fig. 6)
- Hilfe bei der statistischen Auswertung (Tab. 1 + 2, Fig. 3 + 4)
- Schreiben und Korrektur des Manuskriptes zusammen mit den oben stehenden Autoren
- Unterstützung bei der Revision mit den oben stehenden Autoren

Berlin, der 02.07.2020

PD Dr. rer. nat. Anna Foryst-Ludwig
Erstbetreunde Hochschullehrerin
(Unterschrift + Stempel)

Iris Rosa Betz
(Doktorandin)

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationsliste

1. Beyhoff, N., Brix, S., **Betz, I.R.**, Klopfleisch, R., Foryst-Ludwig, A., Krannich, A., Stawowy, P., Knebel, F., Grune, J., and Kintscher, U. (2017). Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *Journal of the American Society of Echocardiography* 30, 1239–1250.e2.

2. Grune, J., Beyhoff, N., Smeir, E., Chudek, R., Blumrich, A., Ban, Z., Brix, S., **Betz, I.R.**, Schupp, M., Foryst-Ludwig, A., et al. (2018). Selective Mineralocorticoid Receptor Cofactor Modulation as Molecular Basis for Finerenone’s Antifibrotic Activity. *Hypertension* 71, 599–608.

11 Danksagungen

Ich möchte hiermit allen Menschen, die mich auf diesem doch nicht kurzem Weg zur Promotion begleitet haben, danken.

Insbesondere dankbar bin ich meiner Doktormutter PD Dr. Anna Foryst-Ludwig, die mich nicht nur wissenschaftlich all die Jahre begleitet hat, sondern mir auch außerhalb der Promotion all die Jahre unterstützend zur Seite gestanden hat und mir geholfen hat, als Mensch zu wachsen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Kintscher bedanken, der mich als Leiter unserer AG stets unterstützt und gefördert hat.

Ein großes Dankeschön ergeht auch meiner AG, die AG Kintscher, die mich wissenschaftlich, technisch und menschlich im und außerhalb des Labors unterstützt hat. Danke an all meine Mitdoktoranden für die schöne Zeit mit euch! Insbesondere möchte ich mich bei unserer technischen Assistentin, Beata Höft, bedanken, die mir so oft bei technischen Fragen weitergeholfen hat und immer unterstützend zur Seite stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe „Molekulare Endokrinologie“ am Institut für Diabetes und Adipositas des Helmholtz-Zentrums München, die uns hervorragend bei der RNA-Sequenzierung unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Henriette Uhlénhaut und Dr. Franziska Greulich bedanken.

Ein ganz lieber Dank ergeht auch an all die Korrekturleser dieser Arbeit, die nicht nur viel zu lesen hatten, sondern auch exzellent korrigiert haben: Dr. Annelie Blumrich, Dr. Juliane Kasch, Dr. Hendrik Bartolomaeus, Theda Bartolomaeus, Heidi Betz, Roland Betz und Christoph Bornemann.

Und zu guter Letzt ein riesiges Dankeschön an meine Familie und Freunde. Danke, dass ihr das all diese Jahre mit mir und meiner Arbeit ausgehalten habt!