

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

DISSERTATION

Der Einfluss von Palmitoleinsäure (C16:1) auf die PI3K/AKT/FOXO
und ERK 1/2 (MAPK) Signalkaskaden im Kontext physiologischer
kardialer Hypertrophie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Julia Qaiyumi

Datum der Promotion: 03.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract	XI
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Pathologische und Physiologische kardiale Hypertrophie	4
1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen kardialer Hypertrophie	4
1.2.2 Pathologische kardiale Hypertrophie	5
1.2.3 Physiologische kardiale Hypertrophie	7
1.3 Grundlagen des Lipidstoffwechsels im menschlichen Organismus	9
1.4 Fettsäuren im Kontext kardialer Hypertrophie	10
1.5 Palmitoleinsäure	12
1.5.1 Effekte von Palmitoleinsäure im metabolischen Kontext	14
1.5.2 Palmitoleinsäure im Kontext physiologischer kardialer Hypertrophie	16
1.6 Der IGF-1 Signalweg	21
1.6.1 Die PI3K-AKT Signaltransduktion	22
1.6.1.1 Die Proteinkinase AKT	23
1.6.2 Die FOXO-Transkriptionsfaktoren	24
1.6.2.1 Posttranslationale Regulation der FOXO-Transkriptionsfaktoren	25
1.7 Der MAPK-ERK Signalweg	27
2 Zielsetzung	29
3 Material	30
3.1 Verwendete Geräte	30
3.2 Labormaterialien	31
3.3 Lösungen, Medien, Kits	32
3.4 Chemikalien und Substanzen	32
4 Methoden	38
4.1 Zellkulturtechniken	38
4.1.1 HL-1 Zelllinie.....	38
4.1.2 Kultivierung und Passagierung der HL-1 Zellen.....	38
4.2 Stimulationsexperimente	39
4.2.1 Aussäen von HL-1 Zellen	39
4.2.2 Ansetzen von Fettsäuren und IGF-1	40
4.2.3 Stimulation von HL-1 Zellen	40
4.2.4 Lyse der Zellen sowie Protein- und RNA- Isolation	41
4.3 Proteinbiochemische Methoden	41
4.3.1 Proteinisolation	41
4.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proben	41
4.3.3 Herstellung der Gele.....	43
4.3.4 Western Blotting	43

4.3.4.1 Vorbereitung der Proben	43
4.3.4.2 Gelelektrophorese	44
4.3.4.3 Transfer der Proteine.....	44
4.3.4.4 Blocken der Membran	45
4.3.4.5 Auftragen des Erstantikörpers.....	45
4.3.4.6 Waschen der Membran und Auftragen des Zweitantikörpers.....	46
4.3.4.7 Dunkelkammerarbeit	46
4.3.4.8 Stripping der Membran.....	46
4.4 Immunfluoreszenz- Versuche.....	47
4.4.1 Durchführung des Immunfluoreszenz-Assays	47
4.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	48
4.5 Real-Time PCR Versuche.....	48
4.5.1 RNA Präparation	49
4.5.2 cDNA Synthese	49
4.5.3 Durchführung der Real-Time PCR	50
4.5.4 Auswertung der Real-Time PCR.....	51
4.6 Statistische Berechnungen	53
5 Ergebnisse.....	54
5.1 Kontrollversuche p-AKT.....	54
5.2 Analyse der C16:1 vermittelten FOXO-Regulation auf Proteinebene.....	55
5.2.1 Screening auf die Beteiligung von FOXO am C16:1 Wirkmechanismus	55
5.2.1.1 p-FOXO1 Versuche	55
5.2.1.2 p-FOXO3a Versuche	57
5.2.2 Versuchsreihe zur Regulation der FOXO Stabilität.....	59
5.2.2.1 Gesamt FOXO1	60
5.2.2.2 Gesamt FOXO3a.....	61
5.2.3 Zusammenfassung und Vergleich mit C16:0 und IGF-1	62
5.3 FOXO Translokationsanalyse.....	64
5.4 Einfluss von C16:1 auf die FOXO-Zielgenexpression	65
5.4.1 Messung der MuRF1 und Atrogin-1 mRNA Expression	66
5.4.2 Messung der p21 mRNA-Menge.....	67
5.5 Einfluss von C16:1 auf die Regulation der ERK 1/2 Kinase	68
6 Diskussion	72
6.1 Palmitoleinsäure reguliert FOXO1 und FOXO3a an verschiedenen funktionellen Seitenketten mittels Phosphorylierung.....	72
6.1.1 Palmitoleinsäure bewirkt die funktionale Interaktion von AKT und FOXO im Kontext physiologischer kardialer Hypertrophie	75
6.2 Palmitoleinsäure steigert nach kurzfristigem Stimulationsintervall die zelluläre Gesamtproteinmenge an FOXO3a	76
6.3 Palmitoleinsäure reguliert die Stabilität von FOXO1 sowie FOXO3a	78
6.3.1 Vergleich des Effektes von IGF-1 und C16:1 auf die FOXO-Proteinstabilität	80
6.4 Palmitoleinsäure induziert die zytosolische Translokation von FOXO3a.....	81
6.5 Palmitoleinsäure hat keinerlei Einfluss auf die Genexpression der E3-Ubiquitin- Ligasen MuRF1 und Atrogin-1 (MAFbx).....	83
6.6 Palmitoleinsäure induziert die Genexpression des FOXO3a-Zielgens p21	85
6.7 Palmitoleinsäure reguliert den MAPK-Signalweg durch die Dephosphorylierung der ERK 1/2 Kinase.....	88
6.7.1 Interaktion des PI3K-AKT- mit dem MAPK-ERK Signalweg	89
6.7.2 Bedeutung der Dephosphorylierung von ERK 1/2 im Kontext kardialer Ischämie	90
6.7.3 C16:0 zeigt im Vergleich zu C16:1 keinerlei Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad der ERK 1/2 Kinase	91
6.8 Zusammenfassung und vorgeschlagener Wirkmechanismus.....	93
6.9 Limitationen.....	94

6.10 Medizinische Relevanz und Ausblick.....	96
7 Literaturverzeichnis.....	99
8 Eidesstattliche Versicherung.....	121
9 Lebenslauf	123
10 Publikationen	125
11 Danksagung	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung und Progression kardialer Hypertrophie bis zur dekompensierten Herzinsuffizienz.....	4
Abbildung 2: Pathophysiologische Differenzierung physiologischer von pathologischer kardialer Hypertrophie.....	9
Abbildung 3: Strukturformel von cis-Palmitoleinsäure (C16:1n-7).....	13
Abbildung 4: Strukturformel von trans-Palmitoleinsäure (C16:1 trans-9).....	13
Abbildung 5: Nahrungsmittelquellen von C16:1 sowie C16:1-vermittelte vorteilhafte Auswirkungen im menschlichen Organismus.....	15
Abbildung 6: C16:1 als Mediator belastungsinduzierter kardialer Hypertrophie.....	17
Abbildung 7: Hypertrophe Effekte des Fettsäurenmixes (FFA) und Untersuchung des fetalen Genprogrammes in HL-1 Kardiomyozyten.....	19
Abbildung 8: Western Blot Analysen von p-AKT.....	20
Abbildung 9: Die IGF-1-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion im Hinblick auf zelluläre Hypertrophie- und Atrophiemechanismen.....	24
Abbildung 10: Mechanismus der AKT-vermittelten subzellulären FOXO Translokation im Hinblick auf die Aktivität der FOXO-Transkriptionsfaktoren.....	26
Abbildung 11: Funktionale Co-Aktivierung des MAPK-ERK sowie des IGF-1 Signalweges durch extrazelluläre Ligandenbindung.....	28
Abbildung 12: Eichgerade zur Erfassung der Western Blot-Proteinkonzentration.....	42
Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines Blot Sandwiches.....	45
Abbildung 14: Saubere Schmelzkurve als Hinweis für eine adäquate Primerspezifität.....	52
Abbildung 15: Halblogarithmische Auftragung der Amplifikationskurve (Ct-Einstellung).....	53
Abbildung 16: C16:1 induziert AKT-Phosphorylierung in HL-1 Zellen.....	54
Abbildung 17: C16:1 induziert FOXO1-Phosphorylierung (Ser256) in HL-1 Zellen.....	56
Abbildung 18: C16:1 induziert FOXO1-Phosphorylierung (Thr24) in HL-1 Zellen.....	57
Abbildung 19: C16:1 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Ser318/321) in HL-1 Zellen.....	58

Abbildung 20: C16:1 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Thr32) in HL-1 Zellen.....59

Abbildung 21: C16:1 bewirkt die Reduktion der FOXO1 Gesamtproteinmenge in HL-1 Zellen.61

Abbildung 22: C16:1 bewirkt die Reduktion der FOXO3 Gesamtproteinmenge in HL-1 Zellen.62

Abbildung 23: C16:0 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Ser318/321) während IGF-1
keine Auswirkung auf p-FOXO3a (Ser318/321) in HL-1 Zellen hat.....63

Abbildung 24: C16:1 induziert die zytosolische Translokation von FOXO3a in HL-1 Zellen.....65

Abbildung 25: C16:1 bewirkt keine Regulation der FOXO3a-Zielgene MuRF1 und Atrogin-1
in HL-1 Zellen66

Abbildung 26: C16:1 induziert die Genexpression des FOXO3a-Zielgens p21 in HL-1 Zellen 67

Abbildung 27: C16:1 induziert ERK 1/2-Dephosphorylierung nach 30 Minuten in HL-1 Zellen .69

Abbildung 28: C16:1 induziert ERK 1/2-Dephosphorylierung nach 15 und 5 Minuten in HL-1
Zellen.....70

Abbildung 29: C16:0 hat keinerlei Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2
in HL-1 Zellen71

Abbildung 30: Potentieller Wirkmechanismus der C16:1-vermittelten kardialen Effekte94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach Ejektionsfraktion	3
Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer	35
Tabelle 3: Verwendete Antikörper.....	36
Tabelle 4: Rezepte der Trenn- bzw. Sammelgel Herstellung.....	43
Tabelle 5: Exemplarische Darstellung der zu pipettierenden Volumina.....	44
Tabelle 6: Protokoll der cDNA Synthese	50
Tabelle 7: Protokoll des Standard qRT-PCR Reaktionsansatzes	51

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AFX	FOXO4
AKT	Proteinkinase B
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANOVA	Analysis of variance = Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
AT-1	Angiotensin-1
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
atATGL-KO	Fettgewebe-Adipozyten-Triglycerid-Lipase-Knockout
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
β -MHC	β -Myosin Heavy Chain
BSA	Bovines Serumalbumin
C14:0	Myristinsäure
C16:0	Palmitinsäure
C16:1	Palmitoleinsäure
C18:0	Stearinsäure
C18:1t11	trans-Vaccensäure
CDK	Cyclin-dependent kinases; Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Complementary RNA = Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunoprecipitation
CK-1	Casein Kinase 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Ct-Wert	Threshold Cycle-Wert
dH ₂ O	Distilled Water = Destilliertes Wasser
DAKO	Dako Fluorescence Mounting Medium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejection Fraction = Ejektionsfraktion
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK 1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1 und 2
ESC	European Society of Cardiology
ET-1	Endothelin-1
FFA	Free Fatty Acid Mix = Freie Fettsäurenmixtur
FBS	Fetal Bovine Serum = Fetales Kälberserum
FKHRL1	Forkhead Box Protein O3 (veraltet)
FOXO	Forkhead-Box-Proteine
FVB	Friend leukemia Virus B
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HI	Herzinsuffizienz

HRQoL	Health-related quality of life
HSL	hormonsensitive Lipase
HFmrEF	Heart Failure with mid-range Ejection Fraction = Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction = Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction = Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HSL	hormonsensitive Lipase
IGF-1	Insulin-like-Growth-Factor-1
IGF-1-R	Insulin-like-Growth-Factor-1-Rezeptor
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
IVSd	Interventrikuläre Septumdicke
JVS	Juvenile Viszerale Steatose
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock Out
LDL	Low-density Lipoprotein
LM	Linksventrikuläre Masse
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Links ventrikuläre Ejektionsfraktion
MAFbx	Atrogin-1
MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinase
MEK	Mitogen-activated-Proteinkinase 2
MGL	Monoacylglycerinlipase
mRNA	Messenger RNA = Botenribunukleinsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MuRF1	Muscle Ring Finger 1
n	Anzahl technischer Replikate
N	Anzahl der Versuchswiederholungen
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	Nicht-alkoholischer Fettleber
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NRVM	Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzniveau
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat Buffered Saline = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCH	Physiologic Cardiac Hypertrophy = Physiologische Kardiale Hypertrophie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PP2a	Proteinphosphatase 2a
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWd	posteriore Wanddicke; linksventrikuläre Hinterwand
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAF	Mitogen-activated-Proteinkinase 3
RAS	EGF-Rezeptor Typ I

RIPA	Radioimmuno-precipitation assay buffer = Radioimmunpräzipitation Assay Puffer
RIPA-Puffer+	RIPA-Puffer mit Proteasen- und Phosphataseninhibitor
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequencing
RNasin	RNase-Inhibitor
rpm	rounds per minute = Zentrifugengeschwindigkeit
RT	Reverse Transkriptase
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAC	Transverse Aortic Constriction = Transverses Aortenkonstriktionsmodell
TAG	Triacylglyceride
TBS	Tris-buffered saline= Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20 = Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UPW	Ultra Pure Water
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Palmitoleinsäure (C16:1) ist eine einfach ungesättigte Fettsäure, die kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe als wichtiger Mediator physiologischer kardialer Hypertrophie (PCH) charakterisiert wurde. Da die molekulare Wirkweise jedoch weitgehend ungeklärt ist, war das Ziel dieser Arbeit den intrazellulären Wirkmechanismus von C16:1 zu entschlüsseln. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- Proteinkinase B (AKT)- Forkhead-Box-Protein (FOXO) Signalkaskade liegen.

Murine HL-1 Kardiomyozyten wurden entweder mit bovinem Serumalbumin als Vehikel, 40 mM C16:1, 130 mM Palmitinsäure (C16:0) oder 10 nM Insulin like Growth factor-1 (IGF-1) als Positivkontrolle stimuliert. Die Stimulationsintervalle variierten hierbei zwischen 5 min und 48 h. Im Anschluss wurden Gesamt-RNA und Proteine isoliert und mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert. Darüber hinaus wurden Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt. Hierzu wurden die immungefärbten Zellen mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop vergrößert und mit der BZ-II Analyser Software analysiert. Zuletzt wurde ebenfalls der Effekt von C16:1 auf den Mitogen-activated Protein Kinases (MAPK)- Extracellular-signal regulated Kinases (ERK) Signalweg betrachtet.

Die atrophieregulierenden FOXO-Transkriptionsfaktoren 1 und 3a zeigten sich nach einer 30-minütigen C16:1 Stimulation durch Phosphorylierung inaktiviert. Zudem beobachteten wir eine Reduktion der FOXO 1 und 3a Gesamtproteinmenge infolge 18-stündiger C16:1 Stimulation. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die C16-induzierte zytoplasmatische Translokation von FOXO3a nachgewiesen werden. Das Genexpressionslevel des FOXO3a-Zielgens p21 erwies sich nach 24-48 h C16:1 Stimulation signifikant hochreguliert. Ferner zeigte sich die wachstumsfördernde AKT-Kinase durch C16:1 aktiviert. Die Zellzyklus-regulierende Kinase ERK 1/2 präsentierte eine Inaktivierung mittels Dephosphorylierung infolge der C16:1 Stimulation.

Zusammenfassend konnten AKT, FOXO und ERK 1/2 als intrazelluläre Schlüsselmediatoren von C16:1 in Kardiomyozyten identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Aktivierung der wachstumsfördernden AKT-Kinase, sondern auch die Hemmung der atrophieregulierenden FOXO-Proteine bei der PCH eine zentrale Rolle spielt. Darüber hinaus scheint C16:1 durch die Inaktivierung von ERK 1/2, möglicherweise auch die Proliferation von Kardiomyozyten zu regulieren. Somit ist es naheliegend, dass die Effekte von C16:1 auf die kardiale Hypertrophie über die Beeinflussung von AKT/FOXO und ERK 1/2 vermittelt werden. Diese Studie liefert ein Hinweis darauf, dass die Fettsäure C16:1 molekulare kardioprotektive Effekte vermittelt, die zukünftig sowohl potentiell in der Prophylaxe als auch in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung sein könnten.

Abstract

We have previously identified palmitoleic acid (C16:1) as a novel regulator of physiological cardiac hypertrophy. Since the underlying mechanisms of the C16:1-induced cardiac effects remain uncertain, we aimed to further investigate the molecular cell signaling pathways behind the C16:1-mediated cardiac responses. The primary focus of this study was set on examining the effects of C16:1 on the PI3K-AKT-FOXO signaling pathway, related to cardiac hypertrophy.

The murine HL-1 cardiomyocytes were stimulated with either vehicle, 40 mM C16:1, 130 mM C16:0 as well as 10 nM IGF-1 (positive control) between 5 mins to 48 h. Subsequently total-RNA and proteins were isolated and examined by performing qRT-PCR or Western Blot analysis. In addition, immunofluorescence staining was conducted. Furthermore, the impact of C16:1 on MAPK/ERK signaling was also examined.

The FOXO transcription factors 1 and 3a revealed to be phosphorylated and therefore inactivated by a 30 min C16:1 stimulation. Moreover, the cells total abundance of FOXO1 and FOXO3a was significantly diminished upon an 18 h C16:1 treatment. As demonstrated by immunofluorescence staining, C16:1 stimulation furthermore resulted in the cytosolic translocation of FOXO3a. The expression level of the FOXO3a target gene p21 proved to be significantly upregulated upon 24-48 h of C16:1 treatment. The growth-promoting AKT kinase was activated by C16:1 treatment, indicating yet another involvement of the AKT-FOXO signaling pathway in C16:1-induced cardiac responses. In addition, the cell cycle-regulating kinase ERK 1/2 demonstrated to be significantly decreased upon C16:1 stimulation.

In conclusion, we were able to identify the C16:1-mediated regulation of AKT, FOXO and ERK 1/2 in cardiomyocytes. As FOXO is known to promote protein degradation and cell atrophy, its inactivation may play a crucial role in mediating physiological cardiac hypertrophy. By activating the growth-promoting kinase AKT, C16:1 ultimately enables pro-hypertrophic cardiac effects. The inactivation of ERK 1/2, being a fundamental regulator of cell cycle progression, indicates that while cell hypertrophy is being promoted, C16:1 may inhibit cell proliferation. This study revealed several molecular targets within the AKT-FOXO as well as the MAPK- signaling pathways that seem to be involved in mediating the previously shown, C16:1-induced beneficial cardiac growth processes. Therefore, it is probable that the effects of C16:1 on cardiac hypertrophy are mediated by affecting the AKT/FOXO as well as the ERK 1/2 signaling pathway. As C16:1 induces physiological cardiac growth, our study may contribute to develop potential future lipid-based therapies for cardiac diseases such as cardiomyopathy or heart failure.

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen im heutigen Zeitalter die weltweit häufigste Todesursache dar [1]. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ließen sich allein im Jahr 2017 31 % der globalen Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurückführen [1]. Angesichts des demographischen Wandels und des verbesserten medizinischen Fortschritts steigen jährlich die Inzidenz und Prävalenz chronischer kardiovaskulärer Erkrankungen [2]. Darüber hinaus verursachen kardiovaskuläre Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland jährlich ca. 46,4 Milliarden Euro Krankheitskosten, weitaus mehr als durch andere Krankheitsentitäten verursacht [3]. Herz-Kreislauf-Erkrankungen nehmen daher nicht nur eine zentrale Stellung in der Medizin ein, sondern sind darüber hinaus von enormer gesellschaftlicher und gesundheitsökonomischer Relevanz [4].

Neben der arteriellen Hypertonie und der koronaren Herzkrankheit (KHK) stellt die Herzinsuffizienz eines der häufigsten kardiologischen Krankheitsbilder dar [5]. Schätzungen gehen davon aus, dass in der Bundesrepublik Deutschland ca. 1,8 Millionen Menschen an Herzinsuffizienz leiden [6]. Laut Daten der CARLA-Studie steigt die Prävalenz der Herzinsuffizienz mit zunehmendem Alter auf bis zu 22 % bei den über 75-Jährigen an [7]. Seit 1995 hat sich die Erkrankungshäufigkeit der Herzinsuffizienz nahezu verdoppelt [8]. Zurzeit stellt die akute Dekompensation der Erkrankung deutschlandweit den häufigsten Hospitalisierungsgrund stationär behandelter Patienten dar [9]. Allein im Jahr 2016 bedingte das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz bundesweit über 444.632 (2016) Krankenhausaufnahmen [8]. Trotz moderner Therapiemöglichkeiten, welche die Morbidität und Mortalität der Herzinsuffizienzpatienten signifikant reduzieren konnten, zeigten Levy et al., dass die Mortalität mit 45-59 % jedoch weiterhin enorm hoch bleibt [10]. Demzufolge ist die Herzinsuffizienz eine häufig lebensbedrohliche Erkrankung von großer sozioökonomischer Relevanz.

Pathophysiologische Grundlage der chronischen Herzinsuffizienz ist eine ineffiziente kardiale Pumpleistung, welche nicht genügt, um die Blutzirkulation und die

Sauerstoffversorgung des Organismus adäquat aufrecht zu erhalten. Aus klinischer Sicht wird das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz als eine hochkomplexe Symptomkonstellation aus Ruhe- oder Belastungsdyspnoe, Ödembildung und Leistungsminderung definiert [11]. Laut der „Europäischen Gesellschaft für Kardiologie“ (ESC) resultieren daraus weitere klinisch relevante Parameter wie ein venöser Rückstau mit erhöhtem Jugularvenendruck, gesteigertem hepatojugulären Reflux, pulmonalvenöser Stauung mit Lungenödem sowie bei der HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction) eine echokardiographisch verminderte Ejektionsfraktion (LVEF) [12]. Die Patienten leiden an zahlreichen belastenden klinischen Symptomen, welche progredient im Verlauf der Erkrankung zunehmen. Laut Blindermann et al. zählen hierzu vor allem Fatigue und Abgeschlagenheit, Nykturie, Luftnot, Husten, Palpitationen, Brustschmerz, Schlaflosigkeit sowie diverse psychische Komorbiditäten[13]. Durch die progrediente Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit erfahren die Patienten eine ausgeprägte Abnahme der Lebensqualität (HRQOL)[14]. Der enorme Leidensdruck resultiert in einer ausgesprochen hohen Prävalenz von Angststörungen (43,7%) und Depressionen (42,7%) [13,15].

Zur funktionellen Einteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz übernahm die „Deutsche Gesellschaft für Kardiologie“ die Kriterien der „New York Heart Association“ (NYHA) [16,17]. Die NYHA-Klassifikation orientiert sich maßgeblich an der Leistungsfähigkeit des Patienten und erfasst zudem Komplikationen im Rahmen kardialer Adaptationsmechanismen [12].

Die ESC hat entsprechend der linksventrikulären Auswurfleistung (Ejektionsfraktion ((EF)) folgendes Schema zur Einteilung der Herzinsuffizienz entwickelt, welches sich auf die echokardiographische Beurteilung der linksventrikulären EF bezieht (s. Tabelle 1). Laut der ESC wird die Herzinsuffizienz echokardiographisch in drei verschiedene Entitäten klassifiziert, wobei es ätiologisch wichtig ist, zwischen systolischer (HFrEF, HFmrEF) und diastolischer Herzinsuffizienz (HFpEF) zu unterscheiden [18,19].

LVEF \geq 50%	“Heart Failure with preserved EF” (HFpEF) diastolische HI mit normaler Ejektionsfraktion
LVEF 40-49%	“Heart Failure with mid-range EF” (HFmrEF) systolische HI mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion
LVEF <40%	“Heart Failure with reduced EF” (HFrEF) systolische HI mit reduzierter Ejektionsfraktion

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach Ejektionsfraktion (basierend auf der ESC Leitlinie 2016)

„Trotz [moderner Diagnostik, kontinuierlicher Aktualisierung der Leitlinien und] der Etablierung neuer, die Prognose verbessernder Therapiestrategien, bleibt die Lebenserwartung herzinsuffizienter Patienten weiterhin deutlich eingeschränkt“ [6]. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (NYHA IV) beträgt die 1-Jahresletalität eines herzinsuffizienten Patienten ca. 50% und stellt damit eine noch ungünstigere Prognose als die diverser Tumorleiden dar [20]. Obwohl medikamentöse Behandlungsansätze mittels Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) oder Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker (ARB), Beta-Blocker, Aldosteronantagonisten, Ivabradin und Nephilysin-Inhibitoren eine Prognoseverbesserung der systolischen Herzinsuffizienz (HFrEF) erzielen können, kann die Erkrankung bis heute nicht geheilt werden und nur zusätzlich symptomatisch mit Diuretika und Digitalisglykosiden behandelt werden [10,17,21,22]. Für die diastolische Herzinsuffizienz (HFpEF) hingegen gibt es, außer einer symptomatischen Diuretikatherapie, zurzeit noch keine prognoseverbessernde Therapiestrategie [18]. Als Ultima Ratio für Patienten im NYHA IV-Endstadium der Herzinsuffizienz verbleibt lediglich die Herztransplantation oder mechanische Ersatzverfahren.

In Anbetracht der exorbitant hohen Mortalitätsrate und der Tatsache, dass bis dato keine kausalen Therapiemöglichkeiten existieren, gewinnt die Implementierung von Herzinsuffizienz-Prophylaxe-Programmen zukünftig an großer Bedeutung. In diesem Kontext muss verdeutlicht werden, dass sich die ursächliche Entstehung einer Herzinsuffizienz stets auf eine strukturelle Myokardschädigung mit kontraktile Dysfunktion, reduzierter LVEF oder verminderter diastolischer Dehnbarkeit zurückführen lässt [23–25].

Ätiologisch lassen sich die KHK, Kardiomyopathien, stenosierende Herzklappenvitien, Myokarditiden sowie vor allem die kardiale Hypertrophie als wichtigste Risikofaktoren für die Manifestation einer Herzinsuffizienz zusammenfassen[18]. Im Folgenden soll näher auf die Entstehung kardialer Hypertrophie eingegangen werden.

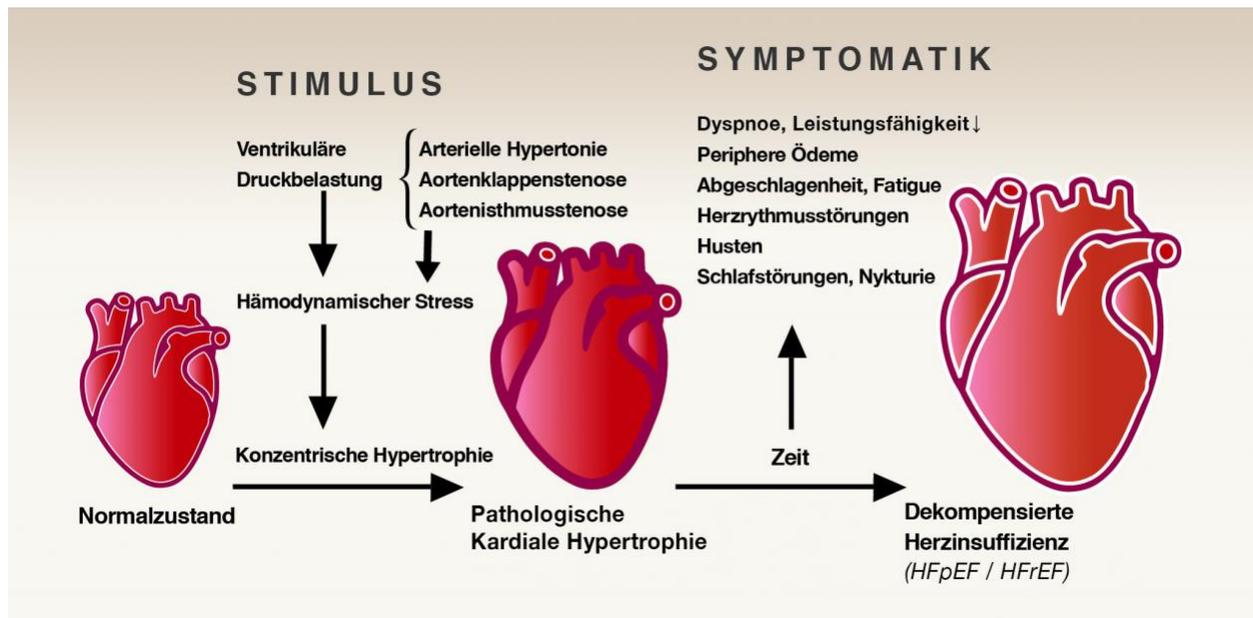


Abbildung 1: Entwicklung und Progression kardialer Hypertrophie bis zur dekompensierten Herzinsuffizienz am Beispiel ventrikulärer Druckbelastungen (Graphik orientiert an Dorn, 2007)

1.2 Pathologische und Physiologische kardiale Hypertrophie

1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen kardialer Hypertrophie

Der Begriff „Hypertrophie“ lässt sich als zellulärer Adaptationsmechanismus definieren, welcher eine myozytäre Größenzunahme bewirkt und ferner in der ganzheitlichen Vergrößerung eines Gewebes resultiert. Hypertrophieentstehung am Herzen erfolgt als Kompensationsreaktion auf diverse kardiale Belastungsfaktoren [26,27]. Hierzu zählen die arterielle Hypertonie, Herzklappenvitien wie beispielsweise die Aortenklappenstenose sowie eine erhöhte hämodynamische Belastung im Rahmen von Ausdauersport [28,29]. Um eine erhöhte Belastung des linksventrikulären Auswurftraktes kompensieren zu können, finden am Herzen prohypertrophe Prozesse statt. Diese verursachen eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten des Herzmuskels [30,31]. Diese Vergrößerung der Kardiomyozyten resultiert letztendlich in der ganzheitlichen Zunahme von Herzwanddicke

und Herzgewicht [32]. Kardiomyozyten sind postnatal bereits terminal differenzierte Zellen, wodurch sie unmittelbar nach der Geburt die Fähigkeit zur Hyperplasie, also zur Vermehrung der eigenen Zellzahl, verlieren [33]. Daher kann eine Größenzunahme des Herzens ausschließlich auf nicht-proliferierende Weise, durch Hypertrophie- anstatt Hyperplasie-Mechanismen, erfolgen [34,35].

Während die Hypertrophie der Skelettmuskulatur überwiegend positiv bewertet wird, stellt die Myokardhypertrophie einen negativen Prädiktor für die Gesundheit dar [36]. Die Hypertrophie des Myokards ist ätiologisch für gravierende Krankheitsbilder wie Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien, Arrhythmien sowie plötzlichen Herztod verantwortlich [37,38]. Jedoch muss dabei zwischen zwei verschiedenen Formen der Myokardhypertrophie differenziert werden. Aufgrund ihrer Genese werden diese als pathologische und physiologische kardiale Hypertrophie klassifiziert. Beide Hypertrophieentitäten lassen sich anhand morphologischer sowie metabolischer Eigenschaften und zugrundeliegenden Signalkaskaden voneinander unterscheiden und werden im Folgenden diskutiert.

1.2.2 Pathologische kardiale Hypertrophie

Das Herz kompensiert eine chronisch erhöhte Arbeitsbelastung durch kardiale Hypertrophie [39]. Chronische ventrikuläre Druck- und Volumenbelastungen durch eine arterielle Hypertonie oder ein Herzklappenvitium führen zur Entwicklung einer pathologischen Herzmuskelhypertrophie [39,40].

Diese persistierend erhöhte ventrikuläre Arbeitsbelastung führt zur Freisetzung von Endothelin-1 aus Endothelzellen [41]. In Kombination mit der Ausschüttung von Katecholaminen und der neurohumoralen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und somit die Manifestation von pathologischer Hypertrophie am Herzen ermöglicht [42]. Charakterisiert wird die pathologische Hypertrophie durch eine deutliche Größenzunahme des Myokards, welche mit Apoptose, interstitieller Fibrose, Inflammation, kardialer Dysfunktion sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [43–46]. Aufgrund fibrotischer Umbauprozesse führt die pathologische Hypertrophie zu einer zunehmenden Steifheit des Herzmuskels, welche die Kontraktilität und Elastizität des Myokards stark einschränkt [45,47]. Echokardiographisch korreliert die maladaptive Myokardhypertrophie durch chronische Druckbelastungen in der

Regel mit dem Bild einer konzentrischen Hypertrophie [48]. Diese zeichnet sich durch die Zunahme von linksventrikulärer Wand- und Septumdicke bei deutlicher Reduktion des Ventrikellumens aus (s. Abbildung 1) [48,49]. Ferner korreliert die pathologische konzentrische Hypertrophie auf zellulärer Ebene mit der Zunahme von Proteinsynthese und Kardiomyozytendurchmesser bei gleichbleibender Kardiomyozytenlänge [50]. Hieraus ergibt sich die echokardiographisch darstellbare Verminderung des linksventrikulären Diameters. Die Veränderung des zellulären Phänotyps durch Hypertrophie induziert auf Genexpressionsebene die Hochregulation bestimmter Hypertrophiemarker, welche auch als „Fetal Gene Program“ bezeichnet werden [51,52]. Hierzu zählen unter anderem folgende Gene: ANF (Atrialer natriuretischer Faktor), β -MHC (β -Myosin Heavy Chain) sowie BNP (Brain natriuretic Peptide), das zudem einen hohen Stellenwert im Rahmen der Herzinsuffizienz-Diagnostik besitzt [51–54]. Die Induktion des fetalen Genprogrammes im Rahmen pathologischer Hypertrophie geht mit einem Switch in der Versorgung des myokardialen Energiemetabolismus einher. Zur ATP-Produktion nutzt gesundes Herzgewebe zu 70-90 % die β -Oxidation von Fettsäuren [55,56]. Der Abbau von Glucose stellt unter physiologischen Bedingungen maximal 30% der kardialen ATP-Gewinnung dar [57]. Unter pathologischen Konditionen bedient sich das Herz jedoch vorwiegend der Glykolyse von Kohlenhydraten anstatt der β -Oxidation von Fettsäuren, um den eigenen Energiebedarf zu decken [58]. Während das Herz unter physiologischen Bedingungen normalerweise ein Gewicht von ca. 300 g aufweist, überschreitet der pathologisch hypertrophierte Herzmuskel häufig das kritische Herzgewicht von 500 g [59]. Ab jenem Herzgewicht kann bei gleichbleibender Kapillarisation aufgrund einer zu hohen Diffusionsstrecke zwischen Kapillarbett und Herzmuskel keine ausreichende Sauerstoffversorgung des Myokards mehr gewährleistet werden [60].

Die Progression von pathologischer Hypertrophie stellt eine der Hauptursachen für die Manifestation von Herzinsuffizienz und kardialer Dekompensation dar [61,62]. Da Herzinsuffizienz, wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, zu den führenden internistischen Krankheitsbildern und den häufigsten kardiovaskulären Todesursachen gehört, gilt die pathologische Myokardhypertrophie als prognostisch schlechtes Zeichen [37]. In der Framingham-Kohortenstudie wurden enorm hohe Prävalenzzahlen von linksventrikulärer Hypertrophie bei Patienten ab dem 70. Lebensjahr evident [63]. Diese betragen 33 % aller

männlichen Probanden sowie 49 % der Frauen [43]. Darüber hinaus weisen 44 % der an arterieller Hypertonie erkrankten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine kardiale Hypertrophie auf [64,65]. Nach der Framingham-Studie gilt die LV-Masse als zentraler Prädiktor für Herzinsuffizienz bedingte Morbidität und Mortalität [38]. Laut Levy et al. korreliert eine LV-Masse von $>140 \text{ g/m}^2$ mit einem hochsignifikant gesteigerten Mortalitätsrisiko bei Herzinsuffizienzpatienten [38]. Linksventrikuläre Hypertrophie gilt somit als hochrelevanter kardialer Risikofaktor.

Im Vergleich zu der im Folgenden beschriebenen physiologischen Hypertrophie, ist keinerlei Regression des pathologisch hypertrophierten Myokards möglich [66]. Jedoch kann die pathologische Hypertrophie durch gezielte pharmakologische Interventionen in ihrer Progression verlangsamt werden. Die pathologische, maladaptive Hypertrophie des Herzens stellt somit einen irreversiblen Prozess dar. Demzufolge ist es von eminenter sozioökonomischer Bedeutung, möglichst frühzeitig der Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie entgegenzuwirken.

1.2.3 Physiologische kardiale Hypertrophie

Physiologische kardiale Hypertrophie wurde erstmalig im Jahre 1899 von dem schwedischen Arzt Eberhard Henschen beschrieben [67]. Mittels Perkussion stellte Henschen eine Herzvergrößerung bei skandinavischen Skilangläufern fest, welche er als „Sportherz“ betitelte [67]. Die Entdeckung des Sportherzens löste zunächst Bedenken und Skepsis hinsichtlich potentieller gesundheitlicher Risiken aus [68]. Durch eine wegweisende Publikation Herbert Reindells fand die Debatte um das Risikoprofil sportbedingter Herzhypertrophie jedoch im Jahre 1960 ein Ende. Reindell, der damalige Präsident des Deutschen Sportärztesbundes, stellte durch umfangreiche röntgenologische Untersuchungen fest, dass das Sportherz besonders leistungsfähig sei [68,69].

Auf pathophysiologischer Ebene erfolgt die Entwicklung von physiologischer kardialer Hypertrophie als kompensatorische Anpassungsreaktion auf einen erhöhten peripheren Sauerstoffbedarf, welcher beispielsweise unter leistungssportlichen Bedingungen entsteht [70]. Neben intensivem Ausdauersport, induziert Schwangerschaft sowie postnatales Wachstum ebenfalls eine physiologische Größenzunahme des Herzens [71]. Im Vergleich zu anderen Hypertrophieentitäten, überschreitet das kardiale Remodeling im Rahmen

physiologischer Hypertrophie in der Regel nicht das kritische Herzgewicht von 500 g [72]. Rein morphologisch entspricht physiologische kardiale Hypertrophie dem Bild eines exzentrisch hypertrophierten, harmonisch vergrößerten Herzens mit Dilatation aller vier Herzhöhlen [73,74]. Dieses zeichnet sich echokardiographisch durch eine Zunahme der linksventrikulären Wanddicke sowie durch die Erhöhung des linksventrikulären Diameters aus, was eine gesteigerte kardiale Auswurfsleistung und eine Senkung der Herzfrequenz ermöglicht. Durch diese positiv inotrope und negativ chronotrope Wirkung wird die Effektivität des Herzmuskels gesteigert [75]. Physiologische kardiale Hypertrophie hat demzufolge im Vergleich zur pathologischen Hypertrophie einen überwiegend positiven Effekt auf die kardiovaskuläre Gesundheit.

Auf zellulärer Ebene korreliert die physiologische Myokardhypertrophie mit der gleichmäßigen Vergrößerung von Kardiomyozytendicke und Kardiomyozytenlänge [76]. Als Stimulus für das Zustandekommen prohypertropher Wachstumsprozesse im Rahmen physiologischer kardialer Hypertrophie, dient die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Hierbei erscheint die Insulinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion, inklusive der nachgeschalteten PI3K-AKT-mTOR (mammalian target of Rapamycin) Signalkaskade eine entscheidende Rolle zu spielen [77,78]. Laut aktuellem wissenschaftlichen Stand scheint ferner der MAPK-ERK Signalweg bei der Entstehung physiologischer Hypertrophie beteiligt zu sein [79]. Im Vergleich zum Zustand der pathologischen Hypertrophie lässt sich im physiologisch vergrößerten Herzen eine verstärkte Angiogenese feststellen [80]. Darüber hinaus finden bei der physiologischen kardialen Hypertrophie weder fibrotische Umbauprozesse, noch Apoptose von Kardiomyozyten statt [81,82].

Das Herz verbraucht mehr Energie als jedes andere Organ. Wie in 1.2.2 beschrieben, stellt die β -Oxidation freier Fettsäuren die primäre ATP-Quelle zur Energieversorgung des Myokards dar [55,57]. Trotz der Aktivierung diverser intrazellulärer Signalwege und des genannten strukturellen Remodelings, bedient sich das physiologisch hypertrophierte Herz weiterhin der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren als primäres Substrat, um den eigenen Energiebedarf zu decken [51,67]. Darüber hinaus bildet sich die physiologische Herzhypertrophie bei Säugetieren der auslösenden Stimuli, beispielweise bei Trainingsabbruch oder auch postnatal, wieder zurück [83,84]. Die vollständige Reversibilität sowie die konservierte kardiale Auswurfsleistung stellen die wichtigsten Charakteristika

physiologischer Herzhypertrophie dar [40]. Jene Eigenschaften begründen daher, weshalb die physiologische Hypertrophie im Vergleich zur maladaptiven, pathologischen Hypertrophie weder Herzinsuffizienz, noch kardiale Dekompensation induziert. Des Weiteren deuten laut Literatur diverse Studien darauf hin, dass die Manifestation von physiologischer Herzhypertrophie die erhöhte Lebenserwartung von Ausdauersportlern im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erklärt [85,86]. Somit grenzt sich die gesundheitlich eher vorteilhafte physiologische Myokardhypertrophie deutlich von der in 1.2.2 beschriebenen pathologischen Herzmuskelhypertrophie ab (s. Abbildung 2).

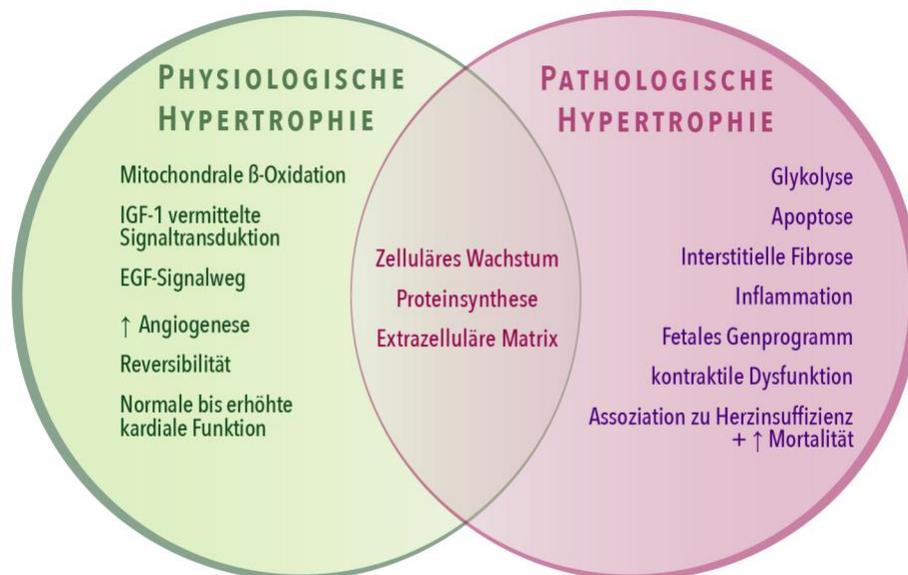


Abbildung 2: Pathophysiologische, funktionale Differenzierung physiologischer von pathologischer kardialer Hypertrophie (basierend auf Dorn, 2007).

1.3 Grundlagen des Lipidstoffwechsels im menschlichen Organismus

Fettstoffwechselstörungen wie Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie oder Hyperlipoproteinämie werden als zentrale Dispositionsfaktoren für die Ausbildung metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen [87]. Die sogenannten „Dyslipidämien“ werden nicht nur mit erhöhter Inflammation, Insulinresistenz und Adipositas assoziiert, sondern korrelieren mit einer deutlich erhöhten Prävalenz für die Ausbildung von

Diabetes Mellitus Typ 2, metabolischem Syndrom, Atherosklerose und Gefäßerkrankungen wie KHK und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) [87–92]. Laut der aktuellen ESC Dyslipidämie Leitlinie wird die Senkung des LDL-Cholesterins als bedeutende bevölkerungsbezogene Präventionsmaßnahme chronisch kardiovaskulärer Erkrankungen hervorgehoben [89]. Ein intakter Fettsäurenstoffwechsel ist daher von enormer medizinischer Relevanz und repräsentiert einen wichtigen Protektionsfaktor gegen diverse kardiovaskuläre Krankheitsbilder.

Bei normalgewichtigen Personen macht das Fettgewebe zwischen 10 und 15 % des Körpergewichtes aus [93]. Obwohl der menschliche Körper einen großen Anteil der lebenswichtigen Fettsäuren endogen synthetisieren kann, stellen Nahrungsfette die wichtigste Quelle der menschlichen Lipidspeicher dar. Nahrungsfette bestehen zu 90 % aus Triacylglycerinen (TAG), welche sich aus Glycerin und langkettigen Fettsäuren zusammensetzen [94]. Im menschlichen Körper sind TAG von enormer Wichtigkeit, da sie die Speicherform von Fettsäuren darstellen. TAG sind demzufolge der größte und effizienteste Energiespeicher des menschlichen Organismus. Obwohl TAG in zahlreichen Körpergeweben präsent sind, sind sie mengenmäßig vor allem im Fettgewebe gespeichert, woraus sie bei Nahrungskarenz rasch mobilisierbar sind [93].

Fettsäuren sind langkettige Monocarbonsäuren mit unverzweigter Kohlenstoffkette, welche wichtige Funktionen im Körper erfüllen. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften sind Fettsäuren nicht wasserlöslich und werden daher im Blut entweder an Serumalbumin oder an sogenannte Lipoproteine gebunden transportiert [94]. Fettsäuren sind nicht nur das Substrat für Energiebereitstellung mittels mitochondrialer β -Oxidation, sondern sie sind maßgeblich an Zellmembranarchitektur und der Synthese intrazellulärer Botenstoffe, wie beispielsweise der Prostaglandine, beteiligt [95]. Je nach Bedarf des Organismus werden Fettsäuren durch einen Prozess namens Lipolyse aus TAG mobilisiert und dem Körper zur β -Oxidation zur Verfügung gestellt [94].

1.4 Fettsäuren im Kontext kardialer Hypertrophie

Das Herz ist ein hochadaptives Organ, was auf diverse physiologische und pathologische Stimuli mit einem bemerkenswerten zellulären Remodeling reagiert [96]. Laut aktuellem wissenschaftlichen Stand können Fettsäuren und Lipide als Signalmoleküle betrachtet

werden, welche eine Inter-Organ-Kommunikation zwischen multiplen Organen wie beispielsweise dem Herzen und der Leber ermöglichen [97,98].

Riquelme et al. stellten sich 2011 die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen bestimmten Fettsäuren und der Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie bestünde [96]. Diese Fragestellung thematisierten sie mithilfe eines Reptilien-Modells, für welches die burmesische Tigerpython (*Python molurus*) herangezogen wurde [96]. Die Tigerpython gilt als exzellentes Modell extremer metabolischer Regulation und physiologischer kardialer Hypertrophie, da sie zwar nur gelegentlich und nach langen Intervallen speist, jedoch nach Nahrungsaufnahme einer exorbitant großen Mahlzeit (ca. 25-65 % der eigenen Körpermasse) eine 40 %ige Zunahme linksventrikulärer Masse präsentiert [99–102]. Diese extreme postprandiale metabolische Anpassungsleistung wird durch eine plötzliche 16-fache Erhöhung des eigenen Sauerstoffbedarfs, einem massiv erhöhten Nährstofftransport sowie einer 4,5-fachen Steigerung der kardialen Auswurfleistung verursacht [101–103]. Dem postprandialen kardialen Remodeling der Tigerpython kommt eine besondere Bedeutung zu, da vergleichbare Säugetier-Modelle deutlich geringere Hypertrophie-Antworten demonstrieren konnten. Belastungsinduzierte physiologische Hypertrophie überschreitet zudem bei Säugetieren meist keine 10-20 %-ige Erhöhung LVM [96,99]. Obwohl die substanziellen kardialen Adaptationsvorgänge der Tigerpython mehrfach beschrieben wurden, blieben die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weitgehend ungeklärt [104].

Riquelme et. al identifizierten frei zirkulierende Fettsäuren, die Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0) sowie Palmitoleinsäure (C16:1), die postprandial im Plasma der Python signifikant erhöht waren. Um einen möglichen Zusammenhang dieser im Plasma gemessenen Fettsäurekonzentrationen mit der Manifestation von physiologischer kardialer Hypertrophie erkennen zu können, wurde das identifizierte Fettsäurenprofil näher untersucht. Hierzu wurden *in-vitro* Experimente mit kultivierten NRVM Kardiomyozyten (Neonatal Rat Ventricular Myocytes) sowie ein *in-vivo* Mausmodell durchgeführt. Sowohl die NRVM Kardiomyozyten als auch die Mäuse des Tierversuches demonstrierten unter Applikation des Fettsäurenmixes aus C14:0, C16:0 und C16:1 erhebliche prohypertrophe kardiale Effekte. Während die NRVM auf die Fettsäurenstimulation mit erheblicher Zunahme der zellulären Größe reagierten, wurde im Mausmodell eine signifikante Erhöhung

linksventrikulärer Masse deutlich. Ferner ließen sich im murinen Myokard keine Anzeichen von kardialer Fibrose oder pathologischer Lipidablagerung feststellen. Auf Genexpressionsebene induzierte die Supplementation des Fettsäurenmixes keinerlei Aktivierung des pathologischen fetalen Genprogrammes. Demzufolge gab es keinen Anhalt für eine mögliche pathologische Komponente der dargestellten kardialen Hypertrophie. Vielmehr implizieren diese Resultate, dass die beobachteten kardialen Wachstumsprozesse der Tigerpython alleinig physiologischer Genese sein könnten[96].

Die von Riquelme et al. publizierten Daten suggerieren somit, dass der im Pythonplasma identifizierte Fettsäurenmix auch im Säugetier als Mediator physiologischer kardialer Hypertrophie wirken könnte [96]. Die beschriebene Kombination aus Myristinsäure, Palmitinsäure und Palmitoleinsäure könnte daher als biologisch aktive, prohypertroph wirkende Lipidspezies betrachtet werden.

1.5 Palmitoleinsäure

Aus dem von Riquelme et al. beschriebenen prohypertroph wirkenden Fettsäuremix kommt der Fettsäure Palmitoleinsäure (C16:1) besondere Bedeutung zu. Im Kontext medizinisch-metabolischer Forschung, wurde die Palmitoleinsäure (C16:1) kürzlich von Cao et al. als Lipokin mit hormonartiger Wirkung charakterisiert, das Insulinsensitivität systemisch moduliert und Hepatosteatosis unterbinden kann [97]. Cao et al. haben somit erstmalig den Begriff des „Lipokins“ etabliert. Ein Lipokin, entspricht laut Cao et al., ähnlich wie ein Adipokin, einem vom Fettgewebe sezerniertem Lipid mit hormonartiger Signalmolekül-Wirkung [97]. Vor jenem Hintergrund stellt sich die Frage nach der Bedeutung von Palmitoleinsäure als potentieller lipokinartiger, prohypertroph wirkender Mediator für die Entstehung von physiologischer kardialer Hypertrophie.

Palmitoleinsäure, chemisch auch bekannt als cis-Hexadec-9-ensäure, ist eine einfach ungesättigte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen. Aufgrund der Doppelbindungs-Lokalisation am 7ten Kohlenstoffatom, zählt Palmitoleinsäure (C16:1n7) zu den Omega-7-Fettsäuren. Im menschlichen Körper existiert sowohl die cis- als auch die trans-Isoform der Palmitoleinsäure [105].

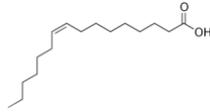


Abbildung 3: Strukturformel von cis-Palmitoleinsäure (C16:1n-7)

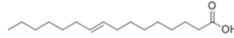


Abbildung 4: Strukturformel von trans-Palmitoleinsäure (C16:1 trans-9)

Palmitoleinsäure ist eine nicht-essentielle Fettsäure, welche dem Körper entweder diätetisch zugeführt wird oder endogen synthetisiert werden kann. Die Rolle von Palmitoleinsäure im menschlichen Organismus wurde erstmalig in den 1960er Jahren beschrieben [106]. Bereits 1962 stellten McLaren et al. im Rahmen einer Kompositionsanalyse des menschlichen Fettgewebes fest, dass die Verteilung von Palmitoleinsäure im adipösen Gewebe je nach Lokalisation differiert [107]. Obwohl Palmitoleinsäure im menschlichen Körper zu den fünf geläufigsten Fettsäuren zählt, entspricht C16:1 lediglich 2,51 % der durch die Nahrung aufgenommenen Fette [108,109]. Das ubiquitär im Serum, in Zellmembranen und Phospholipiden sowie in den meisten Organen des Körpers vorkommende C16:1 entstammt daher hauptsächlich endogener *de novo* Synthese [110]. Die humane C16:1 Biosynthese findet primär in der Leber sowie im Fettgewebe statt [110]. Enzymatisch wird die C16:1 Lipogenese durch die Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) reguliert, einem Schlüsselenzym für die Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren [111]. Die endogene C16:1 Synthese mittels SCD1 produziert ausschließlich die cis-Isoform [110]. Nach abgeschlossener Synthese wird cis-Palmitoleinsäure vor allem in Cholesterolestern, TAG sowie in die Membranphospholipide inkorporiert [110]. Trans-Palmitoleat kann ebenfalls vom Körper gebildet werden, dies geschieht allerdings SCD1-unabhängig [112]. Die Produktion von trans-Palmitoleinsäure ereignet sich durch endogene Verkürzung der diätetisch aufgenommenen trans-Vaccensäure (C18:1t11) [112]. Trans-Palmitoleat wird im Vergleich zu cis-Palmitoleat hauptsächlich exogen über die Nahrung akquiriert und vom Körper in nur äußerst geringen Mengen hergestellt [113]. Wie die meisten Transfette ist trans-Palmitoleat vor allem in industriell hergestellten Lebensmitteln, Frittieröl, sowie in Milchprodukten enthalten [114]. Im Vergleich zu trans-Palmitoleat ist cis-Palmitoleinsäure in nur wenigen

Lebensmitteln zu mehr als 5 % vorhanden [115]. Nahrungsmittel mit einem ausgesprochen hohen C16:1(cis)-Gehalt sind unter anderem Lachs (6 %), Lebertran (7 %) sowie Macadamiaöl (17 %) [116]. Die höchste bekannte C16:1 Konzentration findet sich jedoch mit 32-42 % in der Sanddornbeere [117].

1.5.1 Effekte von Palmitoleinsäure im metabolischen Kontext

Die als Lipokin beschriebene Palmitoleinsäure, welche vom Fettgewebe sezerniert wird, besitzt auto- sowie endokrine Eigenschaften im Körper und übt auf diverse Organe hormonartigen Einfluss aus [110]. Zu diesen zählt insbesondere die Skelettmuskulatur, das Pankreas, die Leber, das kardiovaskuläre System sowie das Fettgewebe. Der von Cao et al. mithilfe eines Mausmodells erstmalig dargestellte Zusammenhang zwischen C16:1 und einer verbesserten systemischen Insulinsensitivität, ließ sich durch mehrere klinische Studien validieren [118,119]. In einer prospektiven Kohortenstudie zeigten Mozaffarian et al. 2011 eine deutlich verringerte Insulinresistenz sowie eine signifikante Reduktion der Diabetes Mellitus Typ 2 Inzidenz bei Probanden mit erhöhten C16:1 Plasmaspiegeln [105]. Ferner wurde auf zellulärer Ebene festgestellt, dass C16:1 eine ausgeprägte Proliferation sowie eine erhöhte Sekretion der Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas bewirkt [120]. Durch diesen Mechanismus lässt sich die durch C16:1 optimierte periphere Insulinsensitivität der quergestreiften Skelettmuskulatur erklären [97].

Im Leberparenchym wirkt C16:1 nachgewiesener Weise antiinflammatorisch und korreliert zudem mit einer verringerten Inzidenz hepatischer Lipidakkumulation und Hepatosteatosis [97,121]. Des Weiteren resultiert die diätetische Supplementation von C16:1 laut Yang et al. in einer deutlichen Reduktion der hepatischen Lipogenese [122]. Jedoch existieren auch Daten, welche C16:1 als negativen Prädiktor für die Manifestation einer nichtalkoholischen Fettleber (NASH) interpretieren [123]. In der 2009 durchgeführten prospektiven Kohortenstudie von Puri et al. wurde ein signifikant erhöhter C16:1 Spiegel in den Blutserumproben NASH-erkrankter Patienten deutlich [124]. Da die Bedeutung von Palmitoleinsäure für die Leberverfettung bzw. das Krankheitsbild der NASH trotz mehrerer Studien derzeit noch kontrovers und unvollständig ist, bedarf dieser Zusammenhang noch weiterer Abklärung.

Darüber hinaus zeigt C16:1 eine günstige Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung des Blutes [125]. Bereits 2003 wurde in einer epidemiologischen Studie von Garg et al. festgestellt, dass der Konsum von Macadamianüssen ein verbessertes Serumlipidprofil bei hypercholesterinämien Patienten bewirkt [126]. Laut Garg et al. führt ein gesteigerter Macadamianusskonsum zu einer Reduktion von LDL- und Gesamtcholesterinwerten sowie zu einer Erhöhung des protektiven HDL-Cholesterins [126]. Interessanterweise gilt jene Beobachtung jedoch lediglich für die cis- und nicht für die trans-Isomere der Palmitoleinsäure. Auch Palmitinsäure (C16:0), eine vollgesättigte, der C16:1 strukturell beinahe identische Fettsäure, zeigt keinerlei positive Auswirkung auf das humane Serumlipidprofil [127]. Tatsächlich scheint C16:0 sich eher ungünstig auf das Lipidmuster des menschlichen Blutes auszuwirken, da eine Assoziation zwischen erhöhten C16:0-Serumspiegeln und der koronaren Herzkrankheit (KHK) besteht [128,129]. Da Palmitoleinsäure nachweislich eine vorteilhafte Modifikation des Serumlipidprofils bewirkt, wurde C16:1 bereits in den USA zur Behandlung des metabolischen Syndroms zugelassen. Summa Summarum ergeben sich immer mehr Evidenzen dafür, dass die durch Lipolyse ins Blut freigesetzte cis-Palmitoleinsäure einen positiven Effekt auf diverse metabolische sowie kardiovaskuläre Krankheitsbilder ausübt [110]. Ferner implizieren die bereits publizierten Daten, dass C16:1 vermutlich sogar als direkter molekularer Signalvermittler im Körper agieren könnte (s. Abbildung 5).

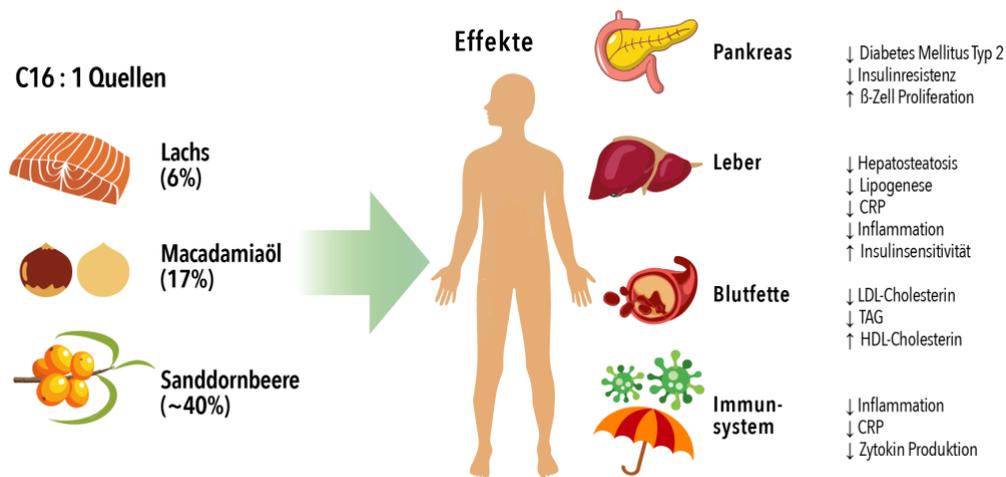


Abbildung 5: Nahrungsmittelquellen von C16:1 sowie C16:1-vermittelte vorteilhafte Auswirkungen im menschlichen Organismus

1.5.2 Palmitoleinsäure im Kontext physiologischer kardialer Hypertrophie

Um den molekularen Mechanismus der in 1.4 beschriebenen Fettsäure-induzierten PCH näher erfassen zu können, führte unsere Arbeitsgruppe (Foryst-Ludwig et al.) weiterführende Experimente durch. Mittels cre/loxP-Technologie wurden ATGL-Knockout Mäuse generiert, welche eine für das weiße Fettgewebe (at) spezifische, defekte Lipolyse aufwiesen (atATGL-KO Mäuse) [130]. Die Lipolyse des Fettgewebes wird maßgeblich durch die enzymatische Aktivität dreier Lipasen reguliert [93]. Da die ATGL den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt der Lipolyse katalysiert, führt eine Inhibition dieses Enzyms zu einer stark verminderten lipolytischen Fettsäure-Freisetzung ins Serum. Im Rahmen eines atATGL-Knockouts sollte demzufolge eine deutliche Reduktion frei zirkulierender Fettsäuren konstatiert werden[131].

In der Arbeit von Foryst-Ludwig et al. wurden atATGL-defiziente Mäuse gemeinsam mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe (wt) einem täglichen Ausdauerlauftraining exponiert. Dieses sollte als Stimulus für die Entwicklung einer adaptiven physiologischen kardialen Hypertrophie dienen. Aufgrund der Inhibition des ATGL-Enzyms war die trainingsinduzierte Lipolyse der Knockout-Tiere eminent gestört, welches sich anhand einer signifikant reduzierten Fettsäure-Freisetzung im Serum der Knockout-Mäuse verdeutlichte. Hingegen demonstrierten die Wildtypmäuse einen starken Anstieg frei zirkulierender Fettsäuren nach Beendigung des Laufbandtrainings. Nach abgeschlossenem 7-wöchigen Ausdauertraining wurden die Tiere beider Gruppen echokardiographisch untersucht. Die wt-Tiere, welche Ausdauertraining absolvierten, zeigten einen signifikanten Anstieg linksventrikulärer Masse, welche morphologisch einer belastungsinduzierten physiologischen Hypertrophie entsprach. Jene kardiale Veränderung konnte jedoch nicht bei den atATGL-KO Tieren beobachtet werden. Hieraus ließ sich schließen, dass die belastungsinduzierte Fettsäuren-Mobilisation aus dem weißen Fettgewebe womöglich einen erheblichen Einfluss auf das Zustandekommen physiologischer Hypertrophie einnimmt. In histologischen Untersuchungen wurde ferner deutlich, dass die kardiale linksventrikuläre Hypertrophie der wt-Mäuse weder mit Fibroseentwicklung noch mit inflammatorischen Prozessen korrelierte, weshalb eine pathologische Genese der Hypertrophie unwahrscheinlich erschien[131].

Um zu identifizieren, welche Fettsäure letztendlich als prohypertroph wirkender Schlüsselmediator des beobachteten kardialen Remodelings einzuschätzen ist, wurden die

Serumlipidprofile der Versuchstiere genauer betrachtet. Es wurde nach einer Fettsäure gesucht, welche im Plasma der wt-Tiere, jedoch nicht in dem der atATGL-KO Tiere signifikant gesteigert war. Interessanterweise erschien in diesem Kontext lediglich C16:1 plausibel. Um die prohypertrophe Wirkung von C16:1 zu verifizieren, wurden die atATGL-KO Tiere in einem zweiten Versuch im Laufe des Ausdauertrainings mit C16:1 supplementiert. Die C16:1 Applikation resultierte interessanterweise darin, dass die atATGL-KO Tiere analog zu den wt-Tieren eine hypertrophe Antwort des Herzmuskels auf die sportliche Belastung hin präsentierten. Folglich konnte angenommen werden, dass frei zirkulierendes C16:1 womöglich eine herausragende Rolle bei der Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie einnimmt (s. Abbildung 6) [131].

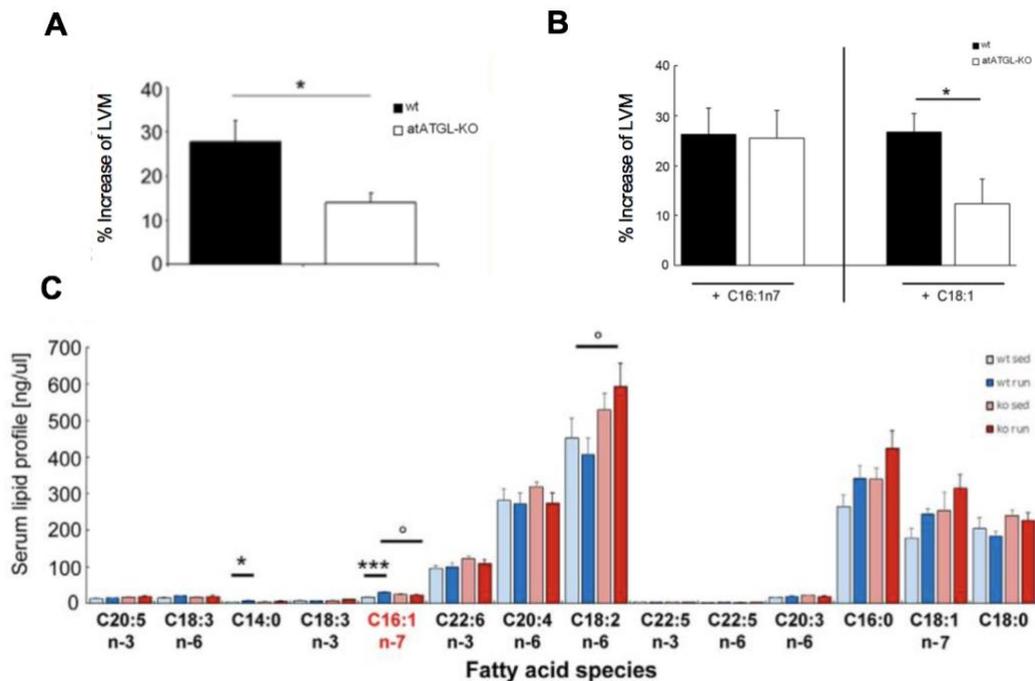


Abbildung 6: Hinweise auf C16:1 als Mediator belastungsinduzierter kardialer Hypertrophie (bereits publizierte in-vivo Daten von Foryst-Ludwig et al.)

A Belastungsinduzierte kardiale Hypertrophie der wt-Mäuse anhand prozentualer Zunahme LVM. * $p < 0,05$ wt versus atATGL-KO Mäuse ($n = 9$; unpaired t-test). **B** C16:1n7 Supplementation in vivo. Kardiale Adaptation von wt/atATGL-KO Mäusen, die während der Ausdauertrainingsperiode mit C16:1n7 oder C18:1 supplementiert wurden. Die kardialen Adaptationsvorgänge werden verdeutlicht anhand prozentualer Zunahme LVM ($n=4-5$; * $p < 0,05$ atATGL-KO versus wt, unpaired t-test). **C** Serumlipid-Analysen von wt/atATGL-KO Mäusen, welche Ausdauertraining absolvierten (run) im Vergleich zu den sitzenden Kontrollgruppen (sed). *** $p < 0,001$ C16:1n7 wt (run) versus wt (sed) ($n=5$). Analysiert mittels rapid resolution HPLC/tandem MS.

Der prohypertrophe Effekt von C16:1 wurde mithilfe eines *in-vitro* Modells auf zellulärer Ebene bestätigt. Hierzu verwendeten Foryst-Ludwig et al. die murine HL-1 Kardiomyozyten Zelllinie. Die HL-1 Kardiomyozyten wurden mit dem von Riquelme et al. beschriebenen Fettsäuremix (FFA) aus C14:0, C16:0 und C16:1 stimuliert [96]. Analysiert wurde hierbei zelluläre Hypertrophie, indem die Fläche der Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wurde. Deutlich wurde, dass die Fettsäuremischung eine zelluläre Hypertrophie der HL-1 Kardiomyozyten herbeiführte. Interessanterweise resultierte ein Mangel von C16:1 in dem Fettsäuregemisch in einem Ausbleiben der beobachteten prohypertropen Effekte. Dies validierte die Annahme, dass C16:1 womöglich als Mediator PCH betrachtet werden könnte [131]. Um zwischen pathologischer und physiologischer Ätiologie der C16:1-induzierten zellulären Hypertrophie differenzieren zu können, wurden die HL-1 Kardiomyozyten mit C16:1 sowie mit Endothelin-1 (Et-1) stimuliert. Ausgewertet wurde in diesem Versuchsansatz die Expression pathologischer Hypertrophiemarker, welche dem fetalen Genprogramm zugehörig sind (s. Abbildung 7). Et-1 diente in diesem Kontext als Positivkontrolle für die Induktion pathologischer Hypertrophie. Die Behandlung mit Et-1 induzierte auf Genexpressionsebene eine signifikant gesteigerte Expression der pathologischen Hypertrophiemarker ANF und β -MHCH. Hingegen konnte keinerlei Hochregulation von ANF und β -MHCH durch C16:1 Stimulation in den HL-1 Zellen hervorgerufen werden. Die fehlende Aktivierung des fetalen Genprogrammes durch C16:1 suggeriert daher, dass die C16:1-induzierte HL-1-Zell-Hypertrophie einem physiologischen Entstehungs-mechanismus zuzuordnen ist (s. Abbildung 7) [131].

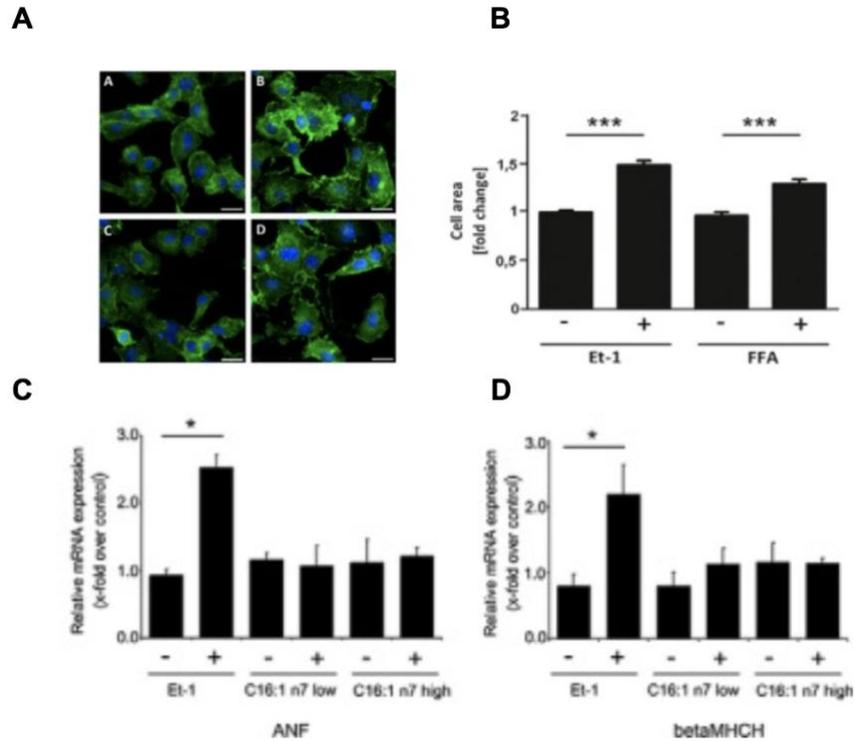


Abbildung 7: Hypertrophe Effekte des Fettsäuremixes (FFA) und Untersuchung des fetalen Genprogrammes in HL-1 Kardiomyozyten (bereits publizierte Daten Foryst-Ludwig et al.)

A Hypertrophe Antwort muriner HL-1 Kardiomyozyten auf FFA; repräsentative Immunfluoreszenz Bilder von HL-1 Zellen, welche 6h lang mit 100 nm Endotheli-1 (Et-1) (B), Fettsäuremix (FFA= C14:0, C16:0, C16:1) (D) oder Vehikelkontrolle (A,C) behandelt wurden. **B** Die Fläche der Zellen wurde mittels BZ-II Analyzer Software und Dynamic Cell Count Tool (Keyence) berechnet. Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur Vehikelkontrolle; *** $p < 0.001$ vs. Kontrolle, one-way ANOVA (Bonferroni post-test) oder unpaired t-test. **C,D** qRT-PCR Analyse des fetalen Genprogrammes anhand ANF und β -MHCH Expression. HL-1 Zellen wurden 6h lang mit 100 nm Et-1, C16:1n7 low/high sowie den zugehörigen Vehikelkontrollen behandelt. ANF, Atrial Natriuretic Factor; β -MHCH, β -cardiac Myosin Heavy Chain Isogene. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle (n=3; one-way ANOVA, Bonferroni post-test).

Nachdem evaluiert wurde, welcher Genese die C16:1 bedingten zellulären Wachstumsprozesse zuzuordnen sind, sollten die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen näher analysiert werden. Die Proteinkinase AKT ist laut Literatur als molekulare Grundlage der PCH bekannt [132]. Laut DeBosch et al. aktivieren physiologische kardiale Wachstumstimuli stets die Proteinkinase AKT mittels Phosphorylierung, weshalb die AKT-Kinase für unsere Arbeitsgruppe zum Gegenstand weiterer Untersuchungen wurde [132]. Hierzu wurden weitere *in-vitro* Versuche durchgeführt, in denen HL-1 Zellen sowie primäre humane Kardiomyozyten mit C16:1 stimuliert wurden, um daraufhin proteinbiochemische Untersuchungen von AKT durchzuführen. Nach kurzfristiger 30-

minütiger C16:1 Applikation wurde sowohl in den HL-1 Zellen als auch in den humanen Kardiomyozyten eine signifikante Hochregulation des Phosphorylierungsstatus von AKT deutlich (s. Abbildung 8). Diese Beobachtung ist ein erster Hinweis auf die molekulare Wirkweise der C16:1 vermittelten physiologischen Hypertrophie und suggeriert darüber hinaus, dass diese womöglich AKT-abhängig abläuft[131].

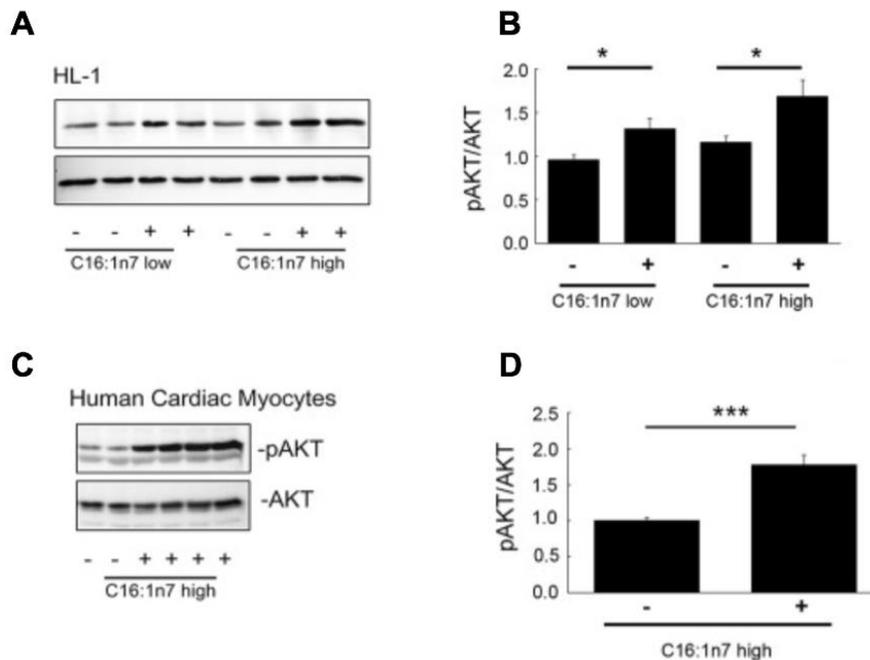


Abbildung 8: Western Blot Analysen von p-AKT (bereits publizierte Daten Foryst-Ludwig et al.)

A WB Analyse von p-AKT sowie AKT als Proteinladungskontrolle. HL-1 Kardiomyozyten wurden 30 min lang mit C16:1n7 stimuliert. **C** WB Analyse von p-AKT und AKT. Primäre humane Kardiomyozyten wurden 30 min lang mit C16:1n7 stimuliert. **B,D** Densitometrische Analysen der in A,C dargestellten WB mittels Image J Software. n=3-4, * p < 0.05 vs. Kontrolle; *** p < 0.01 vs. Kontrolle, unpaired t-test.

Um die Ergebnisse von Foryst-Ludwig et al. auf den menschlichen Organismus translatieren zu können, wurden in Kooperation mit der Abteilung für Sportmedizin der Charité 25 männliche Ausdauerathleten der deutschen Biathlon-Nationalmannschaft untersucht. Das Lebensalter der untersuchten Kohorte betrug 18 bis 28 Jahre. Es wurden sowohl Nüchtern-Serumlipidanalysen als auch echokardiographische bildgebende Untersuchungen der Biathlonathleten durchgeführt. Die Ausdauersportler präsentierten bildmorphologisch allesamt das echokardiographische Korrelat einer linksventrikulären Hypertrophie mit erhöhter linksventrikulärer Masse (LVM), einer erhöhten diastolischen interventrikulären

Septumdicke (IVSd) und einem erhöhten linksventrikulären Diameter (PWd). Aufgrund der extensiven hämodynamischen Belastung im Rahmen des getätigten Ausdauersportes und dem jungen Alter der Probanden, konnte davon ausgegangen werden, dass die kardiale Hypertrophie der Athleten einer physiologischen Genese entsprach. Bemerkenswerterweise ließ sich neben der beobachteten physiologischen Hypertrophie der Probanden eine potentielle Interaktion zwischen den gemessenen C16:1 Serumkonzentrationen der Athleten und den echokardiographischen Bildern erkennen. In diesem Kontext wurde eine positive Korrelation zwischen dem C16:1 Serumspiegel und der linksventrikulären Masse deutlich. Diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Demgegenüber konnte jedoch ein hochsignifikanter linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen C16:1 Serumkonzentration und der echokardiographischen interventrikulären Septumdicke (IVSd) der Hochleistungssportler konstatiert werden ($p\text{-value}=0.0089$). Dies impliziert, dass womöglich ein Zusammenhang zwischen der Manifestation physiologischer sportinduzierter kardialer Hypertrophie und erhöhten C16:1 Serumlipidwerten beim Menschen besteht. Anhand dieser Daten kann angenommen werden, dass C16:1 vermutlich nicht nur im murinen Organismus, sondern ebenfalls im menschlichen Körper von enormer Bedeutung für die Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie sein könnte [131].

1.6 Der IGF-1 Signalweg

Nachdem die hochsignifikante C16:1-vermittelte Phosphorylierung der AKT Kinase von unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden konnte (vgl. Abschnitt 1.5.2), ergibt sich die Frage nach dem genauen molekularen Wirkmechanismus der C16:1 vermittelten prohypertrophen Effekte. In diesem Kontext erscheint der IGF-1 Rezeptor vermittelte Signalweg höchst relevant.

Der Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), auch Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 genannt, ist ein humaner Wachstumsfaktor, der eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zu dem Peptidhormon Insulin besitzt [93]. Der anabol wirkende Wachstumsfaktor IGF-1 wird im menschlichen Körper primär in der Leber sowie im Fettgewebe gebildet [133]. Die Ausschüttung von IGF-1 wird beispielsweise durch körperliches Training oder Ausdauersport stimuliert [134]. Durch die Bindung von IGF-1 an seinen spezifischen Tyrosinkinase-Rezeptor wird eine für sämtliche Wachstumsprozesse des Körpers

essentielle, intrazelluläre Signalkaskade aktiviert [93]. Laut aktuellem Wissenschaftsstand ist die IGF-1 vermittelte Signaltransduktion nicht nur zentral für das Zustandekommen anaboler Wachstumsprozesse, sondern ebenfalls für die Aufrechterhaltung myokardialer Funktionalität verantwortlich [135]. Die IGF-1 Signalkaskade ist der wichtigste Mediator von postnatalem, zellulären Wachstum und ist daher vor allem für die Manifestation physiologischer kardialer Hypertrophie ausschlaggebend [26,77,78]. Zudem ist der IGF-1 Signalweg am Herzen in diverse weitere komplexe Regulationsmechanismen involviert, wie beispielsweise der Differenzierung von Kardiomyozyten, der Vermittlung anti-apoptotischer Effekte sowie der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels [136]. IGF-1 entfaltet seine molekulare Wirkung über die Aktivierung der PI3K-AKT Signalkaskade, welche im Folgenden näher beschrieben wird.

1.6.1 Die PI3K-AKT Signaltransduktion

Die Signaltransduktion, die Weiterleitung von extrazellulären Signalen über die Zellmembran in das Innere der Zelle, erfolgt durch Bindung eines Liganden an einen membranständigen Rezeptor [93]. IGF-1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu dem Insulinrezeptor (IGF-1-R), einem Transmembranrezeptor, welcher eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne an dessen β -Untereinheit aufweist [93]. Nach IGF-1-Ligandenbindung und darauffolgender Konformationsänderung des Rezeptors, erfolgt die Autophosphorylierung der β -Untereinheit des IGF-1-R sowie die Tyrosinkinasen-abhängige Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates 1 (IRS-1) [93]. Das IRS-1 ist ein Adapterprotein, welches eine nachgeschaltete intrazelluläre Signalkaskade aktiviert und somit eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung der IGF-1 vermittelten Signaltransduktion einnimmt [93,137]. Das phosphorylierte IRS-1 aktiviert die katalytische Untereinheit der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [93,138]. Die PI3K wird daraufhin zur Plasmamembran rekrutiert, wo sie das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) konvertiert [26,93,139]. Das modifizierte Membranphospholipid PIP_3 kann daraufhin die Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase B (oder auch AKT genannt) mittels Transphosphorylierung aktivieren [93].

1.6.1.1 Die Proteinkinase AKT

Die Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase AKT ist für die Protein-Homöostase sowie für die Vermittlung zellulärer Wachstumsprozesse von zentraler Bedeutung. Über eine Kaskade von Proteinmodifikationen stimuliert die AKT-Kinase Proteinbiosynthese und Hypertrophieentstehung, während Proteindegradation, Atrophie und Apoptose unterbunden werden [138]. Indem die AKT-Kinase das Gleichgewicht zwischen Proteinbiosynthese und Proteolyse zugunsten der Synthese verschiebt, werden Wachstumsvorgänge und Hypertrophieentstehung begünstigt [140–142]. Mittels Serin-/ Threonin-Phosphorylierungen ist die AKT-Proteinkinase in der Lage, diverse zytoplasmatische sowie nukleär lokalisierte, weiter Downstream gelegene Substrate zu regulieren [139]. Hierzu zählen die Proteine der FOXO-Transkriptionsfaktoren, das mammalian Target of Rapamycin 1 (mTOR) sowie die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) [143,144]. Im Kontext kardialer Wachstumsprozesse, kommt vor allem der AKT-vermittelten mTOR-Aktivierung eine besondere Bedeutung zu [145–148]. Die Proteinkinase AKT stellt den Hauptregulator des PI3K-AKT-Signalweges dar und kann somit als zentraler Mediator zellulären Wachstums betrachtet werden (s. Abbildung 9). Die Lebensdauer der aktivierten phosphorylierten AKT-Kinase in Kardiomyozyten beträgt laut Literatur bis zu zwei Stunden [40]. Die AKT-vermittelte Signalübertragung wird letztendlich durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A) terminiert, welche AKT dephosphoryliert und somit inaktiviert [143,149].

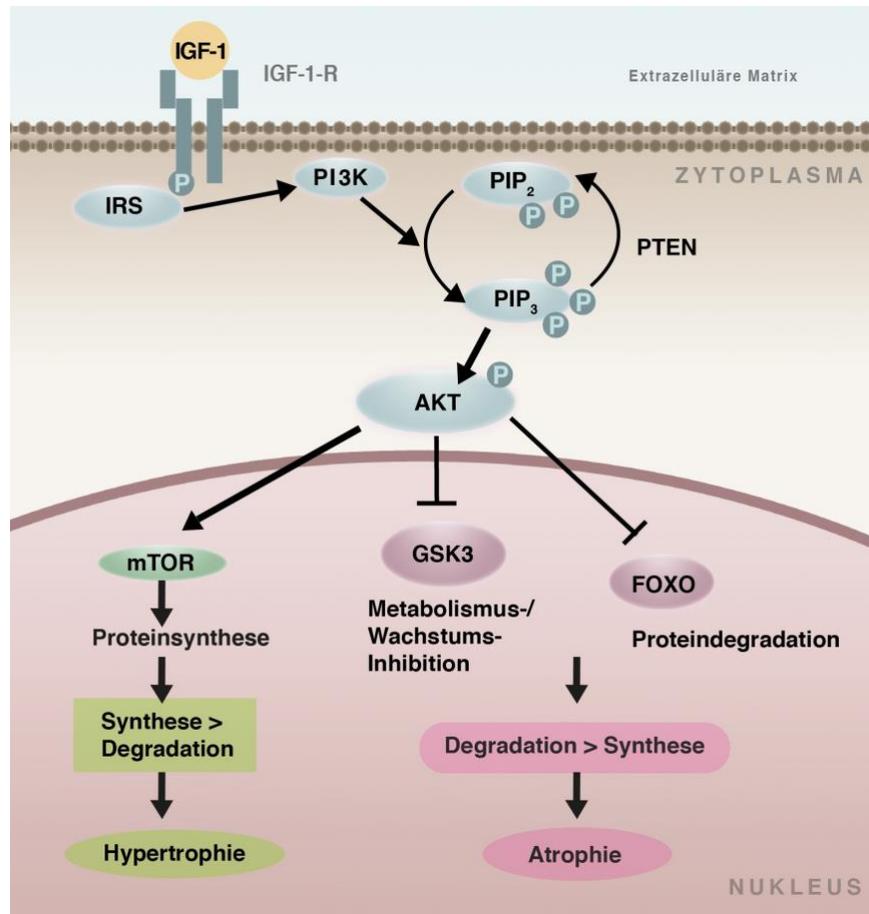


Abbildung 9: Die IGF-1-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion im Hinblick auf zelluläre Hypertrophie- und Atrophiemechanismen.

1.6.2 Die FOXO-Transkriptionsfaktoren

Die „Forkhead-Box-Proteine“ der Subgruppe O (FOXO) gehören zur Familie der Fox-Transkriptionsfaktoren, welche ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommen und sich durch eine charakteristische DNA-Bindungsdomäne, die auch als „Forkhead Box“ bezeichnet wird, auszeichnen [150–152]. Erstmals beschrieben wurden die FOXO-Transkriptionsfaktoren (früher auch FoxO genannt) im Jahre 1989 von Weigel et al. im Rahmen der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* [153]. FOXO-Transkriptionsfaktoren spielen eine bedeutende Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Proteindegradation, Atrophieentstehung und Apoptose [154]. Zudem ist FOXO in diverse weitere molekularbiologische Vorgänge wie Zellzykluskontrolle, Proliferation, Tumorsuppression sowie Schutz vor oxidativem Stress involviert [155–157]. Im Menschen

sind bisher 4 verschiedene humane FOXO-Transkriptionsfaktoren identifiziert worden: FOXO1, FOXO3a, FOXO4 sowie FOXO6 [158,159]. FOXO-Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Genexpression diverser proatrophisch sowie proapoptotisch wirkender Zielgene. Zu den prominentesten FOXO-Zielgenen zählt der apoptotisch wirkende Fas-Ligand, die Zellzyklus-regulierenden CDK-Inhibitoren p21 und p27 sowie die E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen Muscle RING Finger 1 (MuRF1) und Atrogin-1 (MAFbx) [154,160]. MuRF1 und Atrogin-1 zählen zu den sogenannten „Atrogenen“, die Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) herbeiführen und somit kardiale Atrophieentstehung regulieren [161,162]. Im transkriptionell aktiven Zustand antagonisieren FOXO-Proteine die PI3K-AKT vermittelten zellulären Wachstumseffekte [163]. Da FOXO-Transkriptionsfaktoren intrazelluläre, wachstumshemmende Signale auf Genexpressionsebene übertragen, repräsentiert FOXO den zentralen Gegenspieler der prohypertroph wirkenden AKT-Kinase [158,164].

1.6.2.1 Posttranslationale Regulation der FOXO-Transkriptionsfaktoren

FOXO-Proteine werden durch verschiedene posttranslationale Modifikationen (PTM) reguliert [143]. Hierzu zählen strukturelle Proteinveränderungen durch Phosphorylierung, Acetylierung sowie Ubiquitinierung [165]. Durch diese posttranslationalen Strukturveränderungen wird die transkriptionelle Aktivität bzw. die DNA-Bindungsaffinität der FOXO-Transkriptionsfaktoren modifiziert [155]. Da Phosphorylierung die wichtigste PTM der FOXO-Proteine darstellt, soll diese im Folgenden genauer betrachtet werden. Der Phosphorylierungsstatus der FOXO-Transkriptionsfaktoren spielt eine bedeutende Rolle für die Genexpression der von FOXO kontrollierten Zielgene [157]. Die Phosphorylierung von FOXO wird maßgeblich durch den extrazellulären Wachstumsfaktor IGF-1 sowie den PI3K-AKT Signalweg gesteuert [166]. In Anwesenheit von IGF-1 wird FOXO direkt von der Proteinkinase AKT an einem Threoninrest sowie zwei Serinresten phosphoryliert [166–168]. Diese regulatorischen Phosphorylierungsstellen determinieren je nach Phosphorylierungsmuster die subzelluläre Lokalisation der FOXO-Transkriptionsfaktoren [169]. Während sich dephosphoryliertes FOXO im Zellkern befindet und seine volle transkriptionelle Aktivität besitzt, führt die AKT-vermittelte Phosphorylierung zu einer Translokation von FOXO aus dem Nukleus heraus in das Zytosol der Zelle [158,170]. Der

zytosolische Export von FOXO bewirkt die transkriptionelle Inaktivierung der FOXO-Proteine sowie deren Abbau über das Proteasom der Zelle [167]. Der Transport der FOXO-Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern heraus wird auch als „FOXO Shuttling“ bezeichnet [166,171]. Sowohl die transkriptionelle Inaktivierung, als auch das zytosolische Shuttling von FOXO werden durch das Protein 14-3-3 reguliert [171–173]. Die AKT-vermittelte Phosphorylierung von FOXO ermöglicht dem nukleären Protein 14-3-3 an FOXO zu binden, was eine essentielle Konformationsänderung des FOXO-Proteins bewirkt [172,174]. Diese Konformationsänderung inhibiert letztendlich das DNA-Bindungspotential der FOXO-Transkriptionsfaktoren und bewirkt zudem eine Interaktion von FOXO mit Exportin/ Crm1, was den zytosolischen Transport von FOXO verursacht (s. Abbildung 10) [168,174,175]. Die Phosphorylierung bzw. Inaktivierung der FOXO-Proteine spielt eine wichtige molekularbiologische Rolle bei der Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie [176,177]. Jedoch bleibt die Bedeutung der FOXO-Transkriptionsfaktoren im Kontext der C16:1-vermittelten physiologischen kardialen Hypertrophie bisher unerforscht und bedarf daher weiterer Klärung.

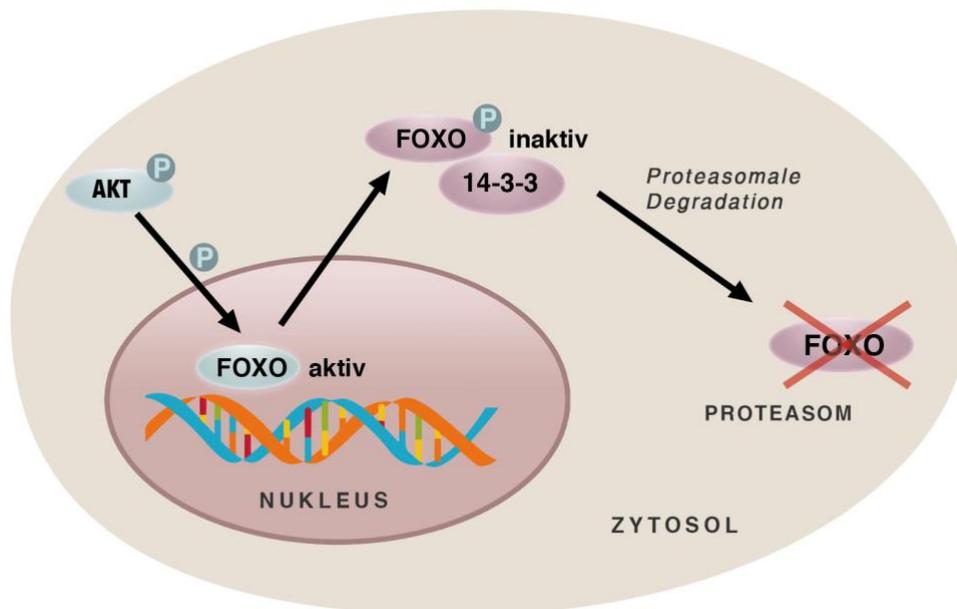


Abbildung 10: Mechanismus der AKT-vermittelten subzellulären FOXO Translokation im Hinblick auf die transkriptionelle Aktivität der FOXO-Transkriptionsfaktoren

1.7 Der MAPK-ERK Signalweg

Neben der Aktivierung des PI3K-AKT Signalweges, initiiert die Ligandenbindung des Wachstumsfaktors IGF-1 an den spezifischen IGF-1-R eine weitere wichtige intrazelluläre Signalkaskade [178]. Hierbei handelt es sich um die Aktivierung der Mitogen-activated-Proteinkinase (MAPK) sowie des MAP-Kinasen nachgeschalteten Signalweges, welcher normalerweise durch den Wachstumsfaktor EGF initiiert wird [179–181]. Die MAP-Kinasen rat sarcoma (RAS) / rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF) / mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) sowie die bisher am besten erforschte MAP-Kinase ERK (extracellular-signal regulated kinase) sind bedeutsame Regulatoren von Zellproliferation, Zellwachstum und Zelldifferenzierung [182,183]. Die Serin/Threonin-spezifischen MAPK ERK 1 und 2 stellen die zentrale Komponente der MAPK-Phosphorylierungskaskade dar und determinieren, je nach Phosphorylierungsgrad, die Aktivierung diverser Zellzyklus regulierender Transkriptionsfaktoren [184]. Im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand transloziert p-ERK 1/2 in den Nukleus und bewirkt Zellzyklus-Progression bzw. Proliferation, indem die Transition von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus ermöglicht wird [183,185–188]. Demgegenüber resultiert die Inaktivierung von ERK 1/2 mittels Desphosphorylierung in einer signifikanten Inhibition von Zellproliferation [187,189]. Der proliferationsfördernde Effekt von ERK 1/2 beruht einerseits auf der gesteigerten Expression von Cyclin D1 und den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4, CDK6), welche maßgeblich für das Voranschreiten des Zellzyklus verantwortlich sind [190,191]. Andererseits bewirkt die Aktivierung von ERK 1/2 eine Herunterregulation antiproliferativer Gene wie beispielsweise die der CDK-Inhibitoren p27^{kip1} oder p21^{cip1} [189,192,193]. Neben der Co-Aktivierung des PI3K-AKT und des MAPK-ERK Signalweges durch denselben extrazellulären Wachstumsfaktor (IGF-1), gibt es weitere Schnittstellen zwischen den beiden Signalkaskaden (s. Abbildung 11). Zum einen bestehen synergistische, wachstumsfördernde Effekte zwischen den beiden Signalwegen, zum anderen wurde kürzlich gezeigt, dass eine direkte molekularbiologische Interaktion zwischen den beiden Pathways existiert [194].

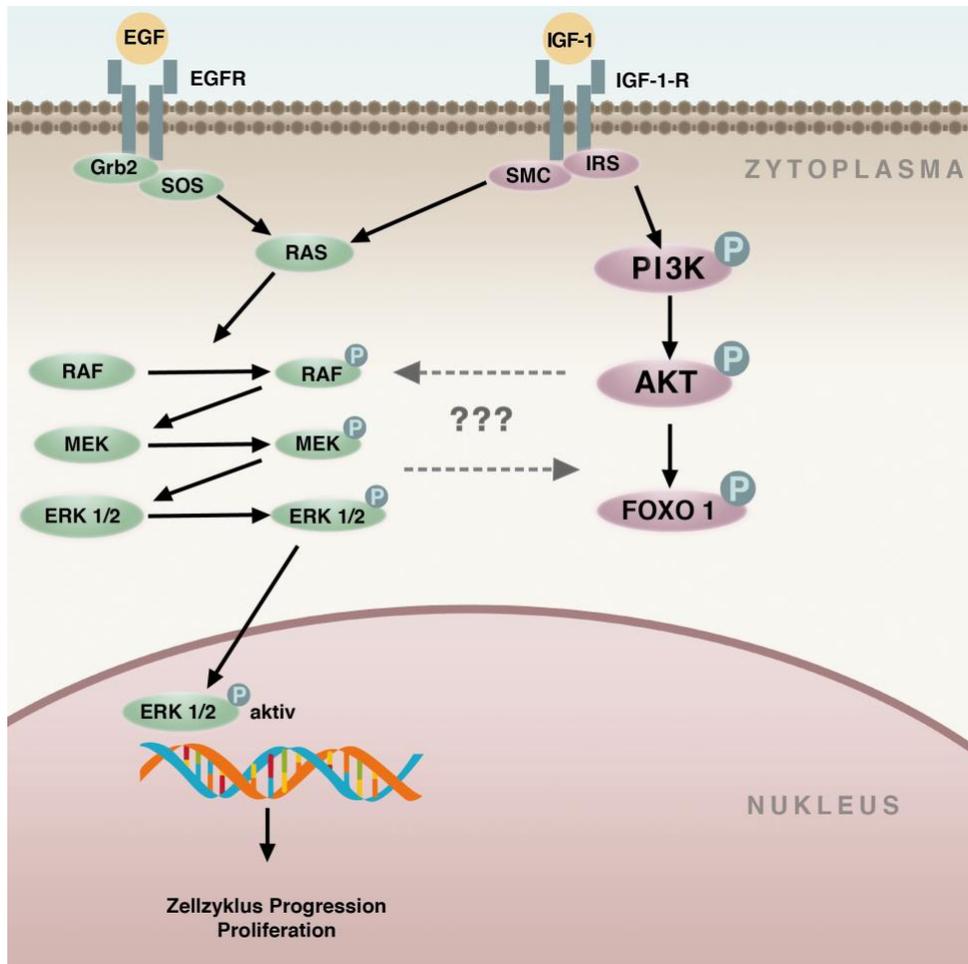


Abbildung 11: Funktionale Co-Aktivierung des MAPK-ERK sowie des IGF-1 Signalweges durch extrazelluläre Ligandenbindung.

2 Zielsetzung

Bereits im Jahre 2011 wurde der Stellenwert des Lipidstoffwechsels bei der Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie (PCH) in einer tierexperimentellen Studie von Riquelme et al. erstmalig untersucht [96]. Hierbei wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer bestimmten Plasma-Fettsäurenkomposition und der relevanten Vergrößerung linksventrikulärer Masse (LVM) deutlich [96]. Hierauf aufbauend konnte unsere Arbeitsgruppe tierexperimentell als auch anhand eines humanen Patientenkollektivs, die Fettsäure C16:1 als wichtigen Mediator physiologischer kardialer Hypertrophie charakterisieren. Die pro-hypertrophen Effekte von C16:1 ließen sich darüber hinaus mithilfe eines *in-vitro* Modells an HL-1- sowie an humanen Kardiomyozyten bestätigen. Ferner zeigte sich eine signifikante C16:1-vermittelte Regulation der Proteinkinase AKT, was als erster Hinweis auf den molekularen Wirkmechanismus der C16:1-induzierten kardialen Wachstumsprozesse verstanden werden könnte [131]. Um die C16:1-vermittelte PCH besser verstehen zu können, müssen genauere molekulare Einblicke in den Wirkmechanismus von C16:1 erlangt werden, insbesondere in Hinblick auf weitere mit PI3K-AKT assoziierte Effektorproteine.

Vor dem epidemiologischen Hintergrund weiterhin hoher Morbiditäts- und Mortalitätszahlen kardiovaskulärer Erkrankungen, erscheint die Entschlüsselung des C16:1-Wirkmechanismus daher zentral, um das potentiell vielversprechende therapeutische Potential dieser Fettsäure sinnvoll nutzen zu können.

Die konkrete Zielsetzung dieser Arbeit ist daher die *in-vitro* Untersuchung des C16:1-Wirkmechanismus, um folgende Fragen genauer aufklären zu können:

1. Bewirkt C16:1 eine funktionale Interaktion zwischen der Proteinkinase AKT und den FOXO-Transkriptionsfaktoren und inwieweit regulieren diese PCH?
2. Welche Isoformen von FOXO werden durch C16:1 reguliert und welchen Einfluss hat C16:1 auf die subzelluläre Lokalisation von FOXO?
3. Reguliert C16:1 das Genexpressionsprofil von FOXO-Zielgenen?
4. Inwieweit ist die MAPK ERK 1/2 am Wirkmechanismus von C16:1 beteiligt?
5. Bestehen Unterschiede zwischen den molekularen Wirkweisen von C16:1 und IGF-1 sowie zwischen C16:1 und der strukturell beinahe identischen Fettsäure C16:0?

3 Material

3.1 Verwendete Geräte

Analysewaage Alt 220-5DAM	Kern (Balingen, D)
Badthermostat Lauda Alpha A6	Lauda (Lauda, D)
Curix 60 Processor	AGFA (Köln, D)
Eisschrank Comfort o Frost	Liebherr (Biberach, D)
Elektrophorese Spannungsversorgung: Power Pac 300	Bio-Rad (München, D)
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE (Neu-Isenburg, D)
Galaxy Mini Tischzentrifuge	VWR (Radnor, USA)
Homogenisator Sonopuls	Bandelin (Berlin, D)
Inkubator Heracell™ 150	Thermo Scientific (Hamburg, D)
Laminar Airflow Clean Bench (Holten)	Thermo Scientific (Hamburg, D)
Laborabzug 2-453-DXNO	Köttermann (Uetze/Hänigsen, D)
Magnetrührer MST basic C	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Multipipette® Stream	Eppendorf (Hamburg, D)
Kamera CFI60	Nikon (Tokyo, Japan)
Mikroskop	Olympus (Hamburg, D)
Nanodrop® ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab (Erlangen, D)
Neo Accupette 3-9905	neoLab Migge Laborbedarf (Heidelberg, D)
pH-Meter pH211	Hanna Instruments (Kehl am Rhein, D)
Promax 120 Schüttler	Heidolph Instruments, (Schwabach, D)
PTC-200 Thermocycler	Bio-Rad (München, D)
Real-time PCR-System Mx3000P	Stratagene (La Jolla, USA)
Scale BL 150 S	Sartorius Ag (Göttingen, D)

Schlauchpumpe Reglo	IDEX Health & Science GmbH (Wertheim, D)
Sonowasserbad	Bandelin (Berlin, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex-Genie® 2T	Scientiis (Baltimore, US)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach, D)
Western Blot Equipment (Elektrophorese, Blot Kammer)	Bio-Rad (München, D)
xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer	Bio-Rad (München, D)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich (Hanau, D)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich (Hanau, D)

3.2 Labormaterialien

96-well PCR-Platen	Bio-Rad (München, D)
96-well Platte	Corning (New York, USA)
Amersham hybond PVDF (0,45 µm)	GE Healthcare (Solingen, D)
Amersham hyperfilm ECL	GE Healthcare (Solingen, D)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning (New York, USA)
Cell Scraper	Sarstedt AG (Nürmbrecht, D)
Cryo Tubes	Nunc (Roskilde, DK)
Descosept®	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)
Deckgläser 12 mm	NeoLab Migge GmbH (Heidelberg, D)
Falcons, Pipetten, Pipettenspitzen	BD, Sarstedt, Eppendorf, VWR, Falcon
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Hamburg, D)
Objekträger	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen, D)
Parafilm® M Barrier Film	SPI supplies (Glasgow, UK)
RNaseZap™	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Rotilabo® Spritzenfilter	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Spritzen	B. Braun Melsungen (Melsungen, D)
Kanülen	B. Braun Melsungen (Melsungen, D)

Whatmanpapier

Whatman plc (München, D)

3.3 Lösungen, Medien, Kits

BCA Protein Assay Reagenz

Thermo Scientific (Langenselbold, D)

Claycomb Medium

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Fetal Bovine Serum (FBS) (#12J100)

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

G153A+B Entwickler

AGFA (Köln, D)

G354 Rapid Fixierer

AGFA (Köln, D)

M-MLV RT 5x Buffer

Promega (Mannheim, D)

Penicillin / Streptomycin

Biochrom AG (Berlin, D)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Gibco by Life Technologies
(Karlsruhe, D)

Qiazol

Qiagen (Hilden, D)

Restore™ Western Blot Stripping Buffer

Thermo Scientific (Langenselbold, D)

RNeasy® MiniKit

Qiagen (Hilden, D)

3.4 Chemikalien und Substanzen

Acrylamid/bis (30 %)

SERVA Electrophoresis (Heidelberg, D)

Albumin fraction V (BSA)

Thermo Scientific (Langenselbold, D)

Albumin fraction V (fettsäurefrei)

Thermo Scientific (Langenselbold, D)

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Bromphenol blau

VWR (Darmstadt, D)

Chloroform

Merck (Darmstadt, D)

Chlorwasserstoff (HCl)

Merck (Darmstadt, D)

DAKO Mounting Medium

Agilent (Santa Clara, USA)

Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs)

Promega (Mannheim, D)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Endothelin-1

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Ethanol 96 %

Merck (Darmstadt, D)

Fibronektin

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)

Formaldehyd 37 %	Merck (Darmstadt, D)
Gelatin aus Rinderhaut	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Goat Serum	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
IGF-1	PeptoTech GmbH (Hamburg, D)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe, D)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Methanol	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumlaurylsulfat, 10 % (SDS)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, D)
Norepinephrin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon, D)
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Palmitoleinsäure	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
PhosSTOP Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Random Primers	Promega (Mannheim, D)
RNAasin	Promega (Mannheim, D)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, D)
Taq Polymerase	Fermentas, (St. Leon-Rot, D)
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, (Darmstadt, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Tris-Base	Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, D)
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Tween 20®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ultra Pure Water	Biochrom AG (Berlin, D)

3.5 Selbsthergestellte Lösungen und Puffer

0.5 M Sammelgelpuffer	Tris 6.05 g Add H ₂ O set pH to 6.8 with HCl
1.5 M Trenngelpuffer	Tris 18.15 g Add H ₂ O and set pH to 8.8 with HCl.
6 x Probenpuffer für Western Blot	Tris 1 M (pH 6.8) SDS 1g Glycerol 1 ml Dithiothreitol 0.93 g Bromphenol Blau 60 µl (2%)
10 x Elektrophoresepuffer	Tris-Base 0.25 M Glycin 19.92 M SDS 10 % Add H ₂ O.
RIPA Puffer	Tris pH 7.5 50 mM NaCl 150 mM MgCl ₂ 5 mM Nonidet P-40 1 % Glycerol 2,5 % EDTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 100 µM

	Protease Inhibitor «Complete Mini» 1Tablette in 50 mL Stammlösung PhosStop 1 Tablette in 10 ml Stammlösung
10 x TBS	Tris 0.2 M NaCl 1.4 M pH wurde mit HCl auf 7.6 eingestellt, and ddH ₂ O added
TBST	10 x TBS 100 ml Tween 20 1 ml ddH ₂ O 900 ml
Towbin Puffer	Tris 25 mM Glycin 192 mM SDS 0.05 % Methanol 20 % Add ddH ₂ O

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer

3.6 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Firma
Forkhead Signaling Antibody Sampler Kit	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-Akt	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology
Anti-Akt	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology

Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/204)	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology
Anti-p44/42 MAP Kinase (Thr202/204)	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology
β-Actin	1:200	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Firma
Anti-Rabbit	1:10000	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Anti-Mouse	1:10000	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Alexa 488 Fluor	1:400	Donkey	Thermo Fisher Scientific
DAPI	1:1000		Thermo Fisher Scientific

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

3.7 Primer

18S	For 5' ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA G Rev 5' TTA ATG AGC CAT TCG CAG TTT C
MuRF1	For 5' GCT GGT GGA AAA CAT CAT TGA CAT Rev 5' CAT CGG GTG GCT GCC TTT
Atrogin-1	For 5' CTT TCA ACA GAC TGG ACT TCT CGA Rev 5' CAG CTC CAA CAG CCT TTA CTA CGT
p21	For 5' AGT CAG GCG CAG ATC CAC AG Rev 5' CAC TTT GCT CCT GTG CGG AA

3.8 Computerprogramme

Graph Pad Prism 6

Statistische Analysen, Abbildungen

Stratagene MxPro

qRT-PCR Analyse

ImageJ

Western Blot Quantifikation

Primer Blast NCBI

Primer Design für qRT-PCR

BZ-II Analyzer Software

Immunfluoreszenz Analyse

PubMed

Literaturrecherche

Zotero

Literaturverwaltungsprogramm

Microsoft Office 2016

Datenanalyse

4 Methoden

4.1 Zellkulturtechniken

Die im Folgenden dargestellte Zellkulturarbeit erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem Labor der Sicherheitsstufe S1. Es wurde ausschließlich unter einer sterilen Werkbank gearbeitet, und die verwendeten Arbeitsmaterialien wurden vor der Benutzung entweder autoklaviert oder gründlich mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer 95 %igen Luftfeuchtigkeit sowie einer 5 %igen CO₂ Konzentration, um optimale Wachstumsbedingungen der Zellen zu gewährleisten.

4.1.1 HL-1 Zelllinie

Alle Zellkulturexperimente wurden in der murinen HL-1 Kardiomyozyten Zelllinie durchgeführt, welche der AG Kintscher freundlicherweise durch Prof. William C. Claycomb zur Verfügung gestellt wurde. Bei den HL-1 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie muriner Myokardzellen, die einem atrialen Maustumor entnommen wurde. HL-1 Zellen stellen weltweit die erste etablierte Herzmuskelzelllinie dar, die trotz Passagierung den Phänotyp und die biochemischen Eigenschaften differenzierter Kardiomyozyten aufrechterhalten können [195]. Zudem besitzen HL-1 Zellen ein ähnliches Genexpressionsprofil herzspezifischer Gene [195]. Daher dient die HL-1 Zelllinie seit nunmehr 20 Jahren als Modell zur Aufklärung der molekularen Mechanismen kardiologischer Krankheitsbilder und trug bisher maßgeblich zur Erkenntnisgewinnung auf dem Gebiet der Hypertrophie-, Hypoxie- sowie Myokardinfarkt-Forschung bei.

4.1.2 Kultivierung und Passagierung der HL-1 Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers [195]. Das speziell für die HL-1 Kardiomyozyten entwickelte und nach deren Begründer benannte Claycomb Medium wurde von Sigma-Aldrich erworben. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist aufgrund von Urheberrechten nicht bekannt. Gelagert wurde das Claycomb Medium lichtgeschützt bei 4 °C. Zu Beginn der Kultivierung wurden die HL-1 Zellen, die in sterilen Kryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert wurden, in eine T75 Zellkulturflasche überführt,

die bereits auf 37 °C vorgewärmtes Claycomb+ Medium beinhaltetete. Die Zellkulturflasche wurde daraufhin in den Inkubator platziert, um ein Heranwachsen der Zellen zu begünstigen. Nach 3-stündiger Inkubation konnte das Medium gewechselt und die eigentliche Kultivierung begonnen werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets in Claycomb+ Medium bei 37 °C. Die Zellen erhielten alle 1-2 Tage einen Mediumwechsel.

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, erfolgte alle 3-4 Tage das Passagieren der Zellen. Hierzu wurde das Medium der adhärennten Zellen abgesaugt und die Zellen mit 12 ml vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Trypsinierung der Zellen mittels 2 ml Trypsin/EDTA, das für 2 min bei 37 °C inkubiert wurde. Um sicherzustellen, dass die Serinprotease Trypsin alle Zell/Zell- und Zell/Boden-Kontakte löst, wurde dieser Schritt wiederholt. Nach der zweiten Trypsin Inkubation erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsininhibitor, um die Zellen vor einer möglichen Denaturierung zu schützen. Daraufhin wurde 5-6 ml Claycomb+ Medium hinzupipettiert, die Suspension mehrfach resuspendiert, in ein Falcon überführt und bei 1000 rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das verbliebene Zellpellet mit Claycomb+ Medium resuspendiert. Schlussendlich wurde 1 ml des Resuspendats in eine neue Zellkulturflasche überführt, welche zuvor mit einer Gelatin/Fibronectin Lösung beschichtet wurde. Die Zellkulturflasche wurde mit 10 ml Claycomb+ Medium ergänzt und zur Kultivierung in den Inkubator überführt. Das Wegfrieren der Zellen erfolgte analog zum Passagieren. Jedoch wurde das Zellpellet hierbei mit 1,5 ml Freezing Medium (FBS + 10 % DMSO) resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

4.2 Stimulationsexperimente

4.2.1 Aussäen von HL-1 Zellen

Für die Western Blot- sowie die Real-Time PCR-Versuche wurden 6-Well Platten mit jeweils 1 ml Claycomb+ Medium pro Well präpariert und danach in den Inkubator gestellt. Hingegen wurden für die Immunfluoreszenz Experimente 24-Well Platten verwendet, welche vorerst mit Objektträgern versehen und daraufhin mit 0,5 ml Vollmedium pro Well vorbereitet wurden. Anschließend wurde eine konfluent gewachsene HL1- Zellkulturflasche analog zu dem in 4.1.6 geschilderten Schema passagiert. Das Zellpellet wurde für die Aussat jedoch wesentlich höher verdünnt als in 4.1.6 beschrieben, je nach Versuchsdesign variierte das

Verdünnungsvolumen zw. 25-50 ml Claycomb+ Medium. Für die Western Blot- bzw. Real-Time Experimente wurde 1 ml der Zellsuspension in die vorbereiteten Wells ausgesät, wogegen für die Immunfluoreszenz lediglich 0,5 ml in jedes Well appliziert wurde. Durch mehrfaches akribisches Resuspendieren der Zellsuspension vor der Aussaat, sollte eine möglichst homogene Zellkonzentration in den Wells erzielt werden. Nach dem Aussäen wurden die Multiwell-Platten zurück in den Brutschrank überführt.

4.2.2 Ansetzen von Fettsäuren und IGF-1

Die Herstellung der Fettsäurenstammlösungen erforderte zunächst das Lösen von 100 mg C16:1 bzw. 128 mg C16:0 in 1 ml 0.1 N NaOH, welches zuvor auf 70 °C erwärmt wurde. Daraufhin wurde das Fettsäuregemisch mit 9 ml 10 %igem, fettsäurefreien BSA/PBS verdünnt. Anschließend erfolgte das Sonifizieren der Fettsäuresuspensionen im 50 °C warmen Wasserbad für 3:30 Minuten (C16:1) bzw. 14 Minuten (C16:0) sowie eine sterile Filtration der Lösungen nach Wiedererlangung der Raumtemperatur. Für die Erzeugung der IGF-1 Stammlösung wurde 50µg steril filtriertes murines IGF-1 in 657,9 µl 0,1% igem fettsäurefreien BSA/PBS gelöst. Abschließend wurden die Stammlösungen aliquotiert und zur Konservierung bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Stimulation von HL-1 Zellen

Bevor die Stimulation der ausgesäten HL-1 Zellen erfolgen konnte, sollte der Stoffwechsel der Zellen zunächst auf ein basales Niveau reduziert werden. Hierzu wurden die Zellen über Nacht ausgehungert, indem das Nährmedium der Wells abgesaugt und mit dem in 4.1.2.3 beschriebenen Starving Medium substituiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den Fettsäuren C16:1, C16:0 bzw. dem Wachstumsfaktor IGF-1 und den entsprechenden Vehikelkontrollen behandelt. Die Stimulationssubstanzen wurden ausschließlich in Starving Medium gelöst. C16:1 wurde in einer Konzentration von 40 mM, C16:0 von 130 mM und IGF-1 in 10 nM angewendet. Nach dem Ansetzen der Stimulationssubstanzen, wurde das Hungermedium der Zellen abgesaugt und mit 2 ml (6-Well Platten) bzw. 1 ml (24-Well Platten) Stimulationsmedium pro Well ersetzt. Die Stimulationssubstanzen wurden in jedem Versuch auf jeweils 3 Wells appliziert, um wissenschaftliche Triplikate innerhalb eines Experiments zu generieren. Als Vehikelkontrolle wurde 10 %iges Fettsäure-freies BSA/PBS eingesetzt. Je nach experimentellem Ansatz

wurden diverse Stimulationsintervalle, zwischen 5 min bis 48 Stunden Länge, gewählt.

4.2.4 Lyse der Zellen sowie Protein- und RNA- Isolation

Nach entsprechender Stimulation wurde das Stimulationsmedium mittels Pasteurpipette abgesaugt und die Wells mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Um Proteinlysate zu erzeugen wurde 300 µl Ripa Puffer pro Well eingesetzt. Hingegen erfolgte die RNA Isolation mittels 500 µl Qiazol. Im Anschluss daran wurden die verbliebene Zellen mittels Zellscraper vom Plattenboden abgeschabt, resuspendiert und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Die Zellysate wurden entweder bei -20°C (Proteine) bzw. bei -80 °C (RNA) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

Der Western Blot stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, welches dem Nachweis spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches dient. Prinzip der Methode ist die gelelektrophoretische Auftrennung aller in einer Probe enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Proteingröße mit einem anschließenden Transfer auf eine Trägermembran (Blotting). Die Detektion der Proteine wird daraufhin mittels spezifischer Antikörper gewährleistet.

4.3.1 Proteinisolation

Nachdem die in 4.2.4 beschriebenen, bei -20 °C gelagerten Proteinlysate initial auf Eis aufgetaut wurden, erfolgte die Homogenisierung der Proben im Bandelin Sono Plus Sonifikator für 30 Sekunden bei 50 % Power. Die Sonifikatorspitze wurde nach jedem Zyklus mit 70 %igem Ethanol gereinigt, um eine mögliche Verunreinigung der Proben abzuwenden. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und 1300 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert, die dabei entstandenen Zellpellets verworfen und die Proteingemische in neue Eppendorf Reaktionsgefäße übertragen.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proben

Die Messung der Probenkonzentration wurde mittels Bicinchoninic Acid Assay (BCA) durchgeführt. Das Prinzip dieses Proteinquantifizierungsverfahren beruht auf einer Kombination aus der Biuretreaktion und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA [196]. In

der als Biuret bekannten Reaktion, werden die im Proteingemisch enthaltenen Cu^{2+} Ionen in einem alkalischen Milieu zu Cu^{1+} Ionen reduziert [196]. Im zweiten Reaktionsschritt bilden jeweils zwei BCA-Moleküle mit den einwertigen Kupferionen Chelatkomplexe. Die wasserlöslichen Chelatkomplexe zeigen bei 562 nm eine konzentrationsabhängige Lichtabsorption, welche spektralphotometrisch detektiert werden kann [197].

Praktisch wurden für das BCA Assay die Substanzen "Prot Assay B" (4 % Kupfersulfat) und "BCA Prot Assay A" (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA, Natriumtartrat in 0,1 M Natronlauge) Probenanzahl-abhängig miteinander vermischt. Auf einer 96-Well-Platte wurde danach eine Verdünnungsreihe bekannter BSA Konzentrationen pipettiert, um die zu erfassenden Proteinkonzentrationen anhand einer Eichkurve bestimmen zu können. Ferner wurde auf die Multiwell-Platte von jeder Probe drei 5 μl Triplikate und jeweils 100 μl BCA-Mix gegeben. Im Anschluss wurde die Platte mit Aluminiumfolie bedeckt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Unter Verwendung des Programmes "Microplate Manager" wurde daraufhin die Absorption der Proben spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt und anhand der erstellten Eichgerade die genaue Probenkonzentration berechnet (s. Abbildung 12)

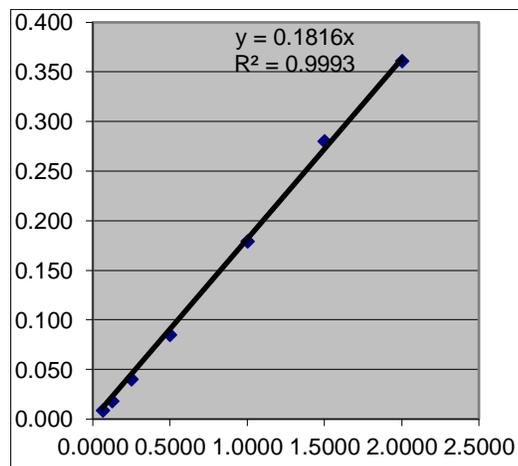


Abbildung 12: Eichgerade zur Erfassung der Proteinkonzentration

Aufgetragen ist Absorption/Extinktion (Y-Achse) in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge (X-Achse)

4.3.3 Herstellung der Gele

Zur Anfertigung der Gele wurden die dafür vorgesehenen Glasplatten zunächst mit 70 %igem Ethanol gereinigt und in die zugehörigen Haltevorrichtungen eingespannt. Trenngel (8-10 %, je nach Proteingröße) und Sammelgel (niedrigprozentig) wurden zeitgleich gemäß den unten aufgeführten Rezepturen (s. Tabelle 4) bis auf das Tetramethylethyldiamin (TEMED) in 50 ml Falcons angesetzt. Daraufhin wurde das für die Polymerisation zuständige TEMED dem Trenngel beigefügt, dieses vorsichtig zwischen die Glasplatten gegossen und letztendlich 1 ml Isopropanol aufpipettiert. Es benötigte 45-60 Minuten ehe das Gel aushärtete und das Isopropanol abgekippt werden konnte. Nachdem die Oberfläche des ausgehärteten Trenngels mit destilliertem Wasser gespült wurde, wurde das vorbereitete Sammelgel mit TEMED ergänzt. Im Anschluss wurde das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert und ein zuvor gereinigter Plastikamm von 6 bzw. 12 Kammern in dieses eingebracht. Hierdurch wurden Taschen im Gel geformt, welche dem späteren Auftragen der Proben dienten. Die vollständige Polymerisation des Sammelgels ereignete sich nach 15-20 Minuten. Um die Austrocknung des fertig polymerisierten Gels zu verhindern, wurde dieses in Papiertücher eingewickelt, mit destilliertem Wasser befeuchtet und in Aluminiumfolie über Nacht bei 4 °C gelagert.

	8%	10%	12%
1,5 M Trenngelpuffer	1.3ml	1.3ml	1.3ml
10% SDS	50µl	50µl	50µl
Acrylamid Bis 30%	1.3ml	1.7ml	2ml
10% APS	50µl	50µl	50µl
TEMED	3µl	2µl	2µl
H2O	2.3ml	1.9ml	1.6ml

0,5 M Sammelgelpuffer	2.5ml
10% SDS	100µl
Acrylamid Bis 30%	1.3ml
10% APS	100µl
TEMED	12µl
H2O	6.1ml

Tabelle 4: Rezepte der Trenn- bzw. Sammelgel Herstellung (Mengenangaben für 10ml Gel)

4.3.4 Western Blotting

4.3.4.1 Vorbereitung der Proben

Für die Western Blot Proteinanalyse wurde eine ideale Proteinkonzentration von 30 µg/Probe angestrebt. Um einen zur gelelektrophoretischen Auftrennung geeigneten Proteinmix zu generieren, wurde die besagte Proteinmenge entsprechend des unten

aufgeführten Schemas mit RIPA Puffer (+ Protease und Phosphatase Inhibitoren) und 6x Puffer (1:6) verdünnt (s. Tabelle 5).

Probe	Proteinkonzentration	30µg	RIPA	6x Puffer
1A	0,78 µg/µl	38,25	6,75	9
1B	0,79 µg/µl	37,85	7,15	9
1C	0,75 µg/µl	40,19	4,81	9
2A	0,79 µg/µl	37,93	7,07	9
2B	0,75 µg/µl	40,02	4,98	9
2C	0,87 µg/µl	34,61	10,39	9

Tabelle 5: Exemplarische Darstellung der zu pipettierenden Volumina

Die Proteingemische wurden daraufhin gevortext, kurz runterzentrifugiert, 2 Minuten lang bei 95 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert und letztendlich eine weitere Minute lang bei 4 °C zentrifugiert.

4.3.4.2 Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine anhand ihrer Proteingröße wurde das SDS-PAGE-Verfahren angewendet. Hierzu wurden die bereits vorbereiteten SDS-Polyacrylamid Gele in den Haltevorrichtungen der Elektrophoresekammern befestigt und der zwischen den Platten liegende Raum mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Im Anschluss wurden die Kämme der Gele vorsichtig entfernt und die Proteinmische sowie 5 µl Ladder luftblasenfrei in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurde die restliche Kammer mit dem Elektrophoresepuffer aufgefüllt, die Elektroden angeschlossen und das Proteingemisch mindestens 60 Minuten lang in einem elektrischen Feld von 150 V nach Laemmli separiert [198].

4.3.4.3 Transfer der Proteine

Nach der Auftrennung des Proteinmixes erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf einen festen Träger, die PVDF-Membran. Jene Membran wurde vorerst 1 Minute lang in Methanol aktiviert. Daraufhin wurden die in 4.3.4.2 verwendeten Gele vorsichtig der Kammervorrichtung entnommen, zur Orientierung markiert und spiegelverkehrt in Towbinpuffer von den Glasscheiben gelöst. Im Anschluss wurde ein "Nassblot-Sandwich" in

folgender Reihenfolge (s. Abbildung 13) geschichtet. Die dafür verwendeten Komponenten wurden vor Gebrauch mit Towbinpuffer durchfeuchtet. Anschließend wurde das Blotting Sandwich in die Nassblotchkammer eingesetzt, welche mit Towbinpuffer befüllt und mithilfe eines Eis-Elementes gekühlt wurde. Nun wurden die Elektroden an die Kammer angeschlossen, welche durch die Errichtung einer elektrischen Spannung von 100 V den Transfer der Proteinbanden aus dem Gel heraus auf die Membran innerhalb von 60 Minuten ermöglichten (s. Abbildung 13).

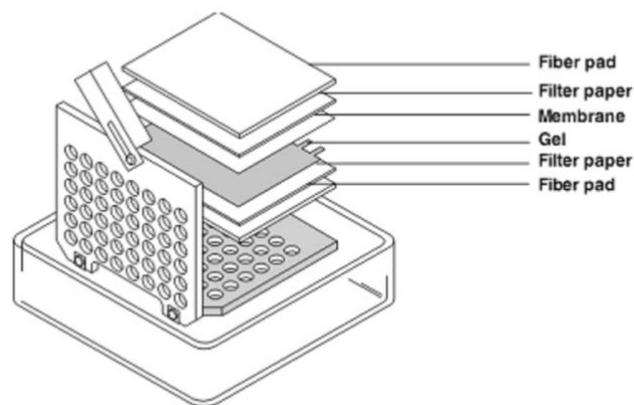


Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines Blot Sandwiches (Graphik entnommen aus <http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>)

4.3.4.4 Blocken der Membran

Um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu minimieren, wurden die Membranen vor Antikörperinkubation mindestens eine Stunde lang auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt. Hierzu wurde ein 5 %iger Blockingpuffer hergestellt, indem 5 g Albumin in 100 ml TBST auf dem Magnetmixer gelöst wurde. Pro Membran wurden 50ml der Blockingsuspension verwendet.

4.3.4.5 Auftragen des Erstantikörpers

Nach Auftrennung und Blotting der Proteinbanden ist es möglich, bestimmte Proteine mittels spezifischer Antikörper zu detektieren. Hierfür wurde die Membran über Nacht mit einem primären Antikörper behandelt. Die bei -20 °C gelagerten Erstantikörper wurden dazu in

einer Konzentration von 1:1000 in 5 %igem BSA verdünnt. Inkubiert wurde die Membran, mit der proteinbeladenen Seite nach innen gerichtet, in einem 50 ml Falcon bei 4 °C auf der Rollmaschine.

4.3.4.6 Waschen der Membran und Auftragen des Zweitantikörpers

Die über Nacht inkubierte Membran unterlief am darauffolgenden Morgen einem gründlichen Waschprozess. Mithilfe einer Pinzette wurde die Membran aus dem Falcon entnommen und anschließend 1 Mal für 5 Minuten sowie 3 Mal für 15 Minuten in TBST gewaschen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des sekundären Antikörpers, wurde dieser lichtgeschützt in einem mit Aluminiumfolie umschlagenen Falcon angesetzt. Die Verdünnung erfolgte analog der Herangehensweise in 4.3.4.5 ebenfalls in 5 %igem BSA, in einer Konzentration von 1:10.000. Der Zweitantikörper wurde daraufhin lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln appliziert. Nach der Inkubation des zweiten Antikörpers wurde dieser verworfen und der oben beschriebene Waschprozess wiederholt.

4.3.4.7 Dunkelkammerarbeit

Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran 1 Minute lang in der Chemilumineszenz ECL aktiviert und daraufhin in eine entsprechende Fotokassette platziert. In der Dunkelkammer erfolgte anschließend das Auspacken, Zuschneiden sowie die Auflage eines Fotofilms. Je nach Antikörper variierte die Belichtungszeit des Films von 1 Sekunde bis 25 Minuten. Im Anschluss wurde der Film in dem dafür vorgesehen Entwicklergerät entwickelt und die auf der Membran befindlichen Proteine somit sichtbar gemacht. Zur Orientierung wurde der Ladder der Membran auf dem Fotofilm abgezeichnet.

4.3.4.8 Stripping der Membran

Um nach der erfolgten Immundetektion weitere Proteine der Proben sichtbar machen zu können, wurden die gebundenen Antikörper mittels Stripping Buffer von der Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran 12 Minuten lang mit 16 ml Stripping Buffer inkubiert. Im Anschluss erfolgten vier 5-minütige Waschschrte mit TBST, woraufhin die Antikörperinkubation bzw. die Vorgehensweise der Abschnitte 4.3.4.4 bis 4.3.4.7 erneut durchlaufen wurde. Abschließend wurden die repräsentativen Blots, die eine Ladungskontrolle benötigten, mit einem Antikörper gegen das stabil exprimierte, 42 kDA schwere β -Actin untersucht.

4.4 Immunfluoreszenz- Versuche

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine mikroskopische Methode, die die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen ermöglicht. Das Verfahren basiert darauf, dass spezifische, gegen ein auserwähltes Protein gerichtete Antikörper, mit einem weiteren, fluoreszierenden Antikörper markiert werden. Durch das mikroskopisch sichtbare Fluoreszenz-Licht des Komplexes, kann somit das zu untersuchende Protein bzw. dessen Lokalisierung innerhalb der Zelle visuell erfasst werden. Das Sichtbarmachen des Fluoreszenz-Lichtes erfordert die Verwendung eines Immunfluoreszenzmikroskopes.

4.4.1 Durchführung des Immunfluoreszenz-Assays

Alle im Folgenden geschilderten Substanzen wurden in einer Menge von 400 µl/Well appliziert. Ferner wurden die Arbeitsschritte, in denen Formaldehyd zur Anwendung kam, ausschließlich unter einem Tiefabzug ausgeführt. Für das Immunfluoreszenz-Assay wurde nach einem 30-minütigen Stimulationsintervall mit C16:1 das Stimulationsmedium der 24-Well-Platte abgesaugt und die HL-1 Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten lang mit 3,7 %-igem Formaldehyd/PBS auf den Deckgläsern fixiert und die Zellmembranen mittels 0,1 % Triton/PBS x-100 geöffnet. Dieses wurde 5 Minuten lang auf dem Schüttler inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen des ersten Antikörpers zu unterbinden, wurden die fixierten HL-1 Zellen mindestens 1 Stunde lang auf der Schüttelmaschine blockiert, wozu 10 %iges Goat Serum verwendet wurde. Nach dem Blockingprozess wurde der Erstantikörper Anti-FOXO3a (rabbit anti-mouse) in einer Konzentration von 1:800 in 10 %igem Goat Serum 1 Stunde lang bei Raumtemperatur appliziert. Im Anschluss wurden die Zellen 3 Mal je 10 Minuten mit PBS gewaschen. Dem Waschprozess folgend, wurde der fluoreszierende Sekundäantikörper Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit) aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit in einem mit Aluminiumfolie umschlagenen Falcon mit 10 %igem Goat Serum 1:400 verdünnt. Dieser wurde lichtgeschützt eine Stunde lang auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der zuvor geschilderte Waschprozess wiederholt. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde die lichtempfindliche Substanz DAPI (4'6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Konzentration von 1:1000 in 10 % Goat Serum angesetzt und die HL-1 Zellen 7 Minuten lang damit angefärbt. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte der Mounting-Step der Deckgläser mittels DAKO

Fluorescent Mounting Medium (S3023) auf bereits vorbereitete Objektträger.

4.4.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden mithilfe eines invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskopes in einer 20- sowie 40-fachen Vergrößerung betrachtet. Analysiert wurde die Lokalisierung von FOXO3a im Vergleich zu den mit DAPI angefärbten Zellkern mittels der Software BZ-II Analyzer. Somit konnte zwischen einer nukleären bzw. zytosolischen Position des FOXO3a-Proteins differenziert werden. Letztendlich wurden die Fluoreszenzsignale der HL-1 Zellen unter Einsatz der digitalen Kamera Nikon CFI60 abgebildet.

4.5 Real-Time PCR Versuche

Die quantitative Real-Time PCR ist eine DNA-Vervielfältigungsmethode, welche mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auslöst und somit die Amplifikation bestimmter Gene bzw. DNA-Abschnitte herbeiführt. Neben der Replikation spezifischer Nukleotidsequenzen, welche in thermisch gesteuerten Zyklen abläuft, ermöglicht die qRT-PCR ebenfalls die Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Menge eines Gen-Transkripts. Hierzu ist die Zugabe spezifisch designter Primer obligat. Der PCR-Prozess setzt sich aus 30-40 thermischen Zyklen zusammen, in denen jeweils 3 Schritte durchlaufen werden. Nachdem die cDNA bei 95 °C denaturiert wird, findet bei Temperaturen um 60 °C die Anlagerung der Primer an die spezifischen DNA-Abschnitte statt. Bei 72 °C ereignet sich daraufhin der Amplifikationsprozess der DNA, welcher durch die DNA-Polymerase katalysiert wird und als Elongation bezeichnet wird. Die Funktionsweise der qRT-PCR beruht auf dem Einsatz eines zunächst inaktiven Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR-Green), welcher sich während der Replikationszyklen in die DNA-Doppelstränge einlagert und somit zur Fluoreszenz befähigt wird. Am Ende jedes Elongationsprozesses wird das Fluoreszenzsignal des interkalierenden SYBR-Greens in Echtzeit gemessen. Da die Intensität der detektierten Fluoreszenz proportional zu der Menge an PCR-Produkt zunimmt, kann somit auf die initial in einer Probe enthaltene Menge eines Gen-Transkriptes geschlossen werden. Die Auswertung der qRT-PCR mittels relativer Quantifizierung erfordert stets das Heranziehen eines konstitutiv exprimierten Referenz-Gens.

4.5.1 RNA Präparation

Vor der Durchführung der RNA Präparation wurde die gesamte Arbeitsfläche und alle verwendeten Utensilien gründlich desinfiziert sowie mit RNAZap™ gereinigt. Die mRNA Isolation aus den in 4.2.4 beschriebenen Qiazol-Zell-Lysaten erfolgte mithilfe des RNeasy® Mini Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die mRNA wird in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und zwischenzeitig bei -80 °C schock gefroren. Die Konzentration der isolierten mRNA sowie die Qualität dieser wurden mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop) ermittelt.

4.5.2 cDNA Synthese

Zur Durchführung quantitativer Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR musste die im vorherigen Arbeitsschritt isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Transkription der präparierten RNA in die komplementäre cDNA basierte auf der Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wurde neben den RNA Proben und der Reversen Transkriptase, Random Primer (1:5), M-MLV RT 5x Puffer, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und RNasin (Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor) auf Eis aufgetaut. Gearbeitet wurde ausschließlich auf Eis nach gründlicher Desinfektion des Arbeitsplatzes und aller verwendeten Materialien. Anhand der photometrisch ermittelten Probenkonzentrationen, wurde 1 µg mRNA mit 1 µg Random Primer versetzt und 5 Minuten lang bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C zwischengelagert und ein Mastermix gemäß folgender Rezeptur (s. Tabelle 6) erstellt. Ferner wurde zur Negativkontrolle ein RT(-)Mastermix hergestellt, der die Reverse Transkriptase nicht beinhaltet. Die Proben wurden mit 12 µl Mastermix bzw. RT(-)Mix versehen und 1 Stunde im Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen von 50 µl hergestellter cDNA wurde 1:4 mit Ultrapure Water verdünnt, um eine endgültige cDNA-Konzentration von 5 ng/µl zu erhalten. Bis zur Analyse der cDNA durch Real-Time PCR wurden die Proben bei -20 °C gelagert (s. Tabelle 6).

	RT(+) Mastermix	RT(-) Mastermix
UP-H2O	-	0,5 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	0,5 µl	-
RNAsin	0,5 µl	0,5 µl
M-MLV 5x Puffer	10 µl	10 µl
dNTPs (10mM)	1 µl	1 µl
37 µl RNA + 12 µl Mastermix + 1 µl Random Primer = 50 µl cDNA		

Tabelle 6: Protokoll der cDNA Synthese

4.5.3 Durchführung der Real-Time PCR

Die quantitative Gentranskriptionsanalyse mittels qRT-PCR erforderte zunächst das Auftauen der in 4.4.2 synthetisierten cDNA-Proben sowie der Gen-spezifischen Primer. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Durchgeführt wurde die qRT-PCR indem ein 20 ng entsprechendes Volumen an cDNA Probe (4 µl) in einer dreifachen Bestimmung auf eine 96-Well Platte pipettiert wurde. Anschließend wurden die cDNA enthaltenen Wells mit 21 µl eines zuvor hergestellten Mastermixes (s. Tabelle 7) versetzt. Ferner wurden zusätzliche Wells anstatt mit cDNA mit 4 µl einer Non-Template Kontrolle aus UPW sowie mit den RT(-) Proben befüllt. Diese wurden gemäß des Standard qRT-PCR Reaktionsansatzes ebenfalls dreifach bestimmt und mit Mastermix behandelt. Im Anschluss wurde die Platte mit einer hitzebeständigen Folie abgedichtet und 2 Minuten lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde die 96-Well Platte in den PCR-Thermocycler platziert und die darauf enthaltene cDNA mithilfe des Programmes Mx3000Pro amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen der untersuchten Gene, Atrogin-1, MuRF1 und p21 sind dem Abschnitt 3.7 zu entnehmen. Für jeden Real-Time PCR Ansatz wurde dasselbe thermale Profil verwendet, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente sicherzustellen. Als Referenz-Gen wurde in jedem Versuch die mitochondriale Untereinheit 18S gemessen und für die Auswertung herangezogen.

Standard Real-Time Reaktionsansatz	
4 µl cDNA +	21 µl qRT-PCR Mastermix
	8µl UP-H2O
	12,5µl SYBR Green
	0,25µl Forward Primer (20µM)
	0,25µl Reverse Primer (20µM)
= 25 µl Finalvolumen pro Probe	

Tabelle 7: Protokoll des Standard qRT-PCR Reaktionsansatzes

Durchgeführt wurde die qRT-PCR nach folgendem thermalen Profil:

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	0:30 min	40 Zyklen
60°C	0:30 min	
72°C	0:30 min	
55°C	0:30 min	
95°C	0:30 min	

4.5.4 Auswertung der Real-Time PCR

Zur Auswertung der Real-Time PCR-Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode verwendet. Um die Expression der Zielgene quantitativ erfassen zu können wurde die interne Kontrolle, 18S, zur Normierung herangezogen. Der sogenannte Ct-Wert wird als Schwellenwert verstanden, der den Zyklus beschreibt, bei dem die detektierte Fluoreszenz und somit die Kopienzahl eines Gentranskriptes erstmalig signifikant ansteigt. Der Ct-Wert ermöglicht daher Rückschlüsse auf die initial in einer Probe enthaltene Menge einer bestimmten Nukleotidsequenz. Vergleicht man die Ct-Werte der einzelnen Proben untereinander, so kann eine mögliche Differenz des Zielgen-Expressionsniveaus der verschiedenen Stimulationsansätze quantitativ erfasst werden.

Für die Auswertung der qRT-PCR Experimente wurde zunächst überprüft, ob die Dissoziationskurve einen einheitlichen Peak aufwies. Hierdurch wurde die Primerspezifität kontrolliert, die die Validität der Messergebnisse maßgeblich bestimmt. PCR-Experimente, die unsaubere Schmelzkurven präsentierten, wurden nicht weiter verwertet. Vorausgesetzt, dass die Schmelzkurve eines Versuchs als adäquat (s. Abbildung 14) einzuschätzen war, wurde der Ct-Wert in den linearen Bereich der Amplifikationkurve gesetzt (s. Abbildung 15). Die relative Quantifizierung eines mRNA-Transkriptes wurde letztendlich errechnet, indem zunächst die Ct-Werte des Zielgens und des Referenzgens voneinander subtrahiert wurden (ΔCt). Anschließend wurde die Differenz der ΔCt -Werte der unterschiedlichen Stimulationsansätze eines Experimentes (Vehikelkontrolle vs. Stimulationssubstanz) gebildet ($\Delta\Delta Ct$). Das spezifische Genexpressionsniveau wurde letztendlich determiniert, in dem die errechneten $\Delta\Delta Ct$ -Werte in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt wurden und ferner arithmetisch gemittelt wurden.

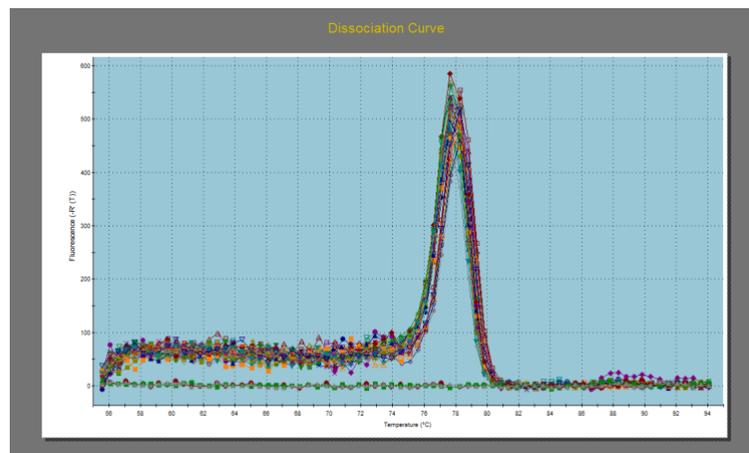


Abbildung 14: Saubere Schmelzkurve als Hinweis für eine adäquate Primerspezifität
Aufgetragen ist die Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse)

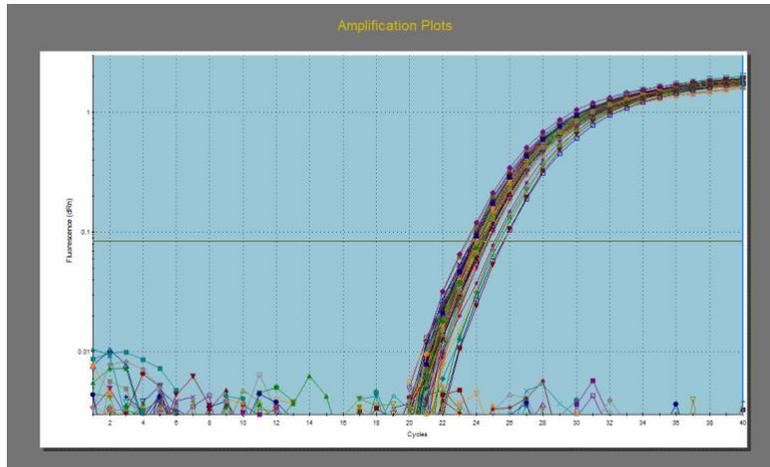


Abbildung 15: Halblogarithmische Auftragung der Amplifikationskurve (Ct-Wert Einstellung)
 Aufgetragen ist die Fluoreszenz (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Temperatur (X-Achse)

4.6 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Softwareprogramme GraphPad Prism 6 und Image J. Alle Experimente wurden mindestens dreifach durchgeführt ($n=3$) mit einer jeweiligen Probenanzahl von $N=3$. Vor der Durchführung parametrischer Tests wurde zunächst die Normalverteilung der Messwerte untersucht mithilfe des Shapiro-Wilks- bzw. des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Bei einem Vergleich der Mittelwerte zweier Behandlungsgruppen wurde der ungepaarte Student's-t-Test angewendet. Wurden die Behandlungsgruppen nicht nur untereinander, sondern ferner mit unterschiedlichen Versuchsvariablen verglichen, so erfolgte die Durchführung einer zweifachen Varianzanalyse (ANOVA). Resultate wurden als statistisch signifikant angesehen bei einem p -Wert $<0,05$. Um auch die Western Blot Ergebnisse auf statistische Signifikanz überprüfen zu können, wurden die Proteinbanden densitometrisch mithilfe des Programmes Image J ausgewertet. Die Auswertung basierte hierbei auf den gezeigten Blots. Die graphische Darstellung der Daten inkludiert Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) sowie die Anzahl der Versuchsdurchläufe (n).

5 Ergebnisse

5.1 Kontrollversuche p-AKT

Die von Foryst-Ludwig et al. beschriebene C16:1 induzierte AKT-Phosphorylierung konnte nach einem 30-minütigen Stimulationsintervall in HL-1 Kardiomyozyten reproduziert werden. Dieser Versuchsansatz wurde als interne Kontrolle gewählt, um die Funktionalität der neu etablierten HL-1 Zellkultur zu verifizieren, bevor weitere Western Blot Experimente bezüglich der FOXO-Transkriptionsfaktoren erfolgten. Zudem dienten die Kontrollversuche mit p-AKT dazu, die Funktionsfähigkeit der neu angesetzten C16:1 Stammlösung sicherzustellen. In Abbildung 16 wird die durch C16:1 herbeigeführte AKT-Phosphorylierung deutlich.

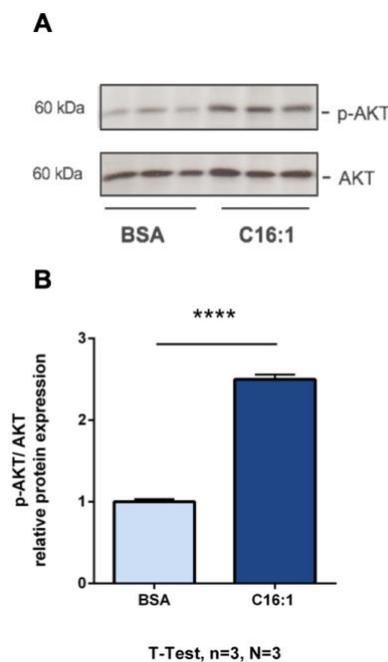


Abbildung 16: C16:1 induziert AKT-Phosphorylierung in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-AKT sowie gesamt AKT als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test, **** p < 0.0001.

5.2 Analyse der C16:1 vermittelten FOXO-Regulation auf Proteinebene

5.2.1 Screening auf die Beteiligung von FOXO am C16:1 Wirkmechanismus

5.2.1.1 p-FOXO1 Versuche

Um den Einfluss der Fettsäure C16:1 auf die mit PI3K-AKT assoziierten FOXO-Transkriptionsfaktoren genauer analysieren zu können, wurden die verschiedenen FOXO-Subtypen separat voneinander betrachtet. Begonnen wurde mit dem Protein FOXO1, welches in der Literatur am häufigsten im Zusammenhang mit Hypertrophie Erwähnung findet [135,199].

Um den Effekt von C16:1 auf FOXO1 aufzuklären, wurden die HL-1 Zellen entsprechend der Vorgehensweise der Abschnitte 4.2 und 4.3 nach einer 30-minütigen C16:1 Stimulation mithilfe der Western Blot-Technik untersucht. Unter Verwendung des Antikörpers Phospho-FOXO1(Serin 256) wurde der Phosphorylierungsgrad von FOXO1 unter C16:1 Applikation ermittelt. Als Kontrolle diente das gesamte zelluläre unphosphorylierte FOXO1, was zwischen den Proben konstitutiv exprimiert sein sollte. Die Auswahl des Stimulationszeitpunktes basierte auf bereits publizierten Daten zur FOXO1-Phosphorylierung durch IGF-1 Stimulation sowie auf der in 5.1 gezeigten AKT-Phosphorylierung durch ein 30-minütiges C16:1Stimulationsintervall [131,135].

Es konnte eine deutliche Hochregulation von p-FOXO1 nach 30-minütiger C16:1 Exposition im Vergleich zur BSA Vehikelkontrolle festgestellt werden, welche in Abbildung 17 dargestellt wird. Die C16:1-vermittelte, posttranslationale Modifikation von p-FOXO1 erreichte nach statistischer Auswertung ein entsprechendes Signifikanzniveau ($p < 0,05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daher wurde der Stimulationszeitpunkt von 30 Minuten für anschließende p-FOXO-Versuche beibehalten.

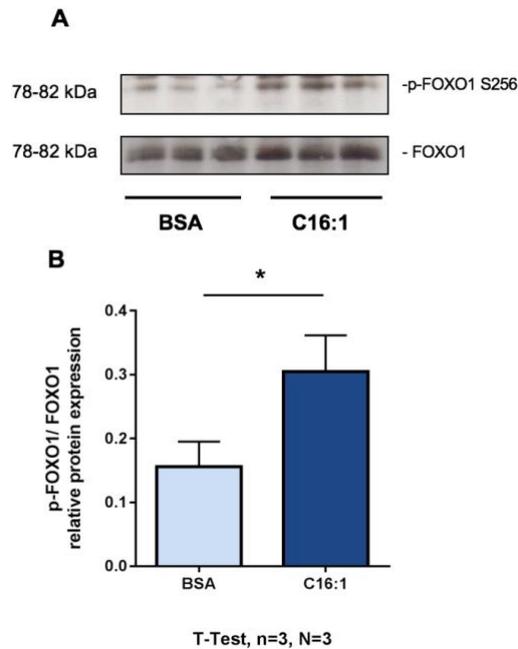


Abbildung 17: C16:1 induziert FOXO1-Phosphorylierung (Ser256) in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-FOXO1 (Serin 256) sowie gesamt FOXO1 als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test , * p < 0.05.

Zusätzlich wurde der Effekt von C16:1 auf eine weitere hypertrophierelevante FOXO1-Phosphorylierungsstelle, Threonin 24, untersucht. Die Seitenkette Threonin 24 wurde ausgewählt, da sie laut Literatur signifikant durch AKT und IGF-1 reguliert wird [200]. Nach Applikation des Antikörpers Phospho-FOXO1 (Threonin 24) konnte eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsgrades von FOXO1 (Threonin 24) durch eine 30-minütige C16:1 Stimulation im Vergleich zur BSA-Kontrolle konstatiert werden (siehe Abbildung 18). Der durch C16:1 gesteigerte Phosphorylierungsgrad von FOXO1 am Threonin-Seitenrest erreichte einen p-Wert <0,05 im Vergleich zur Vehikelkontrolle.

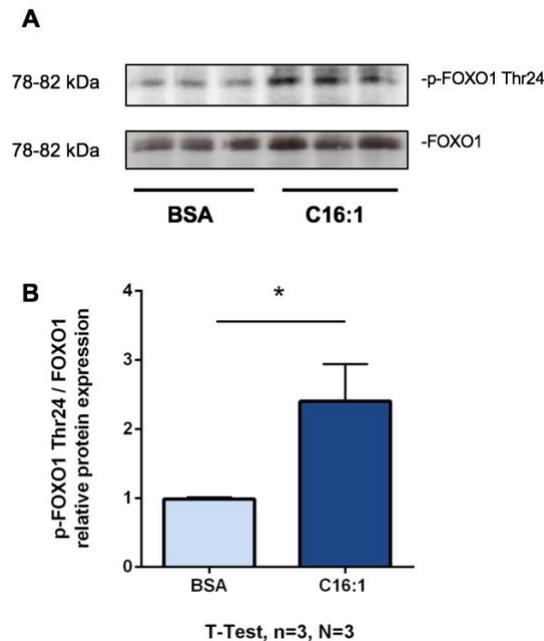


Abbildung 18: C16:1 induziert FOXO1-Phosphorylierung (Thr24) in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-FOXO1 (Threonin 24) sowie gesamt FOXO1 als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test , * $p < 0.05$.

5.2.1.2 p-FOXO3a Versuche

Neben FOXO1, ist FOXO3a im Kontext kardialer Atrophie und Hypertrophie bereits mehrfach untersucht worden [201–203]. Um nachzuweisen, ob der Transkriptionsfaktor FOXO3a ebenfalls in der Signaltransduktion von Palmitoleinsäure involviert ist, wurden weitere Western Blot-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die HL-1 Kardiomyozyten analog der Herangehensweise aus Abschnitt 5.2.1.1 einer 30-minütigen C16:1 Exposition unterzogen und anschließend per Western-Blotting analysiert. Durch Einsatz der monoklonalen Antikörper Phospho-FOXO3a (Serin318/321) sowie Phospho-FOXO3a (Threonin32) wurde das Phosphorylierungsmuster von FOXO3a unter C16:1 Einfluss sichtbar gemacht. Zur Ladungskontrolle erfolgten Gesamtproteinfärbungen mithilfe des Anti-FOXO3a Antikörpers.

Anhand der Western Blot-Proteindetektion, waren signifikant höhere Mengen an phospho-FOXO3a Ser318/321 in den Proteinbanden der C16:1 stimulierten Proben festzustellen. Diese erreichten nach densitometrischer Auswertung und statistischer Kalkulation ein Signifikanzniveau von ($p < 0,05$) im Vergleich zur Vehikelkontrolle und werden in Abbildung 19 visualisiert.

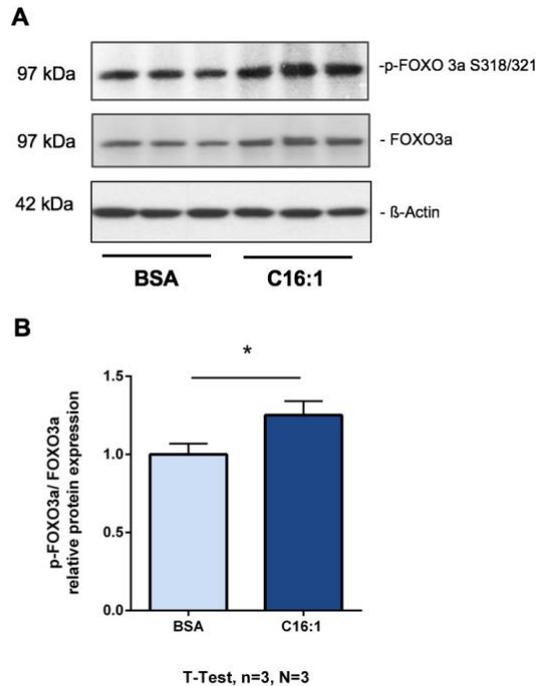


Abbildung 19: C16:1 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Ser318/321) in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-FOXO3a (Serin 318/321), gesamt FOXO3a und β -Actin als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test , * $p < 0.05$.

Simultan zu der Phosphorylierung des Seitenrestes Serin318/321, bewirkt C16:1 eine weitere posttranslationale Veränderung des Transkriptionsfaktors FOXO3a. Die Phosphorylierungsstelle p-FOXO3a Threonin32 zeigt ebenfalls eine statistisch signifikante Hochregulation der C16:1 behandelten Proben im Vergleich zur BSA-Kontrolle ($p < 0,01$). Dieser C16:1-vermittelte Effekt wird anhand Abbildung 20 verdeutlicht.

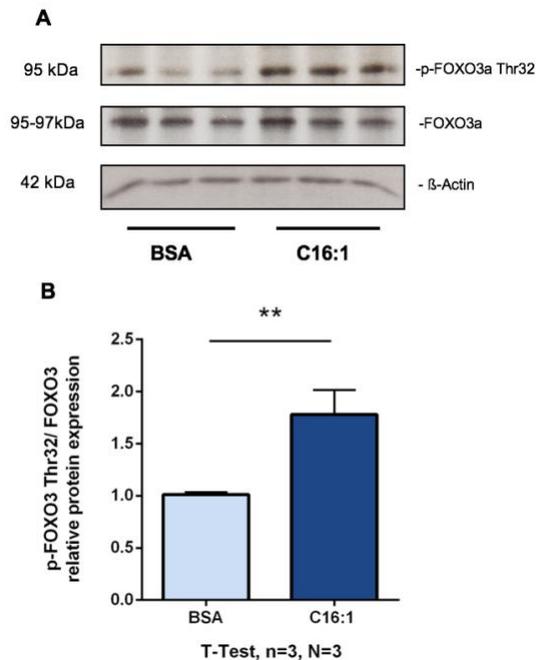


Abbildung 20: C16:1 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Thr32) in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-FOXO3a (Threonin 32) sowie gesamt FOXO3a und β-Actin als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test, ** p < 0.01.

Interessanterweise erschien die Gesamtproteinmenge an FOXO3a ebenfalls unter C16:1 Behandlung hochreguliert zu sein (s. Abbildung 19, 20). Obwohl sich die beobachtete Heraufregulation der FOXO3a Gesamtproteinmenge in diversen Wiederholungsversuchen reproduzieren ließ (s. Abbildung 19,20), wurden zur genaueren Überprüfung des Resultats zusätzliche Ladungskontrollen mit beta-Actin durchgeführt. Beta-Actin zeigte sich unterhalb der Proben konstant exprimiert, was die beobachtete gesamt FOXO3a Heraufregulation durch C16:1 bestätigt (s. Abbildung 19, 20).

5.2.2 Versuchsreihe zur Regulation der FOXO Stabilität

Nachdem eruiert wurde, welche FOXO Subtypen durch C16:1 reguliert sind, stellte sich die Frage, ob Palmitoleinsäure ebenfalls die Stabilität von FOXO beeinflusst. Die in 5.2.1 aufgezeigte Phosphorylierung von FOXO impliziert die Inaktivierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren unter C16:1 Stimulation. Entsprechend des in 1.6.2.1 dargestellten Schemas bezüglich der subzellulären FOXO-Translokation, sollte die phosphorylierte Form

von FOXO stets einen zytosolischen Transport aus dem Nukleus heraus erfahren [201]. Vor dem Hintergrund, dass die FOXO-Transkriptionsfaktoren außerhalb des Nukleus ihre transkriptionelle Aktivität verlieren, sollte FOXO im Zytosol ubiquitiniert und letztendlich über das Proteasom der Zelle abgebaut werden [201]. Da in 5.2.1 dargestellt wurde, dass C16:1 zur Inaktivierung von FOXO führt, wird angenommen, dass die Gesamtmenge der FOXO-Transkriptionsfaktoren bzw. deren Stabilität ebenfalls unter C16:1-Einfluss reguliert sein könnte.

5.2.2.1 Gesamt FOXO1

Zur Überprüfung des Effektes von C16:1 auf die Stabilität von FOXO wurde IGF-1 als Positivkontrolle verwendet, da Liu et al. zeigten, dass IGF-1, der natürliche Ligand der PI3K-AKT-Signalkaskade, nach einer 18-stündigen Stimulation eine bemerkenswerte Herunterregulation des Gesamt-FOXO1-Gehaltes in HL-1 Kardiomyozyten bewirkt [135]. Zur Verifizierung der Hypothese, dass C16:1 einen vergleichbaren Effekt wie IGF-1 auf die Gesamtproteinmenge von FOXO bewirken könnte, wurden die HL-1 Zellen, analog zu den bereits publizierten Daten zu IGF-1, 18 Stunden lang mit Palmitoleinsäure behandelt und mithilfe der in 4.3 geschilderten Western Blot-Methode analysiert [135]. Zur FOXO Gesamtprotein-Detektion wurden die monoklonalen Antikörper Anti-FOXO1 sowie Anti-FOXO3a verwendet. Nach der 18-stündigen C16:1 Stimulation konnte eine hochsignifikante Reduktion des Gesamt-FOXO1-Gehaltes ($p < 0,001$) im Vergleich zu der unbehandelten BSA-Kontrolle demonstriert werden. Ebenfalls konnte die IGF-1 vermittelte, signifikante Verminderung von FOXO1 ($p < 0,0001$) im Vergleich zur Vehikelkontrolle gemäß Liu et al. reproduziert werden. Die geschilderten Resultate der FOXO1 Stabilitäts-Experimente werden in Abbildung 21 dargestellt.

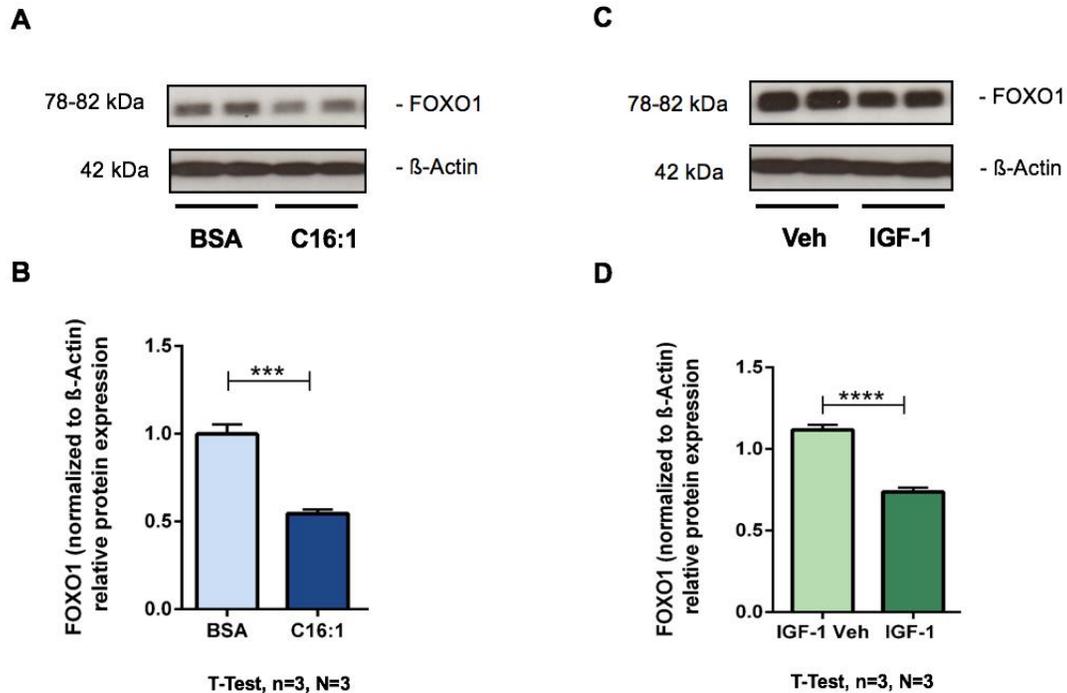


Abbildung 21: C16:1 bewirkt die Reduktion der FOXO1 Gesamtproteinmenge in HL-1 Zellen
 HL-1 Zellen wurden 18h lang entweder mit 40 mM C16:1 und BSA-Kontrolle oder mit 10 nM IGF-1 und IGF-1 Vehikelkontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von gesamt FOXO1 sowie β -Actin als Proteinladungskontrolle unter 18h BSA/C16:1 Stimulation. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. **C** Western Blot Analyse von gesamt FOXO1 sowie β -Actin als Proteinladungskontrolle unter 18h IGF-1 Vehikel/IGF-1 Stimulation. **D** Densitometrische Analyse des in C dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2.2.2 Gesamt FOXO3a

Nachdem die Auswirkung von C16:1 auf die Stabilität von FOXO1 analysiert wurde, wurde in einem zweiten Versuchsansatz untersucht, ob die Gesamtproteinmenge von FOXO3a ebenfalls durch Palmitoleinsäure beeinflusst wird. Um zu prüfen, ob C16:1 übereinstimmend mit dem Effekt auf FOXO1 eine mögliche Reduktion des FOXO3a-Gehaltes bewirkt, wurden die HL-1 Kardiomyozyten analog zum Vorgehen in 5.2.2.1 einer 18-stündigen Stimulation unterzogen und mittels der Antikörper Anti-FOXO3a sowie Anti- β -Actin untersucht. Als Vehikelkontrolle kam erneut 10%iges BSA zum Einsatz.

Es ließ sich eine signifikante Herunterregulation ($p < 0,01$) des FOXO3a-Gehaltes durch C16:1 Stimulation im Vergleich zur BSA-Kontrolle zeigen (s. Abbildung 22). Übereinstimmend mit der Auswirkung von IGF-1 auf die FOXO1 Stabilität (s. Abschnitt

5.2.2.1), ließ sich derselbe Effekt für den Transkriptionsfaktor FOXO3a demonstrieren. Auch hier bewirkte die Behandlung mit IGF-1 eine deutliche Reduktion des FOXO3a-Gesamt-Gehaltes, welche nach statistischer Auswertung ferner das Signifikanzniveau erreichte ($p < 0,01$). Die genannten Ergebnisse der FOXO3a Stabilitäts-Experimente werden in Abbildung 22 dargestellt.

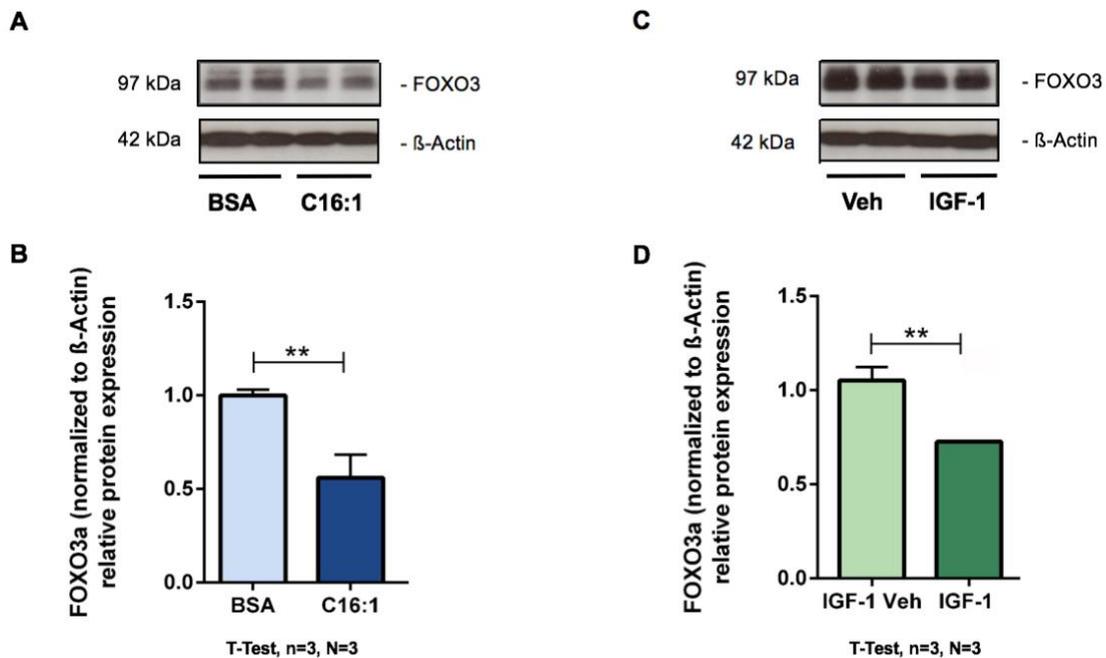


Abbildung 22: C16:1 bewirkt die Reduktion der FOXO3 Gesamtproteinmenge in HL-1 Zellen
 HL-1 Zellen wurden 18h lang entweder mit 40 mM C16:1 und BSA-Kontrolle oder mit 10 nM IGF-1 und IGF-1 Vehikelkontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von gesamt FOXO3a sowie β -Actin als Proteinladungskontrolle unter 18h BSA/C16:1 Stimulation. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. **C** Western Blot Analyse von gesamt FOXO3a sowie β -Actin als Proteinladungskontrolle unter 18h IGF-1 Vehikel/IGF-1 Stimulation. **D** Densitometrische Analyse des in C dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test, ** $p < 0.01$

5.2.3 Zusammenfassung und Vergleich mit C16:0 und IGF-1

Um genauere mechanistische Einblicke in die Wirkungsweise von Palmitoleinsäure zu erlangen, wurde der Einfluss von C16:1 auf FOXO untersucht. Nachdem identifiziert wurde, welche FOXO Subtypen durch Palmitoleinsäure reguliert werden und zudem die Stabilität dieser betrachtet wurde, erfolgten Kontrollexperimente mit IGF-1 und Palmitinsäure (C16:0). Hierbei handelt es sich um eine vollgesättigte, strukturell fast identische Fettsäure, welche

laut Literatur jedoch im Gegensatz zu C16:1 keine prohypertrophen Effekte vermittelt [128]. Um nachzuweisen, dass sich der Wirkmechanismus der zwei beinahe identischen Fettsäuren unterscheidet, erfolgten weitere Zellkulturexperimente, in welchen die HL-1 Kardiomyozyten anstelle von C16:1 30 Minuten lang mit C16:0 behandelt wurden. Analysiert wurde der Phosphorylierungsgrad von FOXO3a Serin318/321. Die genannte Phosphorylierungsstelle wurde ausgewählt, da sie sich in den zuvor erfolgten Western Blot-Versuchen am stärksten durch C16:1 reguliert erwies. Die Proteindetektion von p-FOXO3a Ser318/321 erfolgte analog zur Vorgehensweise in 5.2.1.2. Deutlich zu erkennen war eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung von FOXO3a in den C16:0 behandelten Proben, verglichen mit der zugehörigen BSA-Kontrolle (vgl. Abbildung 23 A/B). Hingegen blieb p-FOXO3a S318/321 unter IGF-1 Stimulation im Vergleich zur Vehikelkontrolle nahezu unverändert (vgl. Abbildung 23 C/D).

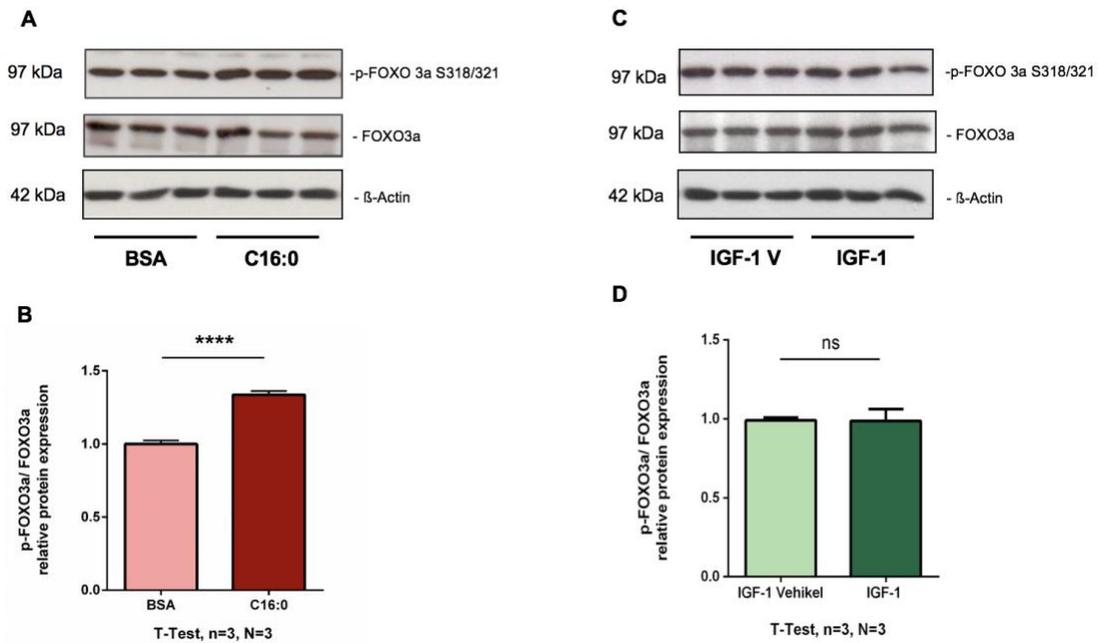


Abbildung 23: C16:0 induziert FOXO3a-Phosphorylierung (Ser318/321) während IGF-1 keinerlei Auswirkung auf p-FOXO3a (Ser318/321) in HL-1 Zellen hat

HL-1 Zellen wurden 30 min lang entweder mit 130 mM C16:0 und BSA-Kontrolle oder mit 10 nM IGF-1 und IGF-1 Vehikelkontrolle stimuliert. **A, C** Western Blot Analyse von p-FOXO3a (Serin318/321) sowie gesamt FOXO3a als Proteinladungskontrolle. **B, D** Densitometrische Analyse der in A, C dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test, **** p < 0.0001, ns p > 0.05.

Die Gesamtproteinmenge an FOXO3a blieb zwischen den verschiedenen Stimulationssubstanzen konstant exprimiert (vgl. Abbildung 23). Dies stellt einen Unterschied zwischen der Wirkung von C16:0 und C16:1 dar. Denn anhand Abschnitt 5.2.1.2 konnte gezeigt werden, dass C16:1 neben der Induktion einer FOXO3a-Phosphorylierung, ebenfalls eine Steigerung der FOXO3a-Gesamtmenge bewirkt.

5.3 FOXO Translokationsanalyse

Da C16:1 auf Proteinebene eine vielfältige Regulation der FOXO-Transkriptionsfaktoren bewirkt, stellte sich die Frage, welchen Effekt C16:1 auf die transkriptionelle Aktivität von FOXO ausübt. Hierfür wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von FOXO unter C16:1 Stimulation mittels Immunfluoreszenzmikroskopie genauer betrachtet. Die HL-1 Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und gemäß Abschnitt 5.2.1 30 Minuten lang mit C16:1 und der entsprechenden BSA-Kontrolle stimuliert. Bei der FOXO Translokationsanalyse wurde der Fokus auf FOXO3a gelegt, da sich diese Isoform von FOXO in Abschnitt 5.2 als am deutlichsten durch C16:1 reguliert erwies. In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass eine Stimulation mit BSA (Kontrolle) eine überwiegend nukleäre Lokalisation von FOXO3a bewirkt. Demgegenüber zeigt sich unter C16:1 Stimulation ein deutlicher zytosolischer Export von FOXO3a aus dem Zellkern heraus. Die zytosolische Translokation von FOXO3a durch C16:1 weist darauf hin, dass die FOXO-Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss von C16:1 aus dem Nukleus heraustransportiert werden und somit womöglich ihre transkriptionelle Aktivität reduziert wird.

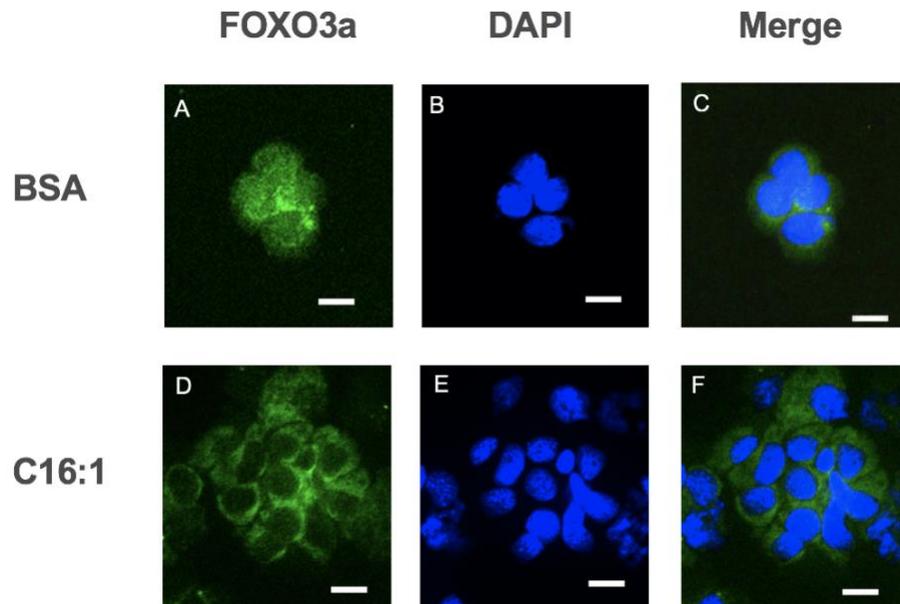


Abbildung 24: C16:1 induziert die zytosolische Translokation von FOXO3a in HL-1 Zellen

Repräsentative Immunfluoreszenzmikroskopie Bilder von HL-1 Kardiomyozyten, welche mit 40 mM C16:1 (D, E, F) oder BSA-Kontrolle (A, B, C) für 30 min behandelt wurden. Die Zellen wurden um einen Faktor von 40x mit dem KEYENCE Fluorescence Microscope BZ-X700 vergrößert. Der angegebene Maßstab misst 30 µm. **A** FOXO3a Färbung unter BSA Stimulation. **B** DAPI Zellkern Färbung. **C** „Merge“ = Überlagerung von BSA stimulierter FOXO3a- sowie DAPI Zellkern-Färbung. **D** FOXO3a Färbung unter C16:1 Stimulation. **E** DAPI Zellkern Färbung. **F** „Merge“= Überlagerung von C16:1 stimulierter FOXO3a- sowie DAPI Zellkern-Färbung.

Zusammenfassend konnte in Abschnitt 5.2 und 5.3 gezeigt werden, dass C16:1 FOXO auf Proteinebene mittels Phosphorylierung hemmt. Zudem beeinflusst C16:1 die subzelluläre Lokalisation von FOXO, indem C16:1 die Translokation von FOXO3a aus dem Nukleus heraus in das Zytoplasma der Zelle bewirkt.

5.4 Einfluss von C16:1 auf die FOXO-Zielgenexpression

Um den Einfluss von C16:1 auf die transkriptionelle Aktivität von FOXO genauer zu verstehen, wurde neben der durchgeführten Immunfluoreszenz-Translokationsanalyse ferner die FOXO-Zielgenexpression mittels qRT-PCR untersucht. Hierzu erfolgten weitere Zellkulturexperimente, in denen HL-1 Kardiomyozyten mit C16:1 oder der entsprechenden Vehikelkontrolle (10 %iges, Fettsäure freies BSA) stimuliert wurden. Als Stimulationsintervalle wurden diverse Zeitpunkte zwischen 6 und 48 Stunden gewählt.

Anschließend erfolgten RNA Präparation, cDNA Synthese sowie quantitative Real Time PCR-Messungen gemäß Abschnitt 4.5. Bei den FOXO-Genexpressionsanalysen wurde der Fokus erneut auf FOXO3a gelegt, da sich diese Isoform der FOXO-Transkriptionsfaktoren in Abschnitt 5.2 und 5.3 als am stärksten durch C16:1 reguliert erwies. Untersucht wurde das Expressionsniveau der FOXO3a Zielgene MuRF1, Atrogin-1/MAFbx sowie p21.

5.4.1 Messung der MuRF1 und Atrogin-1 mRNA Expression

Nach 24- sowie 48-stündiger Stimulation zeigten die C16:1 behandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Atrogin-1 mRNA-Menge im Vergleich zu den Zellen, die mit BSA behandelt wurden ($p > 0,05$) (s. Abbildung 25 A). Parallel zu den Beobachtungen der Atrogin-1 Genexpression, ergab die Behandlung mit C16:1 ebenfalls keine signifikante Regulation von MuRF1 gegenüber der BSA-Vehikelkontrolle ($p > 0,05$). Vielmehr blieb das Expressionsniveau des FOXO3a-Zielgens MuRF1 unter 24- sowie 48-stündiger C16:1 Stimulation unverändert (s. Abbildung 25 B).

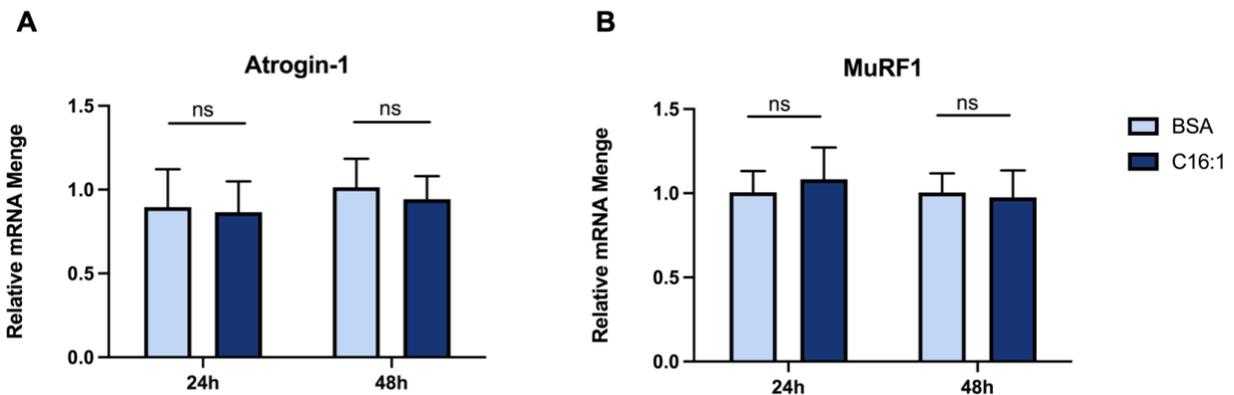


Abbildung 25: C16:1 bewirkt keine Regulation der FOXO3a-Zielgene MuRF1 und Atrogin-1 in HL-1 Zellen

A, B qRT-PCR Analyse von HL-1 Kardiomyozyten. HL-1 Zellen wurden 24h sowie 48h lang mit 40 mM C16:1 und entsprechender BSA Kontrolle stimuliert. **A** Atrogin-1/MAFbx. **B** MuRF1: Muscle Ring Finger 1. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Zweifache Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA), ns $p > 0.05$.

5.4.2 Messung der p21 mRNA-Menge

Um den Einfluss von C16:1 auf die FOXO-Zielgeninduktion näher erfassen zu können, wurde die mRNA-Expression eines weiteren FOXO3a-Zielgens gemessen. Hierzu wurde die Genexpression von p21 analog zu der Vorgehensweise aus Abschnitt 5.4.1 nach C16:1 oder BSA Stimulation mittels qRT-PCR quantifiziert. Nach dem Stimulationsintervall von 24 Stunden ließen sich signifikant höhere Mengen an p21-mRNA in den C16:1 behandelten Zellen im Verhältnis zur BSA-Kontrolle detektieren ($p < 0,01$) (s. Abbildung 26). Parallel dazu zeigte sich nach 48-stündiger C16:1 Behandlung erneut eine deutliche Induktion der p21-Genexpression ($p < 0,01$) (s. Abbildung 26). Im Gruppenvergleich mittels Two-Way-ANOVA ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied des p21-Genexpressionsniveaus zwischen den verschiedenen Stimulationszeitpunkten demonstrieren.

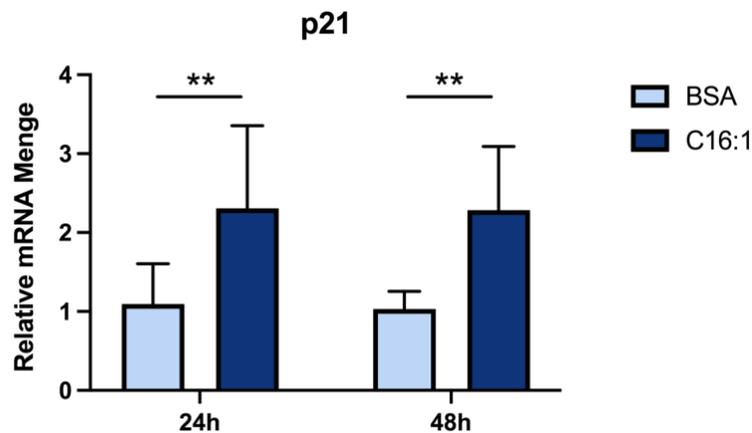


Abbildung 26: C16:1 induziert die Genexpression des FOXO3a-Zielgens p21 in HL-1 Zellen

qRT-PCR Analyse von p21 in HL-1 Kardiomyozyten. HL-1 Zellen wurden 24h sowie 48h lang mit 40 mM C16:1 und entsprechender BSA-Kontrolle stimuliert. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Zweifache Varianzanalyse (Two-way-ANOVA) mit Bonferroni Post-hoc Test, ** $p < 0.01$.

Summa summarum zeigte C16:1 keinerlei Auswirkung auf die Genexpression der FOXO3a-Zielgene Atrogin-1 und MuRF1. Hingegen wurde das FOXO3a-Zielgen p21 durch C16:1 Stimulation signifikant hochreguliert trotz des in Abschnitt 5.3 gezeigten C16:1-induzierten zytoplasmatischen Transportes des Transkriptionsfaktors FOXO3a. Dies weist womöglich auf eine FOXO3a unabhängige Regulation von p21 hin.

5.5 Einfluss von C16:1 auf die Regulation der ERK 1/2 Kinase

Nachdem dargestellt wurde, dass die Genexpression des Zellzyklusregulators p21 durch C16:1 reguliert wird, sollte der Effekt von C16:1 auf weitere Modulatoren des Zellzyklus untersucht werden. Laut Literatur vermittelt der CDK-Inhibitor p21 eine anti-proliferative Wirkung, indem p21 die Zellzyklus-Progression der Zelle von der G- in die S1-Phase unterbindet [204,205]. Daher sollte im Anschluss an die p21 qRT-PCR Versuchsreihe ein weiterer Regulator von Zellproliferation und Zellzyklus-Progression analysiert werden. In diesem Kontext erschien die „Extracellular-Signal Regulated Kinase“ (ERK) von besonderer Relevanz, deren Aktivität vom eigenen Phosphorylierungsgrad determiniert wird [181]. Laut Literatur ist ferner bekannt, dass die Isoform ERK 1/2, als zentraler Bestandteil des MAPK-Signalweges, eine starke Zellzyklus regulierende Wirkung aufweist und Zellproliferation sowie Zellzyklus-Fortgang maßgeblich reguliert [206,207].

Die HL-1 Zellen wurden analog zu der Vorgehensweise des Abschnittes 5.2.1 einer 30-minütigen C16:1 Behandlung unterzogen und mithilfe der Western Blot-Technik analysiert. Nach dem 30-minütigen Stimulationsintervall ließ sich eine hochsignifikante Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung von ERK 1/2 im Vergleich zur BSA-Kontrolle demonstrieren (s. Abbildung 27). Diese erreichte nach densitometrischer Auswertung und statistischer Kalkulation ein Signifikanzniveau von ($p < 0,0001$) (s. Abbildung 27 B). Die Gesamtproteinmenge an ERK 1/2 blieb zwischen den unterschiedlich behandelten Proben konstant exprimiert (vgl. Abbildung 27).

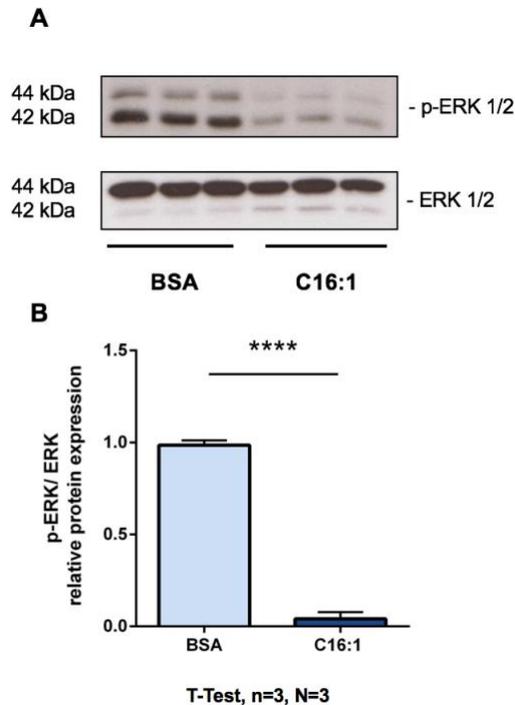


Abbildung 27: C16:1 induziert ERK 1/2-Dephosphorylierung nach 30 Minuten in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-ERK 1/2 (phospho-p44/42 MAPK) sowie gesamt ERK 1/2 als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test , **** p<0.0001.

Um den Effekt von C16:1 auf den Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2 genauer zu untersuchen, wurden weitere Zellkulturexperimente durchgeführt, in denen die HL-1 Zellen einer 15- bzw. 5-minütigen C16:1 Stimulation unterzogen wurden. Parallel zu den im Voraus geschilderten Resultaten, konnte die signifikante Reduktion des ERK 1/2-Phosphorylierungsgrades ebenfalls nach dem 15- sowie 5-minütigen C16:1 Stimulationsintervall beobachtet werden (s. Abbildung 28). Während C16:1 zu allen Zeitpunkten eine deutliche ERK-Dephosphorylierung im Vergleich zur BSA-Kontrolle induziert, zeigt sich die Gesamtproteinmenge an ERK 1/2 zwischen den verschiedenen Proben jedoch unverändert (s. Abbildung 28).

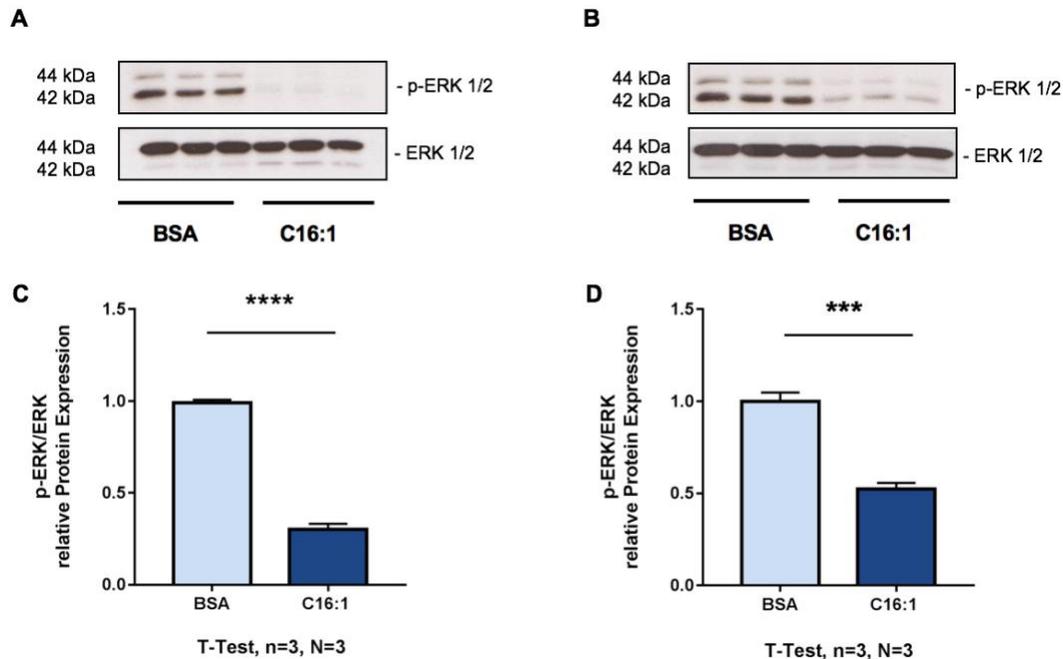


Abbildung 28: C16:1 induziert ERK 1/2-Dephosphorylierung nach 15 und 5 Minuten in HL-1 Zellen

A HL-1 Zellen wurden 15 min lang mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. Western Blot Analyse von p-ERK 1/2 (phospho-p44/42 MAPK) sowie gesamt ERK 1/2 als Proteinladungskontrolle. **B** HL-1 Zellen wurden 5 min lang mit 40 mM C16:1 oder BSA-Kontrolle stimuliert. Western Blot Analyse von p-ERK 1/2 (phospho-p44/42 MAPK) sowie gesamt ERK 1/2 als Proteinladungskontrolle. **C** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. **D** Densitometrische Analyse des in B dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's t-test , *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Nachdem der Einfluss von Palmitoleinsäure (C16:1) auf die ERK 1/2 Kinase genauer untersucht wurde, erfolgten Kontrollexperimente mit Palmitinsäure (C16:0). Um zu überprüfen, ob sich der Wirkmechanismus der beiden fast identischen Fettsäuren in Bezug auf ERK 1/2 unterscheidet, erfolgten weitere Stimulationsexperimente. Hierbei wurden die HL-1 Kardiomyozyten anstatt mit C16:1, 30 Minuten lang mit C16:0 behandelt. Um eine eindeutige Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde das weitere experimentelle Prozedere aus Abschnitt 5.5 beibehalten. Es zeigte sich, dass der Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2 in den C16:0 behandelten Proben im Vergleich zur BSA-Kontrolle unverändert blieb (s. Abbildung 29). Dies stellt einen bedeutsamen Unterschied zu der Wirkweise von C16:1 dar, welche eine signifikante Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung von ERK 1/2 induziert. Der Gesamtproteingehalt von ERK 1/2 erwies sich unter C16:0 Stimulation als konstant exprimiert im Vergleich zur BSA-Vehikelkontrolle.

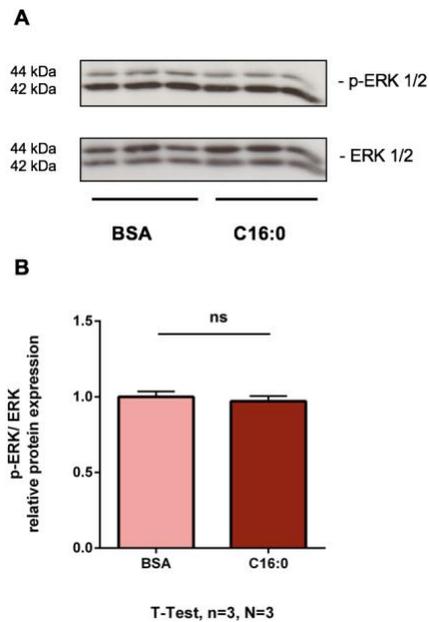


Abbildung 29: C16:0 hat keinerlei Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von ERK 1/2 in HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden 30 min lang jeweils mit 130 mM C16:0 oder BSA-Kontrolle stimuliert. **A** Western Blot Analyse von p-ERK 1/2 (phospho-p44/42 MAPK) sowie gesamt ERK 1/2 als Proteinladungskontrolle. **B** Densitometrische Analyse des in A dargestellten Western Blots mittels Image J Software. N=3, n=3. Mittelwert + SD, Daten werden präsentiert als x-fache Änderung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Ungepaarter Student's T-test , ns $p > 0.05$

C16:1 hemmt die Aktivität der Zellzyklus-regulierenden Kinase ERK 1/2 mittels signifikanter Dephosphorylierung auf Proteinebene. Die beobachtete Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung von ERK 1/2 ließ sich nicht durch C16:0 induzieren.

6 Diskussion

Nachdem kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Palmitoleinsäure (C16:1) als Mediator physiologischer kardialer Hypertrophie (PCH) agiert, war das vorrangige Ziel dieser Arbeit, den genauen molekularen Wirkmechanismus von C16:1 zu entschlüsseln. Um tiefere Einblicke in die zellulären Effekte von C16:1 zu erlangen, wurde der Effekt von C16:1 auf die PI3K-AKT-FOXO Signalkaskade erstmalig in dieser Arbeit untersucht. Hierbei lag der primäre Fokus darauf, die in Abschnitt 2 hypothetisierte C16:1-vermittelte Regulation der FOXO-Transkriptionsfaktoren auf posttranslationaler Proteinebene sowie auf Translokations- und Genexpressionsebene zu analysieren. Darüber hinaus wurde eine potentielle Beteiligung des MAPK-Signalweges an der zellulären Wirkweise von C16:1 untersucht. Die zentralen experimentellen Beobachtungen dieser Arbeit werden im Folgenden diskutiert, bewertet und in den Kontext aktueller Publikationen eingeordnet.

6.1 Palmitoleinsäure reguliert FOXO1 und FOXO3a an verschiedenen funktionellen Seitenketten mittels Phosphorylierung

Da Foryst-Ludwig et al. unlängst die Aktivierung der Proteinkinase AKT durch C16:1 darstellen konnten, lag der initiale Fokus dieser Arbeit darauf, den Effekt von C16:1 auf die direkten AKT-Substrate, die FOXO-Transkriptionsfaktoren, zu eruieren [131]. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die C16:1-gesteuerte Regulation der FOXO-Isoformen 1 und 3a mittels posttranslationaler Phosphorylierung aufgezeigt werden. Nach einem 30-minütigen C16:1 Stimulationsintervall ließ sich per Western Blot eine signifikante Steigerung des Phosphorylierungsgrades von FOXO1 sowie FOXO3a an diversen funktionellen Seitenketten demonstrieren: FOXO1 Serin256, FOXO1 Threonin24, FOXO3a Serin318/321, FOXO3a Threonin32. Diese experimentellen Beobachtungen sind ein erster Hinweis darauf, dass die Familie der FOXO-Transkriptionsfaktoren durch C16:1 reguliert wird. Wie in Abschnitt 1.6.2.1 beschrieben, verursacht die Phosphorylierung von FOXO die transkriptionelle Inaktivierung der FOXO-Proteine. Demnach weist diese Arbeit die Hemmung der FOXO-Transkriptionsfaktoren 1 und 3a durch C16:1 nach.

Da die FOXO-Proteine im aktiven Zustand zelluläre Wachstumsprozesse antagonisieren und Atrophie manifestieren begünstigen, scheint die Inhibition von FOXO eine zentrale Rolle im Entstehungsmechanismus der C16:1-vermittelten PCH einzunehmen. Die beobachtete Phosphorylierung bzw. Inaktivierung von FOXO durch C16:1 kongruiert gut mit den Ergebnissen von Foryst-Ludwig et al. hinsichtlich der C16:1-gesteuerten Aktivierung der Proteinkinase AKT [131]. Da AKT als elementarer Mediator kardialer Wachstumsprozesse gilt und FOXO im aktivierten, dephosphorylierten Zustand als dessen Gegenspieler fungiert, bestärken die in dieser Arbeit erhobenen Western Blot-Daten die These, dass sowohl AKT als auch FOXO in den molekularen Wirkmechanismus von C16:1 involviert sind [166]. Demzufolge aktiviert C16:1 die prohypertroph wirkende Proteinkinase AKT, während Wachstumsinhibition durch die Inaktivierung von FOXO unterbunden wird. Auf diese Weise kann C16:1 das zelluläre Gleichgewicht zwischen Proteinbiosynthese und Proteindegradation in Richtung Proteinsynthese und Hypertrophie manifestieren verschieben. Dieser Mechanismus erscheint plausibel, um die C16:1-vermittelten kardialen Wachstumsprozesse auf molekularbiologischer Ebene zu erklären.

Weltweit beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit den FOXO-Transkriptionsfaktoren im Kontext kardialer Hypertrophie [176,208–212]. Die Beteiligung der FOXO-Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung kardialer Hypertrophie ist daher bereits in Grundzügen erforscht. Die Arbeitsgruppe um Ni et al. konnte tierexperimentell nachweisen, dass die FOXO-Isoformen 1 und 3a negative Regulatoren physiologischer kardialer Hypertrophie darstellen, indem aktiviertes FOXO die Calcineurin/NFAT Signalkaskade hemmt [176]. Zudem beobachteten Ni et al., dass FOXO3a-Knockout Mäuse eine 10 %ige Zunahme der Herzmasse im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe entwickelten, ohne dass Marker pathologischer Hypertrophie wie ANF oder β -MHC auf Genexpressionsebene hochreguliert wurden oder sich echokardiographisch eine systolische Dysfunktion detektieren ließ [176]. Ni. et al untersuchten FOXO ebenfalls im Kontext pathologischer kardialer Hypertrophie und konnten proteinbiochemisch in linksventrikulären Kardiomyozyten zeigen, dass sowohl FOXO1 als auch FOXO3a mittels Phosphorylierung im Rahmen TAC-induzierter kardialer Hypertrophie bei C57BL6 Mäusen inaktiviert werden [176]. Dies validiert die Annahme, dass die Inaktivierung von FOXO einen wichtigen Mechanismus darstellt, durch den sich Hypertrophie kompensatorisch auf eine erhöhte hämodynamische Belastung am Herzen

manifestieren kann [176]. Die Daten von Ni et al. bekräftigen daher die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass sowohl FOXO1 als auch FOXO3a inaktiviert werden, um die C16:1-induzierten kardialen Wachstumsprozesse ermöglichen zu können. Sengupta et al. verifizierten die von Ni et al. publizierten Daten, indem sie in einem *in-vitro* Ansatz FOXO1 in NRVM Kardiomyozyten überexprimierten. In den FOXO1-überexprimierenden Zellen konnten Sengupta et al. eine signifikante Reduktion der NRVM-Zellgröße im Vergleich zur Vehikelkontrolle zeigen [208]. Durch einen FOXO1-Knockout, ließ sich dieser wachstumshemmende Effekt jedoch nicht mehr darstellen [208]. Sengupta et al. konnten somit FOXO1 als wichtigen Regulator zellulärer Größe in NRVM-Kardiomyozyten nachweisen [208]. Der Stellenwert von FOXO3a für kardiale Hypertrophie- bzw. Atrophieprozesse wurde ferner von Schips et al. untersucht [209]. In einem transgenen Mausmodell konnten Schips et al. bei konstitutiv-exprimierenden FOXO3a-Mäusen eine signifikante Abnahme des Herzgewichts um 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe demonstrieren [209]. Die Herzgewichtsreduktion der transgenen Mäuse ließ sich ausschließlich auf die Verminderung von Kardiomyozytengröße zurückführen, nicht aber auf eine gesteigerte zelluläre Apoptose [209]. Schips et al. und Sengupta et al. konnten FOXO folglich im murinen Organismus bzw. in der NRVM Zelllinie als negativen Regulator kardialer Wachstumsprozesse charakterisieren [208,209]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigten Fang et al. in einem FVB-Mausmodell, dass die Phosphorylierung von AKT sowie die von FOXO3a ausschlaggebend für die Manifestation kardialer Hypertrophie im murinen Organismus zu sein scheint [210]. Fang et al. zeigten, dass eine hochkalorische Diät kardiale Hypertrophie durch die Inaktivierung von FOXO3a bei FVB-Mäusen bewirkt [210]. Während sich molekularbiologisch die Phosphorylierung von FOXO3a zeigte, bestätigte sich die kardiale Hypertrophie der hochkalorisch ernährten Mäuse durch funktionale Parameter wie bspw. einer 24 %-igen Zunahme der LVM sowie einer echokardiographisch detektierten 25 %-igen Reduktion des fractional shortening [210]. Da sich unsere Resultate mit den Ergebnissen internationaler Arbeitsgruppen decken, erscheint die These, dass die Phosphorylierung von FOXO eine elementare Rolle bei der Vermittlung der C16:1-induzierten PCH spielt, plausibel. Zukünftig weiter zu verfolgen wäre jedoch ebenfalls die Bedeutung der von Ni et al. diskutierten Calcineurin-NFAT Signalkaskade bei der Entstehung von C16:1-induzierter PCH. Dies lässt sich darauf

zurückführen, dass laut Literatur neben der PI3K-AKT Signalkaskade auch der Calcineurin-NFAT Pathway in den Mechanismus involviert sein könnte, wodurch phosphorylierte FOXO-Transkriptionsfaktoren kardiale Hypertrophie begünstigen [211].

6.1.1 Palmitoleinsäure bewirkt die funktionale Interaktion von AKT und FOXO im Kontext physiologischer kardialer Hypertrophie

Vor dem im vorherigen Abschnitt sowie in Abschnitt 1.6 beschriebenen theoretischen Hintergrund der PI3K-AKT Signalkaskade, in dem die Hemmung von FOXO durch die weiter Upstream gelegene Proteinkinase AKT erläutert wird, ist davon auszugehen, dass C16:1 eine funktionale Interaktion zwischen AKT und FOXO bewirkt.

Im Kontext von PCH wurde die funktionale Interaktion von AKT und FOXO bereits näher untersucht. In einem transgenen Mausmodell demonstrierten Li et al., dass die Überexpression von FOXO1 sowie FOXO3a die prohypertrophen kardialen Effekte von AKT antagonisiert [203]. Darüber hinaus zeigten Ni et al., dass dephosphoryliertes, aktiviertes FOXO3a durch eine negative Feedback-Inhibition seinen direkten Upstream-Regulator AKT mittels Phosphorylierung aktiviert [177]. Mithilfe dieses negativen Feedback-Mechanismus initiiert aktiviertes FOXO3a somit die eigene Hemmung mittels AKT-gesteuerter Phosphorylierung [177]. Die Daten von Ni et al. suggerieren demzufolge, dass die funktionale Interaktion von AKT und FOXO in beide Richtungen verläuft [177]. Diese Beobachtungen sind ein erster Anhalt dafür, dass nicht nur AKT die Aktivität von FOXO via Phosphorylierung kontrolliert, sondern dass FOXO ebenfalls die Aktivität der Proteinkinase AKT regulieren könnte [177]. Daraus wäre zu folgern, dass AKT nicht nur den Upstream gelegenen Regulator des nachgeschalteten Signalmoleküls FOXO darstellt, sondern dass AKT ebenfalls ein Substrat von FOXO3a sein könnte. Da eine potentiell bidirektional verlaufende Interaktion von AKT und FOXO nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, bleibt derzeit ungeklärt, ob die von Ni et al. erhobenen Daten auf C16:1 stimulierte HL-1 Kardiomyozyten übertragbar wären. Diese Fragestellung bedarf daher zukünftig weiterer Abklärung.

Sicher ist jedoch, dass C16:1 mindestens eine unidirektionale Interaktion von AKT und FOXO bewirkt. Denn die in dieser Arbeit dargestellte C16:1-vermittelte Phosphorylierung von FOXO erfolgt primär an AKT-regulierten Phosphorylierungsstellen. Brunet et al.

bewiesen bereits 1999, dass AKT FOXO3a an drei verschiedenen Seitenketten phosphoryliert: Thr32, Ser253 sowie Ser315 [166]. Ferner zeigten Guo et al., dass AKT FOXO1 an folgenden Phosphorylierungsstellen reguliert: Thr24, Ser256, Ser319 [200]. Zudem wurde bereits dargestellt, dass AKT FOXO4 an der Seitenkette Thr28 phosphoryliert [213]. Summa Summarum konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass C16:1 die FOXO-Transkriptionsfaktoren beinahe an allen AKT-regulierten Seitenketten reguliert. Diese Beobachtungen kongruieren mit der in Abschnitt 2 getätigten Annahme, dass C16:1 PCH durch eine Interaktion von AKT und FOXO induziert. Allerdings ist hervorzuheben, dass die C16:1-induzierte Hemmung von FOXO ebenfalls durch zwei AKT-unabhängige Phosphorylierungsstellen reguliert wird, FOXO3a Ser318/ Ser321. Diese FOXO3a Seitenketten werden laut Literatur anstelle von AKT durch die Casein Kinase 1 (CK1) reguliert [157,214]. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass sich die prohypertrophe Wirkung von C16:1 nicht nur durch AKT, sondern mindestens durch einen weiteren relevanten molekularen Signalvermittler entfaltet. Interessanterweise finden sich laut Literatur Hinweise darauf, dass die CK1-vermittelte Inhibition von FOXO3a AKT-abhängig verläuft [214]. Rena et al. demonstrierten, dass die AKT-gesteuerte Phosphorylierung der FOXO3a Seitenkette Ser315 die strukturelle Voraussetzung für die CK1-vermittelte Phosphorylierung der Seitenketten Ser 318/321 darstellt [214]. Zukünftig genauer zu verfolgen ist demzufolge der Effekt von Palmitoleinsäure auf die CK1. Zugleich wirft sich die Frage auf, ob Palmitoleinsäure eine funktionale Interaktion zwischen der Proteinkinase AKT und der Casein Kinase 1 bewirkt.

6.2 Palmitoleinsäure steigert nach kurzfristigem Stimulationsintervall die zelluläre Gesamtproteinmenge an FOXO3a

Beim Betrachten der in Abschnitt 5.2 dargestellten Western Blot Ergebnisse hinsichtlich der C16:1-vermittelten Phosphorylierung von FOXO, kommt dem Transkriptionsfaktor FOXO3a eine besondere Bedeutung zu. Obwohl C16:1 eine statistisch signifikante Phosphorylierung von zwei verschiedenen FOXO-Isoformen induziert, erwies sich p-FOXO3a am stärksten durch C16:1 reguliert. Interessanterweise zeigte sich die Gesamtproteinmenge an FOXO3a ebenfalls durch eine 30-minütige C16:1 Behandlung hochreguliert, trotz einer konstant exprimierten Proteinladungskontrolle. Es lässt sich daher konkludieren, dass C16:1

entweder die Synthese des Proteins FOXO3a steigert oder den zellulären FOXO3a-Abbau vermindert. Auf theoretischer Grundlage müsste die Phosphorylierung von FOXO, wie in der Einleitung in Abschnitt 1.6.2.1 beschrieben, die transkriptionelle Inaktivierung, den zytosolischen Export sowie die proteasomale Degradation von Gesamt-FOXO bewirken. Infolgedessen wäre vielmehr eine Reduktion der FOXO3a Gesamtproteinmenge nach C16:1 Stimulation zu erwarten, anstatt der hier aufgezeigten Hochregulation von Gesamt-FOXO3a. Diese Beobachtung stellt daher eine Kontroverse zu der in Abschnitt 2 getätigten Hypothese bezüglich des Effekts von C16:1 auf die FOXO-Transkriptionsfaktoren dar. Wenngleich die physiologische Relevanz für dieses Resultat aktuell noch unklar ist, findet sich in der Literatur eine Publikation, die vergleichbare Ergebnisse präsentiert [215]. Van Gorp et al. demonstrierten in der murinen Ba/F3-Knochenmarkszelllinie, dass eine chronische Aktivierung der Proteinkinase AKT die Gesamtmenge von FOXO3a sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene signifikant steigert [215]. Die Daten von Van Gorp et al. stehen daher, trotz Erhebung in einer nicht-kardialen Zelllinie, im Einklang mit der hier dargelegten C16:1-induzierten Hochregulation von Gesamt-FOXO3a [215].

Als möglicher Erklärungsansatz für die Steigerung von Gesamt-FOXO3a nach einem 30-minütigen C16:1 Stimulationsintervall ließe sich womöglich die Kumulierung der FOXO Proteine denken, bevor sie zytoplasmatisch ubiquitiniert und über das zelluläre Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Diese Annahme würde ferner mit den im nächsten Abschnitt diskutierten Resultaten übereinstimmen, die eine Reduktion der zellulären FOXO Gesamtproteinmenge nach 18-stündiger C16:1 Stimulation zeigen. In diesem Kontext wäre also anzunehmen, dass eine C16:1 Stimulation zunächst zu einer Kumulation von FOXO führt, bevor FOXO letztendlich über das Ubiquitin-Proteasom-System der Zelle degradiert wird. Dieser Erklärungsansatz für die kurzfristige Steigerung der FOXO3a-Gesamtproteinmenge erscheint schlüssig, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass eine potentielle Steigerung der ribosomalen FOXO3a-Proteinbiosynthese in nur 30 Minuten wenig plausibel erscheint. Da der zugrundeliegende Mechanismus der kurzfristigen Hochregulation von Gesamt-FOXO3a jedoch aktuell noch nicht hinreichend geklärt werden konnte, sollte diese Beobachtung weiter untersucht werden. Hierzu müsste in einem zukünftigen Versuchsansatz der Einfluss von C16:1 auf die Genexpression von FOXO3a nach 30-minütiger Stimulation im Vergleich zur BSA-Kontrolle eruiert werden. Somit ließe

sich differenzieren, ob die kurzfristige Steigerung der FOXO3a-Gesamtproteinmenge tatsächlich durch eine transiente FOXO Kumulation vor Ubiquitinierung bedingt ist oder eventuell doch auf eine kurzfristig gesteigerte FOXO3a-Biosynthese zurückzuführen ist.

6.3 Palmitoleinsäure reguliert die Stabilität von FOXO1 sowie FOXO3a

In dieser Arbeit wird der negative regulatorische Effekt einer 18-stündigen C16:1 Stimulation auf die posttranslationale Proteinstabilität von FOXO 1 und 3a nachgewiesen. Nach einem 18-stündigen C16:1 Stimulationsintervall ließ sich eine signifikante Herunterregulation der Gesamtproteinmenge von FOXO1 sowie FOXO3a in HL-1 Kardiomyozyten demonstrieren. In Abschnitt 6.1 wurde bereits dargestellt, dass C16:1 die FOXO-Isoformen 1 und 3a phosphoryliert und dadurch hemmt. Demzufolge müsste FOXO, nach erfolgter Inaktivierung bzw. Verlust seines transkriptionellen Potentials, aus dem Zellkern heraus in das Zytosol der Zelle exportiert werden, um dort letztendlich proteasomal abgebaut zu werden. Vor diesem theoretischen Hintergrund erscheint die Reduktion des FOXO1 sowie FOXO3a Gesamtproteingehaltes nach C16:1-induzierter Inaktivierung von FOXO äußerst plausibel. Die C16:1-vermittelte Reduktion der FOXO-Proteinstabilität bekräftigt ferner die Annahme, dass die prohypertrophen zellulären Effekte von C16:1 maßgeblich durch die Inhibierung bzw. die Degradation der FOXO-Transkriptionsfaktoren erfolgt. Durch die Hemmung der anti-hypertrophen Wirkung von FOXO kann sich folglich PCH am Herzen manifestieren. In Kongruenz mit unseren Daten demonstrierten Brunet et al. bereits 1999 in einer humanen epithelialen Zelllinie eine AKT-induzierte Verminderung von Gesamt-FKHRL1 (FKHRL1; veraltet für FOXO3a) [166]. Plas et al. bewiesen ferner in der murinen Knochenmarkszelllinie FL5.12, dass die Aktivierung von AKT eine signifikante Verminderung der Gesamtproteinmengen von FOXO1, FOXO3a und Tuberin herbeiführt [216]. Die Reduktion der drei AKT-Substrate FOXO1, FOXO3a und Tuberin ließ sich von Plas et al. durch die Anwendung eines Proteasom-Inhibitors unterbinden, weshalb angenommen wurde, dass die AKT-vermittelte FOXO-Degradation proteasomal vermittelt wird [216]. Matsuzaki et al. zeigten darüber hinaus in der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2, dass Insulin eine AKT-abhängige FOXO1 Proteindegradation induziert [217]. Übereinstimmend mit diesen Resultaten publizierten Aoki et al., dass PDGF (platelet-derived growth factor) via PI3K-AKT Signaltransduktion die proteasomale Degradation von FOXO1 herbeiführt [218]. In HL-1

Kardiomyozyten wurde von Liu et al. publiziert, dass eine 18-stündige IGF-1 Stimulation zu einer Phosphorylierung von AKT sowie zu einer bemerkenswerten Reduktion des Gesamt-FOXO1 Proteingehaltes führt [135]. In diesen Kontext fügen sich die in dieser Arbeit dargestellten Resultate bezüglich einer C16:1-vermittelten, AKT-abhängigen Modulation der FOXO1- sowie FOXO3a-Proteinstabilität ein.

Hinsichtlich des Einflusses von C16:1 auf die posttranslationale FOXO3a-Proteinstabilität, wird deutlich, dass eine Kontroverse zu den in Abschnitt 6.2 diskutierten Western Blot-Daten besteht. Während eine kurzfristige, 30-minütige C16:1 Stimulation die Gesamtproteinmenge an FOXO3a heraufreguliert, bewirkt das in diesem Abschnitt dargestellte 18-stündige C16:1 Stimulationsintervall eine signifikante Verminderung von Gesamt FOXO3a. Demnach induziert C16:1, je nach Länge des gewählten Stimulationsintervalls, entgegengesetzte Effekte auf die zelluläre FOXO3a-Gesamtproteinmenge. Diese Beobachtung erscheint jedoch valide, da sie mit ähnlichen experimentellen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt. Wie in Abschnitt 6.2 erwähnt, zeigten Van Gorp et al., dass die Gesamtmenge von FOXO3a nach kurzfristiger AKT-Aktivierung gesteigert wird [215]. Im Gegensatz dazu, wurde wie bereits in diesem Abschnitt diskutiert, auch von anderen Arbeitsgruppen verifiziert, dass länger andauernde AKT-Aktivierungen zwischen 18 und 48 Stunden eine Reduktion der FOXO3a Gesamtproteinmenge herbeiführen [166,216,217]. Um den molekularen Wirkmechanismus von C16:1 genauer verstehen zu können, kommt zukünftig der Identifikation des genauen C16:1-Stimulationszeitpunktes, welcher als Wendepunkt zwischen Steigerung und Reduktion des zellulären FOXO3a-Proteingehaltes fungiert, eine besondere Bedeutung zu. Hierzu müsste künftig der Zeitverlauf des zellulären FOXO-Proteingehaltes genauer untersucht werden. Demzufolge müsste die FOXO3a Gesamtproteinmenge nach verschiedenen C16:1 Stimulationsintervallen proteinbiochemisch evaluiert werden. Durch den genannten Versuchsansatz könnte der exakte C16:1 Stimulationszeitpunkt detektiert werden, ab welchem C16:1 die Proteinstabilität von FOXO3a in HL-1 Kardiomyozyten negativ reguliert. Wie bereits in Abschnitt 6.2 diskutiert, scheint die kurzfristige Steigerung der FOXO3a Gesamtproteinmenge, gefolgt von der längerfristigen Reduktion der FOXO Proteine unter C16:1 Stimulation von physiologischer Relevanz zu sein. Demzufolge ist anzunehmen, dass C16:1 eine temporäre zytoplasmatische Kumulation der inaktivierten FOXO Proteine

bewirkt, bevor FOXO letztendlich über das zelluläre Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Durch den Abbau der Atrophie-vermittelnden FOXO Proteine kann C16:1 folglich die Manifestation von PCH am Herzen induzieren.

6.3.1 Vergleich des Effektes von IGF-1 und C16:1 auf die FOXO-Proteinstabilität

Im Rahmen der FOXO-Stabilitätsversuche wurde IGF-1, der natürliche Ligand der PI3K-AKT Signalkaskade, als Positivkontrolle verwendet. Wie bereits von Liu et al. in einem identischen experimentellen Setup gezeigt werden konnte, führt eine 18-stündige IGF-1 Stimulation von HL-1 Kardiomyozyten zu einer signifikanten Reduktion des Gesamt-FOXO1 Proteingehaltes [135]. Derselbe IGF-1 vermittelte signifikante Effekt ließ sich in dieser Arbeit ferner für Gesamt-FOXO3a demonstrieren. Hierbei fällt auf, dass C16:1 im Vergleich zu IGF-1 eine stärkere Reduktion von FOXO1 herbeizuführen scheint. Diese Beobachtung impliziert, dass C16:1 vermutlich eine potentere Wirkung auf die PI3K-AKT Signalkaskade bzw. auf den Transkriptionsfaktor FOXO1 ausüben könnte, als IGF-1. Dies könnte ein erster Anhalt dafür sein, dass C16:1 in HL-1 Kardiomyozyten eventuell stärkere prohypertrophe Effekte besitzen könnte als IGF-1.

Da eine mögliche mechanistische Ursache für dieses Resultat aktuell noch unerforscht bleibt, bedarf dieser Zusammenhang weiterer Abklärung. Denkbar wäre jedoch, dass die Vergleichbarkeit der IGF-1 und C16:1 Stimulationsversuche, trotz identischem experimentellen Setup, aufgrund unterschiedlich starker Stimulationskonzentrationen nicht zwangsläufig gewährleistet sein kann. Folglich lassen sich nur sehr begrenzt stringente Schlussfolgerungen bezüglich der Potenz von C16:1 im Vergleich zu IGF-1 auf die PI3K-AKT-Signalkaskade ziehen. Um die physiologische Relevanz des Resultates sicherzustellen, müsste dieses zukünftig mittels unterschiedlicher IGF-1 sowie C16:1 Konzentrationen reproduziert werden.

6.4 Palmitoleinsäure induziert die zytosolische Translokation von FOXO3a

Sowohl die Phosphorylierung von FOXO durch C16:1 als auch die C16:1-induzierte Reduktion der FOXO-Gesamtproteinmenge, deuten darauf hin, dass C16:1 die FOXO-Transkriptionsfaktoren in HL-1 Kardiomyozyten hemmt. Für den einzelnen Kardiomyozyten bedeutet die Inaktivierung von FOXO letztlich, dass Wachstumsinhibition unterbunden wird und sich somit zelluläre Wachstumsprozesse ereignen können. Dadurch ließen sich womöglich die prohypertrophen kardialen Effekte von C16:1 erklären. Um die Beobachtung der C16:1-vermittelten FOXO-Inaktivierung zu verifizieren, wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopische FOXO-Translokationsanalyse durchgeführt. Wie zu erwarten war, wurde in diesem Kontext deutlich, dass C16:1 die subzelluläre Lokalisation von FOXO reguliert. Genauer genommen zeigte sich in den Immunfluoreszenz-Versuchen im Vergleich zur Vehikelkontrolle, ein C16:1-induzierter Export von FOXO3a aus dem Nukleus heraus in das Zytosol der Zelle. Diese subzelluläre Translokation, welche auch als zytosolisches FOXO3a „Shuttling“ bezeichnet wird, lässt darauf schließen, dass FOXO3a unter Einfluss von C16:1 jegliche transkriptionelle Aktivität verliert [166,171,219]. FOXO-Proteine können ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren nur dann entfalten, wenn sie nukleär lokalisiert sind und an ihre Ziel-DNA-Domäne binden können [166,171]. Das Resultat der Immunfluoreszenzanalyse hinsichtlich der subzellulären FOXO-Lokalisation komplementiert daher die bereits diskutierten Daten aus den Abschnitten 6.1-6.3 und bekräftigt ferner die Hypothese, dass die prohypertrophe Wirkweise von C16:1 über eine posttranslationale Inaktivierung von FOXO erfolgt. Durch die Hemmung von FOXO wird der antagonistische Effekt der FOXO-Proteine auf die PI3K-AKT-Signalkaskade unterbunden, sodass sich folglich AKT-vermittelte, kardiale Wachstumsprozesse ereignen können.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich des Wirkmechanismus von C16:1 erscheinen plausibel, da sie mit aktuellen Daten anderer Arbeitsgruppen korrelieren. Takaishi et al. konnten beispielsweise demonstrieren, dass AFX (AFX; veraltet für FOXO4) negativ durch AKT reguliert wird, indem nukleär lokalisiertes FOXO4 durch AKT phosphoryliert wird und konsekutiv einen zytosolischen Export erfährt [169]. Die Beobachtung, dass AKT für die zytosolische Retention und transkriptionelle Inaktivierung von FOXO4 verantwortlich ist, wurde von Brownawell et al. bestätigt [220]. Zudem bewiesen

Obsilova et al., dass das Protein 14-3-3 die zytosolische Translokation von FOXO4 fundamental reguliert und ferner die DNA-Bindungsaffinität von FOXO4 herabsetzt [172]. Die eminente Bedeutung des Proteins 14-3-3 für das zytosolische Shuttling von AKT-phosphoryliertem FOXO3a konnte von Brunet et al. *in-vivo* sowie *in-vitro* reproduziert werden [174]. Laut Brunet et al., erzeugt die AKT-vermittelte Phosphorylierung des N-Terminus von FOXO3a zwei Bindungsmotive für das Protein 14-3-3 [174]. Durch Bindung von 14-3-3 an FOXO3a erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, welche das DNA-Bindungspotential von FOXO3a aufhebt und FOXO ferner für eine Interaktion mit dem Protein Exportin/Crm1 exponiert [174]. Durch die Protein-Interaktion mit Exportin/Crm1 vollzieht sich letztendlich die Translokation von FOXO aus dem Nukleus heraus in das Zytosol der Zelle [174]. In einer weiteren Publikation zeigten Brunet et al., dass die Inhibition des PI3K-AKT-Signalweges den zytosolischen Export von FOXO3a revidiert und stattdessen dessen nukleäre Akkumulation induziert [166]. In diesem Kontext präsentierten Brunet et al. zudem, dass das Protein 14-3-3 nicht nur an dem zytosolischen Export von FOXO3a beteiligt ist, sondern dass die Protein-Protein-Interaktion von FOXO3a und 14-3-3 die Reaktivierung bzw. Dephosphorylierung von zytoplasmatisch lokalisiertem FOXO3a unterbindet [174]. Singh et al. identifizierten die Proteinphosphatase 2a (PP2a) als essentiell für die Reaktivierung von zytoplasmatisch lokalisiertem FOXO3a [221]. Mittels Dephosphorylierung reaktiviert PP2a zytoplasmatisch lokalisiertes, inaktiviertes FOXO3a, wodurch dessen Interaktion mit 14-3-3 aufgehoben wird und FOXO zurück in den Nukleus transportiert werden kann [221]. Die dynamische Interaktion von AKT, 14-3-3 und PP2a reguliert demzufolge die subzelluläre Lokalisation bzw. die Aktivität von FOXO3a [221]. Jene Resultate decken sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen der C16:1-induzierten, AKT-vermittelten zytosolischen Translokation von FOXO3a.

Parallel zu dem aktuellen wissenschaftlichen Konsens hinsichtlich der AKT-vermittelten Translokation der FOXO-Isoformen 3a und 4, wurde bereits dargestellt, dass AKT-phosphoryliertes FOXO1 ebenfalls ein nukleär-zytoplasmatisches-Shuttling erfährt [170,199,222,223]. Interessanterweise demonstrierten Rena et al., dass das Protein 14-3-3 nicht für den nukleären Ausschluss von FOXO1 benötigt wird [224]. Dies suggeriert folglich, dass mindestens ein weiterer, 14-3-3 unabhängiger Mechanismus existiert, welcher die zytosolische Translokation von FOXO ermöglicht. Daher ist es zukünftig von großem

wissenschaftlichen Interesse, den genauen molekularen Mechanismus der C16:1-vermittelten zytosolischen FOXO-Translokation zu ermitteln. Hierbei sollte eruiert werden, ob FOXO1 und FOXO4 nach C16:1 Stimulation parallel zu FOXO3a ebenfalls ein zytosolisches Shuttling erfahren. Weiterhin sollte der präzise molekularbiologische Mechanismus des nukleären Exportes von FOXO nach erfolgter C16:1 Stimulation analysiert werden. Vor diesem Hintergrund sollte zukünftig die Fragestellung untersucht werden, ob die C16:1-induzierte FOXO-Translokation 14-3-3 abhängig verläuft.

6.5 Palmitoleinsäure hat keinerlei Einfluss auf die Genexpression der E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und Atrogin-1 (MAFbx)

Nachdem im ersten Teil der Arbeit die Wirkung von C16:1 auf die FOXO-Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene untersucht worden war, sollte im zweiten Teil der Einfluss auf Genexpressionsebene analysiert werden. Diese ist deshalb von großer Bedeutung, da Veränderungen der FOXO-Zielgenexpression indirekte Rückschlüsse auf die transkriptionelle Aktivität von FOXO ermöglichen. Bislang deuteten die in Abschnitt 6.1.-6.4 diskutierte Ergebnisse der proteinbiochemischen Untersuchungen allesamt darauf hin, dass C16:1 die FOXO-Transkriptionsfaktoren hemmt und einen zytosolischen Export dieser induziert, sodass die FOXO-Proteine letztendlich proteasomal abgebaut werden können. Da Transkriptionsfaktoren nukleär lokalisiert sein müssen, um an die Promoterregion der DNA binden und folglich die Transkription ihrer Zielgene induzieren zu können, implizieren diese Resultate womöglich, dass C16:1 die FOXO-Proteine transkriptionell inaktiviert. Demzufolge war zu erwarten, dass das Genexpressionsprofil der FOXO-Zielgene durch eine Behandlung mit C16:1 im Vergleich zur Vehikelkontrolle herunterreguliert sein müsste. Um die vermutliche transkriptionelle Inaktivierung von FOXO auf Genexpressionsebene nachweisen zu können, wurden zwei FOXO3a-Zielgene, MuRF1 und Atrogin-1 (MAFbx), mittels qRT-PCR untersucht.

Interessanterweise ließ sich durch die Genexpressionsanalyse der FOXO3a-Zielgene MuRF1 und Atrogin-1 (MAFbx) der Effekt von C16:1 nicht nachweisen. Ganz im Gegenteil erwiesen sich MuRF1 und Atrogin-1 (MAFbx) in den qRT-PCR Experimenten als nicht differenziell durch C16:1 reguliert. Vielmehr blieb das Genexpressionsniveau von MuRF1 und Atrogin-1 nach 24- sowie 48-stündiger C16:1 Stimulation unverändert im Vergleich zur

Vehikelkontrolle. Basierend auf diesen Ergebnissen ist zu folgern, dass C16:1 womöglich keinerlei Effekt auf die Genexpression von MuRF1 und Atrogin-1 ausübt. Der Effekt der transkriptionellen Inaktivierung von FOXO durch C16:1 lässt sich anhand dieser Resultate daher nicht belegen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass mit MuRF1 und Atrogin-1 eventuell die falschen FOXO3a-Zielgene gemessen wurden und womöglich andere FOXO-Zielgene durch C16:1 reguliert sein könnten oder sogar die C16:1-induzierte transkriptionelle Inaktivierung von FOXO zeigen könnten.

Um jedoch die physiologische Bedeutung des Ergebnisses verstehen zu können, muss die Funktion dieser Gene im Kontext von Hypertrophie vergegenwärtigt werden. MuRF1 und Atrogin-1 sind E3-Ubiquitin-Ligasen, welche zur Protein-Ubiquitinierung beitragen und folglich Proteindegradation über das zelluläre Ubiquitin-Proteasom System herbeiführen [161,225]. Da MuRF1 und Atrogin-1 als zentrale Mediatoren von zellulärer Atrophie betrachtet werden, werden diese auch als „Atrogene“ bezeichnet [201]. Im Skelettmuskel wurde von Sandri et al. demonstriert, dass aktiviertes FOXO durch die Expression von MuRF1 und Atrogin-1 Skelettmuskelatrophie herbeiführt [160]. Im Kontext kardialer Hypertrophie ist bereits bekannt, dass das Genexpressionsniveau von MuRF1 und Atrogin-1 im Rahmen pathologischer Hypertrophie signifikant vermindert ist [226]. Diese Erkenntnis konnten Razeghi et al. in einem murinen Modell TAC (transverse aortic constriction)-induzierter pathologischer Hypertrophie zeigen [226]. An Wistar-Ratten demonstrierten Razeghi et al., dass eine TAC Operation bereits nach 7 Tagen das Verhältnis von Herzgewicht/Körpergewicht um 19 % im Vergleich zur Kontrollgruppe steigerte [226]. Die TAC-Tiere präsentierten nicht nur den Phänotyp einer pathologischen kardialen Hypertrophie, sondern erwiesen eine signifikant verringerte kardiale Genexpression der E3-Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MuRF1 [226]. Zudem wurde von Song et al. in NRVM-Kardiomyozyten *in-vitro* demonstriert, dass pathologisches Kardiomyozytenwachstum mit der Herunterregulation der Atrogene MuRF1 und Atrogin-1 einhergeht [227]. Li et al. bestätigten die Beobachtung, dass Atrogin-1 im Kontext pathologischer kardialer Hypertrophie signifikant vermindert ist [211]. Darüber hinaus konnten Li et al. aufweisen, dass die Überexpression von Atrogin-1 so starke antihypertrophe kardiale Effekte besitzt, dass die Manifestation von TAC-induzierter pathologischer kardialer Hypertrophie in einem Rattenmodell annihiliert werden konnte [203]²⁷⁵. Im menschlichen Herz konnten Galasso et

al. bei Patienten mit Herzinsuffizienz mittels Western Blot Analysen feststellen, dass die myokardiale Aktivität von FOXO3a gesteigert ist, was zu einer Induktion von Atrogin-1 beiträgt [228]. Die Daten von Galasso et al. identifizieren FOXO3a und Atrogin-1 als Regulatoren von Herzmuskelatrophie sowie links ventrikulärer Dysfunktion bei herzinsuffizienten Patienten [228].

Hinsichtlich physiologischer kardialer Hypertrophie konnten Li et al. in einem murinen in-vivo Modell darstellen, dass Atrogin-1 beim Phänotyp PCH vermindert ist [203]. Demgegenüber hemmte die Überexpression von Atrogin-1 im Herzen transgener C57BL/6 Mäuse die Manifestation von PCH trotz dreiwöchigem Ausdauerlauftraining der Mäuse [203]. Skurk et al. demonstrierten ferner *in-vitro*, dass die IGF-1 Stimulation von NRVM-Kardiomyozyten nicht nur zelluläre PCH induziert, sondern das Genexpressionsniveau der FOXO3a-Zielgene Atrogin-1 und MuRF1 reduziert [201].

Angesichts der bereits publizierten Daten, wurde eine Reduktion der Atrophie-Gene MuRF1 und Atrogin-1 unter C16:1 Stimulation angenommen, sodass sich PCH manifestieren kann. Wie bereits erwähnt, ließ sich diese Hypothese in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen. Dieses Ergebnis scheint zwar nicht zu der in Abschnitt 2 getätigten Arbeitshypothese zu passen, jedoch widerspricht die ausbleibende Regulation der Atrogene unserem Hypertrophiemodell nicht. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass zwar die Herunterregulation der FOXO3a-Zielgene MuRF1 und Atrogin-1 ausblieb, jedoch waren die Atrogene auch nicht hochreguliert, was dem Modell der PCH nicht widerspricht. Vielmehr zeigten sich MuRF1 und Atrogin-1 nicht reguliert durch C16:1. Da die physiologische Relevanz dieses Ergebnisses aktuell noch unklar, wurden weitere FOXO3a-Zielgene identifiziert und im nächsten Abschnitt der Arbeit analysiert.

6.6 Palmitoleinsäure induziert die Genexpression des FOXO3a-Zielgens p21

Um den Einfluss von C16:1 auf die FOXO-Zielgeninduktion näher erfassen zu können, wurde das Genexpressionsprofil von p21, einem weiteren FOXO3a-Zielgen, mittels qRT-PCR untersucht. Während sich die FOXO3a-Zielgene MuRF1 und Atrogin-1 als nicht durch C16:1 reguliert erwiesen, ließ sich ein signifikanter Anstieg der p21 mRNA-Menge nach 24- sowie 48-stündiger C16:1 Stimulation darstellen. Ursprünglich wurde eine Reduktion der

FOXO3a-Zielgenexpression durch C16:1 Stimulation erwartet. Um die physiologische Relevanz der C16:1-vermittelten p21-Induktion genauer verstehen zu können, muss die Funktion des Gens p21 veranschaulicht werden.

Das Gen p21 gehört zu der Cip/Kip-Familie der CDK-Inhibitoren, welche maßgeblich an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind [229]. Die primäre Funktion von p21 ist die negative Regulation der Zellzyklus-Progression durch die Inhibierung des Cyclin/CDK2-Komplexes [230]. Demnach unterbindet p21 den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase, was darin resultiert, dass die Zellteilung bzw. die Zellproliferation gehemmt wird [231]. Aufgrund seiner anti-proliferativen Wirkung, wird p21 in der Literatur auch als „Tumorsuppressorgen“ bezeichnet [232]. Darüber hinaus wurde die differentielle Genexpression von p21 in der Vergangenheit bereits von zahlreichen Autoren beschrieben. Bislang konnte festgestellt werden, dass die Herunterregulation von p21 Zellproliferation und kanzerogene Zellentartung fördert [205]. Ferner konnte von diversen Forschungsgruppen aufgezeigt werden, dass die Induktion von p21 den Zellzyklusarrest bedingt und zelluläre Apoptose unterbindet [233,234].

Wenngleich der erwartete Effekt der C16:1-vermittelten FOXO3a-Zielgenrepression in dieser Arbeit nicht am Beispiel von p21 demonstriert werden konnte, widerspricht dieses Resultat keineswegs dem in dieser Arbeit untersuchten Hypertrophiemodell. Denn obwohl die expressionsregulatorischen Mechanismen der C16:1-vermittelten p21-Induktion aktuell noch unklar bleiben, erscheint diese Beobachtung im Kontext PCH von physiologischer Relevanz zu sein. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass HL-1 Zellen nicht proliferieren dürfen, um hypertrophieren zu können. Es besteht ein allgemein akzeptierter wissenschaftlicher Konsens darüber, dass sich Zellwachstum bzw. zelluläre Hypertrophie nur manifestieren kann, solange sich eine Zelle nicht teilt bzw. nicht proliferiert [235]. Vor diesem Hintergrund erscheint die beobachtete Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21 durch die prohypertroph wirkende Fettsäure C16:1 plausibel. Die beobachtete p21-Geninduktion validiert demzufolge die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich C16:1-induzierter kardialer Hypertrophie. Dieses Resultat steht nicht nur im Einklang mit den bereits gewonnenen Daten zu C16:1 und PCH, sondern es suggeriert darüber hinaus, dass die C16:1-vermittelte PCH womöglich auf vielfältigen molekularen Mechanismen basiert. Die von unserer Arbeitsgruppe bislang beschriebene Aktivierung der

PI3K-AKT-Wachstumskaskade ist daher vermutlich nur eine von mehreren zugrundeliegenden biochemischen Prozessen. Die Inhibition der zellulären Kardiomyozyten-Proliferation via p21 scheint demnach einen weiteren wichtigen Mechanismus darzustellen, durch welchen C16:1 PCH in HL-1 Zellen vermittelt.

Der beobachtete Effekt von C16:1 auf die Expression des FOXO3a-Zielgens p21 steht zudem in Kongruenz mit Daten anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich FOXO3a und Proliferationsregulation. Brunet et al. beschrieben bereits 1999, dass AKT den Zellzyklusfortgang unterbricht, in dem FKHL1 (FOXO3a) phosphoryliert und somit inhibiert wird [166]. Ferner demonstrierten Birkenkamp et al., dass FOXO durch die differentielle Expression spezifischer Zielgene an der Regulation zellulärer Proliferation beteiligt ist [236]. Die exakte Interaktion von FOXO und p21 ist jedoch momentan im Kontext von kardialem Wachstum, Atrophie und Proliferation noch nicht ausreichend erforscht. Konsistent mit den hier dargelegten Ergebnissen, zeigten Sengupta et al., dass die Stimulation primärer Rattenkardiomyozyten mit IGF-1 eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors FoxM1 sowie eine Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 bewirkt [237]. Sengupta et al. konnten folglich anhand einer Stimulation mit IGF-1, dem primären Liganden der PI3K-AKT-Wachstumskaskade, einen negativ-regulatorischen Effekt auf die Kardiomyozyten-Proliferation beobachten [237]. Dieses Resultat deckt sich mit dem hier dargelegten Effekt von C16:1 auf p21 und Zellzyklusproliferation. Hervorzuheben ist allerdings, dass lediglich der Transkriptionsfaktor FoxM1 von Sengupta et al. betrachtet wurde, anstatt den primär in dieser Arbeit analysierten FOXO-Proteinen 1 und 3a. Evans-Anderson et al. untersuchten primäre embryonale murine Kardiomyozyten in Hinblick auf die FOXO-Transkriptionsfaktoren. Hierbei konnte demonstriert werden, dass eine gesteigerte FOXO1-Aktivität eine erhöhte Genexpression von p21, p27 und p57 bedingt und somit Proliferation negativ reguliert [238]. Obwohl diese Beobachtung mit unseren Ergebnissen partiell übereinstimmt, fällt trotzdem eine Kontroverse hinsichtlich FOXO auf. Während Evans-Anderson et al. durch eine Steigerung der FOXO1-Aktivität die Induktion von p21 beobachteten, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass C16:1 sowohl FOXO1 als auch FOXO3a inaktiviert. Dennoch ließ sich dieselbe Feststellung hinsichtlich der gesteigerten p21-Geninduktion sowie der negativen Zellzyklus-Regulation in beiden Arbeiten konstatieren. Diese Kontroverse könnte womöglich der Tatsache geschuldet sein, dass Evans-Anderson

et al. primäre embryonale Kardiomyozyten aus E14.5 FVBN Mäusen anstatt der in dieser Arbeit utilisierten HL-1 Kardiomyozyten für Ihre Forschungszwecke verwendeten [238]. Zumal der Vergleich von embryonalen, primären Kardiomyozyten mit adulten, differenzierten HL-1 Kardiomyozyten allenfalls nur begrenzt aussagekräftig sein könnte. Dazu kommt, dass laut Literatur die Genexpression des Zellzyklusinhibitors p21 nicht nur durch FOXO, sondern ebenfalls durch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren reguliert wird [239]. Demzufolge wirft sich die Frage auf, inwiefern die Aktivität von FOXO tatsächlich von Relevanz für die Genexpression von p21 ist. Diese Fragestellung bedarf daher, zusammen mit den zugrundeliegenden expressionsregulatorischen Mechanismen der C16:1-vermittelten p21-Induktion, zukünftig noch weiterer Abklärung.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt diskutierten Daten, dass der beobachtete Effekt von C16:1 auf p21 ein erstes Indiz dafür darstellt, dass C16:1 nicht nur Hypertrophie, sondern auch Proliferation von HL-1 Kardiomyozyten reguliert. Der genaue molekulare Mechanismus der mutmaßlichen C16:1-induzierten anti-proliferativen Wirkung ist momentan jedoch noch nicht hinreichend geklärt und sollte daher zukünftig genauer erforscht werden.

6.7 Palmitoleinsäure reguliert den MAPK-Signalweg durch die Dephosphorylierung der ERK 1/2 Kinase

Im Anschluss an die p21 qRT-PCR Versuchsreihe wurde ein weiterer Modulator der Zellzyklus-Progression, die ERK 1/2 Kinase, analysiert. Mittels Western Blot Experimenten ließ sich eine signifikante Reduktion des ERK 1/2-Phosphorylierungsgrades nach einem 5-, 15- sowie 30-minütigen C16:1 Stimulationsintervall darstellen. Die MAP-Kinasen RAS/RAF/MEK/ERK sind bedeutsame Regulatoren von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum [182]. ERK 1/2 stellt den zentralen Bestandteil des MAPK-Signalweges dar und determiniert, je nach Phosphorylierungsgrad, die Aktivierung diverser Zellzyklus-regulierender Transkriptionsfaktoren [184]. Im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand transloziert p-ERK 1/2 in den Nukleus und bewirkt Zellzyklus-Progression und Proliferation durch die Herunterregulation antiproliferativer Gene wie beispielsweise die der CDK-Inhibitoren p21^{cip1} oder p27^{kip1} [183,185–193]. Hingegen resultiert die Dephosphorylierung bzw. Inaktivierung von ERK 1/2 in einer signifikanten Inhibition von Zellproliferation [187,189]. Die beobachtete signifikante Dephosphorylierung von ERK 1/2

kongruiert demzufolge sehr gut mit den bislang erhobenen Daten zu C16:1 und PCH. Während C16:1 die prohypertrophe PI3K-AKT-Signalkaskade aktiviert, FOXO 1 und 3a inhibiert und somit PCH vermittelt, wird gleichzeitig zelluläre Proliferation inhibiert durch die Hochregulation von p21 sowie durch die Inaktivierung von ERK 1/2. Man kann also zusammenfassen, dass C16:1 nicht nur Hypertrophie, sondern ebenfalls Proliferation von HL-1 Kardiomyozyten reguliert.

6.7.1 Interaktion des PI3K-AKT- mit dem MAPK-ERK Signalweg

Die beobachtete antiproliferative Regulation des MAPK-ERK-Signalweges durch C16:1 erscheint nicht nur theoretisch plausibel, sondern suggeriert darüber hinaus, dass eine potentielle C16:1-induzierte Interaktion zwischen dem PI3K-AKT- sowie dem MAPK-ERK-Signalweg bestehen könnte. Diese Annahme deckt sich mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen, welche neben der Co-Aktivierung beider Signalkaskaden durch denselben extrazellulären Wachstumsfaktor (IGF-1), weitere Schnittstellen zwischen beiden Signalwegen identifizieren konnten [194,240–242]. Matkar et al. demonstrierten beispielsweise, dass die Inhibition von AKT zu einer FOXO-abhängigen ERK-Phosphorylierung führt, wodurch die ERK 1/2 Kinase aktiviert wird [241]. Demnach scheint eine direkte molekularbiologische Wechselwirkung zwischen FOXO und ERK 1/2 zu existieren. Die potentielle Interaktion des PI3K-AKT- sowie des MAPK-ERK-Signalweges wurde ebenfalls von Serra et al. observiert [240]. Serra et al. beobachteten analog zu den Daten von Matkar et al., dass die Inhibition von PI3K-AKT über einen „Feedback Mechanismus“ die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges bewirkt [240]. Darauf aufbauend, wurde die Wechselwirkung beider Signalkaskaden von Pan et al. kürzlich genauer analysiert [194].

Genau genommen beschrieben Pan et al. eine Interaktion zwischen p-AKT, p-FOXO1 und ERK 1/2 [194]. Laut Pan et al. induziert die AKT-vermittelte Phosphorylierung von FOXO1 die Inaktivierung der ERK 1/2 Kinase mittels Dephosphorylierung [194]. Diese Beobachtung steht im direkten Einklang mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Als zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der Interaktion von FOXO, AKT und ERK 1/2 zeigten Pan et al., dass AKT-phosphoryliertes, zytoplasmatisch lokalisiertes FOXO1 das zytosolische Gerüstprotein (Engl: scaffold protein) „IQGAP1“ bindet [194]. Somit wird die

IQGAP1-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung der ERK 1/2 Kinase gehemmt [194]. Komplementär dazu, gelang es Pan et al. durch die Applikation eines PI3K/AKT-Inhibitors und der daraus resultierenden nukleären Lokalisation des dephosphorylierten FOXOs, die IQGAP1-abhängige, zytoplasmatische Aktivierung von ERK 1/2 wiederherzustellen [194]. Dieser Effekt lässt sich primär auf die Dissoziation des dephosphorylierten FOXOs von IQGAP1 zurückführen, sodass IQGAP1 nun als Bindungspartner für ERK 1/2 fungieren kann [194]. Durch die Bindung von IQGAP1 an ERK 1/2 wird somit die IQGAP1-abhängige Phosphorylierung bzw. Aktivierung von ERK 1/2 ermöglicht [194]. Folglich erscheint IQGAP1 aufgrund seiner Bindungsaffinität sowohl zu p-FOXO1 als auch zu ERK 1/2 eine zentrale Bedeutung bei dem „Crosstalk“ beider Signalkaskaden einzunehmen. Basierend auf den Beobachtungen von Pan et al. wäre es daher prinzipiell denkbar, dass IQGAP1 auch in C16:1-stimulierten HL-1 Kardiomyozyten das „Bindeglied“ zwischen AKT-gesteuerter FOXO-Phosphorylierung und ERK 1/2-Dephosphorylierung darstellt.

Um C16:1-phosphoryliertes FOXO als negativen Modulator des MAPK-ERK-IQGAP1-Signalweges identifizieren zu können, müsste dieser Zusammenhang zukünftig in HL-1 Kardiomyozyten näher erforscht werden.

6.7.2 Bedeutung der Dephosphorylierung von ERK 1/2 im Kontext kardialer Ischämie

Die Dephosphorylierung der ERK 1/2 Kinase wurde von anderen Arbeitsgruppen nicht nur im Kontext kardialer Hypertrophie und Proliferation erforscht, sondern ebenfalls im Rahmen post-ischämischer kardialer Umbauvorgänge. Kaschina et al. konnten beispielsweise aufzeigen, dass ERK 1/2 im postinfarziellen Myokard ebenfalls stark dephosphoryliert wird [243]. Jene ERK-Dephosphorylierung konnte jedoch durch die Applikation des Angiotensin II-Rezeptor Typ 2-Agonisten „C21“ aufgehoben werden [243]. Ebenfalls konstatierten Kaschina et al. eine Verbesserung der postinfarziell reduzierten kardialen Pumpfunktion durch C21-Applikation [243]. Während die proteinbiochemische Dephosphorylierung von ERK 1/2 im Einklang mit unseren Ergebnissen steht, sehen wir jedoch eine Verbesserung der kardialen Auswurfsleistung durch PCH im Zustand der C16:1-induzierten ERK-Dephosphorylierung. Kaschina et al. beobachteten hingegen eine Assoziation von ERK-Phosphorylierung mit Verbesserung kardialer Pumpfunktion [243]. Dies stellt eine klare

Kontroverse hinsichtlich der Auswirkung des ERK-Phosphorylierungsgrades auf die kardiale Pumpleistung dar. Jedoch könnte diese Diskrepanz der Tatsache geschuldet sein, dass Kaschina et al. an einem *in-vivo* Rattenmodell forschten, während die in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse *in-vitro* in murinen HL-1 Zellen gewonnen wurden. Ferner untersuchten Kaschina et al. Kardiomyozyten im Kontext kardialer Ischämie, während in dieser Arbeit ein kardiales Hypertrophiemodell analysiert wurde.

6.7.3 C16:0 zeigt im Vergleich zu C16:1 keinerlei Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad der ERK 1/2 Kinase

Nachdem der Effekt von C16:1 auf die ERK 1/2 Kinase untersucht worden war, sollte der Einfluss der strukturell beinahe identischen Palmitinsäure (C16:0) auf die ERK 1/2 Kinase eruiert werden. Da in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.3 bereits dargestellt werden konnte, dass sowohl C16:1 als auch C16:0 die Phosphorylierung von FOXO3a bewirken, C16:0 jedoch prinzipiell keinerlei prohypertrophe Eigenschaften besitzt, wurde angenommen, dass sich die Wirkmechanismen jener Fettsäuren womöglich hinsichtlich der Regulation von ERK 1/2 unterscheiden. Nach einem 30-minütigen C16:0 Stimulationsintervall ließ sich per Western Blot nachweisen, dass C16:0 keinerlei Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad der ERK 1/2 Kinase hat. Vielmehr blieb die Phosphorylierung von ERK 1/2 unter C16:0-Stimulation unverändert im Vergleich zur BSA-Vehikelkontrolle. Da sich die Aktivität von ERK 1/2 aus dessen Phosphorylierungsgrad ableiten lässt, wird anhand dieses Experimentes deutlich, dass die proliferationsfördernde ERK 1/2-Kinase unter C16:0-Stimulation aktiviert bleibt. Dies stellt einen bedeutsamen Unterschied zu der Wirkweise von C16:1 dar, da C16:1, wie in Abschnitt 6.7 bereits diskutiert, eine signifikante Inaktivierung von ERK 1/2 induziert.

Im Voraus konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass C16:0 im Vergleich zu C16:1 keine zelluläre kardiale Hypertrophie induziert [131]. Basierend auf den in dieser Arbeit nachgewiesenen antagonistischen Effekten von C16:0 und C16:1 auf die ERK 1/2 Kinase könnte also gefolgert werden, dass die Aktivität von ERK 1/2 eine bedeutende Rolle für die Manifestation von PCH einnimmt. Während C16:1 ERK 1/2 inhibiert und somit proliferationshemmend wirkt, kann sich PCH über die Aktivierung der PI3K-AKT-Signalkaskade am Herzen manifestieren. Demgegenüber weisen C16:0 stimulierte HL-1

Kardiomyozyten jedoch eine konstitutiv aktive, phosphorylierte Form der ERK 1/2 Kinase auf, die durch ihren proliferationsfördernden Effekt womöglich die Manifestation von PCH unterbindet. Laut wissenschaftlichem Konsens wird C16:0 mit Dyslipidämie, koronarer Herzkrankheit, Diabetes Mellitus Typ 2 und Adipositas assoziiert [244–246]. Zudem wird die in dieser Arbeit beobachtete C16:0-induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2 durch Ergebnisse anderer Forschungsgruppen validiert. Bi et al. zeigten beispielsweise in männlichen C57BL/6J Mäusen, dass C16:0 ERK 1/2 mittels Phosphorylierung aktiviert [247]. Darüber hinaus konnten Huang et al. in THP-1 Zellen ebenfalls die beschriebene C16:0-gesteuerte ERK 1/2-Phosphorylierung nachweisen [248]. Da diese Resultate jedoch *in-vivo* sowie in einer humanen Monozyten-Zelllinie getroffen wurden, ist die Übertragbarkeit der Daten auf HL-1 Kardiomyozyten nicht zwangsläufig gegeben.

Im Vergleich zu der Fettsäure C16:0, die nachweislich keine prohypertrophen kardiomyozytären Effekte vermittelt, gewinnen neben C16:1 weitere Fettsäuren im Kontext kardialer Hypertrophie an Bedeutung. Nguyen et al. zeigten beispielsweise in einem Mausmodell, dass eine „High Fat Western Diet“ bestehend aus 60 % Fetten, davon 32 % gesättigte Fettsäuren, nach 12 Wochen eine kardiale Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion induziert [249]. Die von Nguyen et al. beobachtete pathologische kardiale Hypertrophie der Mäuse korrelierte mit erhöhten Plasmaspiegeln von Arachidonsäure (C20:4) [249]. Ferner identifizierten Casquel De Tomasi et al. in einem Rattenmodell kardialer Hypertrophie induziert durch eine supra-avalvuläre Aortenstenose, eine signifikante Verminderung der ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (C18:2) und Ölsäure (C18:1) in dem pathologisch hypertrophierten Myokardgewebe [250]. Takahashi et al. präsentierten in einem murinen Modell kardialer Hypertrophie an JVS-Mäusen, dass die dietätische Supplementation von Fischöl vorteilhafte Modifikationen eines pathologisch hypertrophierten Myokards bewirkt [251]. Sie beobachteten im Vergleich zur Standarddiät-Kontrollgruppe, dass eine Fischöldiät sowohl die linksventrikuläre Wanddicke des hypertrophierten Myokards als auch den Kardiomyozytendurchmesser signifikant reduziert und ferner die linksventrikuläre Dysfunktion der JVS-Mäuse deutlich verbessert, was durch eine echokardiographische 20 %-ige Zunahme des Fractional Shortenings gezeigt wurde [251]. Interessanterweise zeigten Takahashi et al. zudem eine Fischöl-induzierte Veränderung der kardialen Diacylglycerin-Fettsäurenkomposition [251]. Einhergehend mit

der Reduktion kardialer Hypertrophie und einer Verbesserung der Ventrikelfunktionsstörung, wurden die zuvor diskutierten, mit pathologischer Hypertrophie assoziierten Fettsäuren C18:1, C18:2 und C20:4 herunterreguliert, während C16:1, C20:5, C22:0, C24:1 und C22:6 hochreguliert wurden [251]. Die Daten von Takahashi et al. bekräftigen daher den in dieser Arbeit dargestellten kardioprotektiven Effekt von C16:1 und suggerieren darüber hinaus, dass, C20:5, C22:0, C24:1 und C22:6 womöglich ebenfalls vorteilhafte kardiale Effekte vermitteln könnten [251].

In Anbetracht der in dieser Arbeit erhobenen Daten könnte die Dephosphorylierung von ERK 1/2 zusammen mit der bereits diskutierten Phosphorylierung von FOXO und AKT eine wichtige mechanistische Grundlage von PCH darstellen. Dieser Zusammenhang sollte zukünftig genauer erforscht werden, vor allem in Hinblick darauf, dass die ERK 1/2 Kinase bekanntlich durch zahlreiche weitere extrazelluläre Stimuli reguliert wird. Um das hier dargestellte Ergebnis zu komplettieren, könnte p-ERK 1/2 zukünftig in HL-1 Kardiomyozyten überexprimiert werden, um zu evaluieren, ob die C16:1-induzierten kardialen Wachstumseffekte dadurch inhibiert würden. Dieses Experiment könnte weitere Aufschlüsse hinsichtlich der Relevanz der ERK 1/2-Aktivität für die Entstehung von PCH geben. Ferner sollten die p-ERK Experimente zukünftig in humanen Kardiomyozyten wiederholt werden, da die Übertragbarkeit auf den Menschen nicht unbedingt gegeben ist. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Beobachtungen in HL-1 Kardiomyozyten erhoben wurden, die im Vergleich zu menschlichen Kardiomyozyten proliferieren können.

6.8 Zusammenfassung und vorgeschlagener Wirkmechanismus

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der zelluläre Wirkmechanismus der C16:1-induzierten PCH weiter aufgeklärt werden. Es konnte die Aktivierung der wachstumsfördernden Proteinkinase AKT sowie die Inhibition der atrophiebegünstigenden Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXO3a durch Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese Resultate scheinen eine wichtige molekulare Grundlage der C16:1-vermittelten PCH darzustellen. Die C16:1-induzierte Hemmung von FOXO wird ferner durch die zytosolische Translokation der FOXO-Proteine sowie durch die Reduktion der FOXO1 und 3a Gesamtproteinmenge verdeutlicht. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass C16:1 nicht nur prohypertrophe kardiomyozytäre Effekte vermittelt, sondern

ebenfalls antiproliferative Wirkungen zu entwickeln scheint. Diese Schlussfolgerung konnte durch die Desphosphorylierung der proliferationsfördernden ERK 1/2 Kinase sowie durch die Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21 getroffen werden. Demnach scheint C16:1 seine prohypertrophen kardiomyozytären Effekte nicht nur durch die Aktivierung der PI3K-AKT-Wachstumskaskade und die Hemmung der FOXO-Transkriptionsfaktoren zu vermitteln. Vielmehr deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Inhibition der Kardiomyozyten-Proliferation einen weiteren wichtigen zugrundeliegenden Wirkmechanismus darstellt, durch den C16:1 PCH vermittelt.

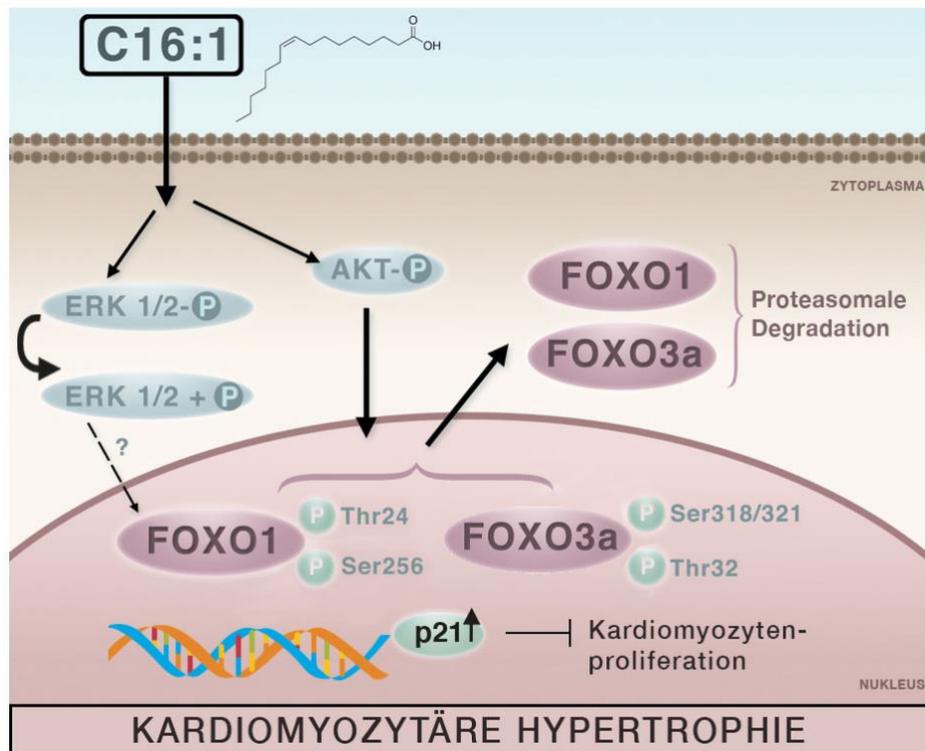


Abbildung 30: Potentieller Wirkmechanismus der C16:1 vermittelten kardialen Effekte
 Detaillierte Erklärung im Text des Abschnitts 6.8. Beschriftung: C16:1 Palmitoleinsäure.

6.9 Limitationen

Die primäre Limitation dieser Arbeit besteht darin, dass an einem *in-vitro*-Modell geforscht wurde. Da ein *in-vitro*-Versuchsmodell stets durch artifizielle Bedingungen charakterisiert wird, bleibt die physiologische Aussagekraft und die Übertragbarkeit auf einen biologischen

Mechanismus beschränkt. Anhand eines Zellkulturmodells kann nicht nachvollzogen werden, wie Organe miteinander interagieren. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass in dieser Arbeit mit C16:1 ein Metabolit untersucht wurde, wäre daher der zusätzliche Einsatz eines murinen *in-vivo*-Modells sinnvoll gewesen. Ein Mausmodell erscheint in diesem Kontext besonders relevant, da das Genom von Mäusen zu 99% mit dem menschlichen Genom übereinstimmt und Mäuse sich somit als exzellentes Versuchsmodell qualifizieren [252].

Um die Validität der in dieser Arbeit demonstrierten Beobachtungen weiter zu untermauern, hätten die Experimente zudem in einer weiteren Zelllinie durchgeführt werden können. Als adäquate Zelllinie zur Untersuchung von kardialer Hypertrophie erscheint in diesem Kontext beispielsweise die H9C2-Zelllinie. Die aus Ratten-Kardiomyoblasten isolierten H9C2-Zellen erweisen sich laut Literatur als zuverlässiges Modell, um hypertrophe kardiale Prozesse zu analysieren und präsentieren beinahe identische Hypertrophieantworten zu primären NRVM-Kardiomyozyten [253]. Ferner hätten induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) verwendet werden können, um die kardiomyozytären Effekte von C16:1 und das Modell der PCH gezielt an differenzierten Kardiomyozyten zu untersuchen. Alternativ zu dem Einsatz einer weiteren Zelllinie erscheint der Gebrauch primärer Kardiomyozyten für Anschlussexperimente angemessen. Vor diesem Hintergrund scheint vor allem die Verwendung primärer humaner Kardiomyozyten geeignet, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus zu gewährleisten. Denn obwohl HL-1 Kardiomyozyten den Phänotyp sowie die biochemischen Eigenschaften differenzierter Kardiomyozyten aufrechterhalten, stellt sich die Frage, inwieweit diese Zelllinie tatsächlich die molekularbiologischen Prozesse humaner Kardiomyozyten imitieren kann. Jedoch erschien die alleinige Analyse primärer humaner Kardiomyozyten technisch und methodisch sehr schwierig.

Darüber hinaus hätten methodische Optimierungen in dieser Arbeit stattfinden können. Die Zellkulturexperimente hätten beispielsweise vereinheitlicht werden können durch die konstante Verwendung der gleichen Stimulationscharge sowie derselben HL-1 Zellpassage. Obwohl die erhobenen Daten überwiegend stringent erscheinen, muss erwähnt werden, dass lediglich einzelne FOXO-Proteine, -Seitenketten und -Zielgene untersucht wurden. Die genaue Auswirkung von C16:1 auf die differentielle Expression aller bekannten,

hypertrophierelevanten Gene ist aktuell nicht hinreichend geklärt. Demzufolge hätte das globale Genexpressionsmuster von C16:1 durch einen RNA-Sequenzierungsansatz (RNA-Seq; next-generation sequencing) entschlüsselt werden können. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) hätte die direkte Interaktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren mit spezifischen DNA-Abschnitten nachgewiesen werden können. Auf diese Weise hätten die C16:1-regulierten FOXO-Zielgene zuverlässig identifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde keine umfassende Analyse des Effekts von C16:1 auf das globale Proteinexpressionsmuster durchgeführt. Stattdessen wurden AKT, die FOXO-Proteine sowie die ERK 1/2-Kinase aufgrund ihres physiologischen Stellenwertes repräsentativ und hypothesengetrieben untersucht. Für die weiterführende Proteinanalytik wäre daher der Einsatz der Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie methodisch sinnvoll, um das vollständige Proteinregulationsmuster von C16:1 zu erfassen und somit die genaue molekularbiologische Wirkweise von C16:1 aufzudecken.

Dennoch sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultate eindeutig vielversprechend und kohärent und liefern wichtige molekularbiologische Grundlagen der C16:1-induzierten PCH. Die Ergebnisse dieser präklinischen Forschungsarbeit haben folglich einen hohen Stellenwert für weitere translationale Untersuchungen hinsichtlich des kardialen Effektes von C16:1 im murinen als auch im menschlichen Organismus. Diese Forschungsarbeit deckt erstmalig wichtige C16:1-modulierte Signalwege auf, die zukünftig gezielt therapeutisch genutzt werden könnten, um die Krankheitsbilder der pathologischen kardialen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz positiv beeinflussen zu können.

6.10 Medizinische Relevanz und Ausblick

Wir konnten erstmalig nachweisen, dass die Fettsäure C16:1 eine physiologische kardiale Hypertrophie (PCH) induziert. Darauf aufbauend entschlüsselt diese Arbeit wichtige molekulare Grundlagen dieser PCH. Es konnte erstmalig demonstriert werden, dass C16:1 wesentliche Hypertrophie- und Proliferations-Marker von Kardiomyozyten reguliert, wodurch tiefere Einblicke in die Wirkweise von C16:1 erlangt werden konnten. Demzufolge stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse dieser präklinischen Forschungsarbeit auch für den menschlichen Organismus relevant wären.

Obwohl noch keinerlei Evidenz hinsichtlich der Auswirkung von C16:1 auf das menschliche Herz besteht, scheint es wahrscheinlich, dass die kardioprotektive Wirkung von C16:1 womöglich auch auf den Menschen übertragbar sein könnte. Diese These wird durch Resultate anderer Forschungsgruppen unterstützt. Bei Hochleistungssportlern mit PCH konnte bereits ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der C16:1 Serumkonzentration und der interventrikulären Septumdicke konstatiert werden [131]. Dies impliziert, dass womöglich ein Zusammenhang zwischen sportinduzierter PCH und erhöhter C16:1 Serumspiegel beim Menschen besteht. Bernstein et al. verifizierten den kardioprotektiven Effekt von C16:1 durch eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie [254]. Die Supplementation von C16:1(cis) bewirkte bei dyslipidämischen Patienten eine signifikante Reduktion der Triglyzeride, des LDL-Cholesterins sowie eine deutliche Erhöhung des HDL-Cholesterins [254]. In weiteren randomisierten, klinischen Studien konnte die C16:1-Supplementation in Form von Macadamianusskonsum eine vergleichbare vorteilhafte Modifikation des Serumlipidprofils erzielen [126,255]. Zudem wurde eine anti-inflammatorische Wirkung von C16:1 durch Reduktion des CRP-Wertes apparent [254]. Bei Patienten mit prädiabetischer Stoffwechsellage konnten Stefan et al. eine positive Korrelation zwischen Erhöhung des C16:1-Serumspiegels und einer Verbesserung der Insulinsensitivität beobachten [119]. Ferner konnte kürzlich in noch unveröffentlichten Daten durch unsere Arbeitsgruppe auch ein anti-fibrotischer kardialer Effekt von C16:1 im Mausmodell nachgewiesen werden.

Im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen könnte C16:1 zukünftig ein bedeutender protektiver Behandlungsansatz für die Prophylaxe von pathologischer Hypertrophie und Herzinsuffizienz sein. Da das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz, trotz des enormen medizinischen Fortschritts, momentan nicht kausal, sondern nur symptomatisch therapiert werden kann, haben Präventionsstrategien zukünftig eine immer größere Bedeutung. Die Supplementation von C16:1 wäre zudem einfach realisierbar durch die orale Gabe von C16:1-Tabletten oder durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln mit einem hohem C16:1-Gehalt wie beispielsweise Sanddornbeeren, Macadamianüssen und Fischölen. Vor allem bei kardiovaskulären Hochrisikopatienten mit metabolischem Syndrom, Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonie, könnte C16:1 den Herzmuskel vorteilhaft schützen.

Möglicherweise könnte, abgesehen von dem prophylaktischen Einsatz, auch eine therapeutische Applikation von C16:1 bei Patienten mit HFpEF oder beginnender Kardiomyopathie von großem Vorteil sein. Um diesen Effekt an menschlichen Kohorten zu verifizieren, wären in naher Zukunft weitere randomisierte kontrollierte klinische Phase 2 Studien nötig. Diese präklinische Forschungsarbeit kann somit eine wichtige Grundlage für weitere klinische Studien bieten, um kardiovaskulären Hochrisikopatienten womöglich einen neuen vielversprechenden Prophylaxe- und Therapieansatz zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. WHO Cardiovascular Disease. In [zitiert 18. Februar 2021]. Verfügbar unter: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Flammer A, Steffel J, Lüscher T. Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen – Prävalenz, Risikofaktoren und Prävention. In: Steffel J, Lüscher T, Herausgeber. Herz-Kreislauf [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. S. 29–34. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-642-55112-3_3
3. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten [Internet]. Statistisches Bundesamt. [zitiert 17. Februar 2021]. Verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html
4. Bauriedel G, Skowasch D, Lüderitz B. Die chronische Herzinsuffizienz. Dtsch Ärztebl. 2005;12.
5. Teresa Kaufeler SW. Epidemiologie körperlicher Erkrankungen und Einschränkungen im Alter. In: Epidemiologie körperlicher Erkrankungen und Einschränkungen im Alter [Internet]. 2008. Aufl. Verlag W. Kohlhammer; S. 110–1. Verfügbar unter: <https://books.google.de/books?id=2tQvgFuOmHlC&printsec=frontcover&dq=Epidemiologie+körperlicher+Erkrankungen+kaufeler&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwj44-Wm3fDuAhWXjaQKHcR5DtIQ6AEwAHoECAEQAg#v=onepage&q=Epidemiologie%20körperlicher%20Erkrankungen%20kaufeler&f=false>
6. Versorgungsrealität in Deutschland: Wird die Herzfrequenz bei chronischer systolischer Herzinsuffizienz ausreichend gesenkt? [zitiert 17. Februar 2021]; Verfügbar unter: <https://dggk.org/pressemitteilungen/2013-jahrestagung/2013-ft-wissenschaftliche-pm/versorgungsrealitaet-in-deutschland-wird-die-herzfrequenz-bei-chronischer-systolischer-herzinsuffizienz-ausreichend-gesenkt/>
7. Tiller D, Russ M, Greiser KH, Nuding S, Ebelt H, Kluttig A, Kors JA, Thiery J, Bruegel M, Haerting J, Werdan K. Prevalence of symptomatic heart failure with reduced and with normal ejection fraction in an elderly general population-the CARLA study. PloS One. 2013;8(3):e59225.
8. Herzinsuffizienz: Immer mehr Betroffene – bessere Therapien senken die Sterblichkeit. 25. Januar 2017 [zitiert 17. Februar 2021]; Verfügbar unter: <https://dggk.org/pressemitteilungen/herzbericht-2016/herzinsuffizienz-immer-mehr-betroffene-bessere-therapien-senken-die-sterblichkeit/>
9. Vollstationäre Patientinnen und Patienten der Krankenhäuser [Internet]. Statistisches Bundesamt. [zitiert 17. Februar 2021]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/diagnose-kapitel-geschlecht.html>

10. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KKL, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 31. Oktober 2002;347(18):1397–402.
11. Arastéh, Keikawus, Baenkler, Hanns-Wolf, Bieber, Christiane. *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme (2012).
12. Pocket-Leitlinie: Herzinsuffizienz (Version 2016) [Internet]. [zitiert 17. Februar 2021]. Verfügbar unter: <https://leitlinien.dgk.org/2017/pocket-leitlinie-herzinsuffizienz-version-2017/>
13. Blinderman CD, Homel P, Billings JA, Portenoy RK, Tennstedt SL. Symptom distress and quality of life in patients with advanced congestive heart failure. *J Pain Symptom Manage*. Juni 2008;35(6):594–603.
14. Heo S, Moser DK, Lennie TA, Zambroski CH, Chung ML. A comparison of health-related quality of life between older adults with heart failure and healthy older adults. *Heart Lung J Crit Care*. Februar 2007;36(1):16–24.
15. Konstam V, Moser DK, De Jong MJ. Depression and anxiety in heart failure. *J Card Fail*. August 2005;11(6):455–63.
16. Goldman L, Hashimoto B, Cook EF, Loscalzo A. Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation*. Dezember 1981;64(6):1227–34.
17. Berliner D, Bauersachs J. Current Drug Therapy in Chronic Heart Failure: the New Guidelines of the European Society of Cardiology (ESC). *Korean Circ J*. September 2017;47(5):543–54.
18. 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, ESC Scientific Document Group. 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.
19. Inamdar AA, Inamdar AC. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. De Rosa S, Herausgeber. *J Clin Med*. Juli 2016;5(7):62.
20. Rainer Sabatowski BOMAier. *Palliativmedizin-1000 Fragen*. Rainer Sabatowski, Bernd Oliver Maier. Bd. 2013. Thieme; 2013. Seite 248.
21. Swedberg K, Komajda M, Böhm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L, SHIFT Investigators. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure

- (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet Lond Engl.* 11. September 2010;376(9744):875–85.
22. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 11. September 2014;371(11):993–1004.
 23. Kolte D, Abbott JD, Aronow HD. Interventional Therapies for Heart Failure in Older Adults. *Heart Fail Clin.* Juli 2017;13(3):535–70.
 24. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol.* 15. Dezember 2015;6(1):187–214.
 25. Viau DM, Sala-Mercado JA, Spranger MD, O’Leary DS, Levy PD. The pathophysiology of hypertensive acute heart failure. *Heart Br Card Soc.* Dezember 2015;101(23):1861–7.
 26. Maillet M, van Berlo JH, Molckentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Januar 2013;14(1):38–48.
 27. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:245–62.
 28. 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.
 29. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* November 1997;29(11):2873–92.
 30. Glennon PE, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J.* Juni 1995;73(6):496–9.
 31. Cacciapuoti F. Molecular mechanisms of left ventricular hypertrophy (LVH) in systemic hypertension (SH)-possible therapeutic perspectives. *J Am Soc Hypertens JASH.* Dezember 2011;5(6):449–55.
 32. Cooper G. Cardiocyte Adaptation to Chronically Altered Load. *Annu Rev Physiol.* 1. März 1987;49(1):501–18.
 33. Oparil S, Bishop SP, Clubb FJ. Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Dezember 1984;6(6 Pt 2):III38-43.
 34. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol.* November 1996;271(5 Pt 2):H2183-2189.

35. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev.* 15. August 2003;17(16):1937–56.
36. Schnyder S, Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone.* November 2015;80:115–25.
37. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* März 2001;141(3):334–41.
38. 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.
39. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 27. März 2008;358(13):1370–80.
40. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* April 2007;34(4):255–62.
41. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* Juli 1991;69(1):209–15.
42. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC, Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, Korsgaard N, Leier CV. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol.* Juli 1992;20(1):3–16.
43. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med.* Januar 1988;108(1):7–13.
44. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1. März 1991;114(5):345–52.
45. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.* Juni 1989;64(6):1041–50.
46. Czubryt MP, Olson EN. Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:105–24.
47. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* Oktober 2006;30(4):604–10.

48. 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.
49. Dorn GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Mai 2007;49(5):962–70.
50. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* August 2006;7(8):589–600.
51. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:551–71.
52. Reddy DS. Cellular and molecular biology of cardiac hypertrophy. *Curr Sci.* 1997;72(1):13–30.
53. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev.* Dezember 2007;12(3–4):331–43.
54. Doust J, Lehman R, Glasziou P. The role of BNP testing in heart failure. *Am Fam Physician.* 1. Dezember 2006;74(11):1893–8.
55. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 15. März 2007;356(11):1140–51.
56. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 30. August 2013;113(6):709–24.
57. Nickel A, Löffler J, Maack C. Myocardial energetics in heart failure. *Basic Res Cardiol.* Juli 2013;108(4):358.
58. Tian R. Transcriptional regulation of energy substrate metabolism in normal and hypertrophied heart. *Curr Hypertens Rep.* Dezember 2003;5(6):454–8.
59. Linzbach AJ. Hypertrophy, hyperplasia and structural dilatation of the human heart. *Adv Cardiol.* 1976;18(0):1–14.
60. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature.* 22. März 2007;446(7134):444–8.
61. Ghali JK, Liao Y, Simmons B, Castaner A, Cao G, Cooper RS. The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 15. November 1992;117(10):831–6.
62. Panidis IP, Kotler MN, Ren J-F, Mintz GS, Ross J, Kalman P. Development and regression of left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 1. Mai 1984;3(5):1309–20.

63. Tsao CW, Vasan RS. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. *Int J Epidemiol*. Dezember 2015;44(6):1800–13.
64. Kim YH, Her A-Y, Choi BG, Choi SY, Byun JK, Baek MJ, Ryu YG, Park Y, Mashaly A, Jang WY, Kim W, Choi JY, Park EJ, Na JO, Choi CU, Lim HE, Kim EJ, Park CG, Seo HS, Rha S-W. Impact of left ventricular hypertrophy on long-term clinical outcomes in hypertensive patients who underwent successful percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents. *Medicine (Baltimore)*. August 2018;97(35):e12067.
65. Sullivan JM, Vander Zwaag RV, el-Zeky F, Ramanathan KB, Mirvis DM. Left ventricular hypertrophy: effect on survival. *J Am Coll Cardiol*. August 1993;22(2):508–13.
66. Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 6:S37-50.
67. Henschen, S.E. Skidlauf und Skidwettlauf (Skilauf und Skiwettlauf). Eine medizinische Sportstudie (pp.1-75, zahlr. Fig.). 99 1898 [zitiert 17. Februar 2021]; Verfügbar unter: <https://www.vialibri.net/years/books/98218535/1898-henschen-salomon-eberhard-skidlauf-und-skidwettlauf-skilauf-und-skiwettlauf>
68. Kindermann W, Scharhag J. Die physiologische Herzhypertrophie (Sportherz). *Dtsch Z Für Sportmed*. 1. Dezember 2014;2014(12):327–32.
69. Reindell H, Klepzig H, Musshoff K. Das Sportherz. In: Buchborn E, Jahrmärker H, Klepzig H, Knebel R, Linzbach AJ, Musshoff K, Reindell H, Riecker G, Schwieglk H, Herausgeber. *Herzinsuffizienz Pathophysiologie-Pathologie-Therapie: Größen- und Formänderungen des Herzens · Sportherz, Schock und Kollaps [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1960. S. 913–51. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-642-94786-5_6
70. Rawlins J, Bhan A, Sharma S. Left ventricular hypertrophy in athletes. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol*. Mai 2009;10(3):350–6.
71. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1. Mai 2011;90(2):234–42.
72. Urhausen A, Monz T, Kindermann W. Sports-specific adaptation of left ventricular muscle mass in athlete's heart. I. An echocardiographic study with combined isometric and dynamic exercise trained athletes (male and female rowers). *Int J Sports Med*. November 1996;17 Suppl 3:S145-151.
73. Scharhag J, Schneider G, Urhausen A, Rochette V, Kramann B, Kindermann W. Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 20. November 2002;40(10):1856–63.

74. Ehsani AA, Hagberg JM, Hickson RC. Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am J Cardiol.* Juli 1978;42(1):52–6.
75. Winsor T, Beckner G. Hypertrophy of the heart; electrocardiographic distinction between physiologic and pathologic enlargement. *Calif Med.* März 1955;82(3):151–8.
76. Hew KW, Keller KA. Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* August 2003;68(4):309–20.
77. Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D, Abel ED. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol Baltim Md.* November 2008;22(11):2531–43.
78. Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Padeletti L, Michelucci A, Colella A, Galanti G. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ Res.* 23. November 2001;89(11):977–82.
79. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 1. Dezember 2000;19(23):6341–50.
80. Heiss HW, Barmeyer J, Wink K, Hell G, Cerny FJ, Keul J, Reindell H. Studies on the regulation of myocardial blood flow in man. I.: Training effects on blood flow and metabolism of the healthy heart at rest and during standardized heavy exercise. *Basic Res Cardiol.* Dezember 1976;71(6):658–75.
81. Burgess ML, Buggy J, Price RL, Abel FL, Terracio L, Samarel AM, Borg TK. Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. *Am J Physiol.* Januar 1996;270(1 Pt 2):H151-159.
82. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, Van Peborgh J, Paoni NF. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dezember 2000;279(6):H2994-3002.
83. Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med.* November 2006;16(8):285–91.
84. Maron BJ, Pelliccia A, Spataro A, Granata M. Reduction in left ventricular wall thickness after deconditioning in highly trained Olympic athletes. *Br Heart J.* Februar 1993;69(2):125–8.
85. Teramoto M, Bungum TJ. Mortality and longevity of elite athletes. *J Sci Med Sport.* Juli 2010;13(4):410–6.

86. Ruiz JR, Morán M, Arenas J, Lucia A. Strenuous endurance exercise improves life expectancy: it's in our genes. *Br J Sports Med.* März 2011;45(3):159–61.
87. Brown MS, Goldstein JL. Michael S. Brown, MD and Joseph L. Goldstein, MD. 1985 Nobel laureates in medicine. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* Februar 1996;44(2):14–23.
88. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mai 2008;9(5):367–77.
89. Sinning D, Landmesser U. [ECS guidelines 2016 - dyslipidaemias]. *Herz.* Dezember 2016;41(8):671–6.
90. Graham IM, Catapano AL, Wong ND. Current guidelines on prevention with a focus on dyslipidemias. *Cardiovasc Diagn Ther.* April 2017;7(Suppl 1):S4–10.
91. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.* Dezember 2003;31(Pt 6):1120–4.
92. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* Februar 2009;9(1):26–32.
93. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag; 2014. 1096 S.
94. Stefan Silbernagl H-CP. Physiologie [Internet]. 9. vollständig überarbeitete Auflage. Thieme; 2019 [zitiert 17. Februar 2021]. Verfügbar unter: <http://www.thieme.de/shop/Physiologie/Pape-Kurtz-Silbernagl-Physiologie-9783132423916/p/000000000210930109>
95. Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW, Bruce CR. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.* Februar 2014;220(2):T61–79.
96. 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.
97. 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.* 19. September 2008;134(6):933–44.
98. Ito M, Adachi-Akahane S. Inter-organ communication in the regulation of lipid metabolism: focusing on the network between the liver, intestine, and heart. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(4):312–7.

99. Andersen JB, Rourke BC, Caiozzo VJ, Bennett AF, Hicks JW. Physiology: postprandial cardiac hypertrophy in pythons. *Nature*. 3. März 2005;434(7029):37–8.
100. Secor SM, Diamond J. Effects of meal size on postprandial responses in juvenile Burmese pythons (*Python molurus*). *Am J Physiol*. März 1997;272(3 Pt 2):R902-912.
101. Secor SM, White SE. Prioritizing blood flow: cardiovascular performance in response to the competing demands of locomotion and digestion for the Burmese python, *Python molurus*. *J Exp Biol*. 1. Januar 2010;213(1):78–88.
102. Secor SM, Diamond J. Adaptive responses to feeding in Burmese pythons: pay before pumping. *J Exp Biol*. 1. Juni 1995;198(6):1313.
103. Secor SM, Diamond J. A vertebrate model of extreme physiological regulation. *Nature*. 15. Oktober 1998;395(6703):659–62.
104. Wall CE, Cozza S, Riquelme CA, McCombie WR, Heimiller JK, Marr TG, Leinwand LA. Whole transcriptome analysis of the fasting and fed Burmese python heart: insights into extreme physiological cardiac adaptation. *Physiol Genomics*. 1. Januar 2011;43(2):69–76.
105. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, Hotamisligil GS. Trans-Palmitoleic Acid, Metabolic Risk Factors, and New-Onset Diabetes in US Adults. *Ann Intern Med*. 21. Dezember 2010;153(12):790–9.
106. 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.
107. McLaren DS, Read WW. Fatty acid composition of adipose tissue. a study in three races in East Africa. *Clin Sci*. Oktober 1962;23:247–50.
108. 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.
109. 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.
110. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The Role of the Novel Lipokine Palmitoleic Acid in Health and Disease. *Adv Nutr Bethesda Md*. Januar 2017;8(1):173S-181S.
111. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*. März 2004;43(2):91–104.

112. 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.* März 2014;99(3):431–5.
113. Goeransson G. THE METABOLISM OF FATTY ACIDS IN THE RAT. V. PALMITOLEIC ACID. *Acta Physiol Scand.* April 1965;63:428–33.
114. Micha R, King IB, Lemaitre RN, Rimm EB, Sacks F, Song X, Siscovick DS, Mozaffarian D. Food sources of individual plasma phospholipid trans fatty acid isomers: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr.* April 2010;91(4):883–93.
115. Hodson L, Karpe F. Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* März 2013;16(2):225–31.
116. 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.
117. Fatima T, Snyder CL, Schroeder WR, Cram D, Datta 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.* 2012;7(4):e34099.
118. Vessby B, Tengblad S, Lithell H. Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia.* Oktober 1994;37(10):1044–50.
119. 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.
120. Welters HJ, Diakogiannaki E, Mordue JM, Tadayyon M, Smith SA, Morgan NG. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic beta-cells exposed to palmitate. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* Juli 2006;11(7):1231–8.
121. Shiba S, Tsunoda N, Wakutsu M, Muraki E, Sonoda M, Tam PSY, Fujiwara Y, Ikemoto S, Kasono K. Regulation of lipid metabolism by palmitoleate and eicosapentaenoic acid (EPA) in mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(12):2401–3.
122. 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.* 21. Juli 2011;10:120.
123. 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*. 2012;7(6):e39286.

124. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min H-K, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. Dezember 2009;50(6):1827–38.
125. 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.
126. Garg ML, Blake RJ, Wills RBH. Macadamia nut consumption lowers plasma total and LDL cholesterol levels in hypercholesterolemic men. *J Nutr*. April 2003;133(4):1060–3.
127. Wilke MS, French MA, Goh YK, Ryan EA, Jones PJ, Clandinin MT. Synthesis of specific fatty acids contributes to VLDL-triacylglycerol composition in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*. August 2009;52(8):1628–37.
128. Fattore E, Fanelli R. Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *Int J Food Sci Nutr*. August 2013;64(5):648–59.
129. Chen Y-P, Tsai C-W, Shen C-Y, Day C-H, Yeh Y-L, Chen R-J, Ho T-J, Padma VV, Kuo W-W, Huang C-Y. Palmitic acid interferes with energy metabolism balance by adversely switching the SIRT1-CD36-fatty acid pathway to the PKC zeta-GLUT4-glucose pathway in cardiomyoblasts. *J Nutr Biochem*. Mai 2016;31:137–49.
130. Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LAW, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*. Januar 2006;55(1):148–57.
131. Foryst-Ludwig A, Kreissl MC, Benz V, Brix S, Smeir E, Ban Z, Januszewicz E, Salatzki J, Grune J, Schwanstecher A-K, Blumrich A, Schirbel A, Klopffleisch R, Rothe M, Blume K, Halle M, Wolfarth B, Kershaw EE, Kintscher U. Adipose Tissue Lipolysis Promotes Exercise-induced Cardiac Hypertrophy Involving the Lipokine C16:1n7-Palmitoleate. *J Biol Chem*. 25. September 2015;290(39):23603–15.
132. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2. Mai 2006;113(17):2097–104.
133. Conlon I, Raff M. Size control in animal development. *Cell*. 22. Januar 1999;96(2):235–44.
134. Heyner S, Garside WT. Biological actions of IGFs in mammalian development. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. Januar 1994;16(1):55–7.

135. Liu T-J, Lai H-C, Ting C-T, Wang PH. Bidirectional regulation of upstream IGF-I/insulin receptor signaling and downstream FOXO1 in cardiomyocytes. *J Endocrinol.* Januar 2007;192(1):149–58.
136. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res.* 7. September 1998;83(5):516–22.
137. Guo CA, Guo S. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. *J Endocrinol.* Juni 2017;233(3):R131–43.
138. Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* April 2015;4(2):165–76.
139. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* August 2006;7(8):606–19.
140. Cho KS, Lee JH, Kim S, Kim D, Koh H, Lee J, Kim C, Kim J, Chung J. Drosophila phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22. Mai 2001;98(11):6144–9.
141. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* August 2001;114(Pt 16):2903–10.
142. Kozma SC, Thomas G. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* Januar 2002;24(1):65–71.
143. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 20. April 2017;169(3):381–405.
144. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 16. Dezember 1996;399(3):333–8.
145. Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem.* 21. Juni 2002;277(25):22896–901.
146. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* April 2002;22(8):2799–809.
147. Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol Baltim Md.* Mai 1991;5(5):718–24.

148. Soesanto W, Lin H-Y, Hu E, Lefler S, Litwin SE, Sena S, Abel ED, Symons JD, Jalili T. Mammalian target of rapamycin is a critical regulator of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Dezember 2009;54(6):1321–7.
149. Andjelković M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11. Juni 1996;93(12):5699–704.
150. Weigel D, Jäckle H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*. 2. November 1990;63(3):455–6.
151. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 15. Januar 2000;14(2):142–6.
152. Mazet F, Yu JK, Liberles DA, Holland LZ, Shimeld SM. Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene*. 16. Oktober 2003;316:79–89.
153. Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 19. Mai 1989;57(4):645–58.
154. van der Vos KE, Coffey PJ. The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid Redox Signal*. 15. Februar 2011;14(4):579–92.
155. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 14. November 2005;24(50):7410–25.
156. Coomans de Brachène A, Demoulin J-B. FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci CMLS*. März 2016;73(6):1159–72.
157. Wang Z, Yu T, Huang P. Post-translational modifications of FOXO family proteins (Review). *Mol Med Rep*. Dezember 2016;14(6):4931–41.
158. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*. 7. April 2008;27(16):2263–75.
159. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*. April 2014;39(4):159–69.
160. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 30. April 2004;117(3):399–412.
161. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN,

- Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 23. November 2001;294(5547):1704–8.
162. Hu J, Klein JD, Du J, Wang XH. Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology*. November 2008;149(11):5384–90.
163. Ronnebaum SM, Patterson C. The FoxO family in cardiac function and dysfunction. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:81–94.
164. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*. 30. Oktober 1997;389(6654):994–9.
165. Vogt PK, Jiang H, Aoki M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle Georget Tex*. Juli 2005;4(7):908–13.
166. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 19. März 1999;96(6):857–68.
167. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*. 15. April 1999;398(6728):630–4.
168. Tang ED, Nuñez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem*. 11. Juni 1999;274(24):16741–6.
169. Takaishi H, Konishi H, Matsuzaki H, Ono Y, Shirai Y, Saito N, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Kikkawa U, Nishizuka Y. Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12. Oktober 1999;96(21):11836–41.
170. Biggs WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22. Juni 1999;96(13):7421–6.
171. Van Der Heide LP, Hoekman MFM, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*. 1. Juni 2004;380(Pt 2):297–309.
172. Obsilová V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 3:S11-21.
173. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*. November 2011;1813(11):1938–45.

174. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol.* 4. März 2002;156(5):817–28.
175. Nakae J, Park BC, Accili D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem.* 4. Juni 1999;274(23):15982–5.
176. Ni YG, Berenji K, Wang N, Oh M, Sachan N, Dey A, Cheng J, Lu G, Morris DJ, Castrillon DH, Gerard RD, Rothermel BA, Hill JA. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation.* 12. September 2006;114(11):1159–68.
177. Ni YG, Wang N, Cao DJ, Sachan N, Morris DJ, Gerard RD, Kuro-O M, Rothermel BA, Hill JA. FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18. Dezember 2007;104(51):20517–22.
178. Fuentes EN, Björnsson BT, Valdés JA, Einarsdottir IE, Lorca B, Alvarez M, Molina A. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Juni 2011;300(6):R1532-1542.
179. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med.* August 2003;9(8):344–50.
180. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* Februar 2003;5(2):87–90.
181. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 17. Mai 1991;65(4):663–75.
182. Yang S-H, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* 15. Januar 2013;513(1):1–13.
183. Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS, Olwin BB. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J Cell Physiol.* Januar 2001;186(1):104–15.
184. Chambard J-C, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta.* August 2007;1773(8):1299–310.
185. Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* September 2000;22(9):818–26.

186. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* März 2002;12(1):9–18.
187. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem.* 5. Oktober 1992;267(28):20293–7.
188. L'Allemain G, Sturgill TW, Weber MJ. Defective regulation of mitogen-activated protein kinase activity in a 3T3 cell variant mitogenically nonresponsive to tetradecanoyl phorbol acetate. *Mol Cell Biol.* Februar 1991;11(2):1002–8.
189. Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Böhm M, MacKiewicz A, Behrmann I. Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem J.* 1. Juli 2001;357(Pt 1):297–303.
190. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* August 1993;7(8):1559–71.
191. Modi PK, Komaravelli N, Singh N, Sharma P. Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Mol Biol Cell.* September 2012;23(18):3722–30.
192. Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol.* September 1997;17(9):5588–97.
193. Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol CB.* 20. Juni 2006;16(12):1171–82.
194. Pan C-W, Jin X, Zhao Y, Pan Y, Yang J, Karnes RJ, Zhang J, Wang L, Huang H. AKT-phosphorylated FOXO1 suppresses ERK activation and chemoresistance by disrupting IQGAP1-MAPK interaction. *EMBO J.* 13. April 2017;36(8):995–1010.
195. 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 U S A.* 17. März 1998;95(6):2979–84.
196. Smith RJ, Bryant RG. Metal substitutions in carbonic anhydrase: a halide ion probe study. *Biochem Biophys Res Commun.* 27. Oktober 1975;66(4):1281–6.
197. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 15. November 1988;175(1):231–7.

198. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15. August 1970;227(5259):680–5.
199. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S, Unterman TG. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*. 22. November 2002;277(47):45276–84.
200. Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem*. 11. Juni 1999;274(24):17184–92.
201. Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofe S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem*. 27. Mai 2005;280(21):20814–23.
202. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest*. September 2009;119(9):2758–71.
203. Li H-H, Willis MS, Lockyer P, Miller N, McDonough H, Glass DJ, Patterson C. Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *J Clin Invest*. November 2007;117(11):3211–23.
204. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. April 2017;23(4):310–9.
205. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 16. Juni 1994;369(6481):574–8.
206. Campbell JS, Seger R, Graves JD, Graves LM, Jensen AM, Krebs EG. The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. 1995;50:131–59.
207. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 14. Mai 2007;26(22):3291–310.
208. Sengupta A, Molkenin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 9. Oktober 2009;284(41):28319–31.
209. Schips TG, Wietelmann A, Höhn K, Schimanski S, Walther P, Braun T, Wirth T, Maier HJ. FoxO3 induces reversible cardiac atrophy and autophagy in a transgenic mouse model. *Cardiovasc Res*. 1. September 2011;91(4):587–97.

210. Fang CX, Dong F, Thomas DP, Ma H, He L, Ren J. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. September 2008;295(3):H1206–15.
211. Li H-H, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang D-Z, Patterson C. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest*. Oktober 2004;114(8):1058–71.
212. Chen B, Ma Y, Meng R, Xiong Z, Wang H, Zeng J, Liu C, Dong Y. Activation of AMPK inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating of the FOXO1/MuRF1 signaling pathway in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. Juli 2010;31(7):798–804.
213. Zhao Y, Wang Y, Zhu W-G. Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J Mol Cell Biol*. Oktober 2011;3(5):276–82.
214. Rena G, Woods YL, Prescott AR, Peggie M, Unterman TG, Williams MR, Cohen P. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *EMBO J*. 1. Mai 2002;21(9):2263–71.
215. van Gorp AGM, Pomeranz KM, Birkenkamp KU, Hui RC-Y, Lam EW-F, Coffey PJ. Chronic protein kinase B (PKB/c-akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated Foxo3a transcriptional up-regulation. *Cancer Res*. 15. November 2006;66(22):10760–9.
216. Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*. 4. April 2003;278(14):12361–6.
217. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30. September 2003;100(20):11285–90.
218. Aoki M, Jiang H, Vogt PK. Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. September 2004;101(37):13613–7.
219. Davis RJ, Bennicelli JL, Macina RA, Nycum LM, Biegel JA, Barr FG. Structural characterization of the FKHR gene and its rearrangement in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum Mol Genet*. Dezember 1995;4(12):2355–62.
220. Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol*. Mai 2001;21(10):3534–46.
221. Singh A, Ye M, Bucur O, Zhu S, Tanya Santos M, Rabinovitz I, Wei W, Gao D, Hahn WC, Khosravi-Far R. Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT. *Mol Biol Cell*. 15. März 2010;21(6):1140–52.

222. Hou G-J, Li C-N, Huan Y, Liu S-N, Liu Q, Liu M-Z, Shen Z-F. The PI3K/Akt1-FoxO1 Translocation Pathway Mediates EXf Effects on NIT-1 Cell Survival. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* November 2017;125(10):669–76.
223. Fabre S, Lang V, Harriague J, Jobart A, Unterman TG, Trautmann A, Bismuth G. Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. April 2005;174(7):4161–71.
224. Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J.* 15. März 2001;354(Pt 3):605–12.
225. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4. Dezember 2001;98(25):14440–5.
226. Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, Taegtmeyer H. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 7. April 2006;342(2):361–4.
227. Song DW, Ryu JY, Kim JO, Kwon EJ, Kim DH. The miR-19a/b family positively regulates cardiomyocyte hypertrophy by targeting atrogin-1 and MuRF-1. *Biochem J.* 1. Januar 2014;457(1):151–62.
228. Galasso G, De Rosa R, Piscione F, Iaccarino G, Vosa C, Sorriento D, Piccolo R, Rapacciuolo A, Walsh K, Chiariello M. Myocardial expression of FOXO3a-Atrogin-1 pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail.* Dezember 2010;12(12):1290–6.
229. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* November 1996;213(2):138–49.
230. Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2. Februar 1999;96(3):1002–7.
231. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 16. Dezember 1993;366(6456):701–4.
232. Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* 15. August 2001;61(16):6234–8.
233. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* Juni 2002;1(8):639–49.

234. Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* Januar 1998;18(1):629–43.
235. Goss RJ. Hypertrophy versus hyperplasia. *Science.* 30. September 1966;153(3744):1615–20.
236. Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.* Februar 2003;31(Pt 1):292–7.
237. Sengupta A, Kalinichenko VV, Yutzey KE. FoxO1 and FoxM1 transcription factors have antagonistic functions in neonatal cardiomyocyte cell-cycle withdrawal and IGF1 gene regulation. *Circ Res.* 18. Januar 2013;112(2):267–77.
238. Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circ Res.* 28. März 2008;102(6):686–94.
239. Kardassis D, Papakosta P, Pardali K, Moustakas A. c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem.* 8. Oktober 1999;274(41):29572–81.
240. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJA, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, Markman B, Rodriguez O, Guzman M, Rodriguez S, Gili M, Russillo M, Parra JL, Singh S, Arribas J, Rosen N, Baselga J. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene.* 2. Juni 2011;30(22):2547–57.
241. Matkar S, An C, Hua X. Kinase inhibitors of HER2/AKT pathway induce ERK phosphorylation via a FOXO-dependent feedback loop. *Am J Cancer Res.* 2017;7(7):1476–85.
242. Yang J-Y, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang J-Y, Lai C-C, Chang C-J, Huang W-C, Huang H, Kuo H-P, Lee D-F, Li L-Y, Lien H-C, Cheng X, Chang K-J, Hsiao C-D, Tsai F-J, Tsai C-H, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung M-C. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol.* Februar 2008;10(2):138–48.
243. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation.* 9. Dezember 2008;118(24):2523–32.

244. Bautista LE, Herrán OF, Serrano C. Effects of palm oil and dietary cholesterol on plasma lipoproteins: results from a dietary crossover trial in free-living subjects. *Eur J Clin Nutr.* September 2001;55(9):748–54.
245. Kochikuzhyil BM, Devi K, Fattepur SR. Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. *Indian J Pharmacol.* Juni 2010;42(3):142–5.
246. Chen BK, Seligman B, Farquhar JW, Goldhaber-Fiebert JD. Multi-Country analysis of palm oil consumption and cardiovascular disease mortality for countries at different stages of economic development: 1980-1997. *Glob Health.* 16. Dezember 2011;7:45.
247. Bi L, Chiang JYL, Ding W-X, Dunn W, Roberts B, Li T. Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice. *J Lipid Res.* Oktober 2013;54(10):2754–62.
248. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* September 2012;53(9):2002–13.
249. Nguyen S, Shao D, Tomasi LC, Braun A, de Mattos ABM, Choi YS, Villet O, Roe N, Halterman CR, Tian R, Kolwicz SC. The effects of fatty acid composition on cardiac hypertrophy and function in mouse models of diet-induced obesity. *J Nutr Biochem.* 2017;46:137–42.
250. Casquel De Tomasi L, Salomé Campos DH, Grippa Sant’Ana P, Okoshi K, Padovani CR, Masahiro Murata G, Nguyen S, Kolwicz SC, Cicogna AC. Pathological hypertrophy and cardiac dysfunction are linked to aberrant endogenous unsaturated fatty acid metabolism. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193553.
251. Takahashi R, Okumura K, Asai T, Hirai T, Murakami H, Murakami R, Numaguchi Y, Matsui H, Ito M, Murohara T. Dietary fish oil attenuates cardiac hypertrophy in lipotoxic cardiomyopathy due to systemic carnitine deficiency. *Cardiovasc Res.* 1. November 2005;68(2):213–23.
252. Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet.* Januar 2007;8(1):58–69.
253. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* Februar 2011;47(2):125–31.
254. 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.* Dezember 2014;8(6):612–7.

255. 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.* April 2008;138(4):761–7.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Julia Qaiyumi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Palmitoleinsäure (C16:1) auf die PI3K/AKT/FOXO und ERK 1/2 (MAPK) Signalkaskaden im Kontext physiologischer kardialer Hypertrophie“ 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.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sarah Julia Qaiyumi hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Qaiyumi S, Klapper W, Hauschild A, Weichenthal M (2021). Rare haematologic and neurologic drug reactions from immune checkpoint inhibition in a responding patient with metastatic anorectal mucosal melanoma. European Journal of Cancer (under review). Erstautorin. Verfassung des Manuskripts, Literaturrecherche, Auswertung klinischer Daten.

Poster

Qaiyumi S, Koch Franz, Kiecker F, Hillen U. Seltene isolierte endobronchiale/endotracheale Metastasierung eines akral-lentiginösen malignen Melanoms. (31. Deutscher Hautkrebskongress, ADO- Arbeitsgemeinschafts Dermatologische Onkologie, 2021. Erstautorin und Referentin. Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung aller Graphiken in Photoshop und Präsentation des Posters.

Qaiyumi S, Kosova K, Hauschild A, Kähler K. Rasche Resistenzbildung unter einer BRAF/MEK-Inhibition mittels Encorafenib/Binimetinib nach initial eindrucksvollem Ansprechen eines hochaggressiven metastasierten Melanoms. (30. Deutscher Hautkrebskongress, ADO- Arbeitsgemeinschafts Dermatologische Onkologie, 2020. Erstautorin und Referentin. Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung aller Graphiken in Photoshop und Präsentation des Posters.

Qaiyumi S, Betz I, Brix S, Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Palmitoleic Acid (C16:1) regulates the AKT/FOXO- and ERK 1/2 signaling pathways in HL-1 cardiomyocytes. Herztage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Berlin 2017. (DGK Herztage Heft 10/2017, Metabolic Regulation of Myocardial Function, S.50) 2017. Erstautorin und Referentin. Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Ausarbeitung aller Graphiken in Photoshop und Präsentation des Posters.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

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

10 Publikationen

Qaiyumi S, Klapper W, Hauschild A, Weichenthal M (2021). Rare haematologic and neurologic drug reactions from immune checkpoint inhibition in a responding patient with metastatic anorectal mucosal melanoma. *European Journal of Cancer* (under review).

Poster

Qaiyumi S, Koch Franz, Kiecker F, Hillen U. Seltene isolierte endobronchiale/endotracheale Metastasierung eines akral-lentiginösen malignen Melanoms. (31. Deutscher Hautkrebskongress, ADO- Arbeitsgemeinschafts Dermatologische Onkologie, 2021).

Qaiyumi S, Kosova K, Hauschild A, Kähler K. Rasche Resistenzbildung unter einer BRAF/MEK-Inhibition mittels Encorafenib/Binimetinib nach initial eindrucksvollem Ansprechen eines hochaggressiven metastasierten Melanoms. (30. Deutscher Hautkrebskongress, ADO- Arbeitsgemeinschafts Dermatologische Onkologie, 2020).

Qaiyumi S, Betz I, Brix S, Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Palmitoleic Acid (C16:1) regulates the AKT/FOXO- and ERK 1/2 signaling pathways in HL-1 cardiomyocytes. *Herztage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Berlin 2017. (DGK Herztage Heft 10/2017, Metabolic Regulation of Myocardial Function, S.50) 2017.*

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Ulrich Kintscher, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe zu einem sehr spannenden Thema zu promovieren, was mich bis heute begeistert. Ich danke Ihnen für Ihre fachliche Expertise, Ihre interessanten Ideen, Ihren äußerst schnellen Korrekturen sowie für das ausgesprochen nette Klima in Ihrer Arbeitsgruppe.

Ein außerordentlicher Dank geht an Frau PD Dr. Anna Foryst-Ludwig für Ihre Betreuung meines Projektes. Ich bin dankbar für die Geduld, die mir fürsorglich entgegengebracht wurde sowie für die fachliche, moralische und zwischenmenschliche Unterstützung und auch dafür, dass es immer ein offenes Ohr für mich gab. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können.

Ein großer Dank gilt ferner Frau Dr. Iris Betz für Ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Ihr detailliertes fachliches, technisches sowie administratives Know-how, womit sie mich sehr unterstützte während unser gemeinsamen Doktorandenzeit.

Ich möchte mich weiterhin bei der gesamten AG Kintscher bedanken für die Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken sowie für die sehr schöne Zeit in und außerhalb des Doktorandenraums. Mein Dank gilt hier vor allem Beata Höft, Frau Dr. Annelie Blumrich, Frau Dr. Sarah Brix, Frau Dr. Jana Grune, Herrn Dr. Niklas Beyhoff und Herrn Dr. Elia Smeir. Die Doktorandenzeit mit Euch wird eine sehr schöne Erinnerung bleiben.

Ein tief empfundener Dank gilt ferner meinen lieben Eltern sowie meinem Bruder für die Ermöglichung meiner gesamten akademischen Ausbildung sowie für die Unterstützung über all die Jahre. Auch dem Korrekturleser Sebastian Boewer sei nochmals auf diesem Wege ein großer Dank ausgesprochen.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Thomas Schwarz, Herrn Prof. Axel Hauschild sowie Prof. Michael Weichenthal, die mich außerhalb meiner Doktorarbeit an dem Universitätsklinikum Kiel in der Klinik für Dermatologie, Venerologie & Allergologie für klinisch wissenschaftliches Arbeiten begeisterten. Sie wurden für mich sowohl fachlich als auch menschlich zu Vorbildern und ermutigten mich, meine Doktorarbeit neben der klinischen Tätigkeit fertigzustellen.