
Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Akute Effekte von Palmitoleat auf die Ca²⁺-Homöostase ventrikulärer
Kardiomyozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Guthof

aus Kassel

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis..... | VII |
| Zusammenfassung | VIII |
| Abstract | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Herzinsuffizienz | 1 |
| 1.1.1 Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion..... | 1 |
| 1.1.2 „Lipotoxische“ und diabetische Kardiomyopathie | 2 |
| 1.2 Palmitoleat..... | 3 |
| 1.3 Elektromechanische Kopplung..... | 4 |
| 1.3.1 Transversales tubuläres System und der „junktionale Spalt“ | 4 |
| 1.3.2 Ca ²⁺ -Freisetzung | 5 |
| 1.3.3 Ca ²⁺ -Elimination | 5 |
| 1.3.4 Spontane diastolische Ca ²⁺ -Freisetzung | 5 |
| 1.4 Struktur, Funktion und Regulation von Proteinen der Ca ²⁺ -Homöostase | 6 |
| 1.4.1 L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle | 6 |
| 1.4.2 Ryanodin Rezeptor Typ 2 | 6 |
| 1.4.3 Ca ²⁺ -ATPase 2A des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums | 7 |
| 1.4.4 Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher..... | 7 |
| 1.4.5 Protein-Kinasen A..... | 7 |
| 1.4.6 Calmodulin und Calmodulin abhängige Kinasen | 8 |
| 1.5 „Hallmarks“ der gestörten Ca ²⁺ -Homöostase bei Herzinsuffizienz | 9 |
| 1.5.1 Gestörte Ca ²⁺ -Freisetzung..... | 9 |
| 1.5.2 Gestörte Ca ²⁺ -Elimination | 9 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.5.3 | Proarrhythmogenes Remodeling..... | 10 |
| 1.6 | Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei der diabetischen Kardiomyopathie..... | 10 |
| 1.7 | Fragestellung | 11 |
| 2 | Material und Methoden..... | 12 |
| 2.1 | Versuchstiere | 12 |
| 2.2 | Chemikalien..... | 12 |
| 2.3 | Verwendete Lösungen und Puffer | 14 |
| 2.3.1 | Kardiomyozyten-Isolation | 14 |
| 2.3.2 | Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung | 14 |
| 2.3.3 | Messungen am Fluoreszenz-Mikroskop | 15 |
| 2.4 | Antikörper | 15 |
| 2.5 | Geräte und Materialien..... | 15 |
| 2.6 | Isolation von Kardiomyozyten | 16 |
| 2.6.1 | Präparation und Kanülierung des Herzens..... | 16 |
| 2.6.2 | Verdau am Langendorff-Apparat..... | 17 |
| 2.6.3 | Mechanische Dissoziation und Habituation an physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen | 17 |
| 2.7 | Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung..... | 18 |
| 2.7.1 | Herstellung von Homogenisaten für Western Blot Untersuchungen..... | 18 |
| 2.7.2 | Protein Quantifizierung..... | 18 |
| 2.7.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 18 |
| 2.7.4 | Western-Blot, Gesamtproteinfärbung und Blockierung | 19 |
| 2.7.5 | Immundetektion und Auswertung..... | 19 |
| 2.8 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 20 |
| 2.8.1 | Konfokales Ca^{2+} -Imaging | 20 |
| 2.8.2 | Stimulationsprotokoll und Messung des gespeicherten Ca^{2+} | 21 |
| 2.8.3 | Quantifizierung der Verteilung der T-Tubuli | 22 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.9 | Begriffsdefinitionen..... | 23 |
| 2.10 | Software-gestützte Auswertung der Daten..... | 23 |
| 2.11 | Darstellung der Daten und statistische Analyse..... | 25 |
| 3 | Ergebnisse..... | 27 |
| 3.1 | Auswirkungen von Palmitoleat auf die Ca ²⁺ -Freisetzung und Ca ²⁺ -Elimination | 27 |
| 3.1.1 | Veränderung der subzellulären Ca ²⁺ -Freisetzung..... | 30 |
| 3.2 | Auswirkung auf das T-Tubuli System..... | 33 |
| 3.3 | Palmitoleat hemmt die Aktivität von SERCA2A und NCX | 34 |
| 3.4 | Auswirkung auf die Phosphorylierung von Proteinen der Ca ²⁺ -Homöostase..... | 35 |
| 3.5 | Auswirkung auf die Ca ²⁺ -Homöostase bei höheren Stimulationsfrequenzen | 37 |
| 3.6 | Auswirkung auf die spontane Ca ²⁺ -Freisetzung und die Arrhythmogenität | 39 |
| 4 | Diskussion..... | 43 |
| 4.1 | Effekte von Fettsäuren auf Kardiomyozyten..... | 43 |
| 4.2 | Unterschiede der Fettsäuren Palmitat und Palmitoleat..... | 45 |
| 4.3 | Aufnahme von Palmitoleat in Kardiomyozyten | 47 |
| 4.4 | Überlegungen zur Wahl der Konzentration von Palmitoleat | 47 |
| 4.5 | Ergebnisse der Untersuchungen der Ca ²⁺ -Homöostase..... | 49 |
| 4.5.1 | Veränderungen der Ca ²⁺ -Freisetzung bei 1 Hz..... | 49 |
| 4.5.2 | Veränderungen der Ca ²⁺ -Elimination bei 1 Hz..... | 53 |
| 4.5.3 | Ca ²⁺ -Homöostase bei 5 Hz..... | 54 |
| 4.5.4 | Spontane Ca ²⁺ -Freisetzung | 56 |
| 4.6 | Implikationen von Palmitoleat bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie | 59 |
| 4.7 | Limitationen und zukünftige Fragestellungen..... | 60 |
| 4.8 | Conclusio..... | 62 |
| 5 | Literaturverzeichnis | 63 |
| 6 | Eidesstattliche Versicherung..... | 76 |
| 7 | Lebenslauf..... | 77 |

| | | |
|---|------------------------|----|
| 8 | Publikationsliste..... | 79 |
| 9 | Danksagung | 80 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| <i>BSA</i> | <i>bovines Serumalbumin</i> |
| <i>C16:1</i> | <i>(cis-)Palmitoleat</i> |
| Ca^{2+} | <i>Calcium</i> |
| <i>CaM</i> | <i>Calmodulin</i> |
| <i>CaMKII</i> | <i>Calmodulin-abhängige Kinasen 2</i> |
| <i>cAMP</i> | <i>cyclisches Adenosin-Monophosphat</i> |
| <i>CICR</i> | <i>Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung</i> |
| <i>DADs</i> | <i>späte Nachdepolarisationen</i> |
| <i>EADs</i> | <i>frühe Nachdepolarisationen</i> |
| <i>ECC</i> | <i>Elektro-mechanische Kopplung</i> |
| <i>HFpEF</i> | <i>Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion</i> |
| <i>HFrEF</i> | <i>Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion</i> |
| <i>I_{CaL}</i> | <i>langsamer Ca²⁺-Ionen Strom</i> |
| <i>IQA</i> | <i>Interquartilsabstand</i> |
| <i>kDa</i> | <i>Kilodalton</i> |
| <i>LTCC</i> | <i>L-Typ Ca²⁺-Kanäle</i> |
| Na^+ | <i>Natrium-Ionen</i> |
| <i>NCX</i> | <i>Natrium-Ca²⁺-Austauscher</i> |
| <i>NFAT</i> | <i>nuclear factor of activated T-cells</i> |
| <i>NT</i> | <i>Normal Tyrode</i> |
| <i>PKA</i> | <i>Protein Kinasen der Gruppe A</i> |
| <i>PLN</i> | <i>Phospholamban</i> |
| <i>RIPA Puffer</i> | <i>Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer</i> |
| <i>ROS</i> | <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i> |
| <i>RyR</i> | <i>Ryanodinrezeptor</i> |
| <i>SCD</i> | <i>Stearoyl-CoA Desaturase</i> |
| <i>SERCA2A</i> | <i>SR ständige Ca²⁺-ATPase 2A</i> |
| <i>SF</i> | <i>Standardfehler</i> |
| <i>Spark</i> | <i>Ca²⁺-Spark</i> |
| <i>SR</i> | <i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i> |
| <i>TAU</i> | <i>Zeitkonstante des Abfalls der Ca²⁺-Konzentration</i> |
| <i>TBS-T</i> | <i>Tris-Borat-Natrium-Tween 20</i> |
| <i>TF₅₀</i> | <i>Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Ca²⁺-Freisetzung</i> |
| <i>TTP</i> | <i>Zeit bis zum Erreichen der maximalen Ca²⁺-Freisetzung</i> |
| <i>T-Tubuli</i> | <i>transversale Tubuli</i> |
| <i>Wave</i> | <i>Ca²⁺-Wave</i> |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Graphische Darstellung des Messprotokolls..... | 22 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Parameter der Ca^{2+} -Homöostase | 23 |
| Abbildung 3: Repräsentative Linescans und globale Ca^{2+} -Transienten..... | 27 |
| Abbildung 4: Amplitude der Ca^{2+} -Freisetzung. | 28 |
| Abbildung 5: Parameter der Kinetik der Ca^{2+} -Freisetzung..... | 29 |
| Abbildung 6: Zeitkonstante TAU der Ca^{2+} -Elimination. | 29 |
| Abbildung 7: SR Ca^{2+} -Gehalt und fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung. | 30 |
| Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der lokalen Ca^{2+} -Freisetzungskinetik einer Kontrollzelle (oben) und einer mit Palmitoleat behandelten Zelle (unten)..... | 31 |
| Abbildung 9: Anteil der Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten mit früher Ca^{2+} -Freisetzung..... | 32 |
| Abbildung 10: TF50 der späten Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten (links) und die Wahrscheinlichkeit der frühen Ca^{2+} -Freisetzung (rechts)..... | 33 |
| Abbildung 11: Repräsentative Aufnahmen der T-Tubuli. | 33 |
| Abbildung 12: T-Tubuli Signaldichte (links) und Variationskoeffizient der T-Tubuli Dichte (rechts)..... | 34 |
| Abbildung 13: Surrogatparameter der Aktivitäten von SERCA2A und NCX..... | 35 |
| Abbildung 14: Phosphorylierung von RyR P-Ser 2808 und RyR P-Ser 2814..... | 36 |
| Abbildung 15: Frequenzabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten. | 37 |
| Abbildung 16: Die relative diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die relative maximale Ca^{2+} -Freisetzung..... | 38 |
| Abbildung 17: Korrelationen der frequenzabhängigen Änderung von F_0 mit TAU_{SS} (links) und der fraktionierten Ca^{2+} -Freisetzung mit TF50 (rechts). | 38 |
| Abbildung 18: Line Scan mit repräsentativem Spark in der Interventionsgruppe (links) und Spark Frequenz mit und ohne Matching nach SR Ca^{2+} -Gehalt (rechts)..... | 39 |
| Abbildung 19: Sparkdauer (links) und Spark Amplitude (rechts). | 40 |
| Abbildung 20: Wave Frequenz (links) und Verhältnis von Wave zu Spark Frequenz (rechts).... | 41 |
| Abbildung 21: X-Y-Plot der Wave Propagationsgeschwindigkeit gegen den SR Ca^{2+} -Gehalt (links) und Wave Propagationsgeschwindigkeit nach dem Matching (rechts). | 41 |
| Abbildung 22: Korrelation der Wave Propagation-Geschwindigkeit mit der TAU_{Wave} (links). . | 42 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper | 20 |
|---|----|

Zusammenfassung

Ziele:

Erhöhte Serumkonzentrationen von Palmitoleat sind mit einem erhöhten Herzinsuffizienzrisiko assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Palmitoleat auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die T-Tubuli in ventrikulären Kardiomyozyten untersucht.

Methodik und Ergebnisse:

Ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte wurden mit Palmitoleat (C16:1, 120 ng/l, 30 min) oder BSA als Kontrolle inkubiert. Es wurden Ca^{2+} -Transienten, Sparks und Waves (Fluo-4, konfokal) während der Stimulation im elektrischen Feld (1 und 5 Hz) und der Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums (Gabe von Coffein) untersucht. Weiterhin wurde die Phosphorylierung der Ryanodin-Rezeptoren (Western Blot) und die Verteilung der T-Tubuli untersucht (Di-8-ANEPPS). Bei 1 Hz zeigten die mit C16:1 inkubierten Myozyten eine gegenüber der Kontrolle unveränderte Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, aber eine verlängerte Zeit bis zur maximalen Ca^{2+} -Freisetzung (34,6 ms vs. 24,2 ms, $p < 0,05$) und eine verlangsamte Ca^{2+} -Elimination (TAU, 116 ms vs. 68 ms, $p < 0,05$). Die Ca^{2+} -Freisetzung war dyssynchroner mit signifikant weniger frühen Ca^{2+} -Freisetzungseignissen (29% vs. 64%, $p < 0,05$). Bei 5 Hz zeigte sich ein erhöhter Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums (2,58 vs. 2,24 F/F₀, $p < 0,05$) und ein signifikanter Anstieg des diastolischen Ca^{2+} (5Hz/1Hz, 1,090 vs. 1,014, $p < 0,05$). Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten (5Hz/1Hz, 0,79 vs. 0,93, $p < 0,05$) fiel bei 5 Hz bei mit C16:1 behandelten Myozyten stärker ab. Die verlangsamte Ca^{2+} -Elimination von Coffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten (0,88 s vs. 0,59 s, $p < 0,05$) und von Waves (88,1 ms vs. 47,9 ms, $p < 0,05$, in 0Na0Ca Lösung) legte eine Reduktion der SERCA2A Aktivität und des NCX Vorwärtsmodus nahe. Die Variabilität (Variationskoeffizient) der T-Tubuli war erhöht (0,57 vs. 0,54, $p < 0,05$), aber die Dichte vergleichbar. Die mit Palmitoleat inkubierten Zellen zeigten mehr Sparks (1,39 vs. 0 Sparks/ nl / s, $p < 0,05$), eine langsamere Propagation der Waves (120,4 $\mu\text{m}/\text{ms}$ vs. 150,4 $\mu\text{m}/\text{ms}$, $p < 0,05$) und ein geringeres Verhältnis von Waves relativ zu Sparks.

Schlussfolgerung:

Palmitoleat führt in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu ausgeprägten Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase mit dyssynchroner Ca^{2+} -Freisetzung, verlangsamter Ca^{2+} -Elimination, Ca^{2+} -Akkumulation bei höheren Stimulationsfrequenzen sowie erhöhtem diastolischen Ca^{2+} -Verlust. Die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase können zur Erklärung der Assoziation der C16:1 Serumkonzentration und des Herzinsuffizienzrisikos beitragen.

Abstract

Aims:

Increased serum levels of palmitoleic acid are associated with an increased risk to develop heart failure. In this study the effects of palmitoleic acid on the intracellular Ca^{2+} -homeostasis and the t-tubules in ventricular cardiomyocytes were investigated.

Methods and Results:

Rat ventricular cardiac myocytes were incubated with palmitoleic acid (C16:1, 120ng/ μl , 30 min) or BSA without fatty acid (control). We examined Ca^{2+} -transients (Fluo-4, confocal), sparks, waves and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -load (caffeine) during field-stimulation (1 and 5 Hz) and compared t-tubule structures (Di-8-ANEPPS). At 1 Hz, myocytes incubated with C16:1 showed a normal Ca^{2+} -transient amplitude but prolonged time to peak (34.6 ms vs. 24.2 ms, $p < 0.05$) and decay (tau, 116 ms vs. 68 ms, $p < 0.05$). Ca^{2+} -release was more dyssynchronous with significantly less early release sites (C16:1: 29%; control: 64%, $p < 0.05$). At 5Hz, sarcoplasmic Ca^{2+} -content was higher (2.58 vs. 2.24 F/F₀, $p < 0.05$) but the ratio of Ca^{2+} -transient amplitudes (5Hz/1Hz, 0.79 vs. 0.93, $p < 0.05$) and fractional release were decreased (0.67 vs 0.84, $p < 0.05$) and resting Ca^{2+} was increased (5Hz/1Hz, 1.090 vs. 1.014, $p < 0.05$). Slowed decay of the caffeine-induced Ca^{2+} -transients (0.88 s vs. 0.59 s, $p < 0.05$) and waves (88.1 ms vs. 47.9 ms, $p < 0.05$, in 0Na0Ca solution) suggested reduced forward mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity and reduced SERCA2A activity. T-tubule variability was higher (0.57 vs. 0.54, $p < 0.05$) but t-tubule density was unchanged. C16:1-treated cells showed more sparks (1.39 vs. 0 sparks /nl /s, $p < 0.05$), slower propagation velocity of waves (120.4 $\mu\text{m}/\text{ms}$ vs. 150.4 $\mu\text{m}/\text{ms}$, $p < 0.05$) and a lower wave to spark ratio.

Conclusions:

This study shows that C16:1 acutely induces pronounced alterations in Ca^{2+} -homeostasis, resulting in dyssynchronous Ca^{2+} -release, slowed Ca^{2+} -decay, Ca^{2+} -accumulation at higher frequencies and increased diastolic SR Ca^{2+} -leak in rat left ventricular cardiomyocytes. These effects of C16:1 on the Ca^{2+} -homeostasis could be a part of the explanation for the association of the C16:1 serum level and heart failure risk.

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz zählt zu den häufigsten internistischen Erkrankungen. Sie ist in Deutschland die dritt häufigste Todesursache, der häufigste Grund für eine Hospitalisierung und stellt sowohl in Deutschland als auch global die Gesundheitssysteme vor eine große Herausforderung [1, 2]. Durch die voranschreitende Alterung der Gesellschaft, besonders in den entwickelten Ländern, ist eine deutliche Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz, in den USA geschätzt von 2,8% im Jahr 2010 auf bis zu 3,5% im Jahr 2030, zu erwarten [3].

Die Herzinsuffizienz kann als „Abnormalität der kardialen Struktur und/oder Funktion, welche trotz normaler Füllungsdrücke eine Minderversorgung des metabolischen Gewebes mit Sauerstoff zur Folge hat“ (Übersetzung durch den Autor), definiert werden [4]. Das klinische Syndrom der Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch Dyspnoe, Müdigkeit und Belastungsintoleranz sowie die folgenden klinischen Zeichen: erhöhter Jugularvenendruck, periphere Ödeme und pulmonale Rasselgeräusche [4, 5]. Die Herzinsuffizienz kann nach der linksventrikulären Ejektionsfraktion in eine Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), in eine Herzinsuffizienz mit mittelgradig reduzierter Ejektionsfraktion (HFmrEF) [6] und in eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) unterteilt werden [7].

In den letzten 30 Jahren konnte durch erhebliche Fortschritte in der Therapie der HFrEF eine Verbesserung der Überlebenszeit und eine Steigerung der Lebensqualität erreicht werden [4, 8]. Im Gegensatz dazu existiert momentan, trotz vieler großer multizentrischer Studien, keine prognostisch relevante Therapie der HFpEF [9].

1.1.1 Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion

Es wird davon ausgegangen, dass der relative Anteil von Patienten mit HFpEF an allen Patienten mit Herzinsuffizienz von ca. 38% im Jahr 1986 auf 54% im Jahr 2002 gestiegen ist und in Zukunft weiter steigen wird [10]. Ein Hauptgrund für diese Entwicklung ist die Alterung der Gesellschaft, da die Prävalenz der HFpEF mit dem Alter stark zunimmt [11]. Als weitere Ursachen werden die Zunahme der mit HFpEF assoziierten Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie [12] in der Bevölkerung diskutiert [13-15]. Darüber hinaus ist bei Patienten mit HFpEF die Prävalenz von sowohl Adipositas (84%) [16] als auch Diabetes mellitus (20-45%) [12] erheblich erhöht.

Außerdem wurde gezeigt, dass weibliches Geschlecht und Vorhofflimmern mit einem erhöhten Odds-Ratio für die Entstehung von HFpEF verbunden sind [15].

HFpEF ist ein funktionell und strukturell sehr heterogenes Krankheitsbild unterschiedlicher Ausprägung [17]. Dabei ist bei den meisten Patienten eine diastolische Dysfunktion nachweisbar [18]. Nach momentanem Stand der Literatur ist dafür hauptsächlich eine Kombination aus Einschränkung der aktiven isovolumetrischen Relaxation in der frühen Diastole und Erhöhung der linksventrikulären Steifigkeit des Myokards verantwortlich [19, 20]. Physiologisch ist die adäquate Relaxation während der frühen Diastole wichtig für die „Saugfunktion“ des linken Ventrikels [21].

Weiterhin zeigen viele HFpEF Patienten trotz erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion eine Einschränkung der systolischen Funktion durch Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktilität und der regionalen Kammerdeformation [22, 23]. Sowohl die diastolische als auch die systolische Dysfunktion können in Ruhe asymptomatisch sein. Beide verstärken sich jedoch unter Belastung durch ein Unvermögen, die Relaxation und/oder die Kontraktilität ausreichend zu steigern und an den Bedarf anzupassen [24]. Dieses Phänomen bezeichnet man als limitierte systolische und diastolische Reserve.

Weiterhin wurde gezeigt, dass abnormale Vasodilatation, endotheliale Dysfunktion, Veränderungen des vegetativen Nervensystems, reduzierte periphere Sauerstoffextraktion und rechtsventrikuläre Dysfunktion zum Krankheitsbild beitragen [14]. Unklar ist jedoch, wie eine Veränderung des Metaboloms zum Beispiel bei Adipositas und Diabetes mellitus zur Pathogenese der Herzinsuffizienz beiträgt. Zu untersuchen ist in diesem Zusammenhang unter anderem die Rolle der Veränderung der aktiven Relaxation von Kardiomyozyten, für welche eine Arbeit der Arbeitsgruppe des Autors bereits erste Hinweise lieferte [25].

1.1.2 „Lipotoxische“ und diabetische Kardiomyopathie

Bereits im Jahr 1858 wurde von Rudolph Virchow die Ablagerung von Lipiden in Kardiomyozyten als „fettige Degeneration“ des Herzens beschrieben [26]. Es ist lange bekannt, dass Adipositas ein Risikofaktor für die Herzinsuffizienz ist [27]. Ein direkter lipotoxischer Effekt von Lipiden auf das Herz wurde jedoch lange angezweifelt. Erst seit Ende des 20. Jahrhunderts wird die Lipotoxizität sowohl in vivo als auch in vitro genauer untersucht. Dabei sprechen einige Autoren von „lipotoxischer Kardiomyopathie“ als Unterform der nicht-ischämischen

Kardiomyopathie, welche durch linksventrikuläre Hypertrophie und kombinierte systolische und diastolische Dysfunktion charakterisiert ist [28-31].

Heute werden die Auswirkungen einer gestörten Lipidhomöostase und erhöhter Lipidkonzentrationen im Blut auf das Herz, insbesondere im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie [32] und der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, untersucht [33]. Für die Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie wurde gezeigt, dass die Toxizität verschiedener Lipide eine entscheidende Rolle spielt [34]. In einer großen prospektiven Kohortenstudie konnten Djousee et al. eine lineare Korrelation von erhöhten Plasmakonzentrationen der Fettsäure Palmitoleat mit dem Herzinsuffizienzrisiko zeigen [35]. Die Kausalität und der zugrundeliegende Pathomechanismus auf zellulärer Ebene dieser Assoziation sind jedoch bis dato unklar.

1.2 Palmitoleat

Palmitoleat (C16:1n-7, kurz C16:1) ist eine einfach ungesättigte langkettige Fettsäure mit einer Kette aus 16 Kohlenstoff-Atomen und einer Doppelbindung in cis-Konfiguration an Position neun [36]. Palmitoleat ist mit einem Anteil von 5% aller Lipide des menschlichen Körpers eine häufige Fettsäure [37]. Sie kann entweder über die Nahrung aufgenommen werden oder aus Palmitat (C16:0) in der Leber durch das Enzym Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) de novo synthetisiert werden. Dabei ist der Anteil des über die Nahrung aufgenommenen Palmitoleats bei einer typisch westlichen Diät an der Gesamtmenge sehr gering [38]. Die Rolle von Palmitoleat in der Genese kardiometabolischer Erkrankungen wird kontrovers diskutiert. In präklinischen Studien konnten antiinflammatorische Effekte [39], eine Erhöhung der Insulinsensitivität [40] und β -Zell Proliferation [41] durch Palmitoleat nachgewiesen werden. In klinischen Interventionsstudien, bei denen Palmitoleat supplementiert wurde, zeigte sich eine deutliche Verringerung der LDL-Werte [42]. In Korrelationsstudien fanden sich dagegen Assoziationen von erhöhten Palmitoleat-Konzentrationen im Plasma mit Adipositas [43], dem Metabolischen Syndrom [44], Diabetes mellitus Typ 2 [45], nicht-alkoholischer Steatohepatitis [46] und koronarer Herzerkrankung [47].

Weiterhin sind in der Literatur Effekte auf das Myokard beschrieben. In mehreren experimentellen Studien wurde eine Assoziation von Palmitoleat mit der Entwicklung von kardialer Hypertrophie in einer burmesischen Python, in Mäusen und Menschen nachgewiesen [48, 49]. Djousee et al. konnten in einer retrospektiven Studie zeigen, dass die Inzidenz von Herzinsuffizienz unabhängig von weiteren Risikofaktoren wie Vorhofflimmern und Hypertonie mit der

Palmitoleatkonzentration im Plasma korreliert [35]. Je Standardabweichung der Palmitoleat Konzentration stieg dabei das Herzinsuffizienzrisiko um 17% [35]. Im Gegensatz dazu fanden Salatzki et al. bei Mäusen mit druckinduzierter Herzinsuffizienz eine Hochregulation von Palmitoleat-haltigen Phosphatidyl-Ethanolaminen [50]. Darüber hinaus zeigten sie, dass die Deletion von Adipozyten-Triglycerid-Lipase zu sowohl einer Reduktion der Palmitoleatkonzentration im Serum als auch des Herzinsuffizienz Risikos führte [50]. Es existieren jedoch bis dato keine Studien, die isoliert den Effekt von Palmitoleat auf die elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten untersucht haben.

1.3 Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung (ECC) beschreibt das für eine geordnete Herzaktion essentielle Zusammenspiel von elektrischer Depolarisation des Sarkolemmas während des Aktionspotenzials und der daraus resultierenden Kontraktion des myofilamentären Apparates der Kardiomyozyten. Hierbei ist das intrazelluläre Calcium (Ca^{2+}) ein wichtiger Mediator, dessen regulierte Konzentrationsänderung mit der Zeit im Zytoplasma der Kardiomyozyten eine geregelte Abfolge der zellulären Kontraktion und Relaxation ermöglicht [51].

1.3.1 Transversales tubuläres System und der „junktionale Spalt“

Um eine synchronisierte, effektive Kontraktion der ventrikulären Kardiomyozyten zu ermöglichen, ist eine an vielen Orten simultan erfolgende Ca^{2+} -Freisetzung erforderlich. Das wird durch ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk von Einstülpungen des Sarkolemmas in das Zytosol mit einem Durchmesser von 100-300 nm [52], welche als transversale Tubuli (T-Tubuli) bezeichnet werden, ermöglicht [53]. Diese hochverzweigten Membraneinstülpungen sind untereinander im Zytoplasma über longitudinale Tubuli verbunden [53] und bilden mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) den „junktionale Spalt“. Dieser Begriff beschreibt sich periodisch wiederholende Regionen, in denen das Sarkolemma und das SR sehr dicht aneinandergrenzen. In diesem 10-15 nm breiten „junktionale Spalt“ bilden Cluster spannungsgesteuerter L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) und 10-300 Ryanodin-2-Rezeptoren (RyR) in sog. „Couplons“ eine funktionelle Einheit und können dadurch die Effektivität der elektromechanischen Kopplung erheblich erhöhen [54, 55].

1.3.2 Ca^{2+} -Freisetzung

Eine durch das kardiale Aktionspotenzial synchronisierte Öffnung spannungsgesteuerter LTCC führt zu einem kleinen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (I_{CaL}) in den junctionalen Spalt, wodurch eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der RyR und ein dadurch resultierender Einstrom von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol ausgelöst wird [52]. Die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) eines Couplons wird als „ Ca^{2+} -Spark“ (Spark) bezeichnet [52]. Die örtliche und zeitliche Summation dieser Sparks führt zu einem Anstieg der globalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf das 10-100-fache und schließlich zur Bindung von freiem Ca^{2+} an Troponin C, welches durch den Querbrückenzyklus zu einer Kontraktion der Myofilamente und damit des gesamten Kardiomyozyten führt [56, 57]. Bei der Kontraktion des Kardiomyozyten werden nur 50-70% des gesamten SR Ca^{2+} freigesetzt [58]. Die Höhe dieser Fraktion wird u.a. durch die Amplitude des I_{CaL} , den SR Ca^{2+} -Gehalt [59] und die Offenwahrscheinlichkeit der RyR bestimmt [60].

1.3.3 Ca^{2+} -Elimination

Damit sich die Ca^{2+} -Ionen wieder von Troponin C lösen und demzufolge die Relaxation eintreten kann, muss die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wieder gesenkt werden. Dies wird hauptsächlich durch die Ca^{2+} -ATPase 2A des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA2A) medierte Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR und die Extrusion nach extrazellulär durch den Natrium- Ca^{2+} -Austauscher (NCX) im „forward-mode“ erreicht [52]. Der relative Anteil an der Ca^{2+} -Elimination von SERCA2A und NCX variiert erheblich von Spezies zu Spezies. Bei Nagetieren wird 92% des Ca^{2+} durch SERCA2A und 7% durch NCX entfernt [61]. Im Hasen und im Menschen ist der Anteil von SERCA2A mit 70% bzw. 63% deutlich geringer und der von NCX entsprechend höher (28% bzw. 37%) [52]. Ebenfalls beteiligt sind mitochondriale Ca^{2+} -ATPasen und Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen, welche aber quantitativ für nur ca. 1-2% der Ca^{2+} -Extrusion verantwortlich sind und deshalb eine untergeordnete Rolle spielen [62].

1.3.4 Spontane diastolische Ca^{2+} -Freisetzung

In unstimulierten Zellen und während der Diastole kann es durch die stochastische Öffnung von RyR zu einem Verlust von Ca^{2+} aus dem SR („ Ca^{2+} -Leak“) in Form von spontanen Sparks kommen [63]. Diese lokalen, zeitlich auf wenige Millisekunden begrenzten Ca^{2+} -Freisetzung-Events schaffen es normalerweise nicht, eine Ca^{2+} -Freisetzung an benachbarten RyR auszulösen. In einer Zelle mit sensitivierten RyR können Sparks jedoch durch Öffnung benachbarter RyR zu

Makrosparks oder wellenförmig propagierender Ca^{2+} -Freisetzung, sogenannte „ Ca^{2+} -Waves“ (Waves), führen [63]. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration durch Waves kann vermittelt durch den elektrogenen Ionentransport durch den NCX zu einem transienten Netto-Einwärtsstrom und damit zur Depolarisation der Zelle führen und in Form von frühen (EADs) und späten Nachdepolarisationen (DADs) proarrhythmogene Aktionspotenziale auslösen [51, 64].

1.4 Struktur, Funktion und Regulation von Proteinen der Ca^{2+} -Homöostase

1.4.1 L-Typ Ca^{2+} -Kanäle

Die LTCC sind essentiell für die Synchronisation der Depolarisation des Sarkolemmas und der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR [52]. Sie gehören zur Familie der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle und kommen in Kardiomyozyten fast ausschließlich als Subtyp $\text{Cav}1,2_{\alpha1C}$ vor [65]. Die LTCC werden durch die Depolarisation des Sarkolemmas aktiviert [52]. Für die Inaktivierung hingegen ist die Komplexbildung mit Calmodulin (CaM) essentiell. Das nach der Öffnung der RyR freigesetzte Ca^{2+} bindet an CaM und trägt damit entscheidend zu einer Inaktivierung der LTCC im Sinne einer negativen Feedbackschleife bei. Darüber hinaus moduliert CaM ebenfalls die LTCC Offenwahrscheinlichkeit über die basale zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration [66].

1.4.2 Ryanodin Rezeptor Typ 2

Ryanodin Rezeptoren Typ 2 (RyR) spielen eine Schlüsselrolle bei der CICR. Die RyR sind riesige Multipass-Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von 565 kDa und bilden Cluster von bis zu 200 funktionell verbundenen Homotetrameren pro „Couplon“ in der SR-Membran [67, 68]. Die RyR bestehen aus einer zytosolischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer SR-Lumen ständigen Domäne [69] und bilden einen makromolekularen Komplex mit vielen anderen Proteinen. Die zytosolische Domäne dient hauptsächlich der Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung durch Interaktion mit Liganden wie Ca^{2+} , CaM, FK-506-bindendes Protein (FKBP) und Proteinkinase A (PKA) [70]. Die Transmembran-Domäne durchspannt die Membran des SR und bildet die zentrale Pore für die Ca^{2+} -Freisetzung [71]. Die intra-SR-Domäne interagiert mit den Proteinen Junctin, Triadin-1 und Calsequestrin, welche wahrscheinlich eine Regulation der Dauer der CICR und der Anpassung der RyR-Offenwahrscheinlichkeit an den Ca^{2+} -Gehalts des SR ermöglicht [72, 73].

1.4.3 Ca^{2+} -ATPase 2A des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums

Die Enzyme der SERCA2 Familie gehören zu den P-Typ ATPasen, wobei die Splicevariante 2A die dominante Variante in Kardiomyozyten ist. SERCA2A besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne und einer Transmembran Domäne, welche unter anderem die Ca^{2+} -Bindungsstelle bildet [74]. SERCA2A bildet ebenfalls einen makromolekulären Komplex mit anderen regulatorischen Proteinen. Der Hauptregulator der SERCA2A Aktivität ist, nach momentanem Stand der Wissenschaft, das aus nur 52 Aminosäuren bestehende SR-Membran ständige Protein Phospholamban (PLN), welches die Funktion eines reversiblen SERCA2A Inhibitors hat [75]. Das bedeutet, dass PLN im dephosphoryliertem Zustand reversibel an SERCA2A bindet und somit die Ca^{2+} Affinität reduziert [76]. Durch Phosphorylierung von PLN oder durch erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationen wird diese physikalische Interaktion mit SERCA2A wieder aufgehoben [77, 78]. Dieser Sachverhalt ermöglicht eine differenzierte Regulation der SERCA2A-Aktivität durch Kinasen und SR-assoziierte Phosphatasen [79].

1.4.4 Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher

Der NCX ist ein Plasmamembran-ständiger Antiporter. Die Transmembran-Domäne ist für den Austausch von drei Natrium-Ionen (Na^+) gegen ein Ca^{2+} -Ion verantwortlich [80]. Der zytoplasmatische Teil hat zwei zusätzliche Bindungsstellen für Ca^{2+} , über welche der Ionen-Antiport durch die Bindung von Ca^{2+} reguliert werden kann [81]. Der Ionentausch ist bidirektional möglich und ist durch den Transport einer unterschiedlichen Anzahl von Ladungen elektrogen [82]. Das kann zu einer Änderung des Membranpotenzials in beide Richtungen führen. Normalerweise operiert der NCX angetrieben durch den Na^+ -Gradienten im „Vorwärtsmodus“ definiert durch Ca^{2+} -Efflux und Na^+ -Influx [82]. Es wurde gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen der NCX-medierte Ca^{2+} -Ausstrom dem Ca^{2+} -Einstrom durch die LTCC entspricht – der Ca^{2+} -Gehalt der Zelle also konstant gehalten wird [83].

1.4.5 Protein-Kinasen A

Die PKAs sind von cyclischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) abhängige Serin/Threonin Kinasen, welche durch die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit aktiviert werden [84]. Zu den wichtigsten Zielstrukturen der PKA zählen RyR und SERCA2A. Am Beispiel von RyR wurde gezeigt, dass Ankerproteine die PKA in der Nähe der Zielaminosäuren und der regulierender Faktoren wie die Phosphatasen PP1 und PP2A verankern und dadurch eine lokale

Regulation der PKA-Aktivität und damit der RyR-Phosphorylierung möglich machen [85, 86]. Ein in der Literatur häufig beschriebener PKA-abhängiger Phosphorylierungsort ist die Aminosäure Serin-2809/2808 der zytosolischen RyR-Domäne [85, 87]. Der genaue Effekt des Phosphorylierungslevels von Serin-2809 auf die Ca^{2+} -Freisetzung wird jedoch kontrovers diskutiert [70, 88]. In Doppelmembran Studien konnten mehrere Arbeitsgruppen einen Einfluss der Phosphorylierung auf die Offenwahrscheinlichkeit von RyR zeigen [85, 87]. Dabei wird davon ausgegangen, dass sowohl eine relative Erhöhung als auch eine relative Verringerung der Phosphorylierung ausgehend vom „steady-state“ zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von RyR führen [87]. SERCA2A wird dagegen durch eine Phosphorylierung des Mediators PLN an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 reguliert [75].

1.4.6 Calmodulin und Calmodulin abhängige Kinasen

Neben den PKA sind sowohl Calmodulin als auch die Calmodulin-abhängigen Kinasen 2 (CaMKII) zwei wichtige regulatorische Systeme der Ca^{2+} -Homöostase. CaM kann sowohl an Ca^{2+} als auch mit Ca^{2+} -konzentrationsabhängiger Affinität an Proteine wie RyR binden [70], wodurch es zu einer Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit kommt [89].

CaMKII wird hingegen durch die Bindung von aktiviertem CaM aktiviert [90]. Bei anhaltender Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration bzw. einer vermehrten Bindung von CaM kann es zu einer Autophosphorylierung kommen, welche in einer Ca^{2+} /CaM unabhängigen, langfristigen, autonomen Aktivierung von CaMKII resultiert [91]. Neben der Autophosphorylierung wird eine autonome Aktivierung auch im Zusammenhang mit posttranslationalen Modifikationen wie Oxidierung durch Sauerstoffradikale und N-Acetyl-Glucosaminierung beschrieben [92, 93].

CaMKII können eine Vielzahl von Proteinen der Ca^{2+} -Homöostase wie LTCC, RyR und PLN phosphorylieren und damit regulieren. Im Falle des RyR wurden Serin-2809/2808 und Serin-2814/2815 als Zielaminosäuren identifiziert [94, 95], deren Phosphorylierung insbesondere mit einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit assoziiert wird [90]. Bei PLN ist Threonin-17 ein wichtiges Ziel der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung mit eingangs beschriebenen Folgen [96].

1.5 „Hallmarks“ der gestörten Ca^{2+} -Homöostase bei Herzinsuffizienz

1.5.1 Gestörte Ca^{2+} -Freisetzung

Die gestörte Ca^{2+} -Freisetzung ist eine der Hauptursachen für die eingeschränkte systolische Funktion des Herzens bei der Herzinsuffizienz [97]. Ein Grund dafür ist eine dysfunktionale Regulation der RyR. Es wurde gezeigt, dass es bei der Herzinsuffizienz gleichzeitig zu einer Reduktion der systolischen Ca^{2+} -Freisetzung und einer Zunahme der spontanen diastolischen Ca^{2+} -Freisetzung kommt [97]. Diese Beobachtung wird unter anderem durch eine Zunahme der Sensitivität und damit der Offenwahrscheinlichkeit der RyR erklärt. Dies führt durch den diastolischen Verlust von Ca^{2+} aus dem SR zu einer Abnahme des SR Ca^{2+} -Gehalts und damit zu einer Verringerung der Amplitude des globalen Ca^{2+} -Transienten [98]. Die Ursache dieser Funktionsstörung ist komplex und wird kontrovers diskutiert. Trotz teils widersprüchlicher Studienergebnisse spielt wahrscheinlich eine Dysregulation der RyR durch PKA- und CaM-abhängige Kinasen eine entscheidende Rolle [97].

Weiterhin können auch Remodeling und der Verlust von T-Tubuli zur gestörten Ca^{2+} -Freisetzung beitragen [99, 100]. Die Folge ist ein gestörtes Zusammenspiel von LTCC und RyR im junktionalen Spalt, welches zu dem Phänomen der „orphaned“ RyR führen kann [101]. Diese „orphaned“ RyR sind isoliert von den LTCC. Dies kann zu einer Verzögerung der lokalen Ca^{2+} -Freisetzung durch die längere Diffusionsstrecke und damit zu einer dyssynchronen Ca^{2+} -Freisetzung führen [99].

1.5.2 Gestörte Ca^{2+} -Elimination

Die Herzinsuffizienz ist außerdem durch eine gestörte Ca^{2+} -Elimination und die daraus resultierenden erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen charakterisiert [97]. Die erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen führen wiederum zu einer Verringerung der Kontraktion und zu einer Störung der Relaxation [97]. Es wurde gezeigt, dass in diesem Zusammenhang häufig die SERCA2A Aktivität reduziert ist. Ursächlich dafür können eine verringerte Expression [102], eine vermehrte Inhibition durch PLN [103] oder eine erhöhte Aktivität von Histidine-rich Ca^{2+} -binding Protein sein [104]. Der relative Anteil des NCX an der Ca^{2+} -Elimination ist dagegen bei Herzinsuffizienz erhöht [105]. Weiterhin kann es zu einer Hemmung des NCX bzw. zu einem Wechsel aus dem Vorwärtsmodus in den Rückwärtsmodus durch erhöhte subsarkolemmale Na^+ Konzentrationen kommen [106], welches die Ca^{2+} -Elimination weiter beeinträchtigen kann.

1.5.3 Proarrhythmogenes Remodeling

Die Störung der Ca^{2+} Homöostase führt ebenfalls zu einer erhöhten Inzidenz von arrhythmogenen Events bei Herzinsuffizienz [107]. Durch die erhöhte Sensibilität der RyR und den erhöhten diastolischen „ Ca^{2+} -Leak“ kommt es vermehrt zu proarrhythmogenen Waves und DADs [97]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass es bei Herzinsuffizienz zu einer Funktionsänderung der LTCC kommt. Diese ist charakterisiert durch einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und eine verzögerte Inaktivierung und kann schlussendlich zu einer Ca^{2+} -Überladung und der Entstehung von EADs beitragen [108]. Eine häufig diskutierte Ursache für das proarrhythmogene Remodeling ist die erhöhte Aktivität der CaMKII, welche unter anderem entscheidend für die Funktionsänderung von RyR und LTCC verantwortlich ist [109].

1.6 Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase bei der diabetischen Kardiomyopathie

In Tiermodellen für sowohl Diabetes mellitus Typ 1 als auch für Diabetes mellitus Typ 2 konnte eine Dysregulation der Mediatoren der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase in ventrikulären Kardiomyozyten nachgewiesen werden [110, 111]. Die LTCC-Aktivität zeigte sich entweder unverändert [112] oder reduziert [113, 114]. Die Reduktion der LTCC-Aktivität wurde mit einer verringerten LTCC-Expression [115] in Verbindung gebracht.

Neben einem Effekt auf die LTCC beschrieb die Mehrheit der Studien eine Erhöhung der Sensitivität der RyR. Als Ursachen werden eine vermehrte Phosphorylierung [116], eine Oxidierung durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [117, 118] und eine reduzierte Expression [119] diskutiert.

Die Aktivität von SERCA2A zeigte sich in vielen Studien vermindert, welches mit einer verminderten Expression von SERCA2A [119], einer Erhöhung der Expression von PLN [120], einer verstärkten Phosphorylierung von PLN [121] oder mit vermehrter ROS-Bildung [122] assoziiert war. Die NCX-Aktivität war in Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodellen reduziert [123] und in Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen erhöht [121].

Durch welche zellulären Mechanismen die diabetische Stoffwechsellage zu diesen Effekten führt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Es wird postuliert, dass ein vermehrtes Angebot und ein vermehrter Metabolismus von Fettsäuren für einen Teil der Effekte verantwortlich sind [34]. Es wurde gezeigt, dass Fettsäuren unabhängig von Diabetes mellitus direkte Effekte auf die Mediatoren der Ca^{2+} -Homöostase haben können. Für einige Fettsäuren konnte eine direkte

Aktivierung der LTCC mit Zunahme des I_{CaL} gezeigt werden [124]. Eine sehr fetthaltige Diät führte in einem Mausmodell zu einer Hypophosphorylierung von PLN [125] und verringerte die SERCA2A Expression [126]. Beides war assoziiert mit einer Verlangsamung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR [126]. Welche fettsäurespezifischen Effekte existieren und welche Fettsäuren für die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase nach einer sehr fetthaltigen Diät oder bei einer diabetischen Stoffwechsellage maßgeblich verantwortlich sind, ist noch weitgehend unklar.

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

1. Die Inkubation mit Palmitoleat führt zu akuten Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase ventrikulärer Kardiomyozyten von Wildtyp-Ratten.
2. Die Inkubation mit Palmitoleat führt zu akuten Veränderungen der Proteinphosphorylierung der Mediatoren der Ca^{2+} -Homöostase ventrikulärer Kardiomyozyten von Wildtyp-Ratten.
3. Die Inkubation mit Palmitoleat führt zu einem Remodeling des T-Tubuli Systems in ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp-Ratten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Organentnahmen wurden beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) angezeigt und unter der Berücksichtigung des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (National Institute of Health, USA) durchgeführt. Für die Organentnahme wurden männliche Wildtyp-Ratten Typ Wistar im Alter von 11-12 Wochen verwendet.

2.2 Chemikalien

| | |
|---|--|
| 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Albumin Standard | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Blebbistatin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ca ²⁺ -Chlorid (CaCl ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Coffein | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| di-8-ANEPPS | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Diacetylmonoxim (BDM) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Engelbreth Holm Laminin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Fluo-4 AM | Invitrogen™ by Thermo Fischer Scientific |
| Glukose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Gradient Gel Criterion XT 4-12 % | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| Isofluran (Forene ®) | abbVie Inc., Chicago, USA |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

| | |
|---|---|
| Leupeptin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Liberase™ Research Grade | F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz |
| Lithiumchlorid (LiCl) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Lithiumhydroxid (LiOH) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄ 7H ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natriumfluorid (NaF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natrium-Orthovanadat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natriumphosphat, dibasisch | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natrium-Pyrophosphat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| NP40 | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Palmitoleat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| (Stock freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die AG Kintscher) | |
| Pepstatin A | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A + B | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Pluronic Acid F-127 (20% in DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ponceau S Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Running Buffer XT MOPS | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| Taurin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Tris-HCL | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Trypsin 2,5% 10x | Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| β-Glycerophosphat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

| | |
|-------------------|------------------------------|
| XT Sample Buffer | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| XT Reducing Agent | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |

2.3 Verwendete Lösungen und Puffer

2.3.1 Kardiomyozyten-Isolation

Perfusionslösung

NaCl 135 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 0,6 mM, Na₂HPO₄ 7H₂O 0,6 mM Natriumphosphat, dibasisch, Magnesiumchlorid Hexahydrat MgSO₄ 7H₂O 1,2 mM, Taurin 30 mM, HEPES 10 mM, Diacetylmonoxim (BDM) 10 mM, Glukose 10 mM

Kanülierungslösung

Perfusionslösung, 1 mM CaCl₂

Enzymlösung

40 ml Perfusionslösung, 50 µl 10 mM CaCl₂, Liberase™ Research Grade, Trypsin 2,5% 10x

Stopplösung

0,01 mM CaCl₂, Perfusionslösung, 10 mg/ml bovines Serum Albumin (BSA)

Ca²⁺-Reihe

0,125 mM CaCl₂, Perfusionslösung, 4,7 mg/ml BSA

0,52 mM CaCl₂, Perfusionslösung, 4,7 mg/ml BSA

0,5 mM CaCl₂, Perfusionslösung, 4,7 mg/ml BSA

Normal Tyrode

NaCl 136 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ x 6H₂O 1 mM, HEPES 10 mM

2.3.2 Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung

Modifizierter RIPA Puffer

20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% NP40

20 mM NaF, 1 mM Natrium-Orthovanadat, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natrium-Pyrophosphat, 50 mM β-Glycerophosphat, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Aprotinin, 4 µg/ml Pepstatin A, 4 µg/ml Leupeptin

Towbin Puffer

25 mM Tris-HCL, 192 mM Glycin, 5% Methanol

TBS-T(Tris-Borat-Natrium-Tween 20)-Puffer

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1%

2.3.3 Messungen am Fluoreszenz-Mikroskop

Normal Tyrode 2 (NT2)

Normal Tyrode, 2 mM CaCl₂

0Na0Ca Lösung

LiCl 91 mM, LiOH 21 mM, KCL 4 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM, EGTA 10 mM, Glukose 10 mM, dd H₂O, pH 7,4 (eingestellt mit LiOH bei Raumtemperatur)

Coffein Lösung

Normal Tyrode, 2 mM CaCl₂, 20 mM Coffein

2.4 Antikörper

| | |
|---|--|
| Anti-Ryanodinzeptor Antikörper C3-33 #ab2827 | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Anti-Phospho-Ser2808 Ryanodinrezeptor Antikörper #A010-30AP | Badrilla, Leeds, UK |
| Anti-Phospho- Ser2814 Ryanodinrezeptor Antikörper #A010-31AP | Badrilla, Leeds, UK |
| IRDye® 680RD IgG (Ziege anti-Hase) | LI-COR Inc. , Lincoln, USA |
| IRDye® 800CW IgG (Ziege anti-Maus) | LI-COR Inc. , Lincoln, USA |

2.5 Geräte und Materialien

| | |
|-------------------------------|------------------------------|
| Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC | GE Healthcare Life Science |
| Criterion™ Blotter | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| Criterion™ Cell | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |
| Criterion™ XT Gel (4-12%) | Biorad, Hercules, CA, U.S.A. |

| | |
|----------------------------------|--|
| Einkanal Lösungserhitzer TC-324C | Warner Instruments LLC, Hamden, USA |
| Feinwaage BD ED 100 | Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Glasbodenschalen | WillCo Wells B.V. , Amsterdam, Niederlande |
| Konfokales Mikroskop LSM 800 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Langendorff-Apparatur | |
| Doppelwandige Glasgefäße | Gebr. Rettberg GmbH, Göttingen |
| Einhängethermostat Julabo ED | Julabo GmbH, Seelbach |
| Rollerpumpe ISM 831 C | Ismatec, Wertheim |
| Milli-Q Integral 5 | Merck Millipore, Billerica, USA |
| Multimode Microplate Reader | Perkin Elmer Inc, Waltham, USA |
| Narkosebox | Rothacher Medical GmbH |
| Odyssey® Clx Imaging System | LI-COR Inc. , Lincoln, USA |
| pH-Meter ORION 4-STAR | ThermoFischer Scientific, Waltham, USA |
| Tischzentrifuge UNIVERSAL 320R | Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland |
| VC-8M Ventil Kontrollsystem | Warner Instruments LLC, Hamden, USA |

2.6 Isolation von Kardiomyozyten

2.6.1 Präparation und Kanülierung des Herzens

Die Wildtyp-Ratten wurden in einer Inhalationsnarkosebox mit Isofluran anästhesiert und nach der Sicherstellung einer tiefen Narkose durch Decapitation geopfert. Die Ratten wurden an den Extremitäten fixiert und der Thorax eröffnet. Anschließend wurde das Herz präpariert, die Aorta dargestellt und knapp unterhalb des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Die Aorta wurde dann mit einer Pinzette komprimiert und das Herz samt Aorta nach Durchtrennung der Lungengefäße entnommen. Um die „warme Ischämiezeit“ zu minimieren, wurde die Aorta in eiskalter „Kanüllierungslösung“ kanüliert und retrograd perfundiert. Dabei war es wichtig, weder die Aortenklappe zu perforieren, noch die Koronarostien mit der Kanülenspitze zu verlegen, um eine suffiziente Perfusion der Koronararterien zu gewährleisten. Die Aorta wurde dann mit zwei doppelten Überhandknoten an der Kanüle fixiert.

2.6.2 Verdau am Langendorff-Apparat

Anschließend wurden die Herzen an einem Langendorff Apparat perfundiert. Das Herz wurde über die Koronararterien zuerst zwei bis drei Minuten mit der nominell Ca^{2+} -freien Perfusionslösung und danach mit der enzymhaltigen Verdauungslösung perfundiert. Die Verdauungslösung wurde auf Grundlage der Perfusionslösung durch Zugabe von CaCl_2 und der Enzyme LiberaseTM und Trypsin 2,5% hergestellt.

Der Langendorff-Apparat besteht aus doppelwandigen Kammern. Durch einen mit einem externen Heizstab temperierten Warmwasserkreislauf in der Wand dieser Kammern wurden die Lösungen konstant bei 37 °C gehalten und so möglichst physiologische Bedingungen, insbesondere für die Arbeit der „Verdauungsenzyme“, ermöglicht. Eine Luftblasenfalle verhinderte eine Luftembolie in den Koronararterien. Nach abgeschlossenem Verdau wurde der linke Ventrikel exzidiert und in die BSA-haltige Stopplösung (BSA) überführt, um das verbliebene Enzym zu puffern und den enzymatischen Verdau zu beenden.

Die Rationale hinter der Perfusion mit nominell Ca^{2+} -freier Lösung ist die Hypothese, dass diese dazu beiträgt die Zell-Zell-Verbindungen zu lösen, bevor die Extrazellulärmatrix durch die Enzyme zersetzt wird [127]. Diese sogenannte „Null- Ca^{2+} -Zeit“ wurde möglichst kurz eingestellt und danach die Ca^{2+} -Konzentration langsam erhöht, um das sogenannte „ Ca^{2+} -Paradoxon“ zu verhindern. Dieses beschreibt das Phänomen, dass Kardiomyozyten nach zu schneller Ca^{2+} -Repletion in einen Zustand der Hyperkontraktilität übergehen und die resultierenden Rupturen des Sarkolemmas zum Zelltod führen [128, 129].

2.6.3 Mechanische Dissoziation und Habituation an physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen

Für die mechanische Dissoziation der einzelnen Kardiomyozyten wurde der linke Ventrikel mit einer Schere zerkleinert. Einzelne Kardiomyozyten wurden durch wiederholte Resuspension mit Pipetten absteigenden Durchmessers aus dem Zellverband gelöst. Anschließend wurde die Suspension durch eine Nylongaze (300 μm Poren) gefiltert, um die dissoziierten Zellen von den verbliebenen Geweberesten zu trennen. Nach einer zehnminütigen Sedimentation wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Myozyten wurden durch eine sogenannte „ Ca^{2+} -Reihe“ an physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen gewöhnt. Der Begriff „ Ca^{2+} -Reihe“ beschreibt die Zugabe von Ca^{2+} -Lösungen ansteigender Konzentration bis zum Erreichen einer physiologischen Konzentration. Im letzten Schritt wurden die Kardiomyozyten in 1 mM Ca^{2+} -haltige NT überführt.

2.7 Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung

2.7.1 Herstellung von Homogenisaten für Western Blot Untersuchungen

Zur Herstellung von Homogenisaten wurden Kardiomyozyten von drei Ratten isoliert, an Ca^{2+} habituiert und in NT mit 2 mmol Ca^{2+} und Palmitoleat bzw. BSA in einer finalen Konzentration von 120 ng/ μl 35 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert, der Überstand über den sedimentierten Zellen („Pellet“) entfernt und Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer (RIPA Puffer) hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Um den Phosphorylierungsstatus der zu untersuchenden Proteine bestmöglich zu konservieren, wurde die 4 °C kalte Pufferlösung vorher mit Protease - und Phosphatase-Inhibitoren (modifizierter RIPA Puffer) versetzt. Zusätzlich wurde der Lyseprozess durch mechanische Agitation mit einer schmalkalibrigen Pipette unterstützt. Nach Entfernen des verbliebenen Pellets durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 Umdrehungen pro min bei einer Temperatur von 4 °C resultierte ein klares Homogenisat.

2.7.2 Protein Quantifizierung

Nach der Proteinextraktion wurde die in jeder Probe enthaltene Proteinmenge quantifiziert, um die im Elektrophorese-Gel laufende Proteinmenge zu standardisieren. Dafür wurde das Pierce BCA Protein Assay von ThermoFischer, welches analog zur klassischen photometrischen Methode nach Bradford auf einer Änderung des Absorptionsmaximums bei Proteinbindung basiert [130], benutzt. Durch die proportionale Abhängigkeit dieser Farbänderung von der Proteinkonzentration ließ sich mit Hilfe von Proteinstandards eine Standardkurve zur Kalibrierung der Proteinkonzentration erstellen. Für die Messung wurde ein Perkin Elmer Microplate Reader verwendet.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht und Ladung. Für die Gelelektrophorese wurde die entsprechende Menge Homogenisat mit Probenpuffer (XT Sample Buffer) und Detergenz zur Denaturierung (XT Reducing Agent) versetzt. Der vorher zur Lyse verwendete modifizierte RIPA Puffer wurde benutzt, um die Volumina aller Proben anzugleichen. Für die Gelelektrophorese wurde das System Criterion™ Cell mit einem Criterion™ XT Gel (4-12%) und dem Laufpuffer XT MOPS verwendet. Die Taschen des Gels wurden jeweils mit 35 ml Homogenisatgemisch und mit je 30 μg Protein beladen. Je Tier wurde eine Probe nach

Inkubation mit Palmitoleat und eine Probe nach Inkubation mit BSA als Kontrolle untersucht. Zusätzlich wurde für jede Probe ein technisches Duplikat auf dem gleichen Gel prozessiert. In allen Versuchen wurde als Marker 5 µl Precision Plus Protein™ verwendet. Für die Auftrennung der denaturierten Proteine wurde eine Laufzeit von 2 h bei einer Spannung von 120 V bei Raumtemperatur eingestellt.

2.7.4 Western-Blot, Gesamtproteinfärbung und Blockierung

Für den Transfer der nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurde eine Amersham™ Protran™ 0,45 µm Membran mit einem Criterion™ Blotter Tank und Towbin Puffer mit 5% Methanol verwendet. Der Transfer erfolgte über Nacht mit einer Stromstärke von 40 mA bei einer Temperatur von 4°C. Zur Überprüfung des Transfererfolgs und zur Ladekontrolle erfolgte nach dem Transfer eine temporäre Ponceau Protein-Färbung. Dafür wurde die Membran 15 min lang in Ponceau S Lösung inkubiert und anschließend 2 - 3 min mit ultrareinem Wasser gewaschen (MilliQ) und gescannt. Nachdem die Ponceau Färbung mit Tris-Borat-Natrium-Tween-20 Puffer (TBS-T) abgewaschen wurde, erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 5% Milch in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut zwei Mal 5 min in TBS-T gewaschen.

2.7.5 Immundetektion und Auswertung

Zur Immundetektion wurde die Membran zuerst 1 h bei Raumtemperatur unter ständiger Agitation mit den Primärantikörpern gegen RyR total C3-33 und gegen RyR pSer2808 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) in TBS-T erfolgte dann die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dann erneut gewaschen und anschließend mit dem Odyssey® Clx Imaging System gescannt. Danach wurden die Antikörper mittels des Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffers entfernt, um die Membran anschließend mit RyR pSer2814 und dem entsprechenden Sekundärantikörper erneut zu inkubieren und zu scannen.

| Primäre Antikörper | Spezies | Verdünnung | kDa | Sekundäre Antikörper | Verdünnung |
|--------------------|---------|-----------------|-----|-----------------------------------|------------------|
| RyR total, C3-33 | Maus | 1:2000 in TBS-T | 565 | IRDye 800CW IgG (Ziege anti-Maus) | 1:10000 in TBS-T |

| | | | | | |
|-----------------|------|-----------------|-----|--------------------------------------|---------------------|
| RyR pSer2808 | Hase | 1:2000 in TBS-T | 565 | IRDye 680RD IgG (Ziege anti-Hase) | 1:10000 in TBS-T |
| RyR pSer2814 | Hase | 1:1000 in TBS-T | 565 | IRDye 680RD IgG (Ziege anti-Hase) | 1:10000 in TBS-T |

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper

Die Western Blots wurden densitometrisch mit der Software Image Studio (LI-COR, Lincoln, USA) analysiert. Das Dichtesignal der Phospho-Antikörper wurde auf das Dichtesignal des Gesamtproteins normiert. Der resultierende Wert wurde dann als prozentualer Anteil des Wertes der Kontrollgruppe ausgedrückt.

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

2.8.1 Konfokales Ca²⁺-Imaging

Zur Untersuchung des intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsels wurden die isolierten Kardiomyozyten mit dem Ca²⁺-affinen Fluorochrom Fluo-4 AM in einer finalen Konzentration von 20 µM und einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur beladen. Um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern, wurde die Färbung der Kardiomyozyten mit Fluo-4 unter Minimierung der Lichtexposition durchgeführt. Fluo-4 ist ein Fluorescein-Derivat, das sich durch eine vergleichsweise hohe Signalintensität, einen hohen Dynamikbereich und ein geringes Hintergrundsignal auszeichnet [131]. Die Acetoxymethyl-veresterte Form (AM) des Farbstoffs hat den Vorteil, dass sich dieser besonders effektiv in den Zellen anreichert. Der hydrophobe Farbstoff kann so passiv in die Zelle diffundieren und wird dann durch Hydrolyse der Estergruppe durch Esterasen in der Zelle gefangen [132]. Diese Eigenschaften ermöglichen es, dass eine hohe Signalintensität bei geringem Hintergrundsignal erreicht werden kann.

Die mit dem Fluorochrom beladenen Zellen wurden dann mit Laminin auf einer Glasbodenschale fixiert. Das Laminin verhindert, dass sich die Zellen während der Messungen am Konfokalmikroskop bewegen. Anschließend wurden die Kardiomyozyten 30 min mit Palmitoleat bzw. BSA in einer finalen Konzentration von 120 ng/µl inkubiert. Die Untersuchung der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (ZEISS LSM 800). Dieses regt das Fluorochrom mit einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm an. Die emittierten Photonen werden vom Galliumarsenidphosphid (GaAsP) Photomultiplier im Spektralbereich von 510 nm Wellenlänge quantifiziert und als Intensitätswerte (8 bit Auflösung) ausgegeben. Die Intensität des Emissionssignals korreliert dabei direkt mit der

Ca²⁺-Konzentration [133]. Bei allen Messungen wurden die Messparameter entsprechend kalibriert, sodass die Signale innerhalb des dynamischen Bereichs des Detektors lagen. Die Messungen erfolgten im Linescan Modus, wobei jede Zelle wiederholt entlang einer 65 µm Linie parallel der longitudinalen Achse unter Vermeidung der Regionen der Nuclei gescannt wurde und die resultierenden Signalwerte als Funktion der Zeit dargestellt wurden („Linescan Modus“). Die Messungen im Linescan Modus ermöglichten eine, verglichen mit 2D Aufnahmen, höhere zeitliche Auflösung von 0,8 ms/Linie und eine gute räumliche Auflösung mit einer Pixelgröße von 0,12 µm in der horizontalen Ebene.

Unmittelbar vor und während der Messung wurde durch ein Superfusionssystem für einen stetigen Austausch des umgebenden Mediums gesorgt und die Temperatur konstant bei 37°C gehalten. Weiterhin konnten über das Superfusionssystem die anderen Lösungen des Messprotokolls appliziert werden. Die NT2 für das Superfusionssystem war entweder mit Palmitoleat oder BSA in den Konzentrationen der Inkubation versetzt, um ein „Auswaschen“ der Fettsäure zu verhindern. Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte in einem elektrischen Feld über Platinelektroden. Die Spannung wurde auf einen Wert 50% über der Schwellenspannung - die Spannung, die erstmals eine Kontraktion auslöst - eingestellt. Gemessen wurden ausschließlich stabförmige, ruhende Kardiomyozyten mit gut erhaltener Querstreifung.

Kontraktionsartefakte wurden durch die Zugabe von Blebbistatin in einer finalen Konzentration von 20 mM verhindert, welches den Querbrückenzyklus durch die Inhibition der ATPase Aktivität von Myosin II hemmt. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Blebbistatin in dieser Konzentration keinen Einfluss auf den Ca²⁺-Stoffwechsel hat [134].

2.8.2 Stimulationsprotokoll und Messung des gespeicherten Ca²⁺

Durch die Stimulation im elektrischen Feld entstehen synchronisierte, globale Ca²⁺-Transienten. Für die Analyse der frequenzabhängigen Auswirkungen von Palmitoleat auf den Ca²⁺-Stoffwechsel wurden Messungen bei 1 Hz und 5 Hz durchgeführt.

Zuerst wurden die Zellen mit NT2 superfundiert und dann für 30 s mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert um einen „steady state“ der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase sicherzustellen. Im folgenden 10 s Zeitintervall wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Ca²⁺-Transienten aufgezeichnet. Dann wurde die Stimulationsfrequenz stufenweise von 1 Hz auf 3 Hz und letztendlich auf 5 Hz erhöht. Vor der Stimulation erfolgte ein 5 s langes Intervall ohne Aufzeichnung, um den „steady state“ der Ca²⁺-Homöostase zu erreichen und ein Ausbleichen des

Fluorochroms zu minimieren. Dann wurden 3 s lang Ca^{2+} -Transienten bei 5 Hz aufgezeichnet und anschließend über das Superfusionssystem $0\text{Na}0\text{Ca}$ Lösung eingewaschen. Ohne Unterbrechung der Aufzeichnung schloss sich ein stimulationsfreies Intervall von 30 s an, in welchem später spontane Ca^{2+} -Freisetzung-Events quantifiziert werden konnten. Anschließend erfolgte nach dem Stopp der Superfusion von $0\text{Na}0\text{Ca}$ Lösung eine Superfusion mit NT2 und das Einwaschen von 20 mM Coffein NT2 Lösung. Die resultierende zelluläre Reaktion („caffeine response“) wurde für ca. 10 s aufgezeichnet. Die Superfusion mit Coffein hat eine dauerhafte Öffnung aller RyR und die Freisetzung des gesamten SR Ca^{2+} zur Folge. Die Amplitude des resultierenden Fluoreszenzsignals ist ein Surrogatparameter für die gesamte SR Ca^{2+} -Konzentration.

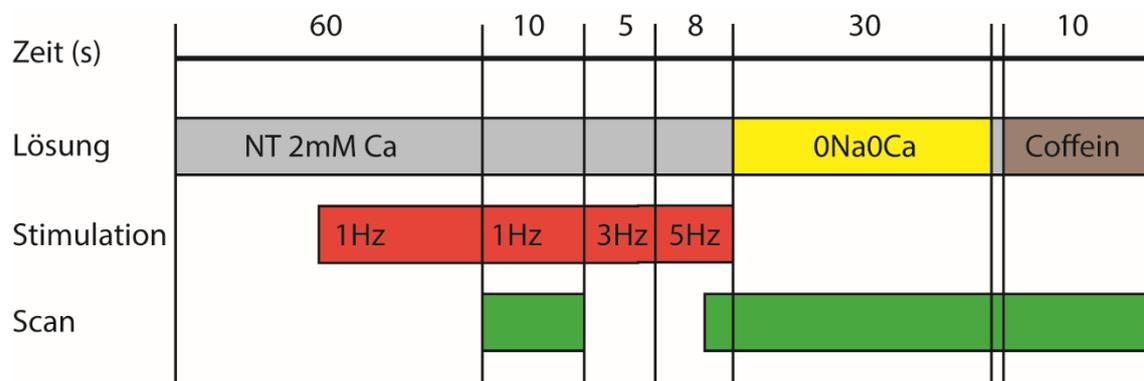


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Messprotokolls

2.8.3 Quantifizierung der Verteilung der T-Tubuli

Für die Visualisierung der T-Tubuli wurden die in NT2 überführten Kardiomyozyten mit dem Membranfluorochrom di-8-ANEPPS in einer finalen Konzentration von $2\mu\text{M}$ 35 min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Palmitoleat oder BSA in einer Konzentration von $120\text{ ng}/\mu\text{l}$ 35 min bei Raumtemperatur. Um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern, wurde die Färbung der Kardiomyozyten mit di-8ANEPPS unter Minimierung der Lichtexposition durchgeführt. Die Quantifizierung der T-Tubuli erfolgte wiederum mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (ZEISS LSM 800). Hierfür wurden zweidimensionale Aufnahmen ($365 \times 1024\text{ px}$) in der Equatorialebene der Kardiomyozyten in der x-y Ebene angefertigt. Dadurch war es möglich, einen repräsentativen Anteil des t-tubulären Systems mit einer hohen räumlichen Auflösung und einer Pixelgröße von $0,12\text{ }\mu\text{m}$ (x-y Ebene) zu untersuchen.

2.9 Begriffsdefinitionen

In Abbildung 2 ist die Darstellung eines zytosolischen Ca^{2+} -Transienten zur Veranschaulichung der wichtigsten Parameter der Ca^{2+} -Homöostase, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, zu sehen. Der Ca^{2+} -Transient wurde als x-y Plot dargestellt. Die Signalintensität wurde auf der y-Achse gegen die Zeit auf der x-Achse aufgetragen. Dabei sind die Parameter F_0 , F_{50} und F_{\max} ein Maß für die Höhe des Fluoreszenzsignals und damit ein relatives Maß der Ca^{2+} -Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten im Zytosol des Kardiomyozyten. Die Parameter TF_{50} und TTP beschreiben die Zeit bis zum Eintreten von F_{50} bzw. F_{\max} . τ ist die Zeitkonstante des Abfalls der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, welche durch eine monoexponentielle Annäherung des Ca^{2+} -Abfalls (von 90% der Amplitude bis zum Ende der Zykluslänge) bestimmt wurde.

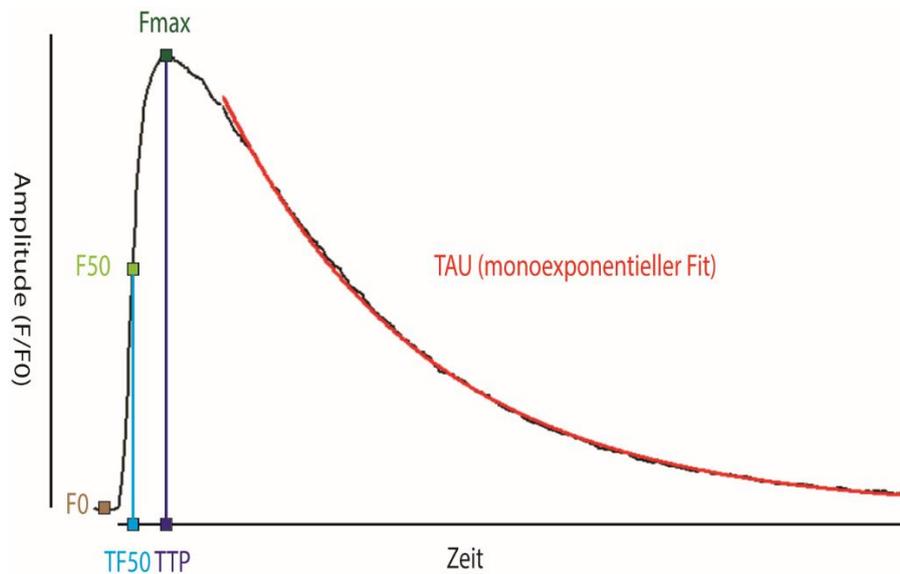


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Parameter der Ca^{2+} -Homöostase

2.10 Software-gestützte Auswertung der Daten

Die Aufnahmen im „Linescan“-Modus wurden mit der von der Arbeitsgruppe programmierten IDL basierten Software Liscana analysiert [99]. Die Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen (Ca^{2+} -Transienten) wurden als Verhältnis F/F_0 des zeitabhängigen Fluoreszenzsignals F und des diastolischen Fluoreszenzsignals F_0 beschrieben. Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Pixelgröße von $0,12 \mu\text{m}$ werden entlang der $61 \mu\text{m}$ langen Scanlinie ca. 512 lokale Signalintensitäten (F_{lokal}) pro Zeiteinheit aufgezeichnet. Die globale

Signalintensität (F_{global}) wurde durch den Mittelwert aller lokalen Signalintensitäten entlang der Scan-Linie berechnet. Zur Beurteilung der lokalen Kontrolle der CICR wurden lokale Ca^{2+} -Transienten (F_{lokal}/F_0) in einem ca. 1 μm großen Bereich analysiert. Die lokalen Ca^{2+} -Transient zeigen die zeitliche Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in diesem Bereich.

Zelluläre Lokalisationen mit früher (Ca^{2+} -Influx getriggert) Ca^{2+} -Freisetzung wurden definiert durch eine lokale $\text{TF50} < 5$ ms in wenigstens drei von zehn konsekutiven Schlägen [99, 100]. Das Zeitintervall von 5 ms entspricht dem Mittelwert der globalen TF50 der Kontrollzellen. Die Wahrscheinlichkeit einer frühen Ca^{2+} -Freisetzung wurde in allen frühen Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten durch die Anzahl der Schläge mit einem lokalen $\text{TF50} < 5$ ms in zehn konsekutiven Schlägen berechnet.

Die Zeitkonstante des zytosolischen Ca^{2+} -Abfalls, TAU , der im elektrischen Feld induzierten Ca^{2+} -Transienten bei 1 Hz (TAU_{ss}), der Waves ($\text{TAU}_{\text{waves}}$) und der Antwort auf die Coffeinexposition ($\text{TAU}_{\text{Coffein}}$) wurden berechnet. $\text{TAU}_{\text{waves}}$ (aufgezeichnet in $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung) und $\text{TAU}_{\text{Coffein}}$ wurden als Näherung der SERCA2A bzw. der NCX Aktivität verwendet, wobei der geringe Anteil von sarkolemmalen und mitochondrialen Ca^{2+} -ATPasen an der gesamten Ca^{2+} -Elimination vernachlässigt wurde. Die fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung wurde als Quotient des SR Ca^{2+} -Gehalts dividiert durch die maximale Ca^{2+} -Freisetzung bei 5 Hz definiert. Die relative diastolische Ca^{2+} -Freisetzung und die relative maximale Ca^{2+} -Freisetzung wurden als Quotient von F_0 bzw. F_{max} bei 5 Hz dividiert durch F_0 bzw. F_{max} bei 1 Hz definiert.

Die Frequenz und Charakteristika der Sparks wurden mit der Software Sparkmaster [135] analysiert. Um sicherzustellen, dass sich die Myozyten im „steady-state“ befinden, wurde bei der Analyse ein Zeitintervall von 0,4 s nach jeder Wave von der Analyse ausgeschlossen. Lokale Ca^{2+} -Signale mit einer geringen Amplitude, definiert als $F_{\text{max}} < 0,5 F/F_0$ (sog. Sparklets), wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Die T-Tubuli wurden mit der von der Arbeitsgruppe programmierten IDL basierten Software T-Tub analysiert [100]. Diese Software führt eine automatische iterative Schwellwertbildung basierend auf der maximalen Zwischen-Klassenvarianz von Signal- und Hintergrundsintensitäten durch, um dadurch ein binäres Bild bestehend aus T-Tubuli und Hintergrund zu erstellen [136]. Über die Signaldichte des binären Bildes konnte die T-Tubuli Dichte und der Variationskoeffizient der Dichte bestimmt werden. Für die Analyse der T-Tubuli wurden die Aufnahmen der Kardiomyozyten mittels Superimposition eines Gitternetzes in kleine Einheiten eingeteilt, welche manuell in intrazelluläre, sarkolemmale und extrazelluläre Bereiche aufgeteilt wurden. Für die

Analyse wurden ausschließlich die intrazellulären T-Tubuli Regionen ohne angrenzende äußere Zellmembran berücksichtigt. [99].

2.11 Darstellung der Daten und statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden graphisch als Streudiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung bei normalverteilten Daten und als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand bei nicht-normalverteilten Daten dargestellt und entsprechend im Text beschrieben. Alle Daten wurden durch mindestens drei unabhängige Experimente mit Zellen aus mindestens drei verschiedenen Tieren generiert. Für die statistische Auswertung und Darstellung wurden Graph Pad Prism (Graph Pad 6 Software, San Diego, USA) und SPSS (IBM SPSS Statistics Version 25, Armonk, USA) verwendet.

Die statistische Auswertung wurde unter der Annahme der Unabhängigkeit der Stichproben durchgeführt. Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um näherungsweise genetisch identische Tiere desselben Geschlechts mit ähnlichem Alter, weshalb interindividuelle Unterschiede der Tiere als minimal betrachtet wurden. Mögliche Effekte durch geringfügige Abweichungen bei der Durchführung der Isolation der Kardiomyozyten wurden ebenfalls als statistisch vernachlässigbar betrachtet. Diese Annahmen sind insbesondere dadurch begründet, dass die Kardiomyozyten jedes Versuchstieres jeweils für eine vergleichbare Zahl von Experimenten in der Kontrollgruppe und in der Interventionsgruppe genutzt wurden. Mögliche Effekte durch Unterschiede der Versuchstiere und der Zellisolation betrafen daher beide Versuchsgruppe in gleichem Maße. Diese Annahmen wurden durch die exemplarische Bestimmung des Intraklassen-Korrelationskoeffizienten der Zeitkonstante τ der Ca^{2+} -Elimination überprüft. Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient wurde durch Berechnung der Kovarianzen in einem gemischten linearen Modell, in welchem der kumulierte Effekt der interindividuellen Unterschiede der Ratten und der Isolationen als zufälliger Effekt moduliert wurde, berechnet. Der resultierende Intraklassen-Korrelationskoeffizient von 0,2 deutete darauf hin, dass diese Effekte ausreichend klein waren und nur eine geringe Clusterung vorliegt. Die Stichproben können somit näherungsweise als unabhängig betrachtet werden.

Die Daten wurden mithilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitätstests auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Es wurde der zweiseitige Student's T-Test modifiziert nach Welch für normalverteilte Daten und der Mann-Whitney-U Test für nicht-normalverteilte Daten angewendet. Für die Analyse der normalisierten Western-Blot Daten wurde der Wilcoxon

matched-pairs signed-ranks Test verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SF) bei normalverteilten Daten oder als Median mit Interquartilsabstand (IQA) bei nicht normalverteilten Daten im Text beschrieben und graphisch als Streudiagramme mit entsprechend Mittelwert und Standardabweichung oder Median mit Interquartilsabstand dargestellt.

Zur Analyse der Korrelation der Daten wurden lineare Regressionen mit anschließender statistischer Testung des Steigungskoeffizienten durchgeführt. Als Maß der Güte der Regression wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt. Analog der Referenzwerte von Cohen, abgewandelt nach Ellis, wurde orientierend in der vorliegenden Arbeit ein $R^2 > 0,25$ als große, ein $R^2 0,1-0,25$ als mittlere und ein $R^2 0,01-0,09$ als geringe Effektstärke beschrieben [137]. Von statistischer Signifikanz wurde bei allen Tests ab einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ ausgegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Palmitoleat auf die Ca^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Elimination

Für die Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie im „Linescan-Modus“ wurden Kardiomyozyten von insgesamt zehn Wildtyp-Ratten untersucht. Die elektrisch induzierten Ca^{2+} -Transienten der mit Palmitoleat behandelten Zellen zeigten einen deutlich ungleichmäßigeren und „gezackt“ erscheinenden Anstieg der Signalintensität und einen verzögerten Abfall der Signalintensität des Ca^{2+} -affinen Fluorochroms.

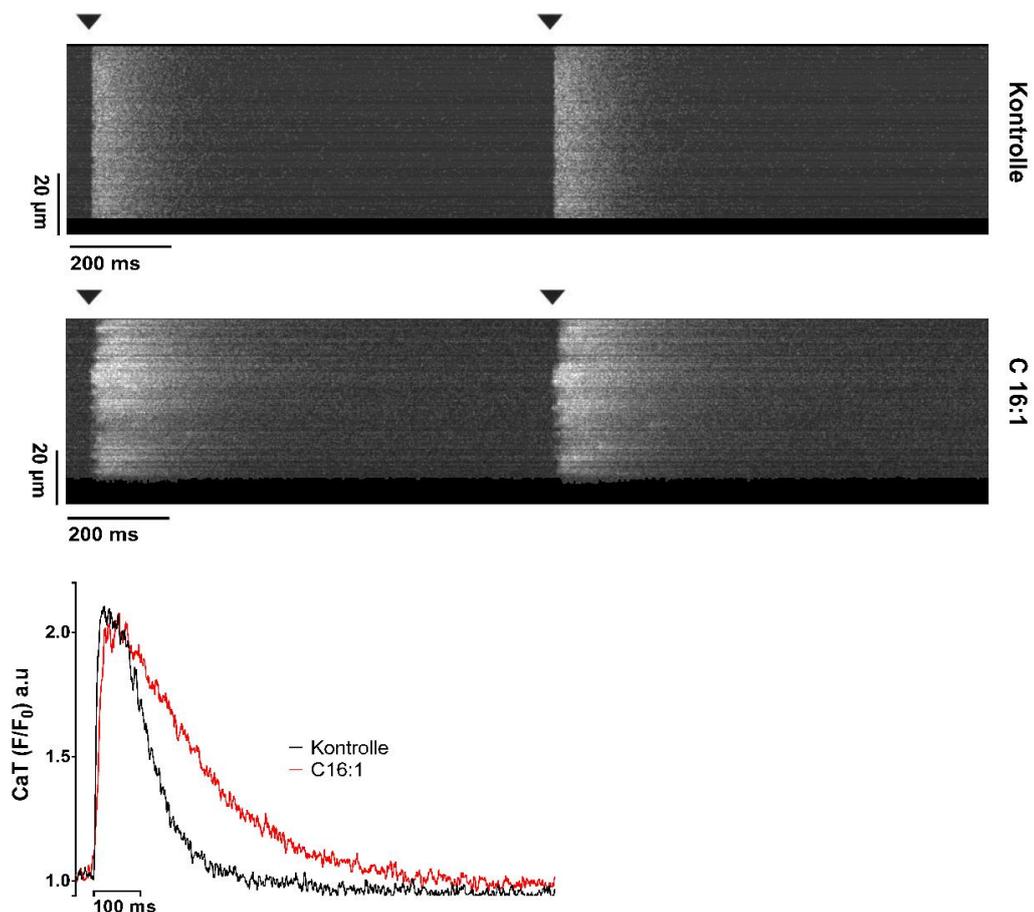


Abbildung 3: Repräsentative Linescans und globale Ca^{2+} -Transienten. Repräsentative Line Scans einer Kontrollzelle und einer Zelle der Interventionsgruppe (oben) mit der korrespondierenden Darstellung des globalen Ca^{2+} -Transienten als x-y-Plot der mittleren Signalintensität entlang der Scanlinie gegen die Zeit aufgetragen (unten). Die schwarzen Pfeile illustrieren den Zeitpunkt der elektrischen Stimulation.

Bei den Ca^{2+} -Transienten der repräsentativen Linescans imponierte eine geringere Anstiegsrate und ein deutlich langsamerer Abfall der Signalintensität (Abbildung 3, unten). In der Analyse der globalen Ca^{2+} -Transienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Amplitude der Ca^{2+} -Freisetzung zwischen den beiden Gruppen (F_{\max} , C16:1: 2,31 (IQA 2,00 – 2,78) $n = 85$ vs. Kontrolle: 2,12 (IQA 1,84 – 2,77) $n = 86$ (F/F_0); Mann-Whitney-U Test, $p = 0,0877$).

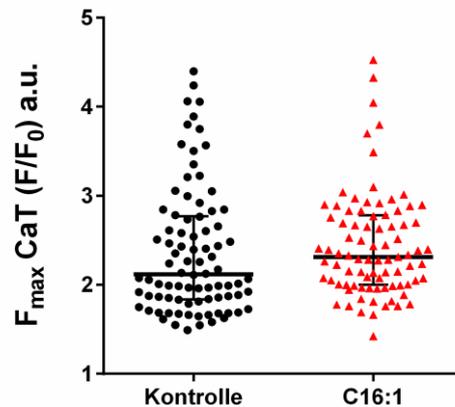


Abbildung 4: Amplitude der Ca^{2+} -Freisetzung. Die Amplitude wird dargestellt als Quotient der Signalintensitäten F/F_0 . Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

Die mit Palmitoleat inkubierten ventrikulären Kardiomyozyten zeigten jedoch eine signifikant, um ca. 50% längere Zeit bis zum Erreichen der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung (TTP: 34,6 ms (IQA 30,51 – 44,52) $n = 85$ vs. 24,2 ms (IQA 20,69 – 28,98) $n = 86$; Mann-Whitney-U Test, $p^* < 0,0001$) und eine verlängerte Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Ca^{2+} -Freisetzung (TF50: C16:1: 7,76 ms (IQA 6,27 – 11,32) vs. Kontrolle: 4,88 ms (IQA 4,24– 5,75), Mann-Whitney-U Test, $p^* < 0,0001$) verglichen mit der Kontrollgruppe.

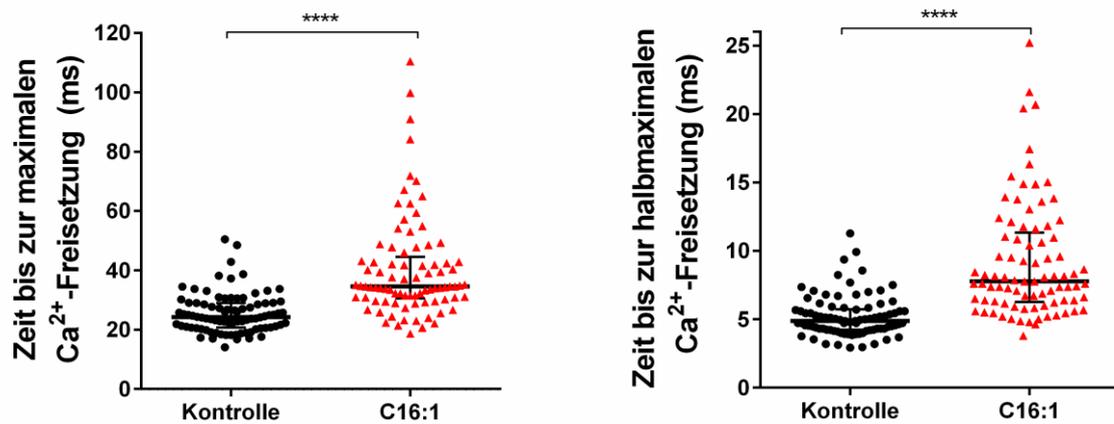


Abbildung 5: Parameter der Kinetik der Ca^{2+} -Freisetzung. Gezeigt wird die Zeit bis zur maximalen Ca^{2+} -Freisetzung (TTP, links) und die Zeit bis zur halbmaximalen Ca^{2+} -Freisetzung (TF50, rechts). Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

Die Inkubation mit Palmitoleat führte außerdem zu einer signifikanten Verlängerung der Zeitkonstante TAU der globalen Ca^{2+} -Elimination um ca. 50% (TAU_{ss} : 116 ms (IQA 89 – 182) $n = 85$ vs. 68 ms (IQA 54 – 116) $n = 86$; Mann-Whitney-U Test, $p^* < 0.0001$) in der Interventionsgruppe.

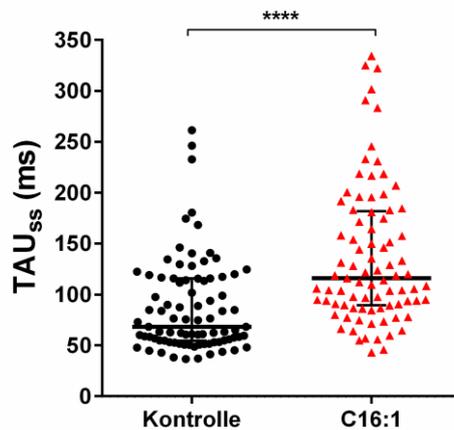


Abbildung 6: Zeitkonstante TAU der Ca^{2+} -Elimination. Dargestellt als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand.

Weiterhin fand sich nach der elektrischen Stimulation mit einer Frequenz von 5 Hz ein erhöhter SR Ca^{2+} -Gehalt (2,58 (IQA 2,30 – 3,26) $n = 19$ vs. 2,24 (IQA 1,94 – 2,56) $n = 29$ (F/F₀); Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0111$) und eine um ca. 15% geringere fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung ($0,67 \pm 0,05$ (SF) $n = 12$ vs. $0,84 \pm 0,03$ (SF) $n = 21$; Welch's T-Test, $p^* = 0,0114$) in den mit Palmitoleat inkubierten Myozyten.

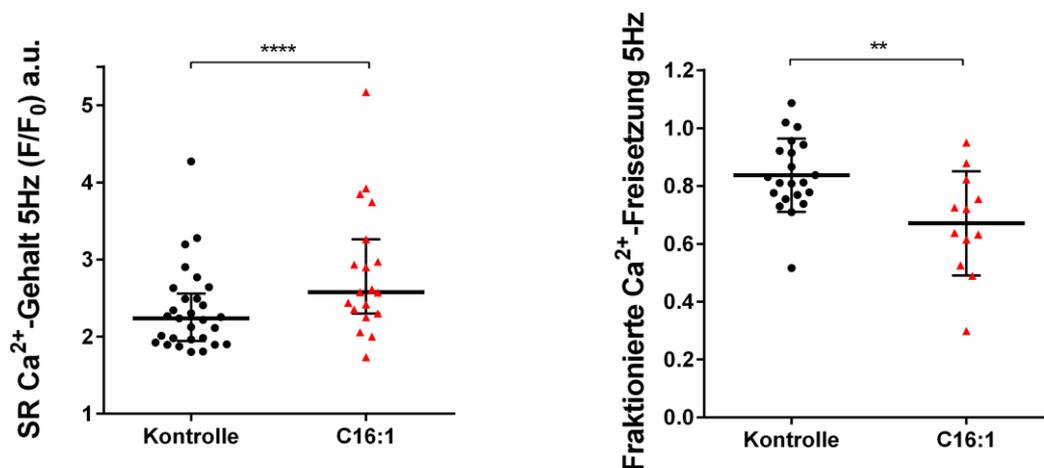


Abbildung 7: SR Ca^{2+} -Gehalt und fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung. Der Quotient der Signalintensitäten F/F₀ der Coffeinantwort als Surrogatparameter des SR Ca^{2+} -Gehalts dargestellt als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand (links). Die fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung wird dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung (rechts).

3.1.1 Veränderung der subzellulären Ca^{2+} -Freisetzung

Subzellulär zeigte sich eine signifikant dyssynchronere CICR in der Interventionsgruppe. Die erhöhte Dyssynchronie wird nachfolgend durch die Darstellung der unterschiedlichen Verteilung der TF50 Werte entlang der Scan Linie in konsekutiven Ca^{2+} -Transienten veranschaulicht. Auffällig war eine deutlich höhere Variation der TF50 Werte im repräsentativen Beispiel der mit Palmitoleat behandelten Kardiomyozyten (Abbildung 8: in rot dargestellt). Weiterhin zeigten sich signifikant höhere TF50 Werte verglichen mit der repräsentativen Kontrollzelle.

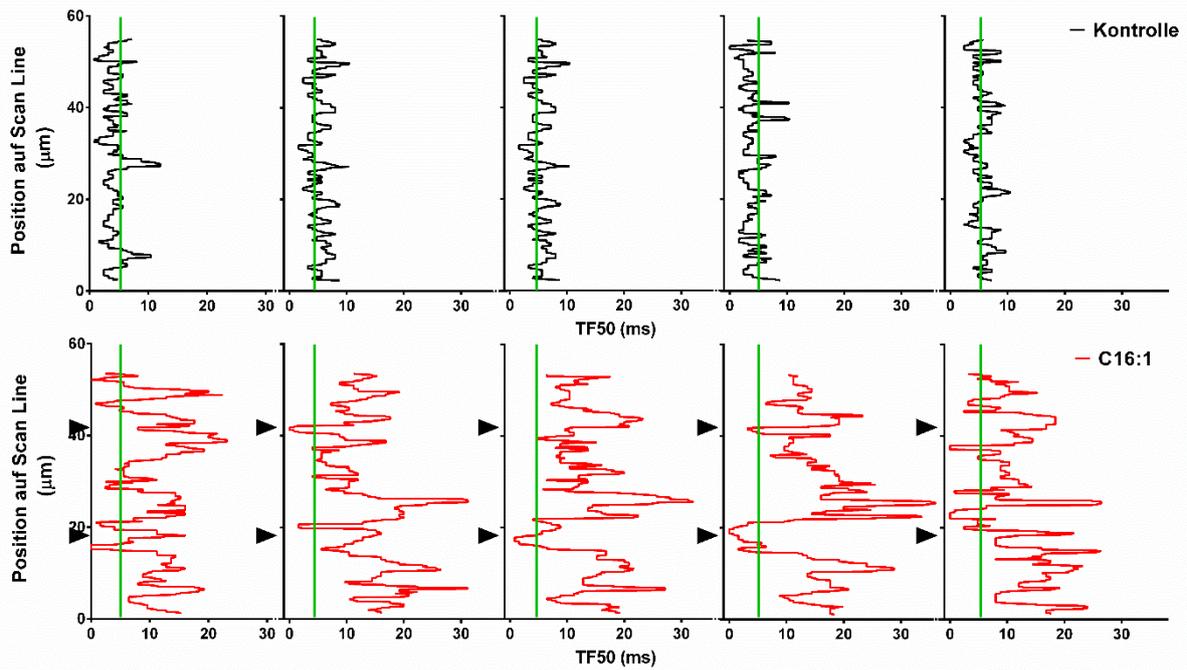


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der lokalen Ca^{2+} -Freisetzungskinetik einer Kontrollzelle (oben) und einer mit Palmitoleat behandelten Zelle (unten). Die lokalen TF50 Werte von fünf konsekutiven Ca^{2+} -Transienten (x-Achse) wurden gegen die Position auf der Scan Line (y-Achse) aufgetragen. Die Pfeile heben Regionen hervor, in denen die Variabilität auch von Herzzyklus zu Herzzyklus besonders deutlich wird. Die grüne Linie markiert den Mittelwert von TF50 der Kontrollzellen (5 ms).

Weiterhin war ein verringerter relativer Anteil von Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten mit früher Ca^{2+} -Freisetzung auffällig (C16:1: $29,12\% \pm 2,64$ (SF) $n = 58$; Kontrollgruppe: $63,58\% \pm 2,61$ (SF) $n = 62$; Welch's T-Test, $p^* < 0,0001$).

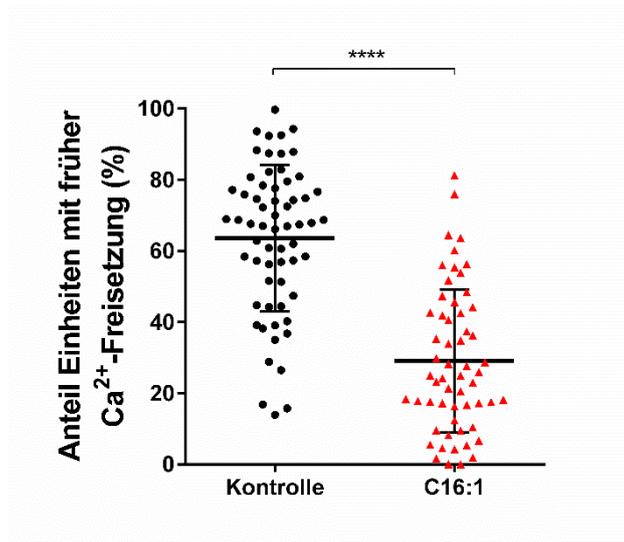


Abbildung 9: Anteil der Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten mit früher Ca^{2+} -Freisetzung. Dargestellt als Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.

Die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Ca^{2+} -Freisetzung der Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten mit später Ca^{2+} -Freisetzung war erhöht ($12,61$ ms (IQA $10,48 - 16,20$) $n = 58$ vs. $8,78$ ms (IQA $7,59 - 10,21$) $n = 62$, Mann-Whitney-U Test, $p^* < 0,0001$; Fig. 2F) und die Wahrscheinlichkeit einer frühen Ca^{2+} -Freisetzung reduziert ($0,61 \pm 0,05$ (SF) $n = 56$ vs. $0,72 \pm 0,03$ (SF) $n = 62$, Welch's T-Test, $p^* < 0,0001$).

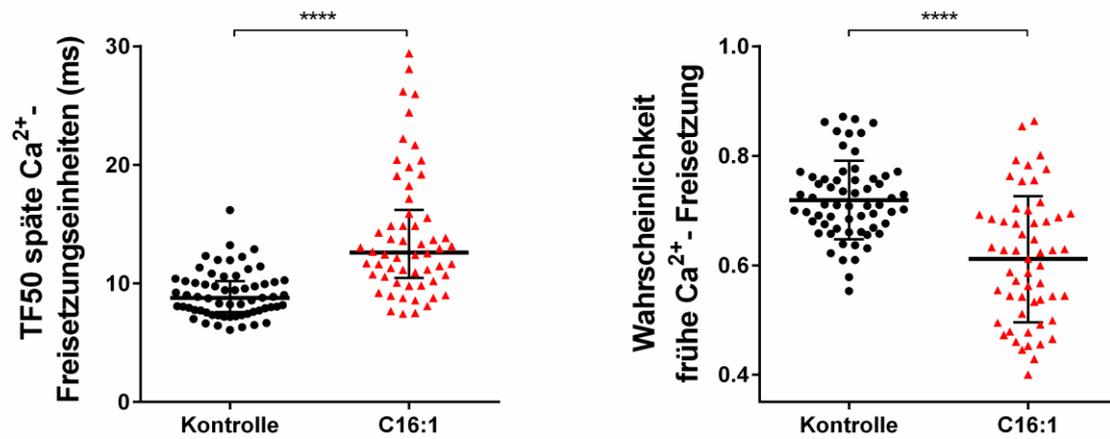


Abbildung 10: TF50 der späten Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten (links) und die Wahrscheinlichkeit der frühen Ca^{2+} -Freisetzung (rechts). Dargestellt als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand (links) und mit Mittelwert und Standardabweichung (rechts).

3.2 Auswirkung auf das T-Tubuli System

Für die Untersuchung des T-Tubuli-Systems wurden Kardiomyozyten von sechs Wistar Wildtyp-Ratten untersucht.

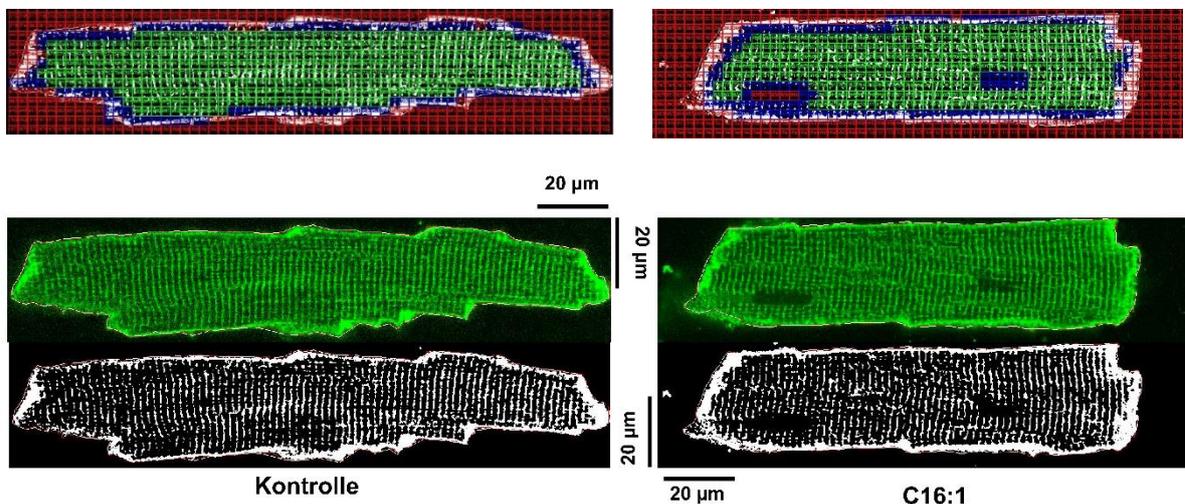


Abbildung 11: Repräsentative Aufnahmen der T-Tubuli. Oben: Analyse der T-Tubuli mittels Superimposition eines Gitternetzes und Einteilung in intrazelluläre (grün), sarkolemmale (blau) und extrazelluläre (rot) Bereiche. Mitte: Die T-Tubuli und das Sarkolemma gefärbt mit di-8-ANEPPS. Unten: Das Ergebnis der Schwellwertbildung verwendet zur Quantifizierung der T-Tubuli Dichte. Auf den Aufnahmen rechts sind die beiden Zellkerne des Kardiomyozyten zu sehen.

Es konnte kein Unterschied der mittleren T-Tubuli Fluoreszenz-Signaldichte zwischen den Gruppen gezeigt werden (19,73% (IQA 18,42 – 21,04) $n = 41$ vs. 19,41% (IQA 18,12 – 21,31) $n = 64$, Mann-Whitney-U Test, $p = 0,6624$). Es fand sich jedoch eine signifikante Erhöhung des Variationskoeffizientens der Signaldichte in den mit Palmitoleat behandelten Zellen (0,5748 (IQA 0,51 – 0,66) $n = 41$ vs. 0,5407 (IQA 0,49 – 0,60) $n = 64$, Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0271$), welches auf eine heterogenere Verteilung der T-Tubuli hindeutet.

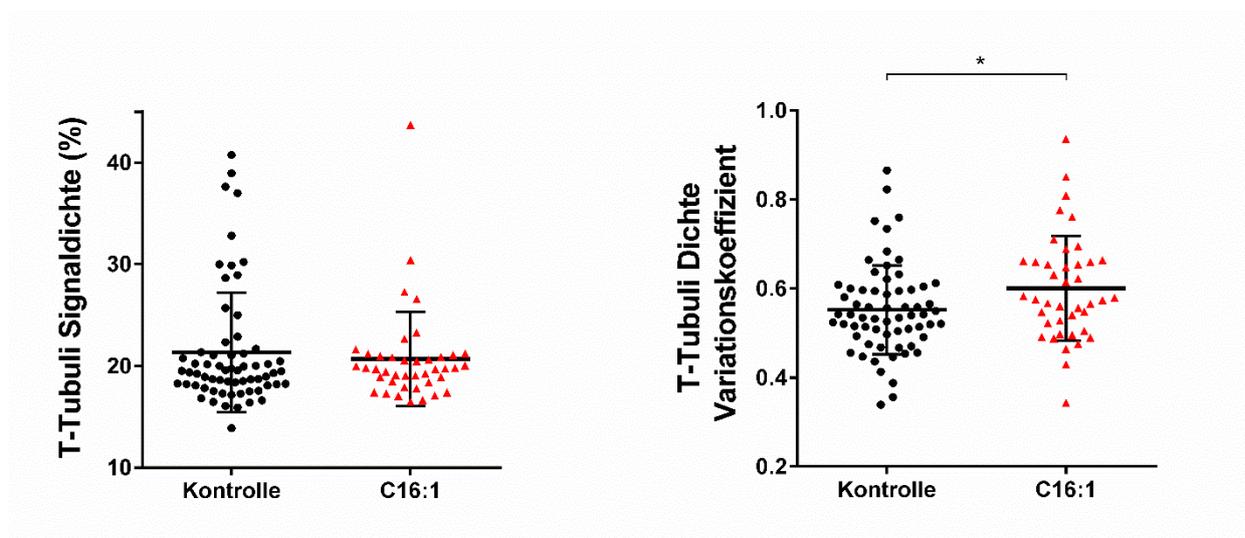


Abbildung 12: T-Tubuli Signaldichte (links) und Variationskoeffizient der T-Tubuli Dichte (rechts). Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

3.3 Palmitoleat hemmt die Aktivität von SERCA2A und NCX

Während der Superfusion mit 0Na0Ca Lösung zeigte sich eine verlangsamte Ca^{2+} -Elimination von spontanen Ca^{2+} -Waves in den mit Palmitoleat inkubierten Zellen ($\text{TAU}_{\text{waves}}$: 88,1 ms (IQA 79,7 – 156,1) $n = 18$ vs. 47,9 ms (IQA 45,0 – 67,1) $n = 19$; Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0001$), welche auf eine reduzierte SERCA2A-Aktivität hinweist. Weiterhin zeigte sich auch die Ca^{2+} -Elimination während der Superfusion von NT2 mit 20 mmol Coffein verlangsamt ($\text{TAU}_{\text{Coffein}}$, 0,876 s (IQA 0,556 – 1,431) $n = 16$ vs. 0,5878 (IQA 0,501 – 0,633) $n = 28$; Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0104$), was auf eine Hemmung der NCX-Aktivität im „forward mode“ schließen lässt.

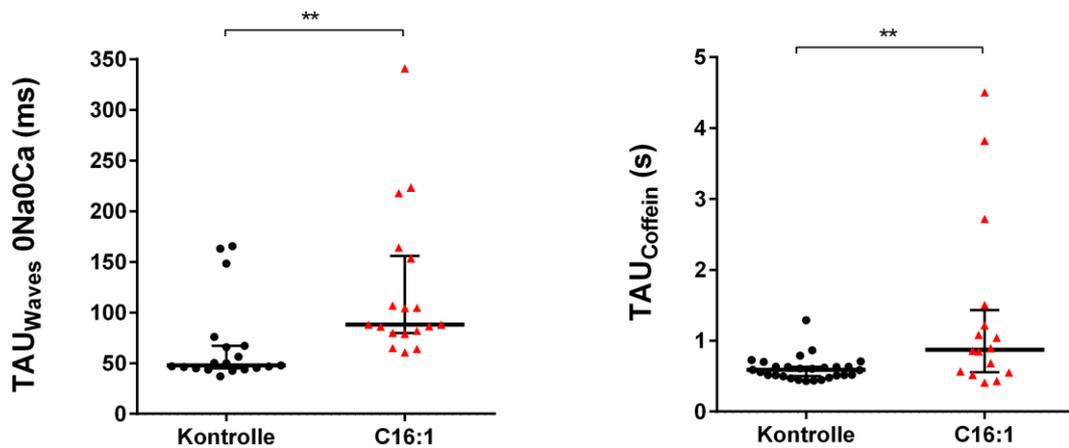


Abbildung 13: Surrogatparameter der Aktivitäten von SERCA2A und NCX. Die Zeitkonstante TAU der Waves als Surrogatparameter der SERCA2A Aktivität (links) und die Zeitkonstante TAU der Coffeinantwort als Surrogatparameter der NCX Aktivität (rechts). Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

3.4 Auswirkung auf die Phosphorylierung von Proteinen der Ca²⁺-Homöostase

Für die Untersuchung der Phosphorylierung der Proteine der Ca²⁺-Homöostase wurden Kardiomyozyten von drei Wildtyp-Ratten untersucht (N=3).

Es zeigte sich kein Unterschied in der Phosphorylierung von RyR Serin2808 (88,87 (IQA 80,12 – 135,8) der Kontrolle, N=3, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks Test, p = 0,99), aber eine Tendenz zur Hypophosphorylierung von RyR Serin2814 in den mit Palmitoleat inkubierten Zellen (69,05 (IQA 60,79 – 83,84) der Kontrolle, N = 3, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks Test, p = 0,2500).

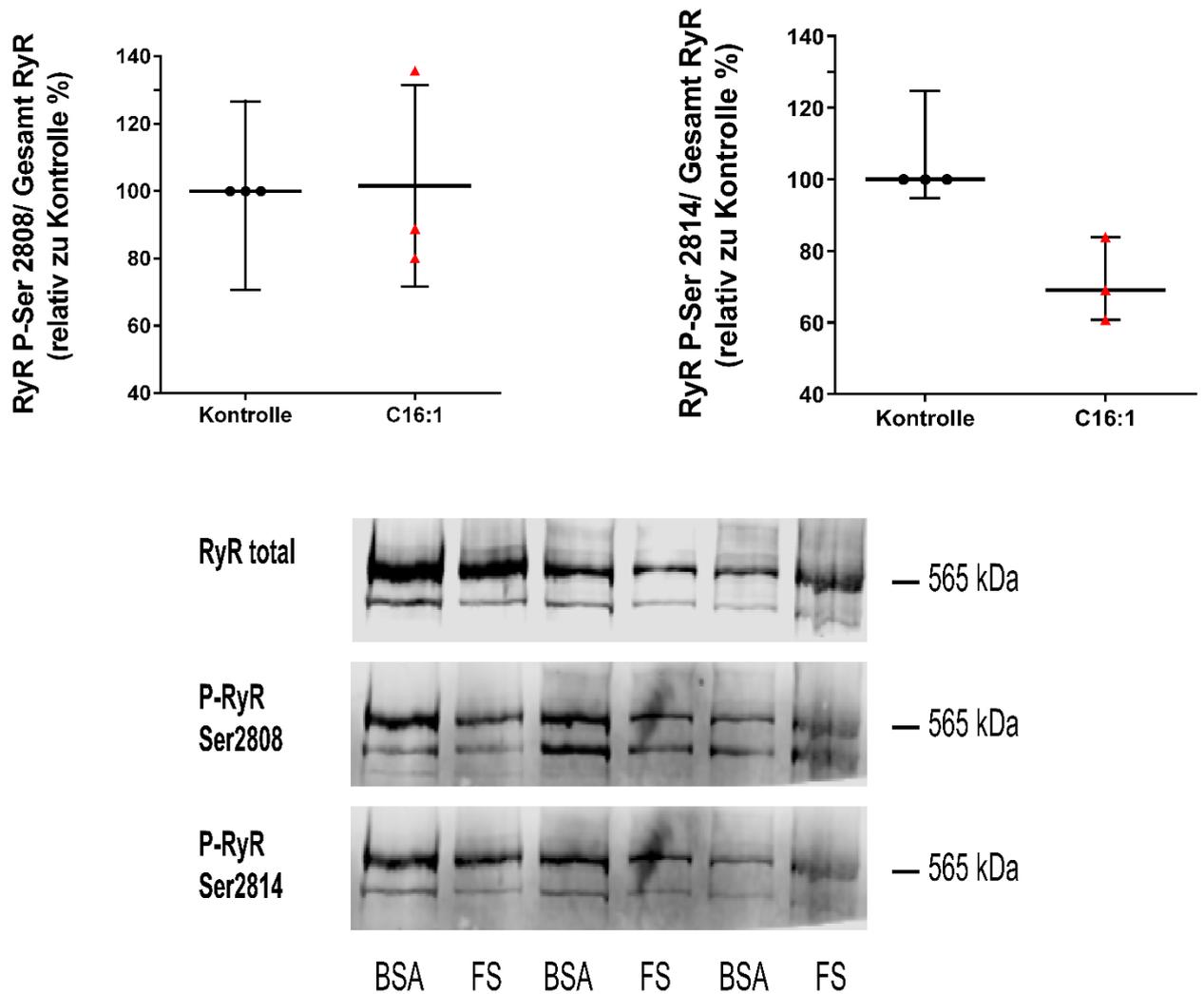


Abbildung 14: Phosphorylierung von RyR P-Ser 2808 und RyR P-Ser 2814. Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand. Die RyR-Phosphorylierung in der Interventionsgruppe werden als relative Werte in Bezug auf die Kontrollexperimente gezeigt. Die Signaldichte der Kontrollexperimente wurde auf 100% gesetzt. Die IQA der Kontrollexperimente illustriert die Streuung der Messwerte bevor sie auf 100% gesetzt wurden (oben). Ausschnitt der korrespondierenden Western Blot Membran mit Markierung des Molekulargewichts. Kennzeichnung der Kontrollgruppe (BSA) und der Interventionsgruppe (FS) (unten).

3.5 Auswirkung auf die Ca^{2+} -Homöostase bei höheren Stimulationsfrequenzen

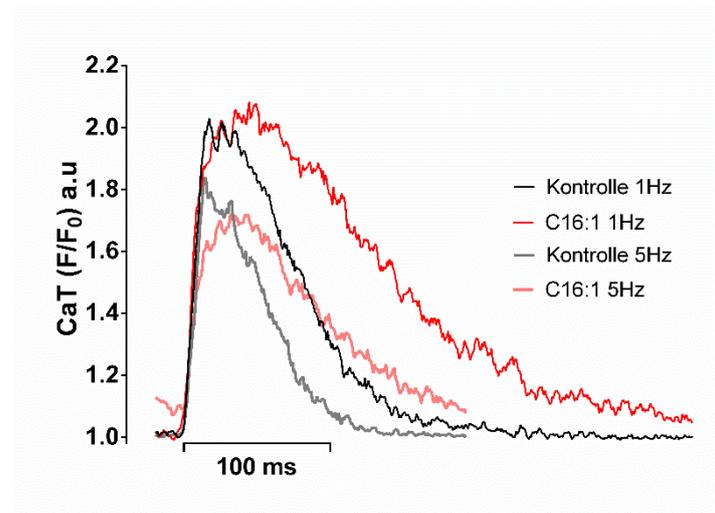


Abbildung 15: Frequenzabhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Transienten. Dargestellt sind repräsentative x-y-Plots der Signalintensität der Ca^{2+} -Transienten aufgetragen gegen die Zeit von Kontrollzellen und von mit Palmitoleat behandelten Zellen jeweils bei Stimulationsfrequenzen von 1 Hz und 5 Hz.

Die Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz führte in den mit Palmitoleat behandelten Zellen zu einer signifikanten relativen Erhöhung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (1,090 (IQA 1,028 – 1,147) $n = 24$ vs. 1,014 (IQA 0,994 – 1,062) $n = 24$; $F_{0\text{5Hz}}/F_{0\text{1Hz}}$, Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0008$) verglichen mit der Kontrollgruppe. Ebenfalls zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine zehnpromtente Reduktion der Amplitude der relativen maximalen Ca^{2+} -Freisetzung ($0,79 \pm 0,03$ (SF) $n = 19$ vs. $0,93 \pm 0,01$ (SF), $F_{\text{max } 5\text{Hz}}/F_{\text{max } 1\text{Hz}}$, $n = 22$; Welch's T-Test $p^* < 0,0001$).

Abbildung 15 illustriert sowohl die diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen als auch die Amplituden bei einer Stimulationsfrequenz von jeweils 1 Hz und 5 Hz in beiden Versuchsgruppen. Hervorzuheben ist die deutliche relative Erhöhung der basalen diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (Signalintensität F_0) und die Verringerung der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten der Interventionsgruppe bei 5 Hz.

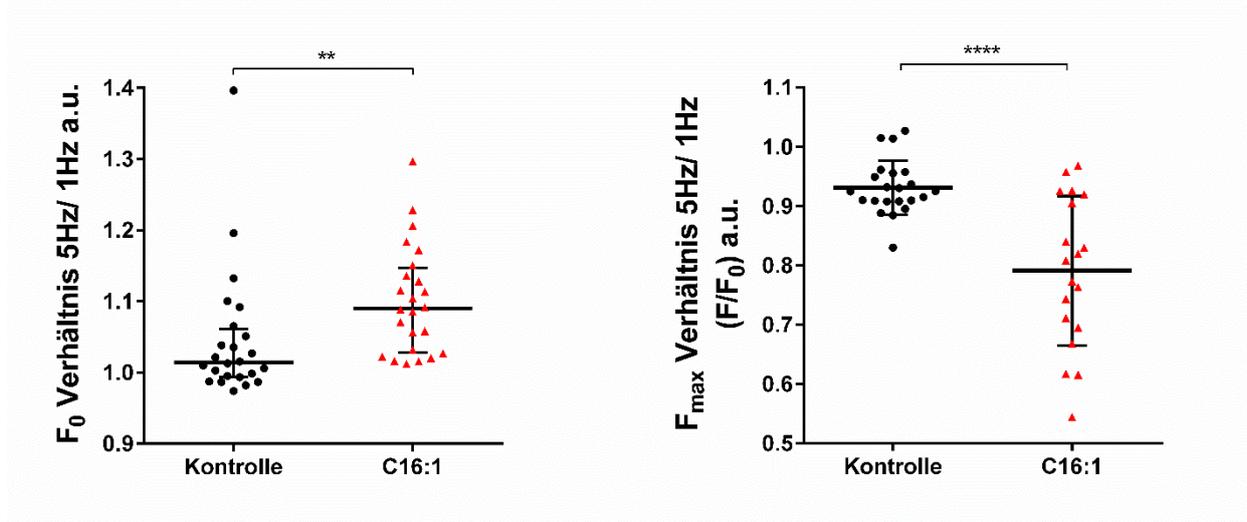


Abbildung 16: Die relative diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die relative maximale Ca^{2+} -Freisetzung. Die relative diastolische Ca^{2+} -Konzentration dargestellt als Verhältnis von F_0 bei 5 Hz zu 1 Hz als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand (links) und die relative maximale Ca^{2+} -Freisetzung dargestellt als Verhältnis von F_{\max} bei 5 Hz relativ zu 1 Hz als Streudiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung (rechts).

Für die relative diastolische Ca^{2+} -Erhöhung konnte eine positive lineare Korrelation mit TAU_{ss} dargestellt werden ($R^2 = 0,32$, $p^* = 0,0049$). Ebenfalls fand sich eine negative lineare Korrelation der fraktionierten Ca^{2+} -Freisetzung mit TF50 ($R^2 = 0,27$, $p^* = 0,0015$).

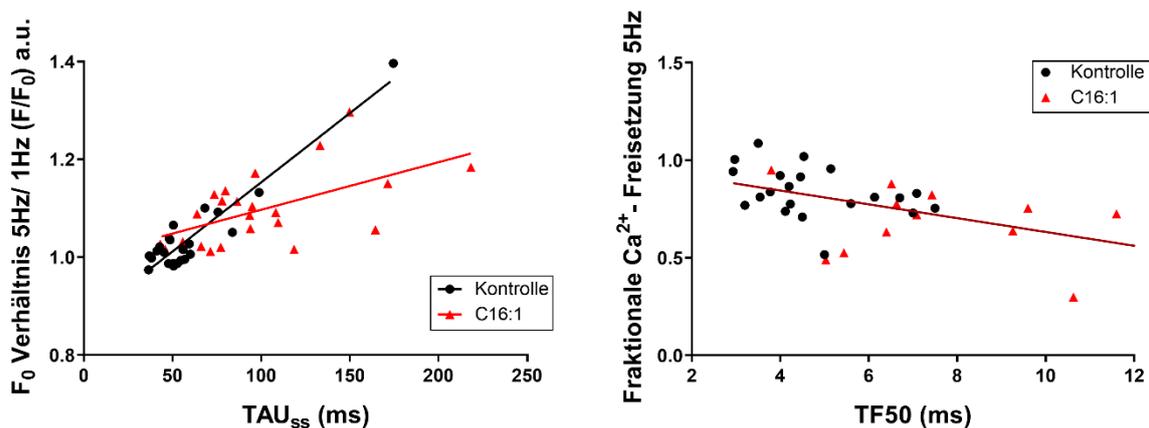


Abbildung 17: Korrelationen der frequenzabhängigen Änderung von F_0 mit TAU_{ss} (links) und der fraktionierten Ca^{2+} -Freisetzung mit TF50 (rechts). Dargestellt als X-Y-Plots mit linearen Korrelationslinien. Die linearen Korrelationen wurden links für jede Gruppe getrennt und rechts für beide Gruppen gepoolt berechnet.

Es fand sich jedoch keine lineare Korrelation der relativen Erhöhung des diastolischen Ca^{2+} und der relativen Abnahme der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung.

3.6 Auswirkung auf die spontane Ca^{2+} -Freisetzung und die Arrhythmogenität

Palmitoleat führte zu einer erhöhten Sparkfrequenz (1,39 (IQA 0,17 – 4,35) $n = 24$ vs. 0,0 (IQA 0,00 – 0,36) $n = 30$ sparks/nl /s; Mann-Whitney-U Test $p^* = 0,0003$), welche jedoch nach matching nach SR Ca^{2+} -Gehalt keine statistische Signifikanz mehr erreichte (1,738 (IQA 0,198 – 3,514) $n = 13$ vs. 0,2799 (IQA 0,0 – 0,869) $n = 15$ Sparks/nl /s; Mann-Whitney-U Test $p = 0,0698$). Die Sparkfrequenz wurde nach SR Ca^{2+} -Gehalt gematcht, um den Effekt des SR Ca^{2+} -Gehalts untersuchen zu können.

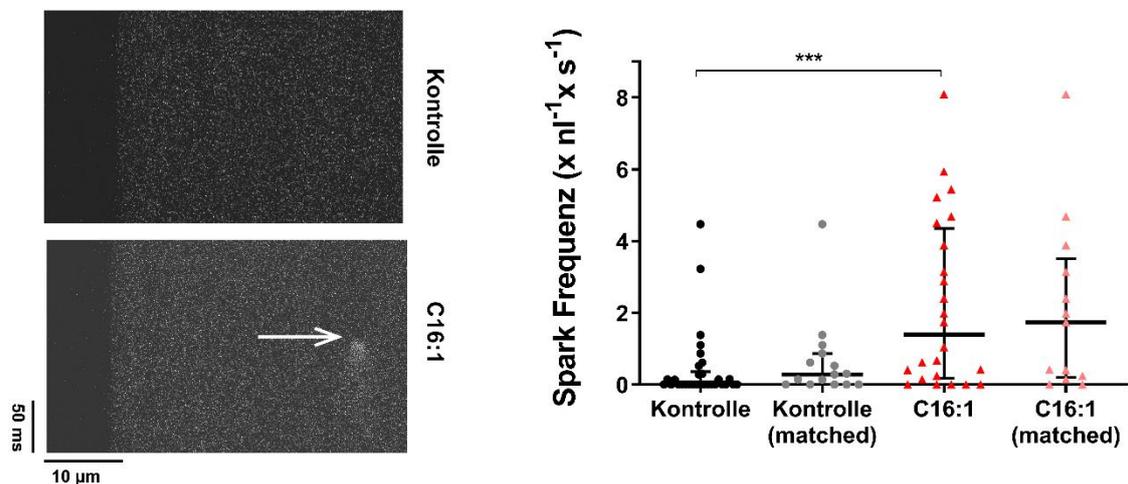


Abbildung 18: Line Scan mit repräsentativem Spark in der Interventionsgruppe (links) und Spark Frequenz mit und ohne Matching nach SR Ca^{2+} -Gehalt (rechts). Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

Die mittlere Dauer der Sparks war in der Interventionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe reduziert ($44 \text{ ms} \pm 2$ (SF) $n = 18$ vs. $53 \text{ ms} \pm 4$ (SF) $n = 13$; Welch's T-Test, $p^* = 0,0438$). Bei der Amplitude bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen ($0,90 \pm 0,04$ (SF) $n = 19$ vs. $0,86 \pm 0,05$ (SF) $n = 13$ ($\Delta F/F_0$); Welch's T-Test, $p = 0,5793$). Eine lineare Korrelation zwischen der Dauer der Sparks und $\text{TAU}_{\text{waves}}$ konnte nicht gezeigt werden.

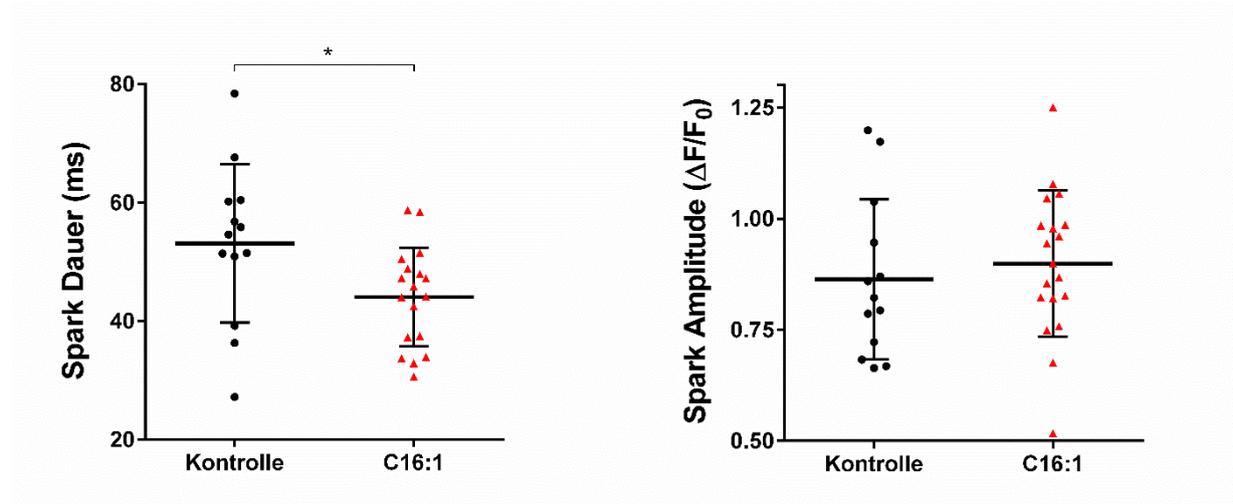


Abbildung 19: Sparkdauer (links) und Spark Amplitude (rechts). Dargestellt als Streudiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung.

Es fand sich weder ein signifikanter Unterschied der nicht nach SR Ca^{2+} -Gehalt gematchten Frequenz der Waves (0,2738 (IQA 0,034 – 0,916) $n = 24$ vs. 0,2735 (IQA 0,0 – 0,460) $n = 30$, waves/nl /s; Mann Whitney Test, $p = 0,5264$) noch der nach SR Ca^{2+} -Gehalt gematchten Frequenz der Waves (0,2787 (IQA 0,0 – 0,869) $n = 14$ vs. 0,2768 $n = 15$, waves/nl /s; Mann Whitney Test, $p = 0,7042$). Als Surrogatparameter für die Offenwahrscheinlichkeit der RyR wurde das Verhältnis von Sparks zu Waves je Zelle berechnet, welches die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, dass ein Spark über CICR eine Ca^{2+} -Propagation in Form einer Wave auslöst. Dieses Verhältnis fand sich signifikant reduziert in der mit Palmitoleat behandelten Gruppe (0,13 (IQA 0,02 – 0,56) $n = 23$ vs. 0,75 (IQA 0,18 – 1,0) $n = 25$, Mann-Whitney-U Test, $p^* = 0,0302$).

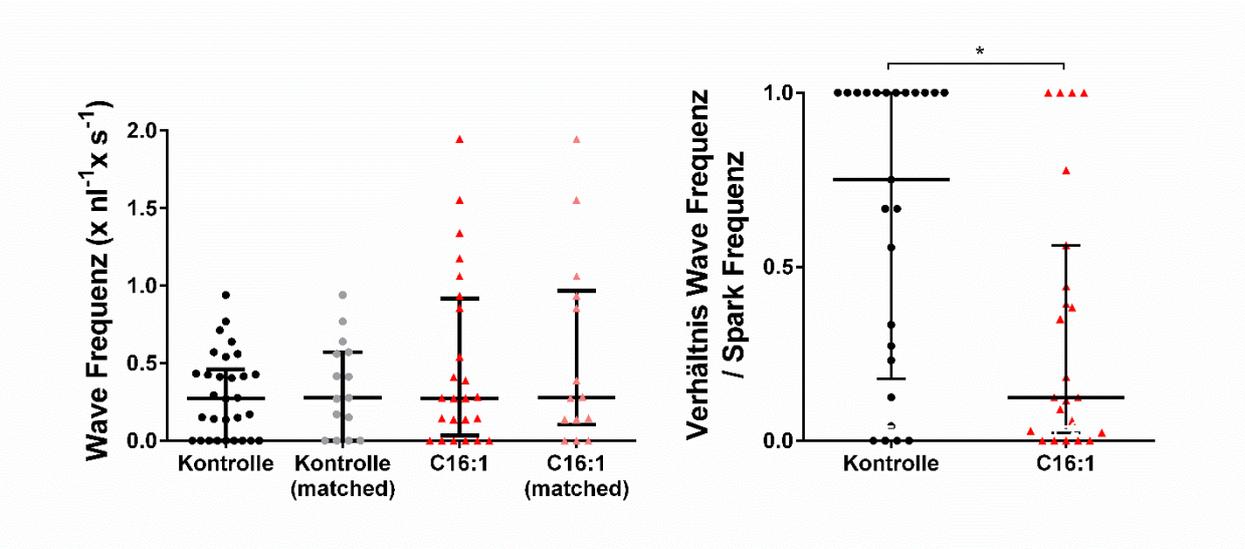


Abbildung 20: Wave Frequenz (links) und Verhältnis von Wave zu Spark Frequenz (rechts).

Dargestellt als Streudiagramme mit Median und Interquartilsabstand.

Weiterhin zeigte sich ebenfalls eine um 20% reduzierte Propagationsgeschwindigkeit der Ca²⁺-Waves während der 0Na0Ca Superfusion ($120,9 \mu\text{m/s} \pm 6,78$ (SF) $n = 18$ vs. $150,4 \mu\text{m/s} \pm 5,02$ (SF) $n = 20$, $p^* = 0,0014$). Der Unterschied in der Propagationsgeschwindigkeit blieb auch nach Matching nach SR Ca²⁺-Gehalt statistisch signifikant ($120,3 \mu\text{m/s} \pm 7,36$ (SF) $n = 10$ vs. $149,6 \mu\text{m/s} \pm 6,65$ (SF) $n = 10$; Welch's T-Test, $p^* = 0,0084$).

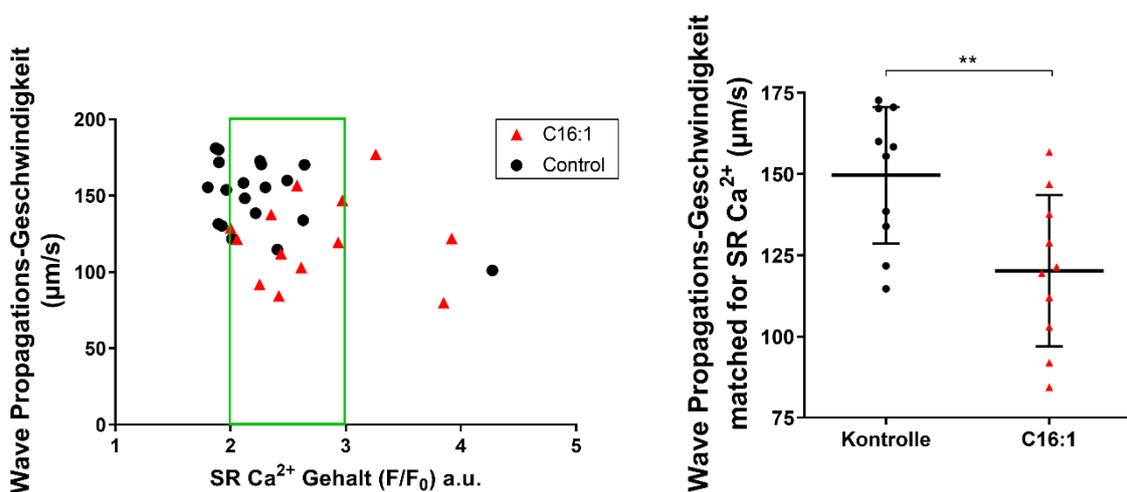


Abbildung 21: X-Y-Plot der Wave Propagationsgeschwindigkeit gegen den SR Ca²⁺-Gehalt (links)

und Wave Propagations-Geschwindigkeit nach dem Matching (rechts). Das grüne Rechteck umschließt die für das Matching berücksichtigten Messwerte. Wave Propagationsgeschwindigkeit nach Matching dargestellt als Streudiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung.

Für die Propagationsgeschwindigkeit der Waves konnte eine positive lineare Korrelation mit $\text{TAU}_{\text{waves}}$ ermittelt werden ($R^2 = 0,29$, $p^* = 0,0005$).

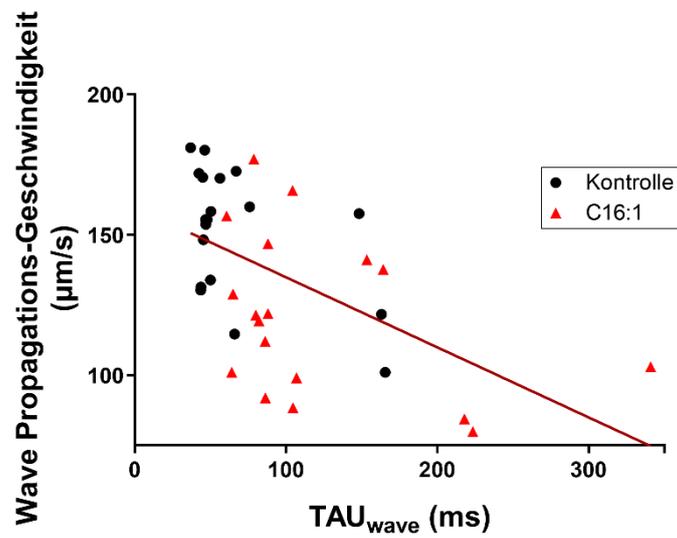


Abbildung 22: Korrelation der Wave Propagations-Geschwindigkeit mit TAU_{wave} . Dargestellt als X-Y-Plot mit linearer Korrelationslinie.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht nach Wissen des Autors erstmalig die akuten Effekte der ungesättigten Fettsäure Palmitoleat auf die Ca^{2+} -Homöostase in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Die Studie präsentiert Evidenz, dass Palmitoleat akute Effekte auf die Kinetiken der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR), sowie die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR und die Ca^{2+} -Elimination hat. Bei erhöhter Stimulationsfrequenz (5 Hz) kommt es darüber hinaus zu einer Erniedrigung der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung und letztendlich zur diastolischen Ca^{2+} -Akkumulation.

4.1 Effekte von Fettsäuren auf Kardiomyozyten

Die Wirkung von Fettsäuren auf Kardiomyozyten wird seit vielen Jahren untersucht. Für die Untersuchung der Auswirkungen einer chronischen Fettsäureexposition erhalten Versuchstiere meist eine sehr fetthaltige Diät. Knowles et al. präsentierten Evidenz für eine Reduktion von Calveolin-3, insbesondere im T-Tubuli System, nachdem C57BL Mäuse über 12 Wochen eine Diät reich an Palmitat oder mittel langkettigen Triglyceriden erhalten hatten [138]. Turdi et al. zeigten, dass eine sehr fetthaltige Diät in einem Mausmodell zu einer signifikanten Verlangsamung der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR führte. Dieser Befund war mit einer Hypophosphorylierung von PLN und einer verringerten SERCA2A Expression assoziiert [126]. Die Kinetiken der Ca^{2+} -Wiederaufnahme wurden jedoch bei subphysiologischen Temperaturen von 25 °C gemessen, weshalb die Aussagekraft dieses Befundes eingeschränkt ist [126]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine mit sehr fetthaltiger Diät assoziierte Hypophosphorylierung von PLN nachweisen. Sie fanden jedoch im Gegensatz zu Turdi et al. keine Reduktion der SERCA2A Expression. Die Auswirkungen auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase wurden nicht untersucht [125].

Weiterhin können Fettsäure-vermittelte Effekte in Tiermodellen mit einer veränderten zellulären Stoffwechslung untersucht werden. Joseph et al zeigten, dass eine zelluläre Lipidüberladung durch Überexpression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- γ (PPAR γ) zu einer erhöhten Amplitude der Ca^{2+} - Transienten, einer verlangsamt Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR, zu einem erhöhtem SR Ca^{2+} - Gehalt und einer erhöhter Sparkfrequenz führt. Diese Befunde waren assoziiert mit einer Oxidierung der RyR, einer verringerten Expression von SERCA2A und einer erhöhten Phosphorylierung von PLN [139].

Ferner zeigen sich die Auswirkungen von erhöhten Fettsäurekonzentrationen auf Kardiomyozyten in Tiermodellen der diabetischen Kardiomyopathie. Hier ist jedoch zu bedenken, dass neben den erhöhten Fettsäurekonzentrationen im Blut auch die diabetogene Stoffwechsellage mit erhöhten Blutzuckerkonzentrationen, erhöhten Insulinspiegeln und erhöhter Insulinresistenz bzw. Insulinmangel für den Zellmetabolismus und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase eine Rolle spielt [140]. Die in diesen Tiermodellen beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase stehen daher wahrscheinlich nicht ausschließlich mit den erhöhten Fettsäurekonzentrationen in Zusammenhang.

In den Studien zeigten sich zudem teils deutliche Unterschiede zwischen den Befunden bei Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen [111]. In Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen spielen erhöhte Fettsäurekonzentrationen im Blut kausal eine entscheidende Rolle, da häufig Tiermodelle mit Leptin-Defizienz verwendet werden [141]. Das Krankheitsbild Diabetes mellitus entsteht in diesen Modellen sekundär durch einen primär veränderten Fettsäuremetabolismus bzw. eine veränderte Nahrungsaufnahme.

Bei Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodellen steht dagegen die Induktion eines absoluten Insulinmangels durch zytotoxische Substanzen im Vordergrund [142, 143]. Daraus resultiert, dass die häufig verwendeten Leptin-Defizienz Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodelle bessere Modelle für das Studium der Auswirkungen der chronisch erhöhten Fettsäureexposition bzw. Lipotoxizität sind. Die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase in diesen Tiermodellen können als zumindest richtungsweisend für die Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Studie gewertet werden.

Pereira et al. untersuchten die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase in einem Mausmodell mit Leptin-Defizienz (57BL/KsJ-db (db/db)). Sie fanden sowohl im ganzen Herz als auch in isolierten Kardiomyozyten eine Reduktion der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, eine verzögerte Ca^{2+} -Freisetzung und eine Verlängerung der Zeitkonstante der Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR. Weiterhin fanden sie eine Verringerung der Ca^{2+} -Spark Frequenz und einen geringeren SR Ca^{2+} -Gehalt. Die Befunde brachten sie mit einer verringerten RyR - und SERCA2A Expression in Zusammenhang. Zusätzlich beschrieben sie eine verminderte LTCC-Expression und eine Erhöhung der NCX-Aktivität [115].

Stølen et al. fanden eine verringerte Kardiomyozytenkontraktion, eine erniedrigte Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, einen vermehrten diastolischen Ca^{2+} -Verlust aus dem SR, eine erhöhte Dyssynchronität der Ca^{2+} -Freisetzung assoziiert mit einer verringerten T-Tubuli Dichte, eine

verringerte SERCA2A Aktivität assoziiert mit einer erhöhten CaMKII medierten PLB Phosphorylierung und eine erhöhte NCX-Aktivität [121].

Eine verringerte SR Ca^{2+} -Wiederaufnahme unabhängig von der SERCA2A Expression wurde ebenfalls von Wold et al. beschrieben [144]. Sie konnten im Gegensatz zu Stølen et al. jedoch keine Veränderung des NCX Stroms nachweisen [144]. Stølen et al. untersuchten ein Mausmodell mit Leptin-Defizienz (db/db) [121]. Wold et al. nutzten dagegen Ratten, die eine Saccharose-reiche Diät erhielten.

Neben der chronischen Exposition von Kardiomyozyten mit Fettsäuren wird ebenfalls die akute Exposition von Kardiomyozyten mit Fettsäuren untersucht. Kelly et al. zeigten mittels $[\text{H}^3]$ -Ouabain und Digoxin Radiorezeptor-Assays, dass Palmitoleat und andere nicht-esterifizierte Fettsäuren die in-vitro Aktivität von isolierter Na^+ - K^+ -ATPase hemmen können [145].

Weiterhin wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Wirkung der gesättigten, strukturell eng mit Palmitoleat verwandten Fettsäure Palmitat auf Kardiomyozyten im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie untersucht. Dabei zeigten Fauconnier et al., dass die akute Exposition mit Palmitat zu einer Reduktion sowohl der Ca^{2+} -Transienten Amplitude und des SR Ca^{2+} Gehalts als auch zu einer Verzögerung der Ca^{2+} -Elimination in ventrikulären Kardiomyozyten von Wild-Typ Ratten führt [146]. In Kardiomyozyten von übergewichtigen C57BL Mäusen mit Leptin-Defizienz führte die akute Exposition mit Palmitat dagegen zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Amplitude und einer Reduktion der Zeitkonstante der Ca^{2+} -Elimination [146]. Haim et al. beschrieben, dass eine akute Exposition mit Palmitat den für die Repolarisation wichtigen K_v -Strom erhöht, ohne spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle zu beeinflussen. Sie schlussfolgerten, dass dadurch ein negativ-inotroper Effekt auf die Kardiomyozyten resultiert [147].

4.2 Unterschiede der Fettsäuren Palmitat und Palmitoleat

Palmitoleat und Palmitat sind strukturell eng verwandt, aber unterscheiden sich in relevanten Aspekten. Palmitat ist mit 23% der Gesamtfettmenge die zweit häufigste Fettsäure im menschlichen Körper, wohingegen Palmitoleat seltener vorkommt [37]. Im Gegensatz zu Palmitoleat, welches hauptsächlich de-novo synthetisiert wird, werden Palmitat und viele andere Fettsäuren hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen [148]. Die effektive Palmitat Menge im Fettgewebe wird dabei streng reguliert. Dies geschieht durch das Enzym Stearoyl-CoA Desaturase (SCD), von welchem 4 Subtypen mit organspezifischer Expression und unterschiedlichen Affinitäten zu den jeweiligen als Substrat dienenden Fettsäuren beschrieben wurden (SCD 1-4).

Die SCD wandelt unter anderem den Überschuss des mit der Nahrung aufgenommenen Palmitats in Palmitoleat um [149].

Das Enzym SCD wird insbesondere durch das Adipokin Leptin reguliert, wobei hohe Leptinkonzentrationen die SCD hemmen [149]. Tiermodelle mit Leptin-Defizienz sind für die Untersuchung der Effekte von erhöhten Palmitoleatkonzentrationen besonders interessant, da die Leptin-Defizienz zu einer vermehrten relativen Umwandlung vom Palmitat zu Palmitoleat katalysiert durch die SCD führt. In diesem Zusammenhang zeigten Dobrzyn et al., dass ein genetischer Knockout der SCD1 in einem Leptin-Defizienz Modell zu einer Verbesserung der diastolischen und systolischen Funktion führt. Die Konzentration von freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut war dabei nicht verändert. Es konnte aber eine geringere Lipidakkumulation in Kardiomyozyten nachgewiesen werden [150]. Djousee et al. bieten diese strenge Regulation der Palmitatkonzentrationen und die Umwandlung des Überschusses von Palmitat zu Palmitoleat durch die SCD als Erklärung an, warum keine Korrelation des Herzinsuffizienzrisikos mit der Serumkonzentration von Palmitat, sondern lediglich mit der Serumkonzentration von Palmitoleat demonstriert werden konnte [35].

Generell korreliert die Zusammensetzung des im Blut zirkulierenden Lipidpools, und damit die Lipidexposition der Organe, stark mit der Zusammensetzung des Lipidpools im Fettgewebe und mit der Nahrungsaufnahme der letzten sechs bis acht Wochen [151]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Palmitoleat De-Novo-Synthese in Adipozyten stark reguliert ist und deutlich gesteigert werden kann [40]. Weiterhin ist das Potenzial der Mobilisierung von Palmitoleat aus dem Fettgewebe höher als bei andere Fettsäuren [152]. Die relative im Blut zirkulierende Menge von Palmitoleat kann dadurch erheblich gesteigert werden. Dahingegen kann die Konzentration von anderen langkettigen Fettsäuren wie zum Beispiel Palmitat unter physiologischen Bedingungen kaum gesteigert werden [40]. Unter anderem aufgrund dieser Ergebnisse wird Palmitoleat eine Rolle als wichtiger Mediator für die Regulation des Metaboloms zugeschrieben [40]. Erkenntnisse über den Einfluss von Palmitoleat auf die elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten liegen bisher nicht vor. Alles in allem bekräftigen diese Unterschiede und die noch unzureichend untersuchte Rolle der SCD die Relevanz, die Wirkung von Palmitoleat auf die Funktion von Kardiomyozyten zu untersuchen. Dies kann helfen, die Rolle des Metaboloms bei der Entstehung der Herzinsuffizienz besser zu verstehen und neue pharmakologische Ziele für die Therapie der Herzinsuffizienz zu identifizieren.

4.3 Aufnahme von Palmitoleat in Kardiomyozyten

Palmitoleat zirkuliert im Plasma sowohl in Form von komplexen Lipiden wie Triglyceriden, Phospholipiden (z.B. Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine, Phosphatidylserine) und Cholesterolestern als auch in nicht-esterifizierter Form, als freie Fettsäuren an Albumin gebunden [153]. Die Fettsäuren gelangen über die Endothelzellen in das Interstitium, wo sie an Albumin gebunden werden [154]. Es wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Fettsäuren in die Kardiomyozyten durch passive Diffusion über die Zellmembran und durch aktiven Transport, mediiert insbesondere durch die Proteine „fatty acid binding proteins“ (FABP), „fatty acid translocase“ (FAT/ CD36) und „fatty acid transport protein“ (FATP) erfolgen kann [155-160].

Die Regulation dieser Prozesse könnte ein wichtiger Faktor für die Lipotoxizität sein. Zum Beispiel zeigten sich im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie und der kardialen Hypertrophie signifikante Veränderungen in der Expression von FABP [161] und FAT [162]. Im Rahmen der vorliegenden Studie kann davon ausgegangen werden, dass eine Regulierung der Fettsäureaufnahme keine Auswirkungen auf die Aussagekraft der Ergebnisse hat. Da die Kardiomyozyten einer Ratte immer sowohl für die Interventionsgruppe als auch für die Kontrollgruppe verwendet werden, sind zugrundeliegende Unterschiede in der Fettsäureaufnahme unwahrscheinlich. Eine mögliche Regulation der Fettsäureaufnahme der Zellen der Interventionsgruppe, ausgelöst durch die Inkubation mit Palmitoleat, ist daher als Teil des akuten Effekts von Palmitoleat und nicht als Confounder zu sehen.

Beim Vergleich der vorliegenden Studie, in der die zeitlich limitierte akute Exposition mit Palmitoleat untersucht wurde, mit Studien der chronischen Exposition von Kardiomyozyten mit Palmitoleat, wie zum Beispiel von Foryst-Ludwig et al., kann eine mögliche Herunterregulation der Fettsäureaufnahme durch eine dauerhaft hohe Fettsäureexposition jedoch relevant sein und eine potenzielle Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bieten. Foryst-Ludwig et al. zeigten, dass Palmitoleat ein wichtiger Mediator für die durch Ausdauertraining induzierte kardiale Hypertrophie ist [49].

4.4 Überlegungen zur Wahl der Konzentration von Palmitoleat

Die in der Studie genutzte Konzentration von Palmitoleat wurde aufgrund einer früheren massenspektroskopischen Analyse murinen Serums von gesunden, trainierten BL6 Mäusen (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe von Professor Kintscher, Institut für Pharmakologie, Charité Universitätsmedizin Berlin), bei welcher sich Konzentrationen von 100-120 ng/µl fanden,

gewählt. Die physiologischen Konzentrationen von Palmitoleat im Serum variieren von Spezies zu Spezies. In TAC/SHAM Mäusen ergab die Analyse der Palmitoleatkonzentration im Serum Werte von 50-60 ng/μl. In gesunden, männlichen Biathleten fanden sich dagegen deutlich geringere Werte von 13,8 bis 49,7 ng/ul (Mittelwert 27,1 ng/ul) [49]. Bei einer Analyse der Palmitoleatkonzentration der Cholesterolester im Blut adipöser Patienten in Mexico fand sich ein Mittelwert von 86 ng/μl verglichen mit einem Mittelwert von 69 ng/μl bei gesunden Probanden [163]. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Palmitoleatkonzentration im Blut bei Adipositas deutlich erhöht ist. Konzentrationsabhängige Effekte sollten daher immer im Kontext speziesabhängiger Vergleichswerte interpretiert werden.

Für den Vergleich verschiedener publizierter Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Verfahren der massenspektroskopischen Analyse von Fettsäurekonzentrationen im Blut verwendet werden. Um eine Aussage über die Rolle der Serumkonzentration in Physiologie und Pathophysiologie von Palmitoleat treffen zu können, ist es daher wichtig zu differenzieren, welche Lipidklassen zur Quantifizierung der Fettsäuren analysiert wurden. Die Publikation von Salatzki et al. unterstreicht die Relevanz dieser Problematik [50]. Durch die verwendete Lipidomics-Analyse war es möglich die verschiedenen Kopfgruppen der Phospholipide zu differenzieren und die Regulation der verschiedenen Lipidklassen bei HFrEF zu beschreiben. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Lipidklassen teils unterschiedlich reguliert werden [50]. Ohne eine Unterscheidung nach Kopfgruppen ist es nicht möglich diese Unterschiede zu erfassen. In der Studie von Djousee et al. wurden dagegen nur Phospholipide analysiert und der relative Anteil von Palmitoleat in den Phospholipiden berechnet, ohne zwischen den Kopfgruppen (PE, PC, PS) zu differenzieren [35]. Es kann daher aus dieser Studie nicht abgeleitet werden, ob eine Regulation des nicht in Phospholipiden gebundenen Palmitoleats und der verschiedenen Phospholipidkopfgruppen für die Erhöhung des Herzinsuffizienzrisikos von Bedeutung ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie erscheinen aber dennoch richtungsweisend für die Relevanz von Palmitoleat bei der Pathogenese einer möglichen Palmitoleat-assoziierten kardialen Dysfunktion.

In der als Grundlage für die Wahl der Konzentration von Palmitoleat in der vorliegenden Studie berücksichtigten massenspektroskopischen Analyse wurde durch Hydrolyse die Gesamtkonzentration von Palmitoleat im Blut unabhängig von der Lipidklasse ermittelt. Dies reflektiert nicht die physiologische Situation im Blut, in der Palmitoleat an verschiedene Kopfgruppen gebunden vorkommt. Das experimentelle Design ist dagegen eine Näherung für die Situation im Interstitium, in welchem insbesondere an Albumin gebundene, freie, nicht-

esterifizierte Fettsäuren von Kardiomyozyten aufgenommen werden [164]. Es ist jedoch unklar, inwiefern sich die Fettsäurekonzentrationen im Blut und im Interstitium unterscheiden.

Letztendlich wurde für die vorliegende Studie eine Palmitoleat-Konzentration von 120 ng/μl am oberen Ende der gemessenen Werte gewählt, um im physiologischen Bereich zu bleiben, aber trotzdem eine hinreichende Effektgröße zu erreichen.

4.5 Ergebnisse der Untersuchungen der Ca²⁺-Homöostase

4.5.1 Veränderungen der Ca²⁺-Freisetzung bei 1 Hz

Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigte sich kein Unterschied in der Amplitude der Ca²⁺-Transienten zwischen den Gruppen, obwohl sich Veränderungen der Kinetiken der Ca²⁺-Freisetzung und der Ca²⁺-Elimination fanden. Die mit Palmitoleat inkubierten Kardiomyozyten zeigten eine Verlangsamung der Zeit bis zur maximalen Ca²⁺-Freisetzung (TTP) und bis zur halbmaximalen Ca²⁺-Freisetzung (TF50).

Eine Erklärung für die verlangsamte Ca²⁺-Freisetzung ist die erhöhte Dyssynchronität mit einer höheren Anzahl von Couplons mit später Ca²⁺-Freisetzung und einer langsameren lokalen Ca²⁺-Freisetzung dieser späten Ca²⁺-Freisetzungseinheiten in der Interventionsgruppe [165].

Aufgrund der hohen Intertransienten-Variabilität („beat-to-beat variability“) der lokalen TF50 Werte (Abbildung 8), ist von einer stochastischen Ursache der Dyssynchronität der Ca²⁺-Freisetzung in den Couplons, der Gesamtheit aller Ca²⁺-Freisetzungseinheiten, auszugehen. Dieser Sachverhalt wird untermauert durch die geringere Wahrscheinlichkeit einer frühen Ca²⁺-Freisetzung der als frühe Ca²⁺-Freisetzungseinheiten klassifizierten Couplons in den mit Palmitoleat inkubierten Kardiomyozyten (Abbildung 10, rechts). An diesen Freisetzungseinheiten kam es also neben den, der Definition entsprechenden, mindestens 30% frühen Ca²⁺-Freisetzung (lokale TF₅₀ < 5 ms) häufiger zu späten Ca²⁺-Freisetzung - entsprechend einer höheren Varianz. In der Kontrollgruppe war die Ca²⁺-Freisetzung an diesen Einheiten dagegen „homogener“ früh - entsprechend einer geringeren Varianz.

Andererseits ist es möglich, dass die höhere intrazelluläre T-Tubuli Variabilität ein Zeichen eines frühen Remodelings des T-Tubuli Systems ist. Die Arbeitsgruppe des Autors hat in früheren Publikationen gezeigt, dass ein Remodeling des T-Tubuli Systems zu einer Erhöhung der Dyssynchronität der Ca²⁺-Freisetzung beitragen kann [99, 100]. Ein Remodeling des T-Tubuli Systems wurde ebenfalls in einem Tiermodell der diabetischen Kardiomyopathie beschrieben.

Stølen et al. zeigten eine Verringerung der T-Tubuli Dichte in einem Leptin-Defizienz Tiermodell [121]. Dieser Befund ist möglicherweise durch den Effekt von erhöhten Fettsäurekonzentrationen in dem Leptin-Defizienz Tiermodell auf das T-Tubuli System zu erklären und unterstützt damit die Hypothese eines Palmitoleat-assoziierten Remodelings des T-Tubuli Systems.

Die Synchronität der Ca^{2+} -Freisetzung an den Couplons bestimmt die Anstiegsrate des globalen zytosolischen Ca^{2+} -Transienten in den Kardiomyozyten während der Systole [165] und ist damit entscheidend für eine effektive Kontraktion des Myokards. Geringfügige lokale Variationen der Ca^{2+} -Freisetzung gelten als physiologisch und sind bedingt durch die stochastische Natur der Öffnung von LTCC und RyR [166]. Eine erhöhte Dyssynchronität wird dagegen mit Herzinsuffizienz [99, 167-169], Vorhofflimmern [170] und diabetischer Kardiomyopathie [121, 171] in Tiermodellen und humanem Gewebe assoziiert. Es wurde gezeigt, dass die Ursache der erhöhten Dyssynchronität, neben einem Remodeling des T-Tubuli Systems, eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und damit eine Abnahme des I_{CaL} , oder eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit der RyR sein kann [167, 172]. Die erhöhte Dyssynchronität ist ein häufiger Befund in Diabetes mellitus Tiermodellen [111, 171]. Da in der vorliegenden Studie bereits eine akute Exposition mit Palmitoleat zu einer erhöhten Dyssynchronität führt, lässt sich daraus eine womöglich relevante Rolle von Palmitoleat bei der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie ableiten. Gegen eine spezifische Rolle von Palmitoleat spricht jedoch, dass auch in Diabetes Typ 1 Tiermodellen, welche weniger durch einen gestörten Fettsäuremetabolismus charakterisiert sind, eine dyssynchrone Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben ist [116]. In Anbetracht der Assoziation von Dyssynchronität mit diversen Krankheitsbildern [99, 170] könnte diese auch eher eine Gemeinsamkeit der pathologischen Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase im Rahmen von zellulärem Stress als ein spezifischer Effekt sein.

Die Zunahme der örtlich und zeitlich dyssynchronen Ca^{2+} - Freisetzung konnte in einer Studie von Diaz et al. durch eine pharmakologische Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit der RyR in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte illustriert werden [172]. Für die Dyssynchronie ist dabei wahrscheinlich eine Population der RyR verantwortlich, die von den LTCC entkoppelt sind. Diese sogenannten nicht-junktionalen oder „orphaned“ RyR werden normalerweise durch die Propagation des Ca^{2+} von benachbarten mit LTCC gekoppelten RyR in den Couplons geöffnet. Diaz et al. stellten die Hypothese auf, dass bei einer herabgesetzten Offenwahrscheinlichkeit aller RyR zwar die CICR in den Couplons funktioniert, jedoch die Öffnung der entkoppelten RyR durch die Ca^{2+} -Propagation beeinträchtigt ist [172].

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Palmitoleat zu einer deutlichen, jedoch statistisch nicht-signifikanten, relativen Hypophosphorylierung der RyR an der Aminosäure Serin2814 verglichen mit der Kontrollgruppe führt (Abbildung 14). Die Implikationen einer Hypophosphorylierung von Serin2814 wurden jedoch bis jetzt nicht hinreichend untersucht. Im Gegensatz dazu wurde für die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle Serin2808 gezeigt, dass sowohl eine Hyperphosphorylierung als auch eine Hypophosphorylierung verglichen mit der basalen Phosphorylierung die Offenwahrscheinlichkeit und damit die Sensitivität der RyR erhöht [87]. Im Gegensatz zu CamKII ist die Relevanz der PKA im Zusammenhang mit einem chronischen SR Ca^{2+} -Verlust und proarrhythmogem Remodeling jedoch umstritten [98].

Darüber hinaus ist die in dieser Studie beobachtete, erhöhte Spark Frequenz in der Interventionsgruppe ein Argument gegen die Möglichkeit, dass eine reduzierte RyR Offenwahrscheinlichkeit verantwortlich für die erhöhte Dyssynchronie ist. Die hohe Spark Frequenz spricht dagegen eher für eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR [98]. Die Offenwahrscheinlichkeit der RyR wird neben der Phosphorylierung maßgeblich durch sowohl die zytosolische als auch durch die SR luminale Ca^{2+} -Konzentration (SR Ca^{2+} -Gehalt) beeinflusst [98]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen liegen in der vorliegenden Studie Hinweise auf eine Erhöhung sowohl der basalen diastolischen als auch der SR luminalen Ca^{2+} -Konzentration vor, welches weitere Argumente gegen eine reduzierte RyR Offenwahrscheinlichkeit sind. Veränderungen der RyR-Aktivität konnten ebenfalls in Tiermodellen der diabetischen Kardiomyopathie demonstriert werden. In einem Tiermodell, induziert durch eine sehr fetthaltige Diät, konnte eine Erhöhung der RyR-Aktivität gezeigt werden [173]. Diese war jedoch nicht mit einer Änderung des Phosphorylierungsstatus, sondern mit einer vermehrten Oxidierung der RyR assoziiert [173]. Eine erhöhte RyR-Aktivität assoziiert mit einer vermehrten Oxidierung der RyR konnte ebenfalls in einem Tiermodell der kardialen Lipidüberladung gezeigt werden [139]. Darüber hinaus konnten Tian et al. eine Erhöhung der Ca^{2+} -Freisetzung der RyR in einem Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodell nachweisen [174]. Alles in allem sind die Befunde in den beschriebenen Tiermodellen konsistent mit den Befunden in der vorliegenden Studie. Das unterstreicht erneut die Relevanz einer Palmitoleat-assoziierten Toxizität.

Die Synchronität der Ca^{2+} -Freisetzung hängt darüber hinaus von der Funktion und Verfügbarkeit der LTCC ab. Song et al. demonstrierten, dass die Synchronität vom Membranpotenzial und damit von der Rekrutierung der LTCC abhängig ist [175]. Niedrigere Membranpotenziale führten dabei zu dyssynchroner Ca^{2+} -Freisetzung [175]. Weiterhin fanden Inoue et al., dass die Variabilität der

Anzahl der LTCC pro Couplon insbesondere bei einer zusätzlichen Veränderung der Funktion zu einer dyssynchronen Ca^{2+} -Freisetzung führt, da mehrere LTCC an der Generation eines Ca^{2+} -Sparks beteiligt sind [176]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Litwin et al. bei der Untersuchung der Dyssynchronität in einem Herzinfarkt Tiermodell [167].

Es ist bekannt, dass es bei der diabetischen Kardiomyopathie ebenfalls zu Veränderung der LTCC kommt [111]. Pereira et al. beschrieben eine Reduktion des makroskopischen I_{CaL} assoziiert mit einer verringerten LTCC-Expression ohne Veränderung der Funktion der einzelnen LTCC in einem Leptin-Defizienz Modell [115]. In verschiedenen Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodellen wurde ebenfalls eine verringerte LTCC-Aktivität beschrieben [111, 113]. Diese Ergebnisse sind ein Indiz dafür, dass ein veränderter Fettsäuremetabolismus Effekte auf die LTCC haben kann. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass die Veränderungen der LTCC in Diabetes mellitus Tiermodellen alleine durch die hyperglykämische Stoffwechsellage zu erklären sind. Diese Vermutung wird durch eine verringerte LTCC-Aktivität in Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodellen bestärkt, da in diesen der gestörte Fettsäuremetabolismus nicht im Vordergrund steht. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Konstellation aus erhöhter Spark-Frequenz, normaler Amplitude der globalen Ca^{2+} -Transienten und erhöhtem SR Ca^{2+} -Gehalt spricht wie bereits ausgeführt gegen eine Verringerung der RyR-Offenwahrscheinlichkeit und damit für eine Palmitoleat-assoziierte Inhibition der LTCC. Die Hemmung der LTCC wäre konsistent mit den beschriebenen Studien der diabetischen Kardiomyopathie. Eine mögliche Inhibition der LTCC durch die akute Exposition mit Palmitoleat könnte auf eine wichtige Rolle von Palmitoleat bei der Lipid-assoziierten Kardiotoxizität hindeuten. Dieser Sachverhalt sollte in Zukunft durch direkte Messung des I_{CaL} bestätigt und der zugrundeliegende Mechanismus weiter charakterisiert werden.

Ein weiterer für die Kinetiken der Ca^{2+} -Freisetzung relevanter Faktor ist die zytoplasmatische Diffusion von Ca^{2+} . Es wurde gezeigt, dass die Diffusion des aus dem SR freigesetzten Ca^{2+} und die dadurch entstehenden intrazellulären Ca^{2+} -Gradienten relevant für die Analyse des CICR sind [177]. Um den Effekt einer unterschiedlichen Diffusion auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu eruieren, kann die Überlegung genutzt werden, dass die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Ca^{2+} -Freisetzung weniger von der Ca^{2+} -Diffusion nach der Freisetzung am junktionalen SR beeinflusst wird, als die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung [99]. Da sich sowohl die Zeit bis zur maximalen Ca^{2+} -Freisetzung als auch die Zeit bis zur halbmaximalen Ca^{2+} -Freisetzung zwischen den Gruppen in der vorliegenden Studie unterscheiden, ist davon auszugehen, dass der Effekt auf die Ca^{2+} -Freisetzung nicht alleine durch eine Änderung

der Diffusionsgeschwindigkeit durch beispielsweise eine Änderung der Architektur und Zusammensetzung des Zytoplasmas zu erklären ist.

Zusammengefasst kann die vorliegende dyssynchrone Ca^{2+} -Freisetzung sowohl durch eine durch „orphaned RyR“ assoziierte Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit der RyR als auch durch eine Veränderung des I_{CaL} bedingt sein. In der vorliegenden Studie lässt sich die Konstellation aus Reduktion der frühen Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten und die geringere Wahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -Freisetzung an den frühen Ca^{2+} -Freisetzungseinheiten jedoch am ehesten durch eine Reduktion des I_{CaL} erklären.

4.5.2 Veränderungen der Ca^{2+} -Elimination bei 1 Hz

Die Inkubation mit Palmitoleat führte in dieser Studie zu einer signifikanten Verlangsamung der Ca^{2+} -Elimination in der Interventionsgruppe. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die verzögerte Ca^{2+} -Elimination nach Inkubation mit Palmitoleat durch eine kombinierte Inhibition der SERCA2A-Aktivität und der NCX-Aktivität im Vorwärtsmodus verursacht wird.

Die Zeitkonstante TAU des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Diastole ist ein Surrogatparameter für die Aktivität der hauptsächlich an der Ca^{2+} -Elimination beteiligten Mediatoren SERCA2A und NCX unter Vernachlässigung der mitochondrialen Ca^{2+} -ATPasen (MCA) und der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA). Durch die pharmakologische Inhibition von entweder SERCA2A oder NCX lässt sich die isolierte Aktivität des jeweils anderen Mediators näherungsweise ableiten. Die verlängerte Zeitkonstante TAU des Abfalls spontaner Ca^{2+} -Waves während der Inhibition des NCX durch Superfusion von Ca^{2+} - und Na^+ -freier Lösung deutet daher auf eine ausgeprägte Inhibition der SERCA2A Aktivität hin. Die Aktivität des NCX wurde durch Bestimmung der Zeitkonstante TAU des Abfalls der Coffein-Antwort näherungsweise bestimmt. Durch die Superfusion mit Coffein werden alle RyR dauerhaft geöffnet und die SERCA2A damit kurzgeschlossen, wodurch die folgende Ca^{2+} -Elimination hauptsächlich von der Aktivität des NCX abhängt. Auch die Aktivität des NCX zeigte sich hier in der Interventionsgruppe deutlich reduziert.

Die Aktivität der einzelnen Mediatoren kann jedoch nicht isoliert betrachtet werden, sondern muss respektive der Wechselwirkungen und Auswirkungen auf die gesamte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase betrachtet werden. Der relative Anteil an der Entfernung des zytosolischen Ca^{2+} in der Diastole von SERCA2A und NCX bestimmt entscheidend wie viel Ca^{2+} in das SR aufgenommen wird und wie viel Ca^{2+} nach extrazellulär transportiert wird [178]. Eine reduzierte

SERCA2A-Aktivität alleine würde durch die verringerte Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR zu einem geringeren SR Ca^{2+} -Gehalt führen und hätte dann ein neues Fließgleichgewicht („steady state“) mit Verringerung der Amplitude der globalen Ca^{2+} -Transienten zur Folge. Der nicht durch SERCA2A wiederaufgenommene Anteil des systolischen Ca^{2+} wird entsprechend hauptsächlich durch den NCX im „forward-mode“ nach extrazellulär transportiert. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigte sich in der vorliegenden Studie jedoch eine verglichen mit der Kontrollgruppe normale Amplitude der globalen Ca^{2+} -Transienten. Dies lässt darauf schließen, dass die SERCA2A-Kapazität bezogen auf die Zeit ausreichend ist, um den SR Ca^{2+} -Gehalt nicht signifikant zu verringern. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Bode et. al. unterstützt, die zeigt, dass die Reduktion der SERCA2A-Aktivität sehr ausgeprägt sein muss, um eine effektive Senkung des SR Ca^{2+} -Gehalts zu erreichen [179].

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist die gestörte Ca^{2+} -Elimination ein im Rahmen vieler Studien belegter „Hallmark“ der Herzinsuffizienzpathophysiologie [97]. Eine gestörte SERCA2A mediierte Ca^{2+} -Elimination wird ebenfalls in der Mehrzahl der Studien der diabetischen Kardiomyopathie beschrieben [111]. Die Störung der Ca^{2+} -Elimination scheint daher ein typischer Befund der diabetischen Kardiomyopathie zu sein. In verschiedenen Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen wurde eine Phosphorylierung von PLN als mögliche Ursache der verringerten Aktivität von SERCA2A dargelegt [121, 144]. Da die Verlangsamung der Ca^{2+} -Elimination in der vorliegenden Studie bereits als akuter Effekt in Folge der Inkubation mit Palmitoleat auftrat, könnte Palmitoleat auch im Rahmen einer chronischen Fettsäureexposition, wie in den Leptin-Defizienz Tiermodellen, entscheidend zur Pathogenese einer postulierten Lipidtoxizität beitragen. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Palmitoleat-mediierte Ca^{2+} -Eliminationsstörung kann daher eine Erklärung für die Assoziation von Palmitoleat mit einem erhöhten Herzinsuffizienzrisiko sein.

4.5.3 Ca^{2+} -Homöostase bei 5 Hz

Bei der Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz zeigte sich in der Interventionsgruppe eine Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts und ein stärkerer relativer Anstieg des diastolischen Ca^{2+} im Zytosol. Diese Befunde weisen auf eine deutliche frequenzabhängige Ca^{2+} -Akkumulation verursacht durch die Inkubation mit Palmitoleat hin.

Ein Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration auch in Kontrollzellen ist physiologisch und wird durch die Verkürzung der Diastole und damit der Zeit, in der die Ca^{2+} -Elimination stattfinden

kann verursacht [178]. Außerdem kommt es physiologisch ebenfalls zu einer frequenzabhängigen Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts. Dies kann unter anderem durch einen vermehrten Ca^{2+} -Influx über die LTCC, bedingt durch eine verzögerte Inaktivierung bei erhöhten Frequenzen erklärt werden [180]. Kombiniert mit dem reduzierten Efflux über den NCX und einer beschriebenen Phosphorylierung von PLN, ausgelöst durch die erhöhten basalen Ca^{2+} -Konzentrationen, resultiert eine Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts [180]. In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration in den behandelten Zellen über das Niveau der Kontrollzellen. Dieses Ergebnis kann durch die zusätzliche Inhibition von sowohl NCX als auch SERCA2A erklärt werden. Bedingt durch das Fehlen einer kompensatorischen Erhöhung der Ca^{2+} -Extrusion über den NCX steigt das diastolische Ca^{2+} über die Werte der Kontrollzellen.

Weiterhin steigt normalerweise die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten durch die Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts nach einer Erhöhung der Frequenz [52], wobei bei Nagetieren im Gegensatz zum Menschen die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten nach Frequenzanstieg trotz Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts nur geringfügig zunimmt [180]. In der vorliegenden Studie war jedoch eine relative Reduktion der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten (F/F_0) verglichen mit 1 Hz zu sehen. Dies kann eine direkte Folge der Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Diastole sein, da die Amplitude über das Verhältnis des systolischen zur diastolischen Ca^{2+} -Konzentration berechnet wird. Es konnte jedoch keine lineare Korrelation zwischen Erhöhung der relativen diastolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Reduktion der Amplitude dargestellt werden. Das spricht gegen die Hypothese, dass alleine die Erhöhung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen für die Abnahme der Amplitude verantwortlich ist.

Die Ursachen für eine verglichen mit dem Menschen geringere frequenzabhängige Erhöhung der Amplitude bei Nagetieren können sowohl eine reduzierte fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung [52] als auch eine Reduktion des Auslösers der CICR, der maximale Ca^{2+} -Strom über die LTCC, sein [180]. Die fraktionierte Ca^{2+} -Freisetzung zeigte sich in der vorliegenden Studie signifikant reduziert und kann neben der erhöhten relativen diastolischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Reduktion der Amplitude bei 5 Hz in der Interventionsgruppe beitragen (Abbildung 7). Weiterhin sollte eine Reduktion des I_{CaL} als zusätzlicher Faktor, der für die Reduktion der Amplitude bei 5 Hz nach Inkubation mit Palmitoleat ursächlich sein könnte, in Betracht gezogen werden.

Die Kombination des erhöhten diastolischen Ca^{2+} und des erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalts bei

gleichzeitig reduzierter SERCA2A-Funktion unterstreicht die Ausprägung der NCX-Funktionseinschränkung. Die genaue Ursache der reduzierten NCX-Aktivität ist jedoch ungewiss und sollte weiter untersucht werden, kann aber durch eine Erhöhung des intrazellulären Na^+ -Konzentration durch eine Palmitoleat-mediierte Hemmung der Na^+ - K^+ -ATPase, wie von Kelly et al. beschrieben, erklärt werden [145]. Interessanterweise zeigte sich die NCX-Aktivität in Diabetes mellitus Typ 1 Tiermodellen in vielen Studien ebenfalls reduziert [111]. In Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen war die NCX-Aktivität hingegen unverändert bzw. erhöht [111, 121, 144]. Zusätzlich war die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten in diesen Tiermodellen meist reduziert [121], wohingegen die Amplitude in der vorliegenden Studie bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz noch normal ist und erst nach der Erhöhung der Frequenz auf 5 Hz stärker abnimmt als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied zu der vorliegenden Studie könnte mit der unterschiedlich langen Dauer der Palmitoleat-Exposition erklärt werden.

Bei der hier vorliegenden akuten Exposition kann der Abfall der Amplitude initial durch eine Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts kompensiert werden. Zusätzlich wird dies durch die von Kelly et al. beschriebene Hemmung der Na^+ - K^+ -ATPase unterstützt, welche über die Interaktion mit NCX zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation führt und damit zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der RyR beiträgt [145]. Wie zuvor beschrieben könnte dieser Kompensationsmechanismus jedoch bei erhöhten Stimulationsfrequenzen zu einer „Dekompensation“ und Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten führen. Eine Ca^{2+} -Akkumulation im SR, wie in der vorliegenden Studie, wird mit Apoptose ausgelöst durch mitochondriale Mediatoren assoziiert [181] und kann dadurch ein entscheidender Faktor einer postulierten Palmitoleat-mediierten Kardiotoxizität sein.

4.5.4 Spontane Ca^{2+} -Freisetzung

Die mit Palmitoleat behandelten Kardiomyozyten zeigten signifikant mehr spontane Sparks, aber einen erniedrigten Quotienten von Waves dividiert durch Sparks (Waves/Sparks), was für einen erhöhten Schwellenwert der Ca^{2+} -Konzentration spricht, den ein Spark erreichen muss, um eine Ca^{2+} -Propagation durch die gesamte Zelle (Wave) auszulösen.

Die Hypothese des erhöhten Schwellenwertes wird durch die um 20% verringerte Propagationsgeschwindigkeit der Waves in mit Palmitoleat behandelten Kardiomyozyten unterstützt. Izu et al. zeigten, dass die Propagationsgeschwindigkeit unter anderem von der Offenwahrscheinlichkeit der RyR abhängt [182]. Daher wäre im Gegensatz zu den Ergebnissen

der vorliegenden Studie bei einer Erhöhung des SR Ca^{2+} -Gehalts eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR und damit eine erhöhte Propagationsgeschwindigkeit zu erwarten. Es wurde in Studien jedoch ebenfalls demonstriert, dass eine Inhibition von SERCA2A zu einer Reduktion der Propagationsgeschwindigkeit führen kann [183]. Ein mögliche Erklärung für den dafür ursächlichen Mechanismus kann die „fire-diffusion-uptake-diffusion“ Theorie von Maxwell et al. liefern [184]. Maxwell et al. demonstrierten, dass die SERCA2A-mediierte Ca^{2+} -Wiederaufnahme an der Front der Wave zu einer Sensitivierung der umgebenden RyR führt und dadurch die weitere Propagation durch die Zelle erleichtert wird [184]. Eine verlangsamte Propagation trotz eines erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalts in mit Palmitoleat behandelten Zellen kann daher durch die stark verminderte SERCA2A-Aktivität zu erklären sein, welche dem Effekt des erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalts entgegenwirkt. Diese Erklärung wird auch durch die negative lineare Korrelation der Wave Propagationsgeschwindigkeit und der Zeitkonstante TAU der Waves, ein Surrogatparameter für die SERCA2A-Aktivität, in der vorliegenden Studie gestützt (Abbildung 22).

Außerdem ist die reduzierte Dauer der spontanen Sparks in den Kardiomyozyten der Interventionsgruppe ein weiteres Argument, das für die Hypothese der SERCA2A-medierten Erhöhung des Schwellenwertes der Propagation spricht. Die Faktoren, welche für die Dauer eines Sparks verantwortlich sind, werden nach wie vor diskutiert und modelliert [63]. Ein entscheidender Faktor scheint jedoch analog zur Propagation der Waves die lokale Depletion des SR Ca^{2+} , wichtig als treibende Kraft der Ca^{2+} -Freisetzung und der luminalen Sensitivierung der RyR, zu sein [63]. Der Befund der reduzierten Dauer der spontanen Sparks in der Interventionsgruppe ist insofern konkordant mit dem Befund der reduzierten Propagationsgeschwindigkeit. Die Inhibition von SERCA2A führt zu einer verlangsamten lokalen Repletion des SRs und somit zu einer früheren Termination der Sparks. Es konnte jedoch keine lineare Korrelation der Dauer der Sparks mit der Zeitkonstante TAU der Waves als Surrogatparameter für die SERCA2A Funktion gezeigt werden, um diese Hypothese weiter zu unterstützen.

Die erhöhte Frequenz der Sparks in den mit Palmitoleat behandelten Kardiomyozyten spricht für eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der RyR. Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit kann sowohl durch die erhöhten basalen Ca^{2+} -Konzentration als auch den erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt erklärt werden [63]. Nach Matching der Sparkfrequenz nach SR Ca^{2+} -Gehalt war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht mehr statistisch signifikant. Das deutet daraufhin, dass die erhöhte Sparkfrequenz erheblich durch den erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt bedingt ist. Es ist jedoch nicht

auszuschließen, dass weitere Faktoren, wie die erhöhten basalen Ca^{2+} -Konzentrationen, zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit beitragen. Weiterhin passt die normale Amplitude der Sparks nicht zu dem erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalt. Die Amplitude der Sparks reflektiert die Menge des initial freigesetzten Ca^{2+} [63]. Die Amplitude (F/F_0) wird aber wiederum durch die erhöhte diastolische Ca^{2+} -Konzentration verringert, welches den Effekt des erhöhten SR Ca^{2+} -Gehalts auf die Amplitude der Sparks aufheben kann. Die Aussage der Messung der Spark Amplitude muss darüber hinaus bedingt durch die technischen Limitationen der Aufnahme mit Vorsicht interpretiert werden. Die „confocal sampling theory“ beschreibt, dass ein Bias durch die Aufnahme von Sparks außerhalb der fokussierten Ebene unter einem zufälligen Winkel entsteht. Dadurch kann die gemessene Amplitude geringer ist als die wahre Amplitude sein und ebenso die Kinetiken verzerrt werden [63, 185]. Zusammen mit einer relativ geringen Stichprobengröße könnte das eine Erklärung für die normale Amplitude sein, aber auch dafür, dass keine lineare Korrelation zwischen der Zeitdauer der Sparks und der Zeitkonstante TAU der Waves gezeigt werden konnte. Bei den Waves spielen diese Limitationen eine geringere Rolle. Durch die größere Ausdehnung relativ gesehen zu den lokal begrenzten Sparks resultiert eine geringere Fehleranfälligkeit bei der Analyse der Kinetiken und damit robustere Werte. Alles in allem besteht jedoch aktuell kein Konsens über eine Erklärung für die Mechanismen, die verantwortlich für die Interaktion von SERCA2A und den Eigenschaften von Waves und Sparks sind.

Der Befund der erhöhten Spark Frequenz deutet auf einen vermehrten Ca^{2+} -Verlust aus dem SR während der Diastole in der vorliegenden Studie hin. Es konnte gezeigt werden, dass ein vermehrter Ca^{2+} -Verlust aus dem SR sowohl proarrhythmogen als auch zytotoxisch wirkt und zu einer geringeren Viabilität von Kardiomyozyten führt [109]. Unter bestimmten Umständen kann ein vermehrter Ca^{2+} -Verlust aus dem SR während der Diastole ebenfalls zu einer Verlangsamung der Ca^{2+} -Elimination beitragen [98, 186]. Ein vermehrter SR Ca^{2+} -Verlust wird ebenfalls von Stølen et al. in einem Leptin-Defizienz Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben [121]. Im Gegensatz dazu war die Spark-Frequenz bei Pereira et al. erniedrigt. Bei Pereira et al. wurde ebenfalls ein verringerter SR Ca^{2+} -Gehalt und eine erhöhte NCX-Aktivität beschrieben [115]. Beide Befunde steuern einer erhöhten Spark Frequenz durch eine verringerte RyR Sensitivität bei geringerer Ca^{2+} -Konzentration im SR und im Zytosol gegen. Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Befunde der erhöhten Spark-Frequenz bei erhöhtem SR Ca^{2+} -Gehalt, erniedrigter NCX Aktivität und erhöhten basalen Ca^{2+} -Konzentration sind insofern mit den Ergebnissen der beschriebenen Studien der diabetischen Kardiomyopathie konkordant. Weiterhin gibt es Evidenz

dafür, dass eine CamKII-mediierte Erhöhung der Spark Frequenz zur Progression von Hypertrophie zu Herzinsuffizienz beiträgt [187].

4.6 Implikationen von Palmitoleat bei der Entwicklung kardialer Hypertrophie

Foryst-Ludwig et al. und Riquelme et al. demonstrierten beide, dass Palmitoleat die Entwicklung kardialer Hypertrophie begünstigt [48, 49]. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Foryst-Ludwig et al. eine vorteilhafte Wirkung von exogen appliziertem Palmitoleat bei maladaptiver kardialer Hypertrophie [49]. Als Indikatoren für eine physiologische Hypertrophie wurden eine nicht erhöhte Expression von Genen der schweren β -Myosinkette und des atrialen natriuretischen Peptids und eine nicht vermehrte Fibrose gezeigt [49]. Über eine mögliche Palmitoleat-assoziierte funktionelle kardiale Dysfunktion kann jedoch keine genaue Aussage gemacht werden. Die echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Ejektionsfraktion wurde lediglich zwischen Wildtyp-Tieren und ATGL-Knockout-Mäusen verglichen, welche aber jeweils Palmitoleat supplementiert bekamen [49]. Die Hypothese der vorteilhaften Wirkung konnte bis jetzt noch nicht durch weitere Studien bestätigt werden.

Kardiale Hypertrophie ist eine Anpassungsreaktion des Herzens an veränderte Umweltbedingungen und kann in physiologische und pathophysiologische Hypertrophie unterteilt werden [188]. Physiologische Hypertrophie ist definiert über eine normal kardiale Architektur und eine erhaltene Funktion [189]. Pathophysiologische Hypertrophie ist assoziiert mit veränderter Architektur, eingeschränkter systolischer und diastolischer Funktion und kann in Herzinsuffizienz übergehen [188]. In den vergangenen Jahren wurde Evidenz dafür gesammelt, dass der Übergang von physiologischer in pathophysiologische Hypertrophie und die involvierten Signalwege zu erheblichen Teilen ein Kontinuum darstellen [188].

In der Pathophysiologie spielen unter anderem Signalwege assoziiert mit dem Insulin-Rezeptor und den subzellulären Mediatoren Akt [190, 191], CamKII [192], cGMP und Protein Kinase G [193], Protein Kinase C / mitogen-activated Protein-Kinasen [194] und nuclear factor of activated T-cells (NFAT)/ Calcineurin [195] eine Rolle [188]. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Level NFAT/ Calcineurin aktivieren können, welche „downstream“ für eine Expression von prohypertrophischen Proteinen verantwortlich sind [195]. Dieser Signalweg ist ein Bindeglied zwischen der Ca^{2+} -Homöostase und der Entstehung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz und ist eine mögliche Erklärung für die Assoziation von Palmitoleat und Hypertrophie [195].

In den Studien von Foryst-Ludwig et al. und Riquelme et al. wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase nicht untersucht. Die vorliegende Studie zeigt, dass die akute Exposition mit Palmitoleat von isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten der Ratte zu deutlichen Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase führt. Diese sind charakterisiert durch verlangsamte Ca^{2+} -Elimination, frequenz-abhängige Ca^{2+} -Akkumulation und erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Verlust in Form von spontanen Sparks und Waves aus dem SR. Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen sind sowohl mit physiologischer als auch mit pathologischer Hypertrophie assoziiert [188]. Es wurde gezeigt, dass alleine die Aktivierung von NFAT/Calcineurin zu pathologischer Hypertrophie führen kann [195] und physiologische Hypertrophie nicht mit der Aktivierung von NFAT/Calcineurin assoziiert ist [196].

Diese Studie liefert neben Hinweisen auf eine Palmitoleat induzierte Ca^{2+} -Überladung ebenso Evidenz für kardiale Dysfunktion, welches eher für ein maladaptives Remodeling spricht. Alles in allem ist die Physiologie der kardialen Hypertrophie außerordentlich komplex und involviert eine Vielzahl verschiedener Signalwege [188]. Die Methodik dieser Studie ist daher ungeeignet, um die Rolle von Palmitoleat bei kardialer Hypertrophie weitergehend zu klären. In Zukunft sollte jedoch die Palmitoleat-assoziierte Aktivierung von NFAT/Calcineurin überprüft werden.

4.7 Limitationen und zukünftige Fragestellungen

Eine Limitation dieser Studie ist die Untersuchung einer kurzen in vitro Exposition von isolierten Kardiomyozyten mit Palmitoleat. Im Gegensatz zu diesem Versuchsaufbau unterliegen Kardiomyozyten in-vivo einer dauerhaften, zyklischen Exposition von Palmitoleat gebunden in verschiedenen Lipidklassen. Es ist davon auszugehen, dass sich Zellen kontinuierlich an die veränderte Exposition mit Fettsäuren durch die Regulation der zellulären Fettsäureaufnahme und des zellulären Fettsäuremetabolismus anpassen. Auch in den vorliegenden Experimenten ist von einer zellulären Regulation auszugehen. Die Regulation über die Phosphorylierung von Proteinen des Fettsäurestoffwechsels findet in einem zeitlichen Rahmen von circa zehn Minuten statt und kann bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten pathomechanistisch eine Rolle spielen [197]. Für eine Regulation auf Ebene des Zellkerns durch Veränderung der Expression bedarf es jedoch mehr Zeit. Eine Studie konnte zeigen, dass die Transkription und Translokation von dem kleinen Strukturprotein β -Aktin circa 10 – 20 Minuten dauert [198]. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Prozess bei großen komplexen Proteinen wie dem RyR erheblich länger dauert. Um diese Effekte im Versuchsaufbau mit zu berücksichtigen und untersuchen zu können, bedarf es daher einer chronischen Palmitoleat-Exposition, idealerweise in Form eines Tiermodells.

Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Lipidspezies und Fettsäuren und der generellen Komplexität des Lipidmetabolismus ist es schwierig, ein geeignetes Tiermodell zu generieren, anhand dessen sich möglichst spezifisch die in-vivo Effekte von Palmitoleat auf das Herz untersuchen lassen. Da der Fokus dieser Studie auf subzellulären Mechanismen lag, wurde dieser Sachverhalt im experimentellen Design nicht berücksichtigt und der Fokus auf die akuten Effekte unter kontrollierten Bedingungen gelegt.

Eine weitere Limitation ist die Untersuchung von Kardiomyozyten der Ratte. Wie eingangs beschrieben unterscheidet sich der relative Anteil der verschiedenen Proteine der Ca^{2+} -Homöostase der murinen, von dem der humanen Kardiomyozyten [52, 61]. Durch einen unterschiedlichen hohen relativen Anteil insbesondere von SERCA2A und NCX resultiert aus der in dieser Studie beschriebenen, spezifischen Inhibition dieser beiden Mediatoren in humanen Kardiomyozyten möglicherweise ein anderer Gleichgewichtszustand der Ca^{2+} -Homöostase. Weiterhin existiert in der Literatur bis dato keine systematische Untersuchung der Unterschiede des Fettsäuremetabolismus von Kardiomyozyten von Nagern verglichen mit dem von Menschen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass humane Kardiomyozyten anders durch eine Exposition mit Palmitoleat beeinflusst werden, als die hier untersuchten murinen Kardiomyozyten.

Weiterhin wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass auch genderspezifische Unterschiede des Fettsäuremetabolismus von Kardiomyozyten und des Palmitoleat-spezifischen Effekts auf die Mediatoren der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase existieren. Die Ergebnisse dieser Studien sollten deshalb idealerweise an einem Tiermodell der chronisch erhöhten Palmitoleatexposition und an humanen Kardiomyozyten beider Geschlechter reproduziert werden.

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie ist dahingehend limitiert, als dass die Differenzierung spezifischer Effekte von Palmitoleat und unspezifischer, pleiotroper Effekte von Fettsäuren hier schwer möglich ist, da die Exposition mit nur einer Fettsäure erfolgte. Zusätzlich ist nur eine Konzentration der Fettsäure untersucht worden. Wie bereits eingangs in der Diskussion beschrieben, legen verschiedene Arbeiten eine speziesabhängige und ernährungszustandsabhängige Variation von physiologischen und pathologischen Palmitoleatkonzentrationen im Plasma nahe. In Zukunft sollten deshalb die Effekte von Palmitoleat mit anderen Fettsäuren verglichen und durch die Verwendung von verschiedenen Fettsäurekonzentrationen die Dosis-Wirkungs-Beziehung besser untersucht werden.

Weiterhin erfolgte aufgrund von technischen Limitationen keine Untersuchung des I_{CaL} , welches eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse ermöglicht hätte. Darüber hinaus müssen die genauen Pathomechanismen der Wirkung von Palmitoleat auf die involvierten Mediatoren der Ca^{2+} -Homöostase wie LTCC, RyR, SERCA2A und NCX noch weiter charakterisiert werden.

4.8 **Conclusio**

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Exposition von murinen Kardiomyozyten mit Palmitoleat zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und der T-Tubuli führt. Diese Veränderungen sind vereinbar mit den „Hallmarks“ der Herzinsuffizienz. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten der prospektiven klinischen Studie von Djousee et al., welche die Assoziation der Palmitoleat Konzentration im Blut mit dem Risiko für Herzinsuffizienz zeigte [35].

Diese Studie beschreibt einen subzellulären Pathomechanismus, der eine Erklärung für die Assoziation von Palmitoleat und Herzinsuffizienz sein kann. Weiterhin sind die Ergebnisse vergleichbar mit den bisher beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase in Diabetes Typ 2 Tiermodellen, welches auf eine mögliche, pathomechanistisch relevante Rolle von erhöhten Palmitoleatkonzentrationen im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie hinweist. Die beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase können darüber hinaus ebenfalls über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einem hypertrophen Remodeling beitragen. Es sind jedoch weitere Studien nötig, um zu klären, ob eine chronischen Exposition mit Palmitoleat zu vergleichbaren Veränderungen führt. Die in der vorliegenden Studie beschriebenen akuten Effekte von Palmitoleat auf die Ca^{2+} -Homöostase und die T-Tubuli bieten die Grundlage für die weitere Untersuchung der chronischen Effekte auf Kardiomyozyten. Die Ergebnisse sollten darüber hinaus an humanen Kardiomyozyten reproduziert werden, um die Rolle von Palmitoleat bei der Herzinsuffizienzentwicklung weiter zu beleuchten.

5 Literaturverzeichnis

1. *Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland*. Fachserie 12, Reihe 4, 2015.
2. *Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle)*. Fachserie 12, Reihe 6.2.1, 2017.
3. Heidenreich, P.A., J.G. Trogon, O.A. Khavjou, J. Butler, K. Dracup, M.D. Ezekowitz, E.A. Finkelstein, Y. Hong, S.C. Johnston, A. Khera, D.M. Lloyd-Jones, S.A. Nelson, G. Nichol, D. Orenstein, P.W. Wilson, and Y.J. Woo, *Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2011. **123**(8): p. 933-44.
4. McMurray, J.J., S. Adamopoulos, S.D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M.A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G.Y. Lip, A.P. Maggioni, A. Parkhomenko, B.M. Pieske, B.A. Popescu, P.K. Ronnevik, F.H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P.T. Trindade, A.A. Voors, F. Zannad, and A. Zeiher, *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
5. Abudiab, M.M., M.M. Redfield, V. Melenovsky, T.P. Olson, D.A. Kass, B.D. Johnson, and B.A. Borlaug, *Cardiac output response to exercise in relation to metabolic demand in heart failure with preserved ejection fraction*. *Eur J Heart Fail*, 2013. **15**(7): p. 776-85.
6. Rastogi, A., E. Novak, A.E. Platts, and D.L. Mann, *Epidemiology, pathophysiology and clinical outcomes for heart failure patients with a mid-range ejection fraction*. *Eur J Heart Fail*, 2017. **19**(12): p. 1597-1605.
7. Ponikowski, P., A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G. Cleland, A.J. Coats, V. Falk, J.R. Gonzalez-Juanatey, V.P. Harjola, E.A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J.T. Parissis, B. Pieske, J.P. Riley, G.M. Rosano, L.M. Ruilope, F. Ruschitzka, F.H. Rutten, P. van der Meer, M. Authors/Task Force, and R. Document, *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 J Heart Fail*, 2016. **18**(8): p. 891-975.
8. MacIntyre, K., S. Capewell, S. Stewart, J.W.T. Chalmers, J. Boyd, A. Finlayson, A. Redpath, J.P. Pell, and J.J.V. McMurray, *Evidence of Improving Prognosis in Heart Failure. Trends in Case Fatality in 66 547 Patients Hospitalized Between 1986 and 1995, 2000*. **102**(10): p. 1126-1131.
9. Borlaug, B.A. and W.J. Paulus, *Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(6): p. 670-9.
10. Owan, T.E., D.O. Hodge, R.M. Herges, S.J. Jacobsen, V.L. Roger, and M.M. Redfield *Trends in Prevalence and Outcome of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **355**(3): p. 251-259.
11. Kitzman, D.W., J.M. Gardin, J.S. Gottdiener, A. Arnold, R. Boineau, G. Aurigemma, E.K. Marino, M. Lyles, M. Cushman, P.L. Enright, and G. Cardiovascular Health Study Research, *Importance of heart failure with preserved systolic function in patients > or = 65 years of age. CHS Research Group. Cardiovascular Health Study*. *Am J Cardiol*, 2001. **87**(4): p. 413-9.
12. Dhingra, A., A. Garg, S. Kaur, S. Chopra, J.S. Batra, A. Pandey, A.H. Chaanine, and S.K. Agarwal, *Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction*. *Curr Heart Fail Rep*, 2014. **11**(4): p. 354-65.

13. Borlaug, B.A., M.M. Redfield, V. Melenovsky, G.C. Kane, B.L. Karon, S.J. Jacobsen, and R.J. Rodeheffer, *Longitudinal changes in left ventricular stiffness: a community-based study*. *Circ Heart Fail*, 2013. **6**(5): p. 944-52.
14. Andersen, M.J. and B.A. Borlaug, *Heart failure with preserved ejection fraction: current understandings and challenges*. *Curr Cardiol Rep*, 2014. **16**(7): p. 501.
15. Lee, D.S., P. Gona, R.S. Vasan, M.G. Larson, E.J. Benjamin, T.J. Wang, J.V. Tu, and D. Levy, *Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute*. *Circulation*, 2009. **119**(24): p. 3070-7.
16. Haass, M., D.W. Kitzman, I.S. Anand, A. Miller, M.R. Zile, B.M. Massie, and P.E. Carson, *Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(3): p. 324-31.
17. Shah, A.M. and M.A. Pfeffer, *The many faces of heart failure with preserved ejection fraction*. *Nat Rev Cardiol*, 2012. **9**(10): p. 555-6.
18. Zile, M.R., J.S. Gottdiener, S.J. Hetzel, J.J. McMurray, M. Komajda, R. McKelvie, C.F. Baicu, B.M. Massie, and P.E. Carson, *Prevalence and Significance of Alterations in Cardiac Structure and Function in Patients With Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction*. *Circulation*, 2011. **124**(23): p. 2491-2501.
19. Westermann, D., M. Kasner, P. Steendijk, F. Spillmann, A. Riad, K. Weitmann, W. Hoffmann, W. Poller, M. Pauschinger, H.P. Schultheiss, and C. Tschope, *Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction*. *Circulation*, 2008. **117**(16): p. 2051-60.
20. Zile, M.R., C.F. Baicu, and W.H. Gaasch *Diastolic Heart Failure — Abnormalities in Active Relaxation and Passive Stiffness of the Left Ventricle*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **350**(19): p. 1953-1959.
21. Opdahl, A., E.W. Remme, T. Helle-Valle, E. Lyseggen, T. Vartdal, E. Pettersen, T. Edvardsen, and O.A. Smiseth, *Determinants of Left Ventricular Early-Diastolic Lengthening Velocity*. *Circulation*, 2009. **119**(19): p. 2578-2586.
22. Borlaug, B.A., C.S. Lam, V.L. Roger, R.J. Rodeheffer, and M.M. Redfield, *Contractility and ventricular systolic stiffening in hypertensive heart disease insights into the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(5): p. 410-8.
23. Kraigher-Krainer, E., A.M. Shah, D.K. Gupta, A. Santos, B. Claggett, B. Pieske, M.R. Zile, A.A. Voors, M.P. Lefkowitz, M. Packer, J.J.V. McMurray, and S.D. Solomon, *Impaired Systolic Function by Strain Imaging in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014. **63**(5): p. 447-456.
24. Borlaug, B.A., W.A. Jaber, S.R. Ommen, C.S. Lam, M.M. Redfield, and R.A. Nishimura, *Diastolic relaxation and compliance reserve during dynamic exercise in heart failure with preserved ejection fraction*. *Heart*, 2011. **97**(12): p. 964-9.
25. Primessnig, U., P. Schönleitner, A. Höll, S. Pfeiffer, T. Bracic, T. Rau, M. Kapl, T. Stojakovic, T. Glasnov, K. Leineweber, P. Wakula, G. Antoons, B. Pieske, and F.R. Heinzel, *Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction*. *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(8): p. 987-97.
26. Virchow R, *Die Cellularpathologie und ihre Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Berlin: Verlag von A. Hirschwald, 1858.
27. *Obesity and heart failure*. *Nutr Rev*, 1966. **24**(7): p. 199-201.
28. Alpert, M.A. and M.W. Hashimi, *Obesity and the heart*. *Am J Med Sci*, 1993. **306**(2): p. 117-23.

29. Alpert, M.A., C.R. Lambert, H. Panayiotou, B.E. Terry, M.V. Cohen, C.V. Massey, M.W. Hashimi, and V. Mukerji, *Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss*. Am J Cardiol, 1995. **76**(16): p. 1194-7.
30. Zhou, Y.T., P. Grayburn, A. Karim, M. Shimabukuro, M. Higa, D. Baetens, L. Orci, and R.H. Unger, *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1784-9.
31. Sharma, S., J.V. Adroge, L. Golfman, I. Uray, J. Lemm, K. Youker, G.P. Noon, O.H. Frazier, and H. Taegtmeier, *Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart*. Faseb j, 2004. **18**(14): p. 1692-700.
32. Miki, T., S. Yuda, H. Kouzu, and T. Miura, *Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features*. Heart Fail Rev, 2013. **18**(2): p. 149-66.
33. Hohendanner, F., D. Bode, U. Primessnig, T. Guthof, R. Doerr, S. Jeuthe, S. Reimers, K. Zhang, D. Bach, P. Wakula, B.M. Pieske, and F.R. Heinzel, *Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **115**: p. 10-19.
34. Zlobine, I., K. Gopal, and J.R. Ussher, *Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2016. **1861**(10): p. 1555-1568.
35. Djousse, L., N.L. Weir, N.Q. Hanson, M.Y. Tsai, and J.M. Gaziano, *Plasma phospholipid concentration of cis-palmitoleic acid and risk of heart failure*. Circ Heart Fail, 2012. **5**(6): p. 703-9.
36. Löffler, G., *Funktionelle Biochemie*. 1993: Springer. p. 136.
37. Walker, C.G., L.M. Browning, L. Stecher, A.L. West, J. Madden, S.A. Jebb, and P.C. Calder, *Fatty acid profile of plasma NEFA does not reflect adipose tissue fatty acid profile*. Br J Nutr, 2015. **114**(5): p. 756-62.
38. Hodson, L. and F. Karpe, *Is there something special about palmitoleate?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(2): p. 225-31.
39. Souza, C.O., A.A. Teixeira, L.A. Biondo, L.S. Silveira, P.C. Calder, and J.C. Rosa Neto, *Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFkappaB, independently of PPARs*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017. **44**(5): p. 566-575.
40. Cao, H., K. Gerhold, J.R. Mayers, M.M. Wiest, S.M. Watkins, and G.S. Hotamisligil, *Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism*. Cell, 2008. **134**(6): p. 933-44.
41. Maedler, K., J. Oberholzer, P. Bucher, G.A. Spinas, and M.Y. Donath, *Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 726-33.
42. Bernstein, A.M., M.F. Roizen, and L. Martinez, *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, 2014. **8**(6): p. 612-7.
43. Gong, J., H. Campos, S. McGarvey, Z. Wu, R. Goldberg, and A. Baylin, *Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine?* Am J Clin Nutr, 2011. **93**(1): p. 186-91.
44. Mayneris-Perxachs, J., M. Guerendiain, A.I. Castellote, R. Estruch, M.I. Covas, M. Fito, J. Salas-Salvado, M.A. Martinez-Gonzalez, F. Aros, R.M. Lamuela-Raventos, and M.C. Lopez-Sabater, *Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease*. Clin Nutr, 2014. **33**(1): p. 90-7.

45. Harris, W.S., J. Luo, J.V. Pottala, K.L. Margolis, M.A. Espeland, and J.G. Robinson, *Red Blood Cell Fatty Acids and Incident Diabetes Mellitus in the Women's Health Initiative Memory Study*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0147894.
46. Merino, J., A. Sala-Vila, N. Plana, J. Girona, J.C. Vallve, D. Ibarretxe, E. Ros, R. Ferre, M. Heras, and L. Masana, *Serum palmitoleate acts as a lipokine in subjects at high cardiometabolic risk*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2016. **26**(3): p. 261-7.
47. Djousse, L., N.R. Matthan, A.H. Lichtenstein, and J.M. Gaziano, *Red blood cell membrane concentration of cis-palmitoleic and cis-vaccenic acids and risk of coronary heart disease*. Am J Cardiol, 2012. **110**(4): p. 539-44.
48. Riquelme, C.A., J.A. Magida, B.C. Harrison, C.E. Wall, T.G. Marr, S.M. Secor, and L.A. Leinwand, *Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth*. Science, 2011. **334**(6055): p. 528-31.
49. Foryst-Ludwig, A., M.C. Kreissl, V. Benz, S. Brix, E. Smeir, Z. Ban, E. Januszewicz, J. Salatzki, J. Grune, A.K. Schwanstecher, A. Blumrich, A. Schirbel, R. Klopffleisch, M. Rothe, K. Blume, M. Halle, B. Wolfarth, E.E. Kershaw, and U. Kintscher, *Adipose Tissue Lipolysis Promotes Exercise-induced Cardiac Hypertrophy Involving the Lipokine C16:1n7-Palmitoleate*. J Biol Chem, 2015. **290**(39): p. 23603-15.
50. Salatzki, J., A. Foryst-Ludwig, K. Bentele, A. Blumrich, E. Smeir, Z. Ban, S. Brix, J. Grune, N. Beyhoff, R. Klopffleisch, S. Dunst, M.A. Surma, C. Klose, M. Rothe, F.R. Heinzl, A. Krannich, E.E. Kershaw, D. Beule, P.C. Schulze, N. Marx, and U. Kintscher, *Adipose tissue ATGL modifies the cardiac lipidome in pressure-overload-induced left ventricular failure*. PLoS Genet, 2018. **14**(1): p. e1007171.
51. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
52. Bers, D.M., *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd ed.* 2002, Dordrecht: Kluwer.
53. Hong, T. and R.M. Shaw, *Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function*. Physiol Rev, 2017. **97**(1): p. 227-252.
54. Page, E. and M. Surdyk-Droske, *Distribution, surface density, and membrane area of diadic junctional contacts between plasma membrane and terminal cisterns in mammalian ventricle*. Circ Res, 1979. **45**(2): p. 260-7.
55. Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh, *Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1528-39.
56. Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell, *Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle*. Science, 1993. **262**(5134): p. 740-4.
57. Maughan, D.W., *Kinetics and energetics of the crossbridge cycle*. Heart Fail Rev, 2005. **10**(3): p. 175-85.
58. Bassani, R.A., R.A. Ricardo, and J.W. Bassani, *Estimation of the fractional sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in intact cardiomyocytes using integrated Ca²⁺ fluxes*. Gen Physiol Biophys, 2012. **31**(4): p. 401-8.
59. Bassani, J.W., W. Yuan, and D.M. Bers, *Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes*. 1995. **268**(5): p. C1313-C1319.
60. Gyorke, S. and D. Terentyev, *Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 245-55.
61. Hove-Madsen, L. and D.M. Bers, *Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes*. Circ Res, 1993. **73**(5): p. 820-8.
62. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, *Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms*. J Physiol, 1994. **476**(2): p. 279-93.

63. Cheng, H. and W.J. Lederer, *Calcium sparks*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(4): p. 1491-545.
64. Qu, Z., L.H. Xie, R. Olcese, H.S. Karagueuzian, P.S. Chen, A. Garfinkel, and J.N. Weiss, *Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: beyond reduced repolarization reserve*. *Cardiovasc Res*, 2013. **99**(1): p. 6-15.
65. Shaw, R.M. and H.M. Colecraft, *L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes*. *Cardiovascular Research*, 2013. **98**(2): p. 177-186.
66. Halling, D.B., P. Aracena-Parks, and S.L. Hamilton, *Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels by Calmodulin*. *Science's STKE*, 2005. **2005**(315): p. re15-re15.
67. Sharma, M.R., P. Penczek, R. Grassucci, H.B. Xin, S. Fleischer, and T. Wagenknecht, *Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(29): p. 18429-34.
68. Ferguson, D.G., H.W. Schwartz, and C. Franzini-Armstrong, *Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle: a freeze-drying, rotary-shadowing study*. *The Journal of Cell Biology*, 1984. **99**(5): p. 1735-1742.
69. Sharma, P., N. Ishiyama, U. Nair, W. Li, A. Dong, T. Miyake, A. Wilson, T. Ryan, D.H. MacLennan, T. Kislinger, M. Ikura, S. Dhe-Paganon, and A.O. Gramolini, *Structural determination of the phosphorylation domain of the ryanodine receptor*. *FEBS Journal*, 2012. **279**(20): p. 3952-3964.
70. Bers, D.M., *Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(2): p. 417-29.
71. Zhao, M., P. Li, X. Li, L. Zhang, R.J. Winkfein, and S.R. Chen, *Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): p. 25971-4.
72. Györke, I., N. Hester, L.R. Jones, and S. Györke, *The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(4): p. 2121-2128.
73. Terentyev, D., S. Viatchenko-Karpinski, I. Györke, P. Volpe, S.C. Williams, and S. Györke, *Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(20): p. 11759-11764.
74. Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomura, and H. Ogawa, *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*. *Nature*, 2000. **405**(6787): p. 647-55.
75. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome*. *Circulation Research*, 2012. **110**(12): p. 1646-1660.
76. Bhupathy, P., G.J. Babu, and M. Periasamy, *Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(5): p. 903-11.
77. James, P., M. Inui, M. Tada, M. Chiesi, and E. Carafoli, *Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum*. *Nature*, 1989. **342**(6245): p. 90-2.
78. Asahi, M., E. McKenna, K. Kurzydowski, M. Tada, and D.H. MacLennan, *Physical Interactions between Phospholamban and Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases Are Dissociated by Elevated Ca²⁺, but Not by Phospholamban Phosphorylation, Vanadate, or Thapsigargin, and Are Enhanced by ATP*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(20): p. 15034-15038.
79. Kranias, E.G., *Regulation of calcium transport by protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Journal of Biological Chemistry*, 1985. **260**(20): p. 11006-11010.

80. Liao, J., H. Li, W. Zeng, D.B. Sauer, R. Belmares, and Y. Jiang, *Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger*. *Science*, 2012. **335**(6069): p. 686-90.
81. Ottolia, M., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *Roles of two Ca²⁺-binding domains in regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32735-41.
82. Shattock, M.J., M. Ottolia, D.M. Bers, M.P. Blaustein, A. Boguslavskyi, J. Bossuyt, J.H. Bridge, Y. Chen-Izu, C.E. Clancy, A. Edwards, J. Goldhaber, J. Kaplan, J.B. Lingrel, D. Pavlovic, K. Philipson, K.R. Sipido, and Z.J. Xie, *Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart*. *J Physiol*, 2015. **593**(6): p. 1361-82.
83. Bridge, J.H., J.R. Smolley, and K.W. Spitzer, *The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and I_{Na-Ca} in cardiac myocytes*. *Science*, 1990. **248**(4953): p. 376-8.
84. Fimia, G.M. and P. Sassone-Corsi, *Cyclic AMP signalling*. *Journal of Cell Science*, 2001. **114**(11): p. 1971-1972.
85. Marx, S.O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt, and A.R. Marks, *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 365-76.
86. Marx, S.O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, M. Gaburjakova, J. Gaburjakova, Y.M. Yang, N. Rosemblyt, and A.R. Marks, *Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(4): p. 699-708.
87. Carter, S., J. Colyer, and R. Sitsapesan, *Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation*. *Circ Res*, 2006. **98**(12): p. 1506-13.
88. Li, Y., E.G. Kranias, G.A. Mignery, and D.M. Bers, *Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2002. **90**(3): p. 309-16.
89. Balshaw, D.M., L. Xu, N. Yamaguchi, D.A. Pasek, and G. Meissner, *Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor)*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 20144-53.
90. Mattiazzi, A., R.A. Bassani, A.L. Escobar, J. Palomeque, C.A. Valverde, M. Vila Petroff, and D.M. Bers, *Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **308**(10): p. H1177-91.
91. Miller, S.G. and M.B. Kennedy, *Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch*. *Cell*, 1986. **44**(6): p. 861-70.
92. Erickson, J.R., B.J. He, I.M. Grumbach, and M.E. Anderson, *CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States*. *Physiological Reviews*, 2011. **91**(3): p. 889-915.
93. Erickson, J.R., L. Pereira, L. Wang, G. Han, A. Ferguson, K. Dao, R.J. Copeland, F. Despa, G.W. Hart, C.M. Ripplinger, and D.M. Bers, *Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation*. *Nature*, 2013. **502**(7471): p. 372-6.
94. Wehrens, X.H., S.E. Lehnart, S.R. Reiken, and A.R. Marks, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor*. *Circ Res*, 2004. **94**(6): p. e61-70.
95. Witcher, D.R., R.J. Kovacs, H. Schulman, D.C. Cefali, and L.R. Jones, *Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(17): p. 11144-52.

96. Karczewski, P., M. Kuschel, L.G. Baltas, S. Bartel, and E.G. Krause, *Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum*. Basic Res Cardiol, 1997. **92 Suppl 1**: p. 37-43.
97. Luo, M. and M.E. Anderson, *Mechanisms of altered Ca²⁺(+) handling in heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 690-708.
98. Bers, D.M., *Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 107-27.
99. Heinzl, F.R., V. Bito, L. Biesmans, M. Wu, E. Detre, F. von Wegner, P. Claus, S. Dymarkowski, F. Maes, J. Bogaert, F. Rademakers, J. D'Hooge, and K. Sipido, *Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca²⁺ release in myocytes from chronically ischemic myocardium*. Circ Res, 2008. **102**(3): p. 338-46.
100. Heinzl, F.R., V. Bito, P.G. Volders, G. Antoons, K. Mubagwa, and K.R. Sipido, *Spatial and temporal inhomogeneities during Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes*. Circ Res, 2002. **91**(11): p. 1023-30.
101. Song, L.-S., E.A. Sobie, S. McCulle, W.J. Lederer, C.W. Balke, and H. Cheng, *Orphaned ryanodine receptors in the failing heart*. 2006. **103**(11): p. 4305-4310.
102. Meyer, M., W. Schillinger, B. Pieske, C. Holubarsch, C. Heilmann, H. Posival, G. Kuwajima, K. Mikoshiba, H. Just, G. Hasenfuss, and et al., *Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 778-84.
103. Nicolaou, P. and E.G. Kranias, *Role of PPI in the regulation of Ca cycling in cardiac physiology and pathophysiology*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 3571-85.
104. Gregory, K.N., K.S. Ginsburg, I. Bodi, H. Hahn, Y.M.A. Marreez, Q. Song, P.A. Padmanabhan, B.A. Mitton, J.R. Waggoner, F. Del Monte, W.J. Park, G.W. Dorn II, D.M. Bers, and E.G. Kranias, *Histidine-rich Ca binding protein: a regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration and cardiac function*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2006. **40**(5): p. 653-665.
105. Hobai, I.A. and B. O'Rourke, *Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1577-84.
106. Mattiello, J.A., K.B. Margulies, V. Jeevanandam, and S.R. Houser, *Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 424-31.
107. Stevenson, W.G., L.W. Stevenson, H.R. Middlekauff, and L.A. Saxon, *Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction*. Circulation, 1993. **88**(6): p. 2953-61.
108. Wu, Y., L.B. MacMillan, R.B. McNeill, R.J. Colbran, and M.E. Anderson, *CaM kinase augments cardiac L-type Ca²⁺ current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias*. Am J Physiol, 1999. **276**(6): p. H2168-78.
109. Koval, O.M., X. Guan, Y. Wu, M.L. Joiner, Z. Gao, B. Chen, I.M. Grumbach, E.D. Luczak, R.J. Colbran, L.S. Song, T.J. Hund, P.J. Mohler, and M.E. Anderson, *CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4996-5000.
110. Dillmann, W.H., *Diabetic Cardiomyopathy*. Circulation Research, 2019. **124**(8): p. 1160-1162.
111. Al Kury, L.T., *Calcium Homeostasis in Ventricular Myocytes of Diabetic Cardiomyopathy*. J Diabetes Res, 2020. **2020**: p. 1942086.
112. Choi, K.M., Y. Zhong, B.D. Hoit, I.L. Grupp, H. Hahn, K.W. Dilly, S. Guatimosim, W.J. Lederer, and M.A. Matlib, *Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to*

- cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1398-408.
113. Wang, D.W., T. Kiyosue, S. Shigematsu, and M. Arita, *Abnormalities of K⁺ and Ca²⁺ currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes*. Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 2): p. H1288-96.
114. Hamouda, N.N., V. Sydorenko, M.A. Qureshi, J.M. Alkaabi, M. Oz, and F.C. Howarth, *Dapagliflozin reduces the amplitude of shortening and Ca(2+) transient in ventricular myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats*. Mol Cell Biochem, 2015. **400**(1-2): p. 57-68.
115. Pereira, L., J. Matthes, I. Schuster, H.H. Valdivia, S. Herzig, S. Richard, and A.M. Gómez, *Mechanisms of [Ca²⁺]_i Transient Decrease in Cardiomyopathy of db/db Type 2 Diabetic Mice*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 608-615.
116. Shao, C.H., X.H. Wehrens, T.A. Wyatt, S. Parbhu, G.J. Rozanski, K.P. Patel, and K.R. Bidasee, *Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(4): p. 1280-92.
117. Joseph, L.C., P. Subramanyam, C. Radlicz, C.M. Trent, V. Iyer, H.M. Colecraft, and J.P. Morrow, *Mitochondrial oxidative stress during cardiac lipid overload causes intracellular calcium leak and arrhythmia*. Heart Rhythm, 2016. **13**(8): p. 1699-706.
118. Oda, T., Y. Yang, H. Uchinoumi, D.D. Thomas, Y. Chen-Izu, T. Kato, T. Yamamoto, M. Yano, R.L. Cornea, and D.M. Bers, *Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **85**: p. 240-8.
119. Teshima, Y., N. Takahashi, T. Saikawa, M. Hara, S. Yasunaga, S. Hidaka, and T. Sakata, *Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine sensitive Ca(2+)Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(4): p. 655-64.
120. Kim, H.W., Y.S. Ch, H.R. Lee, S.Y. Park, and Y.H. Kim, *Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression*. Life Sci, 2001. **70**(4): p. 367-79.
121. Stølen, T.O., M.A. Høydal, O.J. Kemi, D. Catalucci, M. Ceci, E. Aasum, T. Larsen, N. Rolim, G. Condorelli, G.L. Smith, and U. Wisløff, *Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy*. Circ Res, 2009. **105**(6): p. 527-36.
122. Xu, K.Y., J.L. Zweier, and L.C. Becker, *Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site*. Circ Res, 1997. **80**(1): p. 76-81.
123. Hattori, Y., N. Matsuda, J. Kimura, T. Ishitani, A. Tamada, S. Gando, O. Kemmotsu, and M. Kanno, *Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload*. J Physiol, 2000. **527 Pt 1**(Pt 1): p. 85-94.
124. Huang, J.M., H. Xian, and M. Bacaner, *Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(14): p. 6452-6456.
125. Abdurrachim, D., J. Ciapaite, B. Wessels, M. Nabben, J.J. Luiken, K. Nicolay, and J.J. Prompers, *Cardiac diastolic dysfunction in high-fat diet fed mice is associated with lipotoxicity without impairment of cardiac energetics in vivo*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(10): p. 1525-37.
126. Turdi, S., N. Hu, and J. Ren, *Tauroursodeoxycholic Acid Mitigates High Fat Diet-Induced Cardiomyocyte Contractile and Intracellular Ca²⁺ Anomalies*. PLOS ONE, 2013. **8**(5): p. e63615.

127. Muir, A.R., *The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart*. J Anat, 1967. **101**(Pt 2): p. 239-61.
128. Zimmerman, A.N. and W.C. Hulsmann, *Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart*. Nature, 1966. **211**(5049): p. 646-7.
129. Frank, J.S., T.L. Rich, S. Beydler, and M. Kreman, *Calcium depletion in rabbit myocardium. Ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox*. Circ Res, 1982. **51**(2): p. 117-30.
130. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
131. Gee, K.R., K.A. Brown, W.N.U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, and I. Johnson, *Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes*. Cell Calcium, 2000. **27**(2): p. 97-106.
132. Takahashi, A., P. Camacho, J.D. Lechleiter, and B. Herman, *Measurement of Intracellular Calcium*. Physiological Reviews, 1999. **79**(4): p. 1089-1125.
133. Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto, and T. Pozzan, *Looking forward to seeing calcium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 579-86.
134. Dou, Y., P. Arlock, and A. Arner, *Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(3): p. C1148-53.
135. Picht, E., A.V. Zima, L.A. Blatter, and D.M. Bers, *SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(3): p. C1073-81.
136. Otsu, N., *A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 1979. **9**(1): p. 62-66.
137. Ellis, P.D., *The Essential Guide to Effect Sizes: Statistical Power, Meta-Analysis, and the Interpretation of Research Results*. 2010, Cambridge: Cambridge University Press.
138. Knowles, C.J., M. Cebova, and I.M. Pinz, *Palmitate diet-induced loss of cardiac caveolin-3: a novel mechanism for lipid-induced contractile dysfunction*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61369.
139. Joseph, L.C., P. Subramanyam, C. Radlicz, C.M. Trent, V. Iyer, H.M. Colecraft, and J.P. Morrow, *Mitochondrial oxidative stress during cardiac lipid overload causes intracellular calcium leak and arrhythmia*. Heart Rhythm, 2016. **13**(8): p. 1699-1706.
140. Zamora, M. and J.A. Villena, *Contribution of Impaired Insulin Signaling to the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(11): p. 2833.
141. Avramoglu, R.K., H. Basciano, and K. Adeli, *Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states*. Clin Chim Acta, 2006. **368**(1-2): p. 1-19.
142. Skyler, J.S., G.L. Bakris, E. Bonifacio, T. Darsow, R.H. Eckel, L. Groop, P.H. Groop, Y. Handelsman, R.A. Insel, C. Mathieu, A.T. McElvaine, J.P. Palmer, A. Pugliese, D.A. Schatz, J.M. Sosenko, J.P. Wilding, and R.E. Ratner, *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis*. Diabetes, 2017. **66**(2): p. 241-255.
143. Rerup, C.C., *Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells*. Pharmacol Rev, 1970. **22**(4): p. 485-518.
144. Wold, L.E., K. Dutta, M.M. Mason, J. Ren, S.E. Cala, M.L. Schwanke, and A.J. Davidoff, *Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2005. **39**(2): p. 297-307.
145. Kelly, R.A., D.S. O'Hara, W.E. Mitch, and T.W. Smith, *Identification of NaK-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acids and lysophospholipids*. J Biol Chem, 1986. **261**(25): p. 11704-11.

146. Fauconnier, J., D.C. Andersson, S.J. Zhang, J.T. Lanner, R. Wibom, A. Katz, J.D. Bruton, and H. Westerblad, *Effects of palmitate on Ca(2+) handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes: impact of mitochondrial reactive oxygen species*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 1136-42.
147. Haim, T.E., W. Wang, T.P. Flagg, M.A. Tones, A. Bahinski, R.E. Numann, C.G. Nichols, and J.M. Nerbonne, *Palmitate attenuates myocardial contractility through augmentation of repolarizing Kv currents*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(2): p. 395-405.
148. Carta, G., E. Murru, S. Banni, and C. Manca, *Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 902.
149. Cohen, P., M. Miyazaki, N.D. Socci, A. Hagge-Greenberg, W. Liedtke, A.A. Soukas, R. Sharma, L.C. Hudgins, J.M. Ntambi, and J.M. Friedman, *Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss*. *Science*, 2002. **297**(5579): p. 240-3.
150. Dobrzyn, P., A. Dobrzyn, M. Miyazaki, and J.M. Ntambi, *Loss of stearyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice*. *Journal of lipid research*, 2010. **51**(8): p. 2202-2210.
151. Ma, J., A.R. Folsom, E. Shahar, and J.H. Eckfeldt, *Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(3): p. 564-71.
152. Halliwell, K.J., B.A. Fielding, J.S. Samra, S.M. Humphreys, and K.N. Frayn, *Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast*. *J Lipid Res*, 1996. **37**(9): p. 1842-8.
153. de Souza, C.O., G.K. Vannice, J.C. Rosa Neto, and P.C. Calder, *Is Palmitoleic Acid a Plausible Nonpharmacological Strategy to Prevent or Control Chronic Metabolic and Inflammatory Disorders?* *Mol Nutr Food Res*, 2018. **62**(1).
154. van der Vusse, G.J., M. van Bilsen, and J.F.C. Glatz, *Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease*. *Cardiovascular Research*, 2000. **45**(2): p. 279-293.
155. Zakim, D., *Fatty acids enter cells by simple diffusion*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996. **212**(1): p. 5-14.
156. Kamp, F. and J.A. Hamilton, *pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(23): p. 11367-70.
157. Luiken, J.J., F.G. Schaap, F.A. van Nieuwenhoven, G.J. van der Vusse, A. Bonen, and J.F. Glatz, *Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins*. *Lipids*, 1999. **34 Suppl**: p. S169-75.
158. Sorrentino, D., D. Stump, B.J. Potter, R.B. Robinson, R. White, C.L. Kiang, and P.D. Berk, *Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(3): p. 928-35.
159. Abumrad, N.A., M.R. el-Maghrabi, E.Z. Amri, E. Lopez, and P.A. Grimaldi, *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(24): p. 17665-8.
160. Schaffer, J.E. and H.F. Lodish, *Molecular mechanism of long-chain fatty acid uptake*. *Trends Cardiovasc Med*, 1995. **5**(6): p. 218-24.
161. Vork, M.M., N. Trigault, L.H. Snoeckx, J.F. Glatz, and G.J. van der Vusse, *Heterogeneous distribution of fatty acid-binding protein in the hearts of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 1992. **24**(3): p. 317-21.
162. Van Nieuwenhoven, F.A., G.J. Van der Vusse, and J.F. Glatz, *Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins*. *Lipids*, 1996. **31 Suppl**: p. S223-7.
163. Sansone, A., E. Tolika, M. Louka, V. Sunda, S. Deplano, M. Melchiorre, D. Anagnostopoulos, C. Chatgililoglu, C. Formisano, R. Di Micco, M.R. Faraone Mennella,

- and C. Ferreri, *Hexadecenoic Fatty Acid Isomers in Human Blood Lipids and Their Relevance for the Interpretation of Lipidomic Profiles*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152378.
164. van der Vusse, G.J., *Albumin as fatty acid transporter*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(4): p. 300-7.
165. Heinzl, F.R., N. MacQuaide, L. Biesmans, and K. Sipido, *Dyssynchrony of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(3): p. 390-400.
166. Cannell, M.B., H. Cheng, and W.J. Lederer, *Spatial non-uniformities in [Ca²⁺]_i during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes*. Biophys J, 1994. **67**(5): p. 1942-56.
167. Litwin, S.E., D. Zhang, and J.H. Bridge, *Dyssynchronous Ca(2+) sparks in myocytes from infarcted hearts*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 1040-7.
168. Louch, W.E., H.K. Mork, J. Sexton, T.A. Stromme, P. Laake, I. Sjaastad, and O.M. Sejersted, *T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 2): p. 519-33.
169. Song, L.S., E.A. Sobie, S. McCulle, W.J. Lederer, C.W. Balke, and H. Cheng, *Orphaned ryanodine receptors in the failing heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4305-10.
170. Lenaerts, I., V. Bito, F.R. Heinzl, R.B. Driesen, P. Holemans, J. D'Hooge, H. Heidbuchel, K.R. Sipido, and R. Willems, *Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation*. Circ Res, 2009. **105**(9): p. 876-85.
171. Shao, C.H., G.J. Rozanski, K.P. Patel, and K.R. Bidasee, *Dyssynchronous (non-uniform) Ca²⁺ release in myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(1): p. 234-46.
172. Diaz, M.E., D.A. Eisner, and S.C. O'Neill, *Depressed ryanodine receptor activity increases variability and duration of the systolic Ca²⁺ transient in rat ventricular myocytes*. Circ Res, 2002. **91**(7): p. 585-93.
173. Sánchez, G., F. Araneda, J.P. Peña, J.P. Finkelstein, J.A. Riquelme, L. Montecinos, G. Barrientos, P. Llanos, Z. Pedrozo, M. Said, R. Bull, and P. Donoso, *High-Fat-Diet-Induced Obesity Produces Spontaneous Ventricular Arrhythmias and Increases the Activity of Ryanodine Receptors in Mice*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(2): p. 533.
174. Tian, C., C.H. Shao, C.J. Moore, S. Kutty, T. Walseth, C. DeSouza, and K.R. Bidasee, *Gain of function of cardiac ryanodine receptor in a rat model of type 1 diabetes*. Cardiovascular research, 2011. **91**(2): p. 300-309.
175. Song, L.-S., J.S.K. Sham, M.D. Stern, E.G. Lakatta, and H. Cheng, *Direct measurement of SR release flux by tracking 'Ca²⁺ spikes' in rat cardiac myocytes*. The Journal of Physiology, 1998. **512**(3): p. 677-691.
176. Inoue, M. and J.H.B. Bridge, *Variability in couplon size in rabbit ventricular myocytes*. Biophysical journal, 2005. **89**(5): p. 3102-3110.
177. Isenberg, G., E.F. Etter, M.F. Wendt-Gallitelli, A. Schiefer, W.A. Carrington, R.A. Tuft, and F.S. Fay, *Intrasarcomere [Ca²⁺] gradients in ventricular myocytes revealed by high speed digital imaging microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5413-8.
178. Dibb, K.M., D.A. Eisner, and A.W. Trafford, *Regulation of systolic [Ca²⁺]_i and cellular Ca²⁺ flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca²⁺, L-type Ca²⁺ current and diastolic [Ca²⁺]_i*. J Physiol, 2007. **585**(Pt 2): p. 579-92.
179. Bode, E.F., S.J. Briston, C.L. Overend, S.C. O'Neill, A.W. Trafford, and D.A. Eisner, *Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in rat ventricular myocytes*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 19): p. 4723-9.

180. Antoons, G., K. Mubagwa, I. Nevelsteen, and K.R. Sipido, *Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and [Ca(2+)](i) transients in mouse ventricular myocytes*. J Physiol, 2002. **543**(Pt 3): p. 889-98.
181. Chen, X., X. Zhang, H. Kubo, M. Harris David, D. Mills Geoffrey, J. Moyer, R. Berretta, T. Potts Sabine, D. Marsh James, and R. Houser Steven, *Ca²⁺ Influx-Induced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Overload Causes Mitochondrial-Dependent Apoptosis in Ventricular Myocytes*. Circulation Research, 2005. **97**(10): p. 1009-1017.
182. Izu, L.T., W.G. Wier, and C.W. Balke, *Evolution of cardiac calcium waves from stochastic calcium sparks*. Biophys J, 2001. **80**(1): p. 103-20.
183. Stokke, M.K., K. Hougen, I. Sjaastad, W.E. Louch, S.J. Briston, U.H. Enger, K.B. Andersson, G. Christensen, D.A. Eisner, O.M. Sejersted, and A.W. Trafford, *Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca²⁺ wave development in ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(1): p. 63-71.
184. Maxwell, J.T. and L.A. Blatter, *Facilitation of cytosolic calcium wave propagation by local calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes*. J Physiol, 2012. **590**(23): p. 6037-45.
185. Izu, L.T., W.G. Wier, and C.W. Balke, *Theoretical analysis of the Ca²⁺ spark amplitude distribution*. Biophys J, 1998. **75**(3): p. 1144-62.
186. Guo, T., T. Zhang, K.S. Ginsburg, S. Mishra, J.H. Brown, and D.M. Bers, *CaMKII δ slows [Ca]_i decline in cardiac myocytes by promoting Ca sparks*. Biophys J, 2012. **102**(11): p. 2461-70.
187. Ling, H., T. Zhang, L. Pereira, C.K. Means, H. Cheng, Y. Gu, N.D. Dalton, K.L. Peterson, J. Chen, D. Bers, and J.H. Brown, *Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1230-40.
188. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
189. Weeks, K.L. and J.R. McMullen, *The Athlete's Heart vs. the Failing Heart: Can Signaling Explain the Two Distinct Outcomes?* 2011. **26**(2): p. 97-105.
190. Samuelsson, A.-M., E. Bollano, R. Mobini, B.-M. Larsson, E. Omerovic, M. Fu, F. Waagstein, and A. Holmång, *Hyperinsulinemia: effect on cardiac mass/function, angiotensin II receptor expression, and insulin signaling pathways*. 2006. **291**(2): p. H787-H796.
191. Kemi, O.J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G.L. Smith, G. Condorelli, and O. Ellingsen, *Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy*. 2008. **214**(2): p. 316-321.
192. Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, and E.N. Olson, *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. The Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(7): p. 1853-1864.
193. Lee, D.I., G. Zhu, T. Sasaki, G.S. Cho, N. Hamdani, R. Holewinski, S.H. Jo, T. Danner, M. Zhang, P.P. Rainer, D. Bedja, J.A. Kirk, M.J. Ranek, W.R. Dostmann, C. Kwon, K.B. Margulies, J.E. Van Eyk, W.J. Paulus, E. Takimoto, and D.A. Kass, *Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease*. Nature, 2015. **519**(7544): p. 472-6.
194. Arimoto, T., Y. Takeishi, H. Takahashi, T. Shishido, T. Niizeki, Y. Koyama, R. Shiga, N. Nozaki, O. Nakajima, K. Nishimaru, J.-i. Abe, M. Endoh, R.A. Walsh, K. Goto, and I. Kubota, *Cardiac-Specific Overexpression of Diacylglycerol Kinase β ; Prevents Gq Protein-Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice*. 2006. **113**(1): p. 60-66.

-
195. Molkentin, J.D., J.-R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, and E.N. Olson, *A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 215-228.
 196. Wilkins, B.J., Y.-S. Dai, O.F. Bueno, S.A. Parsons, J. Xu, D.M. Plank, F. Jones, T.R. Kimball, and J.D. Molkentin, *Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy*. 2004. **94**(1): p. 110-118.
 197. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann, *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 635-48.
 198. Ben-Ari, Y.a., Y. Brody, N. Kinor, A. Mor, T. Tsukamoto, D.L. Spector, R.H. Singer, and Y. Shav-Tal, *The life of an mRNA in space and time*. *Journal of cell science*, 2010. **123**(Pt 10): p. 1761-1774.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tim Guthof, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Akute Effekte von Palmitoleat auf die Ca²⁺-Homöostase ventrikulärer Kardiomyozyten“ / „Acute effects of palmitoleate on the calcium homeostasis of ventricular cardiomyocytes“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

Bode, D., N.P.L. Rolim, T. Guthof, N. Hegemann, P. Wakula, U. Primessnig, A.M.O. Berre, V. Adams, U. Wisløff, B.M. Pieske, F.R. Heinzel, and F. Hohendanner, *Effects of different exercise modalities on cardiac dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction*. ESC Heart Fail, 2021.

Bode, D., Guthof, T. , Pieske, B. M. , Heinzel, F. R. , Hohendanner, F., *Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. J Vis Exp, 2018(137).

Hohendanner, F., D. Bode, U. Primessnig, T. Guthof, R. Doerr, S. Jeuthe, S. Reimers, K. Zhang, D. Bach, P. Wakula, B.M. Pieske, and F.R. Heinzel, *Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **115**: p. 10-19.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. med. Frank R. Heinzel und meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. med. Felix Hohendanner, die mich während meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben, zu jeder Tageszeit ein offenes Ohr für Fragen hatten und mich mit ihrer Leidenschaft für die kardiovaskuläre Forschung inspiriert haben.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt hat und ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin. Ich danke außerdem allen, die mich während diesem Lebensabschnitt begleitet haben, insbesondere meiner Partnerin Julia Charlotte Mohr, die immer für mich da war.