

**Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.Prof.Dr.rer.nat. Axel Gödecke**

Akute Modifikationen des Sarkomerproteins Titin durch *Lipid droplets* in Kardiomyozyten

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
David Maurice Brucker
2025**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Ich arbeite an meiner Doktorarbeit. - Woran genau? - Daran, dass ich sie irgendwann mal anfrage.

~ Marc-Uwe Kling

Zusammenfassung:

Lipid droplets können in den meisten Zellen des Körpers unter physiologischen Umständen akkumulieren, im Herzen treten sie jedoch nur unter pathologischen Gegebenheiten wie Diabetes mellitus auf (Barba et al. 2009; Funk et al. 2022).

Die Fetttropfen können Teil intrazellulärer Signalkaskaden sein (Roberts und Olzmann 2020), die mechanischen Effekte sind noch nicht vollständig untersucht.

Das Protein Titin ist ein Teil des Sarkomers, gemeinsam mit den Filamenten Aktin und Myosin. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der passiven Steifigkeit der Herzmuskelzellen und der diastolischen Herzfunktion (Krüger et al. 2010).

Aufgrund der mechanischen Belastung, die *Lipid droplets* für die Zelle darstellen, sowie der zellulären Stressreaktionen, ist anzunehmen, dass sie einen Einfluss auf die passive Steifigkeit des Titin haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll zur Oleat abhängigen *Lipid droplet* Bildung in murinen Kardiomyozyten etabliert. Der Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, ebenso die Bestimmung des Flächeninhalts der Zellen. Es wurden Western-Blot Analysen bezüglich der relativen Expression von Titin-Isoformen durchgeführt, zur Untersuchung der PEVK-Phosphorylierung als Marker für die passive Myokardsteifigkeit und auch zur Untersuchung der Titindegradation in den Oleat behandelten Zellen.

Zusätzlich zur Untersuchung von Wildtyp-Mäusen wurden auch Kardiomyozyten aus diabetischen Tieren vom db/db-Typ (homozygot leptinrezeptordefizient) und zur Kontrolle Geschwistertiere vom db/+ -Typ (heterozygot leptinrezeptordefizient) in entsprechenden Experimenten untersucht.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die Behandlung mit Oleat zur Induktion von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten führt. Eine Veränderung des Flächeninhalts der Zellen durch die Akkumulation der *Lipid droplets*, oder eine vermehrte Degradation von Titin in den Oleat behandelten konnten nicht festgestellt werden. Allerdings zeigte sich eine signifikant erhöhte Phosphorylierung der PEVK-Domäne des Proteins Titin, was auf eine erhöhte passive Steifigkeit des Myokards in diesen Zellen schließen lässt.

Abstract:

Lipid droplets can accumulate in most cell types under physiological conditions; however, in the heart, their presence is typically associated with pathological conditions such as diabetes mellitus (Barba et al., 2009; Funk et al., 2022).

These lipid inclusions may participate in intracellular signaling cascades (Roberts and Olzmann, 2020), although their mechanical effects remain incompletely understood.

The protein titin is a key component of the sarcomere, together with the filaments actin and myosin. It plays a crucial role in determining the passive stiffness of cardiomyocytes and is essential for diastolic cardiac function (Krüger et al., 2010).

Given the mechanical load imposed by lipid droplets on the cell, as well as their potential to trigger cellular stress responses, it is reasonable to hypothesize that they may influence the passive stiffness properties of titin.

In the present study, a protocol was established to induce oleate-dependent lipid droplet formation in murine cardiomyocytes.

Lipid droplet accumulation was verified by fluorescence microscopy, which was also used to assess cell area. Western blot analyses were performed to evaluate the relative expression of titin isoforms, to investigate the phosphorylation status of the PEVK domain (as a marker of passive myocardial stiffness), and to examine titin degradation in oleate-treated cells.

In addition to experiments using wild-type mice, cardiomyocytes were also isolated from diabetic db/db mice (homozygous for leptin receptor deficiency) and their db/+ heterozygous littermates, which served as controls.

The results demonstrated that oleate treatment effectively induced lipid droplet accumulation in cardiomyocytes.

No significant changes in cell area due to lipid accumulation, nor increased titin degradation in oleate-treated cells, were observed.

However, a significant increase in phosphorylation of the PEVK domain of titin was detected, suggesting an increase in passive myocardial stiffness in these cells.

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Herz und Gefäße	7
Abb. 2: Herzanatomie	11
Abb. 3: Aufbau des Sarkomer und Struktur von Titin (Adewale und Ahn 2021).....	16
Abb. 4: Titinisoform N2BA und <i>Titinphosphosites</i> (Koser et al. 2019).....	20
Abb. 5: Titinubiquitinierung (Müller et al. 2021).....	23
Abb. 6: Der Einfluss von Insulin auf die Titin Isoformen Zusammensetzung (Krüger et al. 2010)	26
Abb. 7: Überblick der Fettsäureoxidation im Herzen (Lopaschuk et al. 2010).....	28
Abb. 8: <i>Lipid droplets</i> (Schott et al. 2019)	30
Abb. 9: Funktionen von Perilipin 5 (PLIN5) an Lipidtröpfchen und Mitochondrien Proteine (Jarc und Petan 2019)	32
Abb. 10: Schema des Zusammenspiels von CMA mit zytosolischer und lysosomaler Lipolyse durch PLIN2- und PLIN3-Abbau (Kaushik und Cuervo 2015)	35
Abb. 11: <i>Lipid droplets</i> in Kardiomyozyten aus WT-Mäusen (4h und 6h Oleat).....	72
Abb. 12: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen - 4h und 6h in BSA inkubiert	73
Abb. 13: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen – 4h und 6h in Medium inkubiert.....	74
Abb. 14: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 40h in 1mM Oleat inkubiert.....	76
Abb. 15: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 40h in 0,5mM Oleat inkubiert	77
Abb. 16: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 1 Woche in 1mM Oleat inkubiert.....	78
Abb. 17: Kardiomyozyt einer WT-Maus - PLIN2-Färbung	79
Abb. 18: Rattenkardiomyozyten α -Aktinin-Färbung.....	80
Abb. 19: Kardiomyozyten aus Wildtypmäusen 6h Behandlung (Medium-BSA-Oleat) 82	
Abb. 20: Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen 6h Behandlung (Medium-BSA -Oleat) . 84	
Abb. 21: Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen 6h Inkubation (Medium-BSA -Oleat)	85
Abb. 22: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen - Zellmessungen	88
Abb. 23: Statistische Auswertung der Zellfläche im Verhältnis zur jeweiligen Zellbreite	89
Abb. 24: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen	90
Abb. 25: Titinisoformen Wildtyp – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile	91
Abb. 26: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen	91
Abb. 27: Titinisoformen db/db – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile	92
Abb. 28: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	92
Abb. 29: Titinisoformen db/+ – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile	93
Abb. 30: Titinisoformen db/db vs. db/+ – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile	94
Abb. 31: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus WT-Mäusen.....	95
Abb. 32: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen	96
Abb. 33: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen.....	97
Abb. 34: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen	98

Abb. 35: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	99
Abb. 36: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	100
Abb. 37: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen im Vergleich zur relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	101
Abb. 38: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen	102
Abb. 39: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen	103
Abb. 40: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	104
Abb. 41: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen im Vergleich zum relativen Verhältnis von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.....	105

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Chemikalien	42
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	45
Tabelle 3: Kulturmedien für Mauskardiomyozyten.....	49
Tabelle 4: Laborgeräte	50
Tabelle 5: Antikörper.....	52
Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingle.....	65
Tabelle 7: Pipettierschema für 2 SDS-Standardgele/Sammelgele.....	66
Tabelle 8: Perfusionszeiten nach Herzgewicht	143
Tabelle 9: Trennbereiche von SDS- Gelen (carloth.com)	143
Tabelle 10: Auflistung der Lizenzen zur Nutzung von Abbildungen.....	145

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
A.	Arteria
A-Band	<i>Anisotropes</i> Band
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B; Gene AKT1, AKT2, AKT3
AL	Autolysosom
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Adrenorezeptor
Atg	Autophagy related protein
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BDM	2,3-Butandionmonoxim
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
Ca	Calcium
CaMKII δ	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlor
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C	Kontrolle (control)
D	Tag
Da	Dalton

db/db	Homozygot Leptinrezeptor defizient
db/+	Heterozygot Leptinrezeptor defizient
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMT2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	Et alii (und andere)
FN	Fibronektin
G _i	inhibitorisches G-Protein
GPCR	G protein coupled receptor
G _s	stimulatorisches G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
I-Band	<i>Isotropes</i> Band
IE	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
l	Liter
K	Lysin
kDa	Kilodalton
LAD	Left anterior descending
L _p	Persistenzlänge
LV	Linker Ventrikel
M	Molar/Mol
M-Band	Mittel-Band
MDa	Megadalton
MDM2	mouse-double-minute 2
Mg	Magnesium
Min	Minute

mM	Milimolar
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter-Quecksilbersäure
mN	Milnewton
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
MyBP-C	Myosin-bindendes-Protein C
N2-Bus	N2-B unique sequence
Na	Natrium
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PE	Phosphatidyletholamin
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
pH	Potential hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-1,4,5-trisphosphat
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKC α	Ca-abhängige Proteinkinase α
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Perf	Perfusionsgeschwindigkeit
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RBM20	RNA binding motif protein 20
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleid acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)
SEM	Standardfehler
Ser	Serin

SQSTM1	Sequestosome-1
Std.	Stunde(n)
s	Sekunde
T2-Diabetiker	Typ-2-Diabetiker
T3	Trijodthyronin
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
T-cap	Titin-cap/Telethonin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ULK	Uncoordinated-51 Like Kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	unique sequence
USP	United States Pharmacopeia
V	Volt
V.	Vena
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis:	III
Tabellenverzeichnis:	IV
Abkürzungsverzeichnis:.....	I
1 Einleitung:.....	7
1.1 Aufbau und Funktion des Herzens	7
1.2 Aufbau und Funktion des kardialen Sarkomers	12
1.3 Titin ein Sarkomerprotein	15
1.3.1 Titinisoformen, Titinphosphorylierungen und ihre Auswirkungen	17
1.3.2 Titin-Degradation – T2/T1-Ratio und Titin-Ubiquitinierung	21
1.4 diabetesinduzierte Veränderungen des Titins und bekannte Auswirkungen von LDs.....	24
1.5 <i>Lipid droplets</i> - Vorkommen, Aufbau und Funktion	27
1.5.1 <i>Lipid droplet</i> assoziierte Proteine	31
1.5.2 Etablierung von <i>Lipid droplets</i> in Zellkulturen	36
1.5.3 Pathologische Effekte von <i>Lipid droplets</i>	38
1.6 Zielsetzung:	40
2 Material und Methoden:.....	42
2.1 Material	42
2.1.2 Puffer und Lösungen	45
2.1.3 Kulturmedien für Mauskardiomyozyten	49
2.1.4 Laborgeräte.....	50
2.1.5 Antikörper	52
2.2 Methoden	53
2.2.1 Zellkultur und Präparation von Mauskardiomyozyten.....	53
2.2.2 Zellkultur und Präparation von Rattenkardiomyozyten	55
2.2.3 Induzierung und Färbung von <i>Lipid droplets</i> in der Zellkultur.....	57
2.2.4 Gewebeauflösung und Bradford-Assay.....	59
2.2.4.1 Bradford-Assay	59
2.2.5 HCS LipidTOX Färbung	61
2.2.6 Antikörper Färbung	62
2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie.....	63
2.2.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
2.2.9 Western Blot.....	67
2.2.10 Software.....	69
2.2.11 Daten analytische Statistik	69
3 Ergebnisse:.....	70
3.1 Etablierung von <i>Lipid droplets</i> in Zellkulturen.....	70
3.1.1 Induktion von <i>Lipid droplets</i> mittels Ölsäure (Oleat)	70

3.1.2 Färbung der Zellen mit HCS LipidTOX™	75
3.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen.....	81
3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie - Analyse der Auswirkungen der <i>Lipid droplets</i> auf die Zellgröße und die Sarkomerstruktur.....	87
3.2 Proteinbiochemische Analysen von Titin in Zellen mit <i>Lipid droplets</i>	90
3.2.1 SDS-Page - Gelelektrophorese - Analyse der Isoformen N2B und N2BA..	90
3.2.2 Western-Blot Analyse der Phosphorylierung von PEVK	95
3.2.3 Western-Blot Analyse der Titin-T2:T1-Ratio	102
4 Diskussion:.....	106
4.1 Oleat induziert <i>Lipid droplets</i> in kultivierten adulten Kardiomyozyten der Maus	106
4.2 HCS LipidTOX™ ermöglicht den Nachweis von <i>Lipid droplets</i> in adulten Kardiomyozyten der Maus	110
4.3 PLIN-2 eignet sich als Marker für die Induktion von <i>Lipid droplets</i>	112
4.4 <i>Lipid droplets</i> beeinflussen nicht die Zellgröße, aber die Sarkomerstruktur in Kardiomyozyten.....	113
4.5 kurzfristige <i>Lipid droplet</i> Akkumulation induziert keine Veränderungen in der Titinisoformen Komposition.....	116
4.6 <i>Lipid droplets</i> führen zu keiner signifikant erhöhten Degradation von Titin	119
4.7 <i>Lipid droplets</i> induzieren Phosphorylierung der elastischen Titin-Region PEVK	122
5 Literaturverzeichnis	128
6 Anhang.....	143
7 Danksagung:	

1 Einleitung:

1.1 Aufbau und Funktion des Herzens

Das Herz dient als Verbindung und Umschaltstation zwischen den beiden Kreisläufen (Schünke et al. 2018), als solche spielt es eine zentrale Rolle im Organismus und ist wichtiger Bestandteil sowohl physiologischer Funktionen, als auch pathologischer Prozesse.

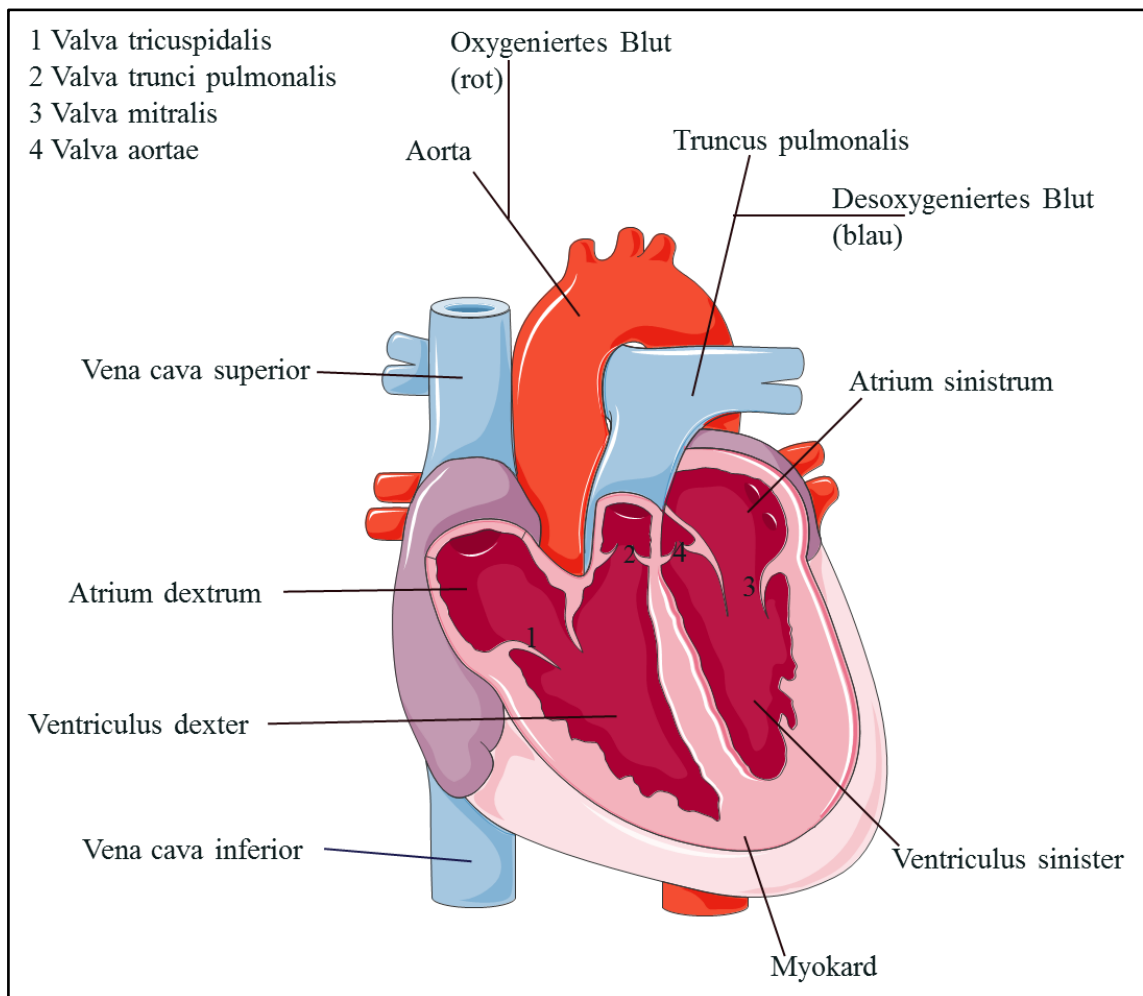


Abb. 1: Herz und Gefäße

Makroanatomie des Herzens und seiner wichtigsten Gefäßabgänge

Die Abbildung wurde unter Nutzung von „Servier Medical Art“, bereitgestellt von Servier, lizenziert durch eine „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“, entworfen.

Das Herz ist ein Organ, das bei Säugetieren im Thorax, im unteren Mediastinum, im Bereich des *Mediastinum mediale*, liegt. Es wird vom Perikard, dem Herzbeutel umgeben. Topographisch befindet es sich in der Nachbarschaft des *Mediastinum anterius* und *Mediastinum posterius* mit den jeweiligen Strukturen. *Kranial* befindet sich das *Mediastinum superius*, das auch die abgehenden Gefäße *Aorta* und *Truncus pulmonalis* enthält, während kaudal das *Diaphragma* den Thorax begrenzt (Schünke et al. 2018).

Die Aufgabe des Herzens ist es Blut zu pumpen, sodass Gewebe und Organe ausreichend versorgt werden. Das Volumen, dass hierfür in Ruhe gepumpt werden muss, beträgt normalerweise 4-6l/min. Auf Basis verschiedener Mechanismen, kann die Pumpleistung des Herzens an äußere und innere Einflüsse schnell adaptiv angepasst oder auch, wie bei pathologischen Prozessen nicht selten der Fall, langfristig reguliert werden (Larsen et al 2016).

Makroskopisch gliedert sich das Herz in vier Räume (vgl. Abbildung 2). Die beiden Vorhöfe und die Kammern, auch *Ventrikel* genannt. Die *Ventrikel* werden über die Vorhöfe mit Blut gefüllt und entleeren sich anschließend über Gefäße in den jeweils zugehörigen Kreislauf. Der rechte *Ventrikel* über die *A. pulmonalis* in den Lungenkreislauf und der linke Ventrikel über die *Aorta* in den Körperkreislauf (*LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE* 2021). Die unterschiedlichen Bereiche des Herzens werden durch Klappen voneinander getrennt, die auch eine Ventilfunktion übernehmen. Die Segelklappen befinden sich zwischen den Vorhöfen und den Kammern. Auf der rechten Seite die dreiseglige Trikuspidalklappe und auf der linken Seite die zweiseglige Mitralklappe (Schünke et al. 2018). Zwischen den Kammern und den jeweiligen Kreisläufen befinden sich Taschenklappen, links die Aortenklappe und rechts die Pulmonalklappe. Die Öffnung und Schließung der Klappen erfolgt passiv, basierend auf den jeweiligen Druckgradienten. Papillarmuskeln, die sich ebenfalls an den Klappen befinden unterstützen lediglich das Stellen der Klappen im Blutstrom (*LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE* 2021). Die Herzklappen werden mit kollagenen Fasern, sogenannten *Anuli fibrosi* umgeben, die aus einer bindegewebigen Schicht in der Ventilebene, dem sogenannten Herzskelett resultieren. Alle Klappen sind von bindegewebigen Dreiecken umgeben und durch das Bindegewebe miteinander verbunden, das *Trigonum fibrosum dextrum* und *sinistrum*. So werden die Herzklappen befestigt und eine elektrische Isolationsschicht geschaffen (Schünke et al. 2018).

Mikroskopisch ähnelt das Herz am ehesten einem Gefäß, da es mit den Gefäßen auch eine funktionelle Einheit bildet. Eine Gemeinsamkeit ist der dreischichtige Wandaufbau. Das *Endokard* am Herzen entspricht der *Tunica intima* am Gefäß, das Myokard der *Tunica media* und das *Epikard* der *Tunica externa*. Das *Endokard* ist dabei eine bindegewebige Schicht, die die Herzinnefläche bedeckt und in die *Tunica intima* herznaher Gefäße übergeht. Das Myokard bildet den eigentlichen Herzmuskel (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Als solcher ist das Herz ein quergestreifter Muskel, der ohne Einwirkung von Nerven und unabhängig von hormoneller Stimulation ein Aktionspotenzial bilden und kontrahieren kann, wobei Einflüsse des *Nervus vagus* oder von Katecholaminen durchaus Frequenz und Kraft des Herzschlages modulieren können (LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE 2021). Der Herzmuskel besteht aus verschiedenen Geweben. Vorhofmuskulatur, Kammermuskulatur, sowie dem Erregungsbildungs- und Leitungssystem. Wie in der Skelettmuskulatur hat auch der Herzmuskel eine Querstreifung. Die Fasern bestehen aus vielen seriell geschalteten Herzmuskelzellen. Aufgrund der leichten Erregungsausbreitung verhält sich die Herzmuskelzelle funktionell wie ein Netzwerk. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem funktionellen *Synzytium* (LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE 2021).

Aus dem Herzen gehen große Gefäße, wie *Aorta* und *Truncus pulmonalis* ab, sie werden als *Vasa publica* bezeichnet und sind nicht exklusiv für die Versorgung des Herzens bestimmt (vgl. Abbildung 1). Der erste Abgang der *Aorta* sind die Koronararterien, *Arteria coronaria dextra* und *sinistra*, sie versorgen mit ihren Abgängen, als Endarterien das Herz mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Durchblutung erfolgt dabei an der Oberfläche des Herzens mittels Endarterien und findet nicht mit sogenannten *Vasa vasorum* bis in die Tiefe des Myokards statt, sondern wird über Diffusion finalisiert (Schünke et al. 2018). Diese Versorgung kann Ursache verschiedener Pathologien sein, da so eine Bildung von Umgehungskreisläufen, Anastomosen, nicht möglich ist und bei vermindertem Blutfluss in den Koronararterien die Durchblutung sämtlicher Schichten des Herzens nicht immer sichergestellt werden kann (Aumüller et al. 2017).

Herzmuskelzellen enthalten eine Vielzahl dicht gepackter Myokarde, die wiederum aus unterschiedlichen kontraktile Einheiten, den Sarkomeren, aufgebaut werden. Zentrale Elemente dieser kontraktile Einheiten sind die drei Filamentproteine Aktin, Myosin und Titin (s. auch Kapitel 1.2).

Um eine Kontraktion im Herzen oder auch jedem anderen Muskel zu erreichen wird ein Aktionspotential benötigt. Ein solches Aktionspotential wird im Sinusknoten generiert, von wo es sich über das gesamte Herz ausbreitet. Außerdem sind die Vermittlung von Kalziumionen und ausreichend Energie entscheidend. Das Aktionspotential entsteht im Gesunden am Sinusknoten, am rechten Vorhof. Von dort aus breitet sich das Signal über das gesamte Herz aus und es kommt zu einer Calciumfreisetzung. Der Herzmuskel kann kontrahieren (LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE 2021). Der Herzzyklus, also die ständige Wiederholung von Kontraktion und Erschlaffung wird in der Fachsprache in *Systole* (Kontraktion) und *Diastole* (Erschlaffung) eingeteilt. In der *Systole* wirft der Herzmuskel einen Teil des Blutes, der sich in den *Ventrikeln* befindet aus, dieser Anteil wird auch Ejektionsfraktion genannt (LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE 2021). In der klinischen Medizin gilt die Ejektionsfraktion als Leitwert für die Herzfunktion und spielt vor allem in der Diagnostik der Herzinsuffizienz eine größere Rolle (Tschöpe et al 2021). In der *Diastole* erschlafft der Herzmuskel und es kommt zu einer Füllung der *Ventrikel* über die Vorhöfe (LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE 2021). Die Herzerregung benötigt, wie bereits erwähnt keine äußeren Einflüsse, sondern läuft autonom ab. Dafür wird in einem Schrittmacherzentrum, bei gesunden Menschen der Sinusknoten, ein Schrittmacherpotential gebildet. Die Schrittmacherzellen haben dabei kein stabiles Ruhemembranpotential. Über sogenannte *funny channels*, die durch Hyperpolarisation bei ca. -60mV öffnen, strömen Kationen in die Zelle und depolarisieren sie auf ca. -40mV. Daraufhin öffnen spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle und der Calciumeinstrom depolarisiert die Zelle auf ca. 20mV. Die Repolarisation erfolgt durch den Schluss der Calciumkanäle und eine Öffnung der Auswärtsgleichrichter Kaliumkanäle. Im Gegensatz zu den Schrittmacherzellen haben die Zellen des *Arbeitsmyokards* ein Ruhemembranpotential von ca. -90mV. Die Depolarisation der Schrittmacherzellen wird über *Gap junctions* zum *Arbeitsmyokard* geleitet und depolarisiert es auf ca. -65mV. Nun öffnen spannungsaktivierte schnelle Natriumkanäle und die Einwärtsgleichrichter Kaliumkanäle schließen. Natrium strömt in die Zellen, bis sie ein Membranpotential von 30mV erreichen, dann schließen auch die Natriumkanäle. Nach diesem Overshoot kommt es zu einer partiellen Repolarisation durch Öffnung eines Kalium- und eines Chloridkanals. Ein Plateau stellt sich ein. In dieser Plateauphase des Aktionspotentials öffnen sich spannungsaktivierte L-Typ-Calciumkanäle bei ca. -30mV und es kommt zu einem langsamen Calciumeinstrom, der

die calciuminduzierte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum für die Kontraktion des Muskels ermöglicht. Die Repolarisation erfolgt bei einer langsamen Abnahme der Calciumleitfähigkeit durch die Öffnung von Auswärtsgleichrichter Kaliumkanälen. Diese Öffnung wird durch die Depolarisation der Zelle induziert. Durch Einwärtsgleichrichter Kaliumkanäle kommt es zu einem weiteren Kaliumausstrom und zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei -90mV (Behrends et al. 2017).

Insgesamt wird deutlich, dass das Herz ein komplexes Organ ist, welches höchste Relevanz für die reibungslose Funktion des Körpers und die Aufrechterhaltung der Homöostase hat.

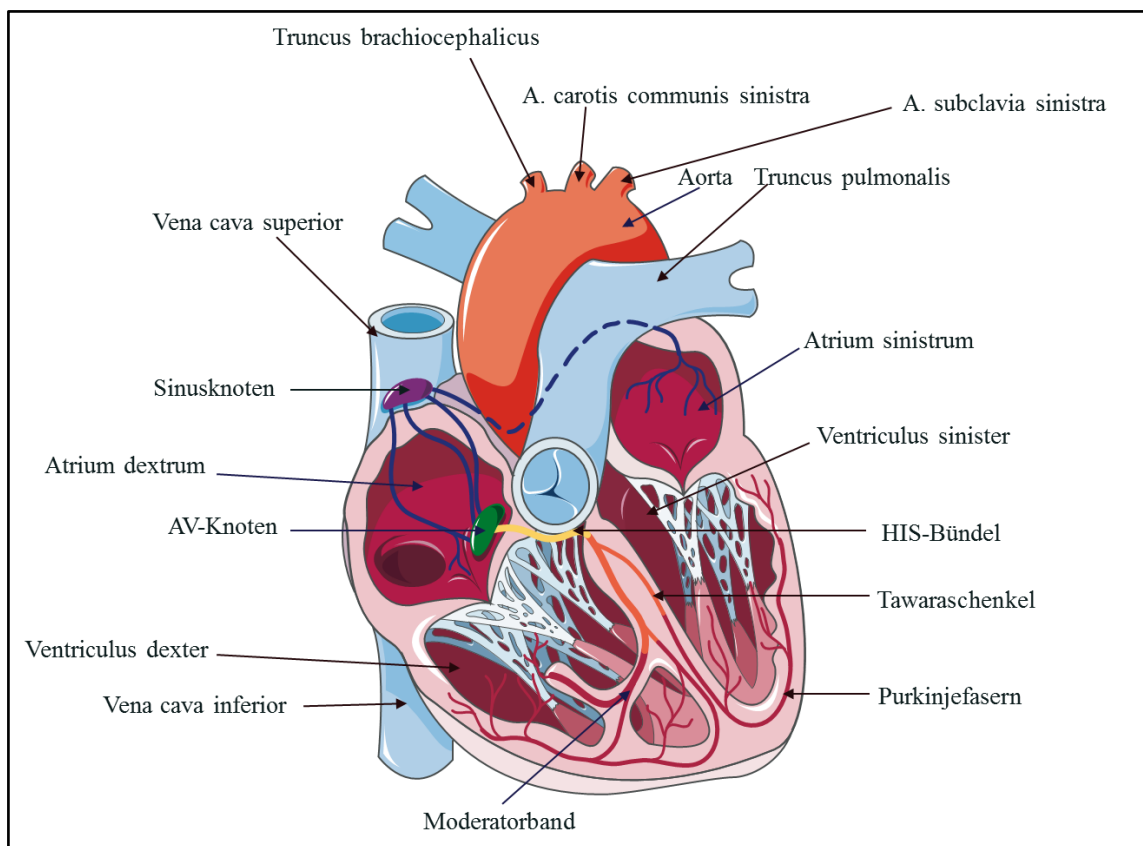


Abb. 2: Herzanatomie

Der Aufbau des menschlichen Herzens, und seine wichtigsten makroskopischen, sowie elektrophysiologischen Strukturen.

Die Abbildung wurde unter Nutzung von „Servier Medical Art“, bereitgestellt von Servier, lizenziert durch eine „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“, entworfen (Servier Medical Art 2023).

1.2 Aufbau und Funktion des kardialen Sarkomers

Die Zellen des Myokards sind einkernig. Die *Myoblasten* ordnen sich in Ketten an, die nicht verschmelzen. An den Zellgrenzen, den sogenannten Glanzstreifen, verbinden *Zonulae adhaerentes* die Aktinfilamente benachbarter Zellen. Auf diese Weise wird die Kraftübertragung sichergestellt. Die Herzmuskelzellen sind ungefähr 100µm lang und haben einen Durchmesser von 15µm. Sie bestehen aus einem Bündel *Myofibrillen*, die wiederum aus hintereinanderliegenden Sarkomeren aufgebaut sind (Pape et al. 2019).

Skelettmuskel und Herzmuskel werden, als gestreifte Muskulatur bezeichnet, da es eine sichtbare, sich wiederholende, Anordnung kontraktile Elemente gibt. Diese bezeichnet man als Sarkomere, die sich in zylinderförmigen Bündeln, den Myokarden, organisieren. In gestreifter Muskulatur nehmen Myokarde den größten Teil des intrazellulären Raums ein, sodass wenig Raum für Zellorganellen bleibt (Sweeney und Hammers 2018). Um die Herzfunktion aufrechtzuerhalten interagieren im kardialen Sarkomer über 200 Proteine miteinander (Martin und Kirk 2020). Ein Sarkomer hat dabei in quergestreifter Muskulatur normalerweise eine Länge von 2,2-2,4µm (Pape et al. 2019).

Das Sarkomer wird maßgeblich von drei Filamenten bestimmt, Aktin, das dünne Filament, Myosin, das dicke Filament und dem großen Protein Titin einem 3,6Megadalton großen Protein (vgl. Abbildung 3), das als molekulare Feder fungiert (Henderson et al. 2017). Sogenannte Intermediärfilamente verbinden das Sarkomer mit Zellorganellen und dienen als Gerüst zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität, während das Costamer, ein Proteinkomplex, der auch die Kraftübertragung vom Sarkomer auf die extrazelluläre Matrix sicherstellt, die Bindung des Sarkomers an die Zellmembran vermittelt (Henderson et al. 2017).

Das Sarkomer besteht aus einem Muster dieser sich wiederholenden Proteine (Gordon et al. 2000). Die Sarkomere sind in Längsrichtung ausgerichtete Multiproteinkomplexe, wodurch sich das charakteristische Muster der Querstreifung ergibt (Crocini und Gotthardt 2021). Dieses Muster wird dadurch bedingt, dass jedes dicke Myosinfilament von sechs dünnen Aktinfilamenten umgeben wird und diese wiederum jeweils von drei dicken Myosinfilamenten, sodass sich ein Verhältnis von Aktin zu Myosin von zwei zu eins ergibt (Pape et al. 2019). Der Aufbau des Sarkomers lässt sich in verschiedene Zonen unterteilen, I-Bande, A-Bande, H-Zone, M-Linie und Z-Scheiben. Die Anordnung der Myokarde in Sarkomeren ist ein Charakteristikum der quergestreiften Muskulatur und

lässt sich nicht in glatter Muskulatur finden (Aumüller et al. 2017). Jedes Sarkomer wird an den Rändern durch die Z-Scheiben begrenzt, an deren Hauptprotein α -Aktinin die Aktinfilamente verankert sind. Diese Aktinfilamente bilden jeweils eine Hälfte der I-Bande und reichen außerdem von den Myosinfilamenten, die sich im A-Band, im Zentrum des Sarkomers finden und ungefähr 1,6 μm lang sind, bis zur H-Zone. Dort gibt es keine Aktinfilamente zwischen den Myosinfilamenten. Im Bereich der I-Bande finden sich freie Titinfilamente mit ihren elastischen Federeigenschaften (Pape et al. 2019). Bei axialer Betrachtung ergibt sich diese Einteilung des Sarkomers in verschiedene Bereiche. In das I-Band (*isotrop*), wo nur Aktin vorkommt und das A-Band (*anisotrop*), wo Aktin und Myosin überlappen (Wang et al. 2021). An den Enden, wo das Sarkomer durch die Z-Scheiben begrenzt wird, sind neben Aktin, das über α -Aktinin verankert ist, auch andere Proteine, wie Titin verankert (Gontier et al. 2005). In der Mitte befindet sich der M-Streifen, wo ausschließlich Myosinfilamente, über Proteinkomplexe, vernetzt sind und so die Stabilität des Sarkomers gewährleistet wird (Gautel 2011). Die Aktin und Myosinfilamente sind durch das dritte Filament, Titin, miteinander verbunden, das sowohl mit Proteinen an der Z-Scheibe, wie α -Aktinin oder CapZ, verbunden ist, als auch mit Proteinen am M-Band, wie Obscurin (Gautel 2011).

Die Skelettmuskelaktion basiert auf der zyklischen Wechselwirkung von Aktin und Myosin, die chemische Energie in kinetische Energie umwandelt, sodass es zu einer relativen Bewegung zwischen den Filamenten kommt, was den Hauptantrieb der Krafterzeugung im Sarkomer darstellt (HUXLEY und HANSON 1954). In diesem Sinne werden aktive Kräfte in einem Prozess, der als Querbrückenzyklus bezeichnet wird, von Aktin und Myosin erzeugt, während passive Kräfte durch das Federprotein Titin entstehen (Crocini und Gotthardt 2021).

Der Querbrückenzyklus beschreibt den Mechanismus der Umwandlung chemischer in kinetische Energie und die Rolle der verschiedenen Myokarde während der Kontraktion (*Physiologische Grundlagen* 2014, 2010). Bereits in Ruhe wird ATP zu ADP hydrolysiert und induziert eine Konformationsänderung von Myosin, die zu einer Aufrichtung des Myosinkopfes führt. Durch Aktionspotenziale werden im Herzen hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen über spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle hervorgerufen. Zusätzlich kommt es durch die calciuminduzierte Calciumfreisetzung über Ryanodinrezeptoren zu einem Calciumeinstrom in das Zytosol aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Calcium bindet nun an TroponinC und durch eine

Konformationsänderung wird die Bindungsstelle für Aktin an Myosin frei. Myosin bindet im 90° Winkel an Aktin. ADP und Phosphat werden vom Myosinkopf abgegeben, der Myosinkopf knickt um 45° ab und Myosin zieht Aktin durch diese Bewegung an sich entlang. Dies ist der sogenannte Kraftschlag, der eine Verkürzung der Sarkomere nach sich zieht. Nun bindet neues ATP an die Bindungsstelle des Myosinkopfes. Es kommt zu einer Konformationsänderung und die Querbrücke zwischen Aktin und Myosin löst sich durch die ATP-Bindung. Sobald die Calcium-Konzentration in der Zelle wieder erhöht wird kann der Zyklus erneut ablaufen (Huppelsberg et al. 2003).

1.3 Titin – ein Sarkomerprotein

Das große Protein Titin, wirkt wie eine molekulare Feder und beeinflusst die passive Spannung des Herzmuskels, maßgeblich. Es ist auch ein Knotenpunkt in der Signaltransduktion und bietet aufgrund seiner Größe vielfältige Ansatzpunkte für Pathologien. Diese Verhältnisse müssen jedoch, ebenso wie seine Rolle in der Therapie von Pathologien, noch weitestgehend erforscht werden (Krüger und Kötter 2013).

Mit einer potenziell erreichbaren Größe von 4,2Megadalton ist Titin das größte bekannte Protein in menschlichen Zellen. Auf diese Weise durchspannt es ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Granzier und Labeit 2004). Der Aufbau von Titin ist in Herz- und Skelettmuskel ähnlich, mit geringfügigen Unterschieden.

Das Protein Titin durchspannt ein halbes Sarkomer und wird auch als Rückgrat des Halbsarkomers bezeichnet (Linke und Krüger 2010). Es umfasst also alle Bereiche des Sarkomers, die Z-Scheibe, die I-Bande, die A-Bande und das M-Band. Im Bereich der Z-Scheibe findet die Bindung an Aktin, das dünne Filament statt. Dort befinden sich sogenannte Z-Repeats des Titin. Es folgt das elastische Segment des Proteins Titin, dieses beinhaltet eine Ig-Domäne, die sogenannte proximale Ig-Domäne, im Bereich der I-Bande. Es folgen eine Ig-Domäne mit variabler Länge, die N2B- und PEVK-Region, sowie eine distale Ig-Domäne, ebenfalls im Bereich der I-Bande. Im Bereich der A-Bande erfolgt die Bindung an das dicke Filament Myosin. Hier befindet sich eine Titinkinasedomäne, die bis zum M-Band reicht (Linke und Krüger 2010).

Der N-Terminus des Proteins ist in die Z-Scheibe eingebettet (Kellermayer et al. 2019), er beteiligt sich am Zusammenbau, dem Erhalt und der Stabilisierung der Myofibrillen (Gregorio et al. 1998). Das A-Band Segment von Titin beinhaltet 178 Ig- und FN-III-Domänen. Es ist funktionell nicht erweiterbar (Burke et al. 2016). Das Segment besteht aus einer I/A-Zone, D-Zone, C-Zone und M-Band-Regionen. Die I/A-Zone befindet sich nahe dem Ende der dicken Filamente. Vor der D-Zone ist das Ig- und FN-III-Muster durch eine Folge von sechs FN-III durchbrochen (Kellermayer et al. 2019). Die C-Zone von Titin spielt eine Rolle bei der Verankerung von Myosinbindepotein c (MyBP-c) (Freiburg und Gautel 1996), reguliert die Aktin/Myosin-Interaktion (Muhle-Goll et al. 2001) und reguliert die Länge des dicken Filaments (Cazorla et al. 2000).

Im Herzen gibt es eine proximale und eine distale immunglobulinähnliche (Ig)-Domäne, zwischen denen die PEVK-Region, sowie die steife N2B und weniger steife N2BA-

Region liegen (Sweeney und Hammers 2018). Die Masse des Proteins machen zu 90% die Ig- und Fibronectin- (FN-III) Domänen aus (Kontogianni-Konstantopoulos et al. 2009). Hiermit wird sehr deutlich, dass Titin aufgrund seiner Größe, einen sehr komplexen Aufbau und viele verschiedene Signalverschaltungen besitzt (Linke 2008). Auch eine Rolle von Titin bei hypertrophieassoziierten Veränderungen wird vermutet (Krüger und Linke 2011).

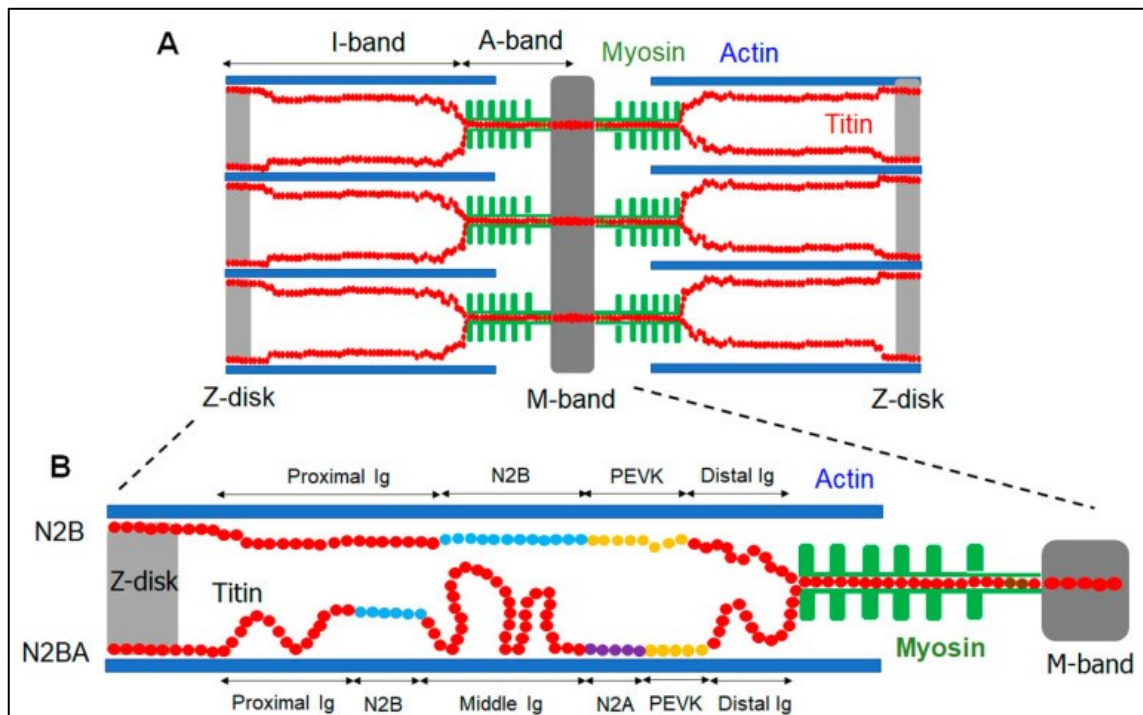


Abb. 3: Aufbau des Sarkomer und Struktur von Titin (modifiziert nach Adewale und Ahn 2021)

Die Abbildung zeigt den grundlegenden Aufbau des Sarkomer mit den Z-Scheiben als Begrenzung und dem M-Band in der Mitte, es werden die I-Bande und A-Bande gezeigt, ebenso wie die Filamente Aktin, Myosin und Titin (A); es wird schematisch der Aufbau von Titin in quergestreifter Muskulatur gezeigt, wobei die Isoformen N2B und N2BA unterschieden werden, N2BA enthält zusätzliche Domänen, in der Mitte eine Ig-Domäne und die N2A-Insertion (B) (Adewale und Ahn 2021).

1.3.1 Titinisoformen, Titinphosphorylierungen und ihre Auswirkungen

Im Herzen von Säugetieren werden zwei verschiedene Isoformen von Titin exprimiert. Eine kurze steifere N2B Isoform (etwa 3MDa) und die längere und elastischere N2BA Isoform (3,2-3,7MDa). Die titinbasierte Myokardsteifigkeit wird stark durch das Expressionsverhältnis beider Isoformen beeinflusst (Cazorla et al. 2000). Im gesunden menschlichen Herzen werden 39,5% des flexibleren N2BA und 60,5% des steiferen N2B exprimiert (Kötter et al. 2013). Beide Isoformen reichen von der Z-Scheibe des Sarkomers bis zum M-Band und unterscheiden sich vor allem in der I-Band-Region des Moleküls. Die N2BA-Isoform enthält, sowohl das N2A-, als auch das N2B-Segment und ist entsprechend länger als die N2B-Isoform, die kein N2A-Segment besitzt. Außerdem sind in der N2B-Isoform weniger Ig-Domänen zu finden und das PEVK-Segment ist kleiner (Kellermayer et al. 1998). Die verschiedenen Zusammensetzungen der I-Band-Region bedingen die Steifigkeit der Isoformen, wobei die Kraft entscheidend ist, die nötig ist, um ein Titinmolekül zu dehnen. Diese Kraft ist bei N2B Titin größer als bei N2BA Titin und folglich ist N2BA die elastischere Titinisoform (LeWinter und Granzier 2013).

Besonders die diastolische Herzfunktion wird durch die passive Steifigkeit des Myokards beeinflusst (Kötter et al. 2013). Dies hat autoregulatorische Effekte auf die systolische Pumpfunktion des Herzens. Der entsprechende Mechanismus wird als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet (Cazorla et al. 2001). Die Expression von Isoformen ist eine mittel- längerfristige Anpassung der Myokardsteifigkeit.

Eine akute und dynamischere Regulation der passiven Steifigkeit kann durch posttranslationale Modifikation von Titin, oder die Bindung von Calcium oder Chaperonen erfolgen (Freundt und Linke 2019). Posttranslationale Modifikation von Titin ist bislang vor allem für die PEVK- und N2Bus-Domäne in der I-Band Region des Proteins beschrieben (Koser et al. 2019).

Bei geringer Dehnung werden zunächst die seriell angeordneten Ig-Domänen gedehnt, bei größerer Kraft werden die PEVK-Domäne und die N2B unique sequence von einem random coil in eine gestreckte Form überführt (Linke und Krüger 2010).

Da diese Arbeit jedoch vor allem auf die posttranslationalen Modifikationen durch Phosphorylierungen und ihre Veränderung durch *LDs* eingeht, soll der Fokus auch hier auf dieser Form der Beeinflussung der Myokardsteifigkeit liegen.

Für den I-Band Bereich von Titin sind bislang Modifikationen durch fünf Kinasen beschrieben worden: die cAMP-abhängige ProteinkinaseA (PKA), die cGMP-abhängige ProteinkinaseG (PKG), extracellular signal regulated kinase ERK2, die Ca^{2+} abhängige Proteinkinase α (PKC α) und die Calcium-Calmodulin-abhängige_Kinase_II δ (CaMKII δ) (Linke und Hamdani 2014). Die ProteinkinaseA wird durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert, insbesondere bei β -adrenerger Stimulation durch erhöhte Sympathikusaktivität (Bers 2002). PKC α ist die wichtigste PKC-Isoform am Herzen und wird unter anderem durch α -adrenerge Stimulation aktiviert (Koser et al. 2019; Dorn und Force 2005).

Die PKC α hat verschiedene Wirkungen im Herzen und spielt beispielsweise bei der Regulation der Inotropie, also der Kontraktionskraft des Herzen im gesunden und insuffizienten Organ eine wichtige Rolle (Kooij et al. 2011). Hierbei spielt auch die Phosphorylierung der PEVK-Domäne des Proteins Titin eine wichtige Rolle (Hidalgo et al. 2009). Hinweise gibt es auch auf die Wirkung von oxidativem Stress, zur Regulation der Steifigkeit quergestreifter Muskulatur (Beckendorf und Linke 2015). Besonders entscheidende Stellen der Phosphorylierung sind Ser11787 und Ser12022 (Hidalgo et al. 2009), die auch als *Targets* für Western-Blot basierte Antikörper-Analysen dienen können. In Tierversuchen zeigte sich, dass die Phosphorylierung durch die PKC α mit einer erhöhten passiven Steifigkeit des kardialen Gewebes einhergeht (Hidalgo et al. 2009). Auch eine Verminderung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit von Kardiomyozyten durch Inkubation mit PKC α ist beschrieben (Kooij et al. 2011).

Eine Aufgabe der CaMKII δ könnte die Phosphorylierung der N2-Bus Region von Titin sein, was die Persistenzlänge dieser Region erhöhen und so die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten verringern würde. Allerdings sind erste Hinweise darauf bisher nur in vitro gefunden worden (Hamdani et al. 2013). In versagenden menschlichen Herzen wurde eine vermehrte Expression der CaMKII δ , sowie eine vermehrte Aktivität der Kinase beschrieben (Hamdani et al. 2013). Aus den Ergebnissen dieser Studie ging hervor, dass die CaMKII δ eine Phosphorylierung an konservierten Serinen/Threoninen induzierte und so die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten senkt. Gleichzeitig wurde eine gestörte Phosphorylierung bei Herzinsuffizienz beschrieben, die zu diastolischem Stress beiträgt (Hamdani et al. 2013).

Ebenfalls für eine Phosphorylierung der N2-Bus Region ist die PKA verantwortlich, deren Wirkung auch eine Senkung der passiven Steifigkeit von Titin ist (Krüger et al. 2009; Krüger und Kötter 2013). Der molekulare Mechanismus dieser Wirkung ist noch nicht genauer erforscht (Krüger et al. 2009). Es ist allerdings bekannt, dass der Wirkung der PKA in Teilen durch eine PKG-Aktivierung entgegengewirkt werden kann (Mudd und Kass 2008). Eine Interaktion zwischen den beiden Kinasen ist, insbesondere im Hinblick auf die hydrolysierende Wirkung von Phosphodiesterasen (PDEs), beschrieben, da beide Kinasen durch Phosphodiesterasen hydrolysiert werden. Dabei hat die PKG eine stimulierende Wirkung auf die PDE2 und eine inhibierende Wirkung auf die PDE3 (Krüger et al. 2009).

Der Mechanismus der PKG-Aktivierung beinhaltet eine Signalkaskade, die nicht herzspezifisch ist, dort jedoch auch zur Anwendung kommt. Durch die Freisetzung von NO oder natriuretischen Peptiden kommt es zur Bildung von cGMP und schließlich zur Aktivierung der PKG. Die Phosphorylierung von Titin durch PKG hat verschiedene Einflüsse auf die Kardiomyozytenfunktion, die vor allem eine protektive Funktion erfüllen. Die Kinase ist an Wegen der Myokard- und Calciumhandhabendenproteinfunktion beteiligt. Außerdem spielt sie eine maßgebliche Rolle bei Wegen des Zellüberlebens und der Fibrose (Kirk et al. 2016).

ERK2 ist eine Effektorkinase, die vor allem über den Signalweg Raf1/MEK1/2-mitogen aktivierte Kinase wirkt. Sie ist unter anderem mit Herzhypertrophie assoziiert (Zhang et al. 2003; Wang 2007). CaMKII δ ist die vorherrschende Form der CaMKII δ im Herzen. Sie wird durch intrazelluläre Calciumspiegel reguliert und wirkt sowohl im gesunden, als auch im kranken Herzen auf vielfältige Weise. Alle beschriebenen Kinasen sind in der Lage die passive Spannung der Kardiomyozyten über Titinphosphorylierungen zu modifizieren (Koser et al. 2019). An der N2Bus Region wirkt die Serin/Threonin-Proteinphosphatase5 (PP5). Diese kann zuvor phosphorylierte Stellen der N2Bus-Region dephosphorylieren, was, da die Phosphatase keinen Einfluss auf die PEVK-Region nimmt, eine Erhöhung der passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten zufolge hat (Krysiak et al. 2018). Welche weiteren Phosphatasen neben PP5 im menschlichen Herzen maßgeblich an der Dephosphorylierung beteiligt sind ist bisher nicht bekannt (Koser et al. 2019).

Phosphorylierungsstellen befinden sich fast ausschließlich in den N2Bus- und PEVK-Regionen (Hamdani et al. 2017), dementsprechend sind Veränderungen des allgemeinen Phosphorylierungsstatus in diesen Regionen von besonderem Interesse, da so verifiziert werden kann, ob durch nicht physiologische Einflüsse Veränderungen induziert werden.

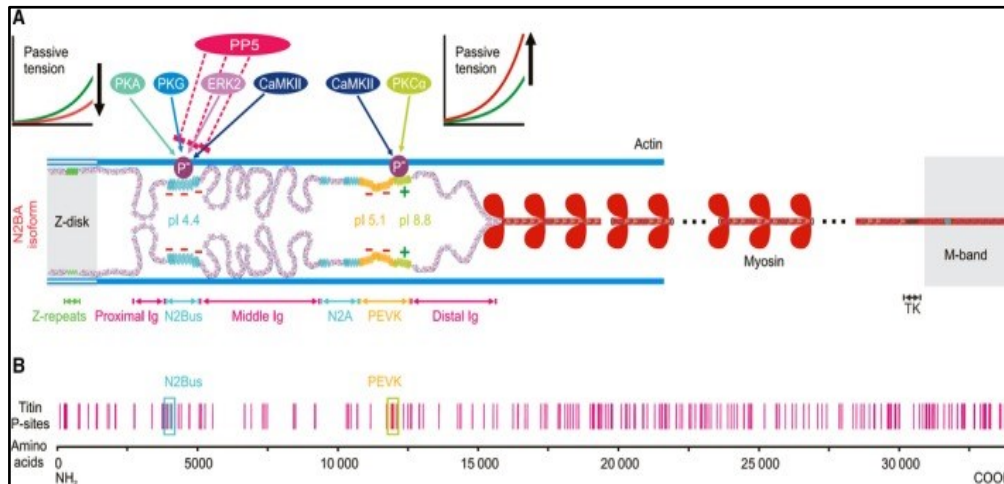


Abb. 4: Titinisoform N2BA und Titinphosphosites (modifiziert nach Koser et al. 2019)

(A) die Titinisoform N2BA und ihre verschiedenen Kinasen und Phosphatasen, in einer schematischen Darstellung, mit Auswirkungen der Phosphorylierung auf die passive Spannung und (B) einer Darstellung bekannter *Phosphosites* in der Aminosäurestruktur mit Hervorhebung besonders relevanter *Phosphosites* (Koser et al. 2019)

PKA: ProteinkinaseA, PKG: ProteinkinaseG, ERK2: Extracellular-signal regulated Kinase 2, CaMKII: Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, PP5: Protein-Phosphatase 5, Ig: Immunglobulin-Domäne

1.3.2 Titin-Degradation – T2/T1-Ratio und Titin-Ubiquitinierung

Eine weitere betrachtete Größe in dieser Arbeit ist die Art und der Umfang des Titinabbaus. Der Hintergrund dieser Untersuchungen ist, dass quergestreifte Muskulatur auf mechanischen Stress durch einen strukturellen Umbau reagiert (Bogomolovas et al. 2021). Titin ist ein Protein, dass viele wichtige Funktionen im Bereich der Mechanotransduktion der Zelle übernimmt und folglich einer konstanten mechanischen Belastung unterliegt. Entsprechend muss Titin eine präzise kontrollierten Protein-Qualitäts-Kontrolle durchlaufen (Borbély et al. 2009).

In diesem Zusammenhang ist das Protein Titin von besonderem Interesse, da es dafür bekannt ist die Muskelreaktion auf Stress hervorzurufen (Kötter et al. 2014). Es wird vermutet, dass dehnungsinduzierte Konformationsänderungen in Titin, Bindungsstellen im Filament freilegen, die eine Assoziation mit Serin/Threonin-Kinasen ermöglichen (Lange et al. 2005), wobei es kaum experimentelle Beweise hierfür gibt (Bogomolovas et al. 2021).

Wahrscheinlich wird das Titinmolekül zunächst durch proteolytische Spaltung aus dem Sarkomerverbund gelöst, bevor die Molekülfragmente anschließend durch Mechanismen des proteasomalen und autophagosomalen Abbaus prozessiert werden (Kötter und Krüger 2022; Müller et al. 2021).

Die T2/T1-Ratio von Titin beschreibt, wie aus der Formel ersichtlich, das Verhältnis von T2 zu T1. Die T2-Abbaubande ist ein spezifisches Titinabbauprodukt (Müller et al. 2021). Sie ist ein Produkt des Vorverdauungsprozess von Titin, also ein Abbauzwischenprodukt (Linke und Hamdani 2014). T1 beschreibt die Gesamtheit des zellulären Titins, sodass der Quotient T2/T1 je mehr er sich der Zahl eins nähert, einen vermehrten Abbau von Titin nahelegt.

Zur Untersuchung der Degradation von Titin kann die Analyse einer charakteristischen Titin-Degradationsbande erfolgen. Im Rahmen einer densitometrischen Analyse kann die Bandenintensität der sogenannten T2-Bande, ins Verhältnis der Bandenintensität der beiden kardialen Isoformen N2B + N2BA (T1) gesetzt werden. So wird die T2/T1-Ratio betrachtet.

Um die Funktionalität des proteasomalen Titin-Abbaus zu bestimmen, kann mittels Western blot Analyse, die Titin-Ubiquitinierung bestimmt werden, da eine

Polyubiquitinierung das Signal für den proteasomalen Abbau ist (Müller et al. 2021). Das Ubiquitin-Proteasom-System ist mit 90% für den weit überwiegenden Teil des Abbaus von fehlerhaften oder geschädigten Proteinen in Säugerzellen verantwortlich (Pagan et al. 2013), sodass eine Einschränkung des proteasomalen Systems zu einem verminderten Abbau und damit zu einer Anreicherung fehlerhafter Proteine führen würde. Es wird vermutet, dass dies für intrinsische Toxizität in den Kardiomyozyten sorgen könnte (Willemsen et al. 2022).

Das Proteasom setzt sich in gesunden Zellen aus einer katalytischen 20-S-Untereinheit und einer, beziehungsweise zwei 19-S-Untereinheiten zusammen. Durch Bindung einer 19-S-Untereinheit entsteht ein 26-S-Proteasomkomplex, binden zwei 19-S-Untereinheiten entsteht ein 30-S-Komplex. Ubiquitin selber ist ein kleines, globuläres Protein, bestehend aus 76 Aminosäuren, mit einer Molekülmasse von 8kDa. Während Mono- und Multiubiquitinierung noch intrazelluläre Prozesse anregen und Endozytose hervorrufen, ist erst die Polyubiquitinierung das Signal für den proteosomalen Abbau (Spänig et al. 2019).

Der Abbau eines Proteins erfolgt grob beschrieben in 2 Schritten, der Bindung von Ubiquitinmolekülen an das Substrat, also die Polyubiquitinierung und der eigentliche Abbau des Zielproteins durch den 26-S-Proteasomkomplex. Die Ubiquitinmoleküle werden abschließende freigesetzt und können wiederverwendet werden (Ciechanover und Schwartz 1998). Eine wichtige Rolle spielen auch die Ligasen E1 bis E3. Zunächst wird Ubiquitin aktiviert, durch Bildung eines Thiolester-Zwischenprodukts am C-terminalen Glycin aktiviert, katalysiert durch E1. Nun kommt eines von mehreren E2-Enzymen zum Einsatz, sie werden auch als Ubiquitin-konjugierende Enzyme bezeichnet, da sie die aktivierte Ubiquitin-Einheit von E1 auf ein Mitglied der E3-Familie, der Ubiquitin-Protein-Ligase, übertragen. An dieses Enzym ist auch das Substratprotein spezifisch gebunden. Der letzte Schritt ist nun die Bindung des aktivierten Ubiquitin an dieses Substrat. Dieser Schritt wird von E3 katalysiert (vgl. Abbildung 5). Über die Bindung weiterer aktivierter Ubiquitinmoleküle an den Lysinrest des jeweils schon gebundenen Ubiquitin wird eine Ubiquitinkette gebildet, eine Polyubiquitinierung, die als Erkennungsstruktur für das Proteasom dient. Die Ubiquitin-Subform K48 oder methyliertes Ubiquitin können sich nicht an der Polyubiquitinierung beteiligen, da sie kein weiteres Ubiquitin binden, sodass sie als Terminatoren der Kettenbildung dienen. Das ist der Grund, weshalb sie, bei hoher Expression, auch die Proteolyse hemmen

können. Nachdem das Protein zum Abbau markiert wurde, wird es auf das Proteasom übertragen. Die Enzyme E2 und E3 werden recycelt und das Proteasom zerkleinert die großen Peptidketten, bis sie in Aminosäuren aufgespalten sind, die ebenso wie die Enzyme und das Ubiquitin einem Recycling zugeführt werden können (Schmidt und Kloetzel 1997).

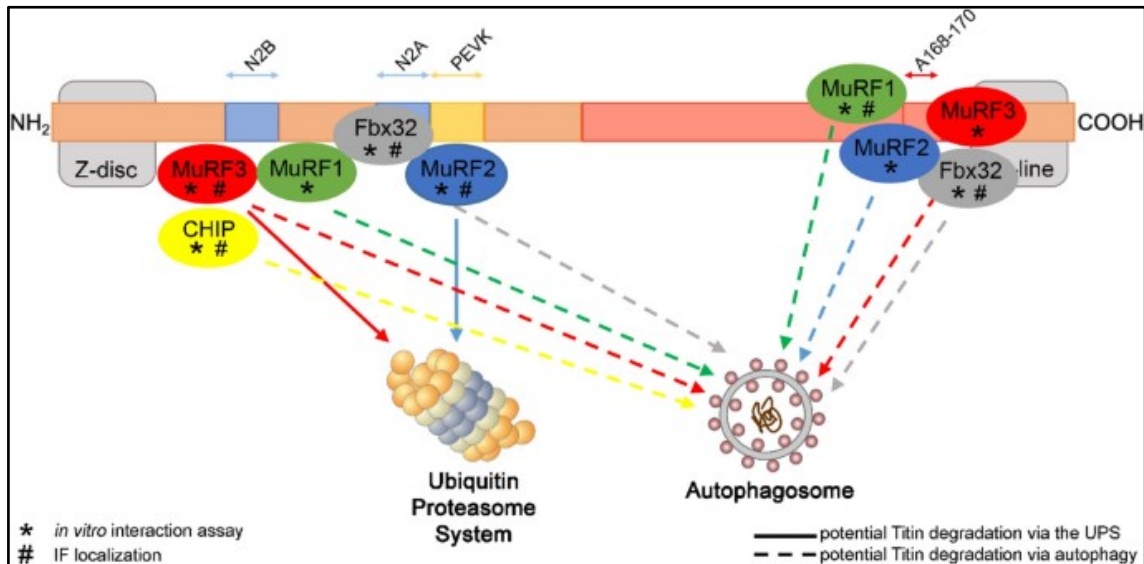


Abb. 5: Titinubiquitinierung (modifiziert nach Müller et al. 2021)

Schematische Darstellung der E3-Ligase-Wechselwirkung und Modifikation des Titinfilaments. Es wird eine mögliche Regulierung der E3-Ligase –basierten Titinubiquitinierung und des anschließenden Abbaus durch Autophagosomen oder das Proteasom dargestellt. Gerade Linien verdeutlichen den Abbau über das Proteasom und gestrichelte Linien über das Autophagosom (Müller et al. 2021).

MuRF1: Muscle-Ring-Finger-Protein1, MuRF2: Muscle-Ring-Finger-Protein2, MuRF3: Muscle-Ring-Finger-Protein3, CHIP: carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein, Fbx32: F-Box-Protein 32, A168-170: Titindomänen 168-170

1.4 Diabetesinduzierte Veränderungen des Titins und bekannte Auswirkungen von LDs

Diabetes mellitus Typ2 ist eine der häufigsten Erkrankungen in westlichen Industrieländern, die neben der charakterisierenden Pathologie, der Insulinresistenz, durch dauerhaft hohe Blutzuckerspiegel und daraus resultierend einer Überbeanspruchung der β -Zellen des Pankreas, mit einer folgenden Erschöpfung dieser Zellen, auch mit vielen Manifestationen an anderen Organen assoziiert ist (Kenny und Abel 2019). Bei der Beurteilung der Relevanz dieser Patientengruppe ist zu beachten, dass in der EU 17% der Erwachsenen zwischen 20 und 74 Jahren adipös sind (*Products - Health E Stats - Overweight, Obesity, and Extreme Obesity Among Adults 2007-2008* 2023) und Adipositas als eine wichtige Komorbidität des Diabetesmellitus Typ2 gilt, die diese Erkrankung auch mit auslösen kann (Toplak et al. 2016). In Kombination erhöhen die beiden Erkrankungen das Mortalitätsrisiko auf das 7-Fache (Hossain et al. 2007). Es zeigt sich also eine hohe gesamtgesellschaftliche Relevanz des hier untersuchten Erkrankungsbildes.

Zu den erwähnten Manifestationen gehört unter anderem auch die diabetische Kardiomyopathie, also eine funktionelle Einschränkung des Herzmuskels, besser bekannt als Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (Methawasin und Granzier 2018). Früh zeigen sich insbesondere eine asymptomatische diastolische Dysfunktion und als Spätfund eine systolische Dysfunktion, die in Kombination mit der diastolischen Dysfunktion auftritt. Die diabetische Kardiomyopathie muss entsprechend unter Berücksichtigung der ventrikulären Funktion behandelt werden und unterscheidet sich in dieser Hinsicht nicht von Myokardiopathien anderer Ätiologien (Okoshi et al. 2007). In klinischen und experimentellen Studien zeigte sich, dass Diabetes mellitus myokardiale Hypertrophie, Nekrose und Apoptose hervorruft und das interstitielle Gewebe vermehrt (Okoshi et al. 2007). Die Pathophysiologie der Erkrankung ist noch nicht vollständig verstanden, es scheinen verschiedene metabolische Störungen eine Rolle zu spielen, beispielsweise Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie, die wiederum auf molekularbiologischer Ebene negative Folgen auf die Herzfunktion haben (Okoshi et al. 2007). Hierbei wird die diabetische Kardiomyopathie besonders mit einer pathologischen Veränderung der molekularen Feder Titin auf der Ebene des Sarkomers assoziiert (Hopf et al. 2018). In Tierexperimenten an Mäusen zeigte sich, dass durch posttranslationale Modifikation des Titin, nach kardialer Ischämie und Reperfusion, die Steifigkeit von

Kardiomyozyten akut erhöht wird. Das gilt als funktionelle Adaption von vitalem Myokardgewebe (Kötter et al. 2016). Zu dieser Adaption gehören eine veränderte Expression kalziumregulierender Proteine, nämlich einer verminderten Phosphorylierung von Phospholamban, was wiederum zu einer Hemmung der SERCAa und somit zu dauerhaft erhöhten Calciumspiegeln führt. Auch eine Titinversteifung zählt zu diesen Adaptionen. Ähnliche adaptive Vorgänge scheinen im diabetischen Herzen schon vorher induziert zu werden, wodurch eine zusätzliche Adaption, beispielsweise an eine Myokardischämie nicht mehr möglich zu sein scheint (Funk et al. 2022). So konnte in Kardiomyozyten eine diabetes-abhängig erhöhte passive Steifigkeit des Titins identifiziert werden (Hopf et al. 2018; Borbély et al. 2009; Falcão-Pires et al. 2011), eine zusätzliche Adaption der Kardiomyozytensteifigkeit als Antwort auf eine Ischämie/Reperfusion war im Tiermodell allerdings lediglich in nicht-diabetischen Tieren, nicht aber in Tieren mit einem diabetischen Phänotyp nachweisbar (Funk et al. 2022).

Bisher sind die Ursachen dieser pathologischen Veränderung noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise auf hormonadaptierte Veränderungen von Titin, wie eine starke Phosphorylierungszunahme der N2Bus-Domäne, an S4010, durch Insulin, was eine verringerte Steifigkeit der Kardiomyozyten durch Insulin implementiert (Hopf et al. 2018), (vgl. Abbildung 6), bei Diabetikern mit Insulinmangel kommt es so womöglich adaptiv zu einer erhöhten Steifigkeit. Außerdem zeigte sich in diabetischen Mäusen eine hohe Aktivität der ProteinkinaseC (PKC), die für die Phosphorylierung der PEVK-Domäne verantwortlich ist und so eine höhere passive Steifigkeit induzieren kann (Funk et al. 2022). Abseits dieser speziellen Veränderungen wird allgemein angenommen, dass die diabetische Kardiomyopathie als Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels metabolischer Anomalien, die mit Diabetes einhergehen und den zellulären Folgen ist, die daraus resultieren und Veränderungen in der myokardialen Struktur führen (Poornima et al. 2006). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Anstieg von Serumlipiden, Glucose und Insulin eine Veränderung von Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten induziert, was mit einer veränderten Genexpression einhergeht und Veränderungen in der Substratverwertung und dem Wachstum von Herzmuskelzellen hervorruft, ebenso wie es mit endothelialer Dysfunktion und Zunahme der myokardialen Steifigkeit assoziiert ist (Hayat et al. 2004). In Studien an diabetischen leptinrezeptordefizienten Mäusen wurde auch gezeigt, dass es in diabetischen und

adipösen Tieren zu einer massiven Akkumulation von *Lipid droplets* in den Kardiomyozyten kommt (Funk et al. 2022).

Kardiomyozyten akkumulieren unter physiologischen Bedingungen keine *Lipid droplets*. Diese intrazelluläre Veränderung tritt in Folge von Übergewicht, beziehungsweise Diabetes mellitus oder Ischämie auf (Barba et al. 2009; Zuo et al. 2020; Saito et al. 2013). Erwähnt wurden bereits der Zusammenhang von Diabetes mit Adipositas und Hyperlipidämie, als möglichen Induktoren von *Lipid droplets* im Herzmuskel. Es stellt sich nun die Frage, ob die Akkumulation von *Lipid droplets* ursächlich für eine erhöhte Steifigkeit von Titin sein kann, mit dem Ziel auf diese Weise die Sarkomerstabilität zu verbessern und die Myokarde vor der mechanischen Belastung durch die *Lipid droplets* zu schützen.

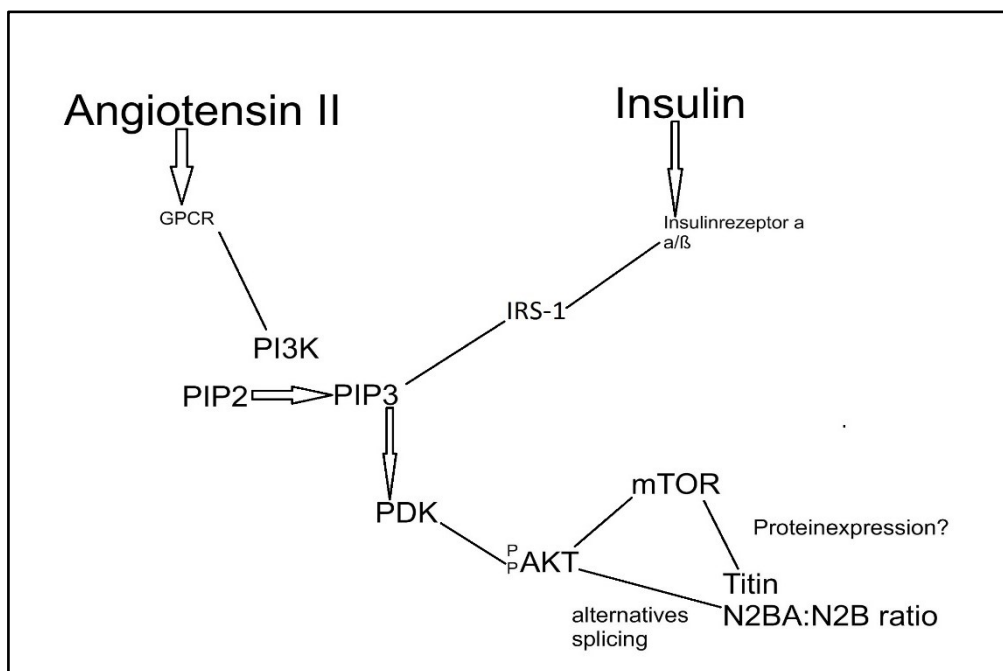


Abb. 6: Der Einfluss von Insulin auf die Titin Isoformen Zusammensetzung (modifiziert nach Krüger et al. 2010)

Eine Zusammenfassung der wichtigsten bekannten Signalwege und ihrer Auswirkungen zur insulinabhängigen Isoformenexpression von Titin (Krüger et al. 2010).

GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen, PIP2: Phosphoinositoldiphosphat, PIP3: Phosphoinositoltriphosphat, IRS-1: Insulin receptor substrate 1, PDK: Phosphoinositid dependent kinase, AKT: ProteinkinaseB, mTOR: mammalian target of Rapamycin

1.5 *Lipid droplets* – Vorkommen, Aufbau und Funktion

Lipid droplets, also Fetttropfchen, sind Speicherorganellen, deren physiologische Hauptfunktion im Bereich der Lipid- und Energiehomöostase liegt. Der Aufbau ist charakterisiert durch einen hydrophoben Kern aus neutralen Lipiden, der von einer Phospholipideinzelschicht umgeben ist (vgl. Abbildung 7). Auf dieser finden sich verschiedene Proteine assoziiert. *Lipid droplets* können, wenn sie im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden, Verbindungen mit anderen Zellorganellen eingehen. Diese Kopplungen scheinen jedoch hochdynamisch und mit dem Status der *Lipid droplets* gekoppelt zu sein (Olzmann und Carvalho 2019).

Über die Auswirkungen von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten ist bisher wenig bekannt. Titin ist ein sehr großes und komplexes Protein im Herzmuskel, das als Knotenpunkt in der Signaltransduktion dient (Linke 2008), sodass es von hohem Interesse ist, zu erfahren, ob *Lipid droplets* auch Titin und die *Sarkomerfunktion* beeinflussen.

Lipid droplets variieren in ihrer Anzahl und Größe stark, abhängig vom Stoffwechselzustand der Zelle, in der sie lokalisiert sind, was ihre Funktion in der Energiehomöostase unterstreicht (Olzmann und Carvalho 2019).

Die Fetttropfchen werden am endoplasmatischen Retikulum gebildet, unter Beteiligung verschiedener Enzyme. Besonders wichtige Bausteine sind Sterolester und Triacylglyceride (Sorger et al. 2004). Die Proteine, die an den *LDs* assoziiert sind können auf verschiedenen Wegen gekoppelt werden. Dabei werden die Proteine, bezogen auf ihren Insertionsmechanismus, in zwei Klassen eingeteilt. Lipidtröpfchenproteine der Klasse eins fügen sich in das endoplasmatische Retikulum ein, diffundieren seitlich in der Membran und treten in die sich bildenden Lipidtröpfchen ein. Proteine der Klasse zwei treten direkt über das Zytosol oder Fettsäuremodifikationen in die *Lipid droplets* ein (Olzmann und Carvalho 2019).

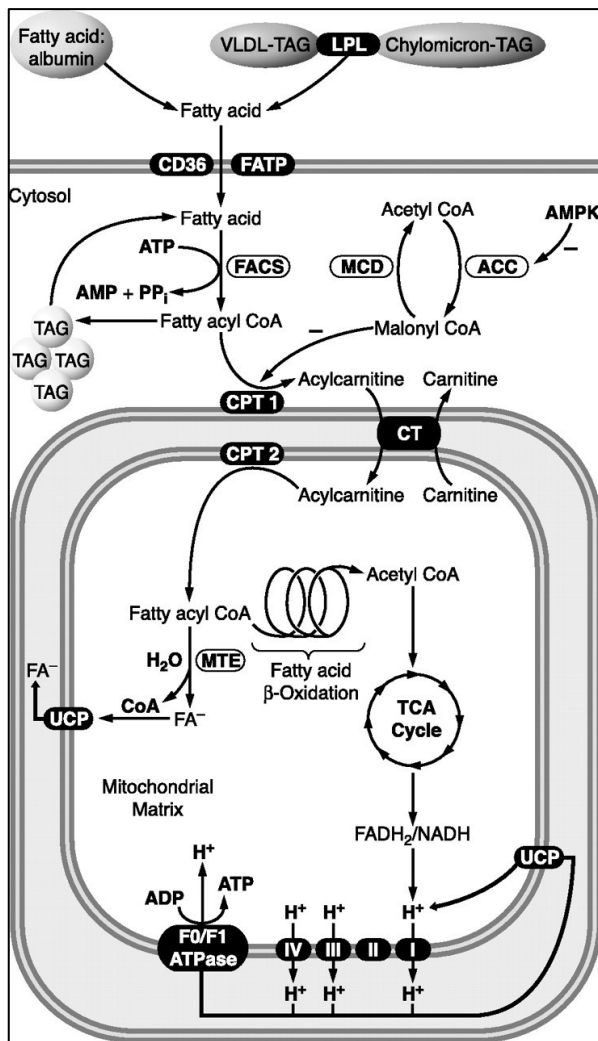


Abb. 7: Überblick der Fettsäureoxidation im Herzen (modifiziert nach Lopaschuk et al. 2010)

Fettsäuren, die zur oxidativen Energiegewinnung im Myokard genutzt werden, stammen überwiegend aus dem Plasma (gebunden an Albumin) oder aus Triacylglycerinen (TAG) in Chylomikronen und VLDL. Der zelluläre Import erfolgt über Diffusion oder Transportproteine wie CD36 und FATP. Im Zytosol werden die Fettsäuren durch Fettsäure-CoA-Synthetase (FACS) zu Fettsäure-CoA aktiviert, welches entweder in komplexe Lipide eingebaut oder über Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) auf Carnitin übertragen wird. Das so gebildete Acylcarnitin gelangt in die Mitochondrien und wird durch CPT2 zurück in Fettsäure-CoA umgewandelt. Dieses wird in der β -Oxidation abgebaut, wobei Acetyl-CoA, NADH und FADH₂ entstehen. Unter bestimmten Bedingungen kann mitochondriale Thioesterase (MTE) langkettiges Acyl-CoA zu freien Fettsäuren (FA⁻) spalten, die über Uncoupling-Proteine die mitochondriale Matrix verlassen können (Lopaschuk et al. 2010).

Im adulten Herzen gibt es verschiedene Möglichkeiten der Energiegewinnung (Lopaschuk et al. 2010), trotzdem wird der Großteil des Energiebedarfs aus der Oxidation von Fettsäuren gedeckt. Diese werden zumeist aus Triacylglyceriden gewonnen (vgl. Abbildung 7), die durch Lipoproteine bereitgestellt werden und von der Lipoproteinlipase, auf der Lumenoberfläche des Koronararterienendothel abgebaut werden (Pulinilkunnil et al. 2003). *Lipid droplets* ermöglichen durch ihre Wechselwirkung mit Mitochondrien eine effiziente Bereitstellung von Fettsäuren für die Energieproduktion, sind aber auch an der Aufrechterhaltung der Organellen- und Membranhomöostase beteiligt. Sie regulieren die Membranzusammensetzung, verhindern die Lipidperoxidation und entfernen beschädigte Lipide und Proteine (Jarc und Petan 2019). Auch an Albumin gebundene Fettsäuren aus Adipozyten können für die Energiegewinnung im Herzen genutzt werden. Die Fettsäuren können dann mithilfe von Carriern oder Diffusion die Plasmamembran überwinden (van der Vusse et al. 2000), sie werden dann zu aktivierten Fettsäuren, Fettsäure-Acyl-Coenzym-A-Estern, umgewandelt, die dem intrazellulären Metabolismus zur Verfügung stehen (Ellis et al. 2011). Nun können sie entweder in der β -Oxidation verbraucht werden oder zu Triacylglyceriden verestert werden, um in Form von *Lipid droplets* gespeichert zu werden (Pulinilkunnil et al. 2003). Zu einer Bildung von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten kommt es, bei einem massiven Überschuss freier Fettsäuren in den Zellen. Die Ursachen für diesen Zustand können beispielsweise eine verminderte β -Oxidation, wie bei Ischämie oder eine metabolische Erkrankung wie Diabetes_mellitus_Typ2 sein. Unter physiologischen Umständen kommt es allerdings nicht zu einer Akkumulation der *Lipid droplets*, da das Herz einen hohen Energiebedarf hat, der insbesondere durch die Fettsäureoxidation gedeckt wird (Huang et al. 2022).

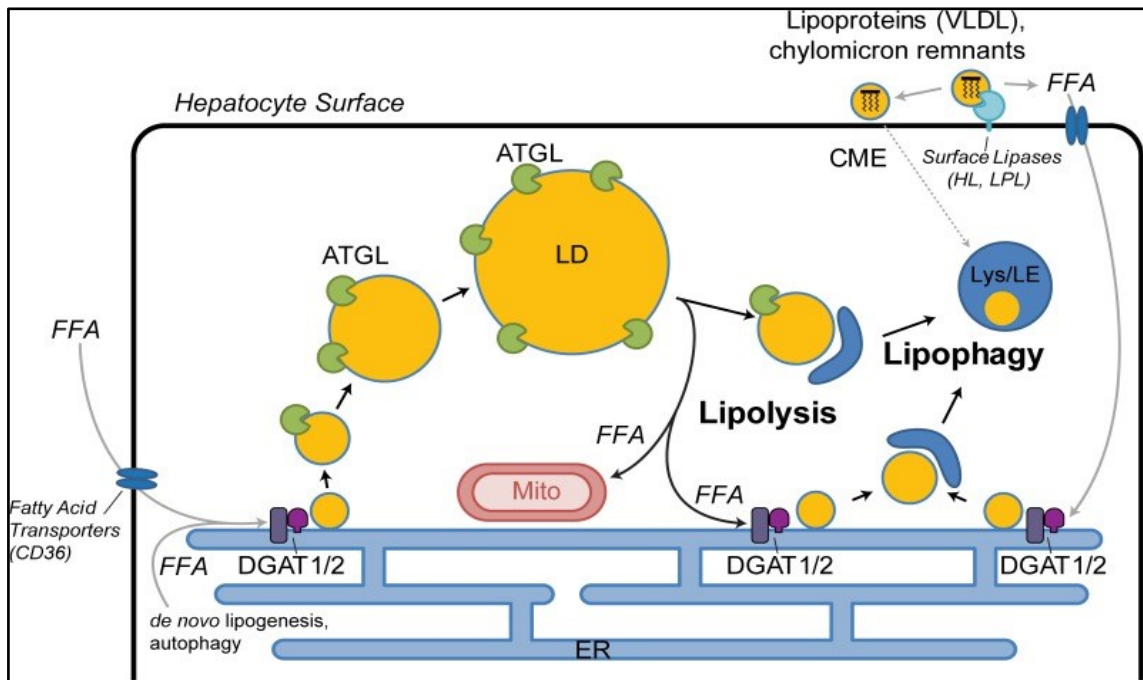


Abb. 8: Lipid droplets (modifiziert nach Schott et al. 2019)

Beispielhafte Darstellung der Synthese von *Lipid droplets* und schematische Darstellung des Aufbaus von *Lipid droplets* (Schott et al. 2019).

FFA: freie Fettsäuren, LD: *Lipid droplets*, VLDL: very low density lipoprotein, CME: clathrin-mediated endocytosis, DGAT1/2: Diacylglycerol acyltransferase 1/2, Mito: Mitochondrium, Lys/LE: Lysosom/late endosome, HL: hepatische Lipase, LPL: Lipoproteinlipase, ER: endoplasmatisches Retikulum, ATGL: Adipose Triglyceride Lipase

1.5.1 *Lipid droplet* assoziierte Proteine

Es gibt verschieden Proteine, die von *Lipid droplets* gebildet werden, beziehungsweise Einfluss auf die metabolischen und regulatorischen Funktionen dieser Organellen nehmen. Man bezeichnet sie entsprechend als *Lipid droplet associated proteins*, also mit *Lipid droplets* assoziierte Proteine.

Lipid droplet assoziierte Proteine können nach ihrem Insertionsmechanismus in die *Lipid droplets*, oder nach ihrer Funktion eingeteilt werden. Teilt man die Proteine nach ihrer Funktion ein ergibt sich eine Vielzahl funktioneller Klassen. Viele Proteine sind Enzyme des Lipidstoffwechsels, die Wachstum und Abbau von *Lipid droplets* vermitteln. Hierzu gehören auch die sogenannten Perilipine (auch Plin genannt), die; nach bisherigen Erkenntnissen; vornehmlich eine Gerüstfunktion erfüllen, jedoch auch an vielfältigen regulatorischen Aufgaben beteiligt sein können (Roberts und Olzmann 2020). Beispiele dieser Perilipine sind Plin1, Plin2 und Plin3. Da die *Lipid droplets* oft eng mit anderen Zellorganellen assoziiert sind und dabei Aufgaben im Zellmetabolismus übernehmen (vgl. Abbildung 9); ist es schwierig, die echten *Lipid droplet* assoziierten Proteine zu identifizieren (Walther und Farese 2012).

Für die Oberfläche der *Lipid droplets*, die aus einer Phospholipideinzelschicht besteht, ist eine Zusammensetzung integraler und peripherer Proteine charakteristisch, die in ihrer Gesamtheit das Proteom der *Lipid droplets*, also die *Lipid droplet* assoziierten Protein bilden (Bersuker und Olzmann 2017). Außerdem ist es *Lipid droplets* möglich Proteine vorübergehend zu speichern, die andernfalls aggregieren würden (Cole et al. 2002). Welche Mechanismen für die Anlagerung von Proteinen an *Lipid droplets* verantwortlich sind ist noch nicht im Detail gesichert. So ist eine Bindung über amphiphile Helices an der Oberfläche möglich, ebenso die Einbettung von hydrophoben Regionen am N-Terminus. Auch die Einbettung interner Proteindomänen, die die *Lipid droplets* mit hydrophoben Spannen durchdringen, Lipidanker oder Wechselwirkungen mit anderen *Lipid droplet* gebundenen Proteinen sind denkbar. Für einige dieser Hypothesen gibt es bereits Beispiel wie das HCV-Core-Protein, das *amphipathische* Helices als Targeting-Signal erhält (Walther und Farese 2012).

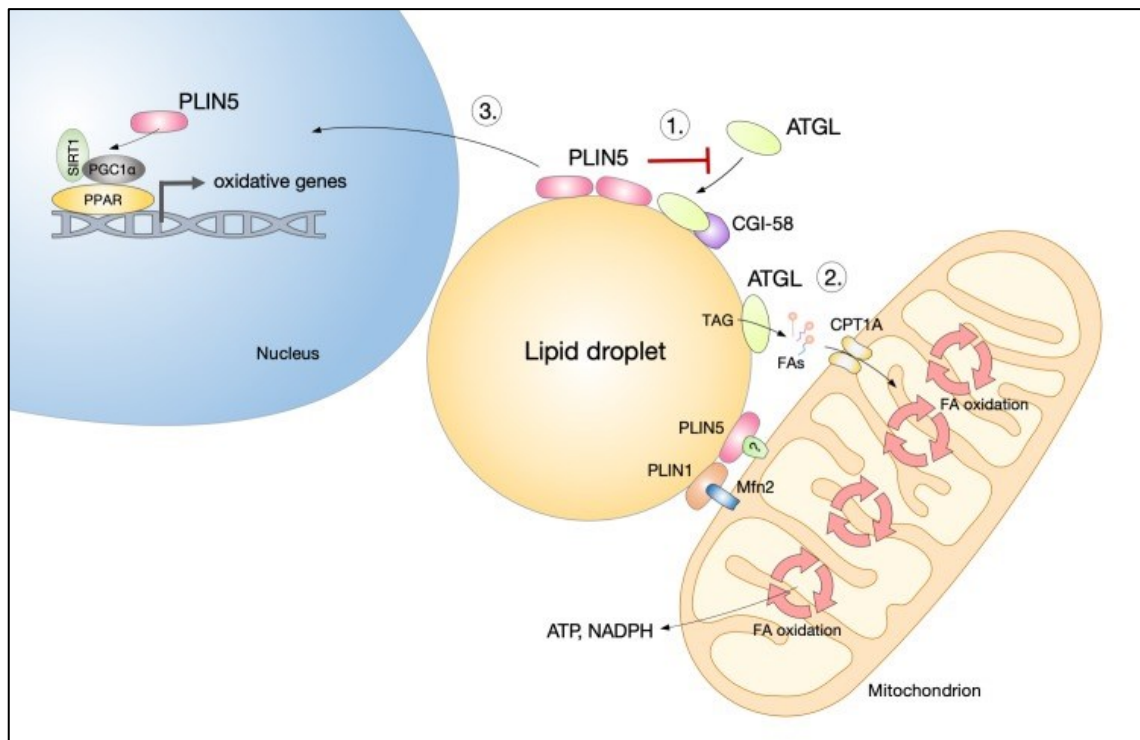


Abb. 9: Funktionen von Perilipin 5 (PLIN5) an Lipidtröpfchen und Mitochondrien Proteine (modifiziert nach Jarc und Petan 2019)

PLIN5 ist ein Lipidtröpfchen-assoziiertes Protein, das eine zentrale Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels und der mitochondrialen Funktion spielt. Es wirkt über drei wesentliche Mechanismen: (1) Bei Lipidüberladung bildet PLIN5 eine Barriere gegen unkontrollierte Lipolyse, indem es die Aktivität der Adipozyten-Triacylglycerinlipase (ATGL) und ihres Koaktivators CGI-58 hemmt – dies schützt die Zelle vor Lipotoxizität und Insulinresistenz. (2) Während Nährstoffmangel unterstützt PLIN5 den gerichteten Transport von Fettsäuren von Lipidtröpfchen zu Mitochondrien und fördert so deren energetische Nutzung; dabei vermittelt es auch eine physikalische Nähe der Organellen. (3) Unter katabolen Bedingungen wie Fasten oder Katecholamin-Stimulation wandert PLIN5 in den Zellkern und kooperiert dort mit SIRT1 und PGC1 α , was zur Aktivierung mitochondrialer Gene führt (Jarc und Petan 2019).

Perilipine sind die ersten bekannten Markerproteine für *Lipid droplets* gewesen (Greenberg et al. 1991), sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Lipidstoffwechsels der *Lipid droplets* (Bulankina et al. 2009), sind allerdings für die *Lipid droplet* Bildung nicht essentiell. In allen Zellen, die *Lipid droplets* enthalten finden sich auf den dortigen *Lipid droplets* die Perilipine 2 und 3 (vgl. Abbildung 10), während die Subtypen 1, 4 und 5 nur in speziellen Zelltypen exprimiert werden (Sztalryd und Brasaemle 2017). So findet sich Perilipin 1 beispielsweise vor allem in weißen Adipozyten, während Perilipin 5 in stark oxidativen Zelltypen, wie Kardiomyozyten, exprimiert wird (Walther und Farese 2012). Auch Perilipin 4 findet sich ebenfalls in

Kardiomyozyten, Myozyten und Adipozyten (Zhang et al. 2022). Perilipin2 wird auch im Herzen stark exprimiert, wobei seine Funktion für den Stoffwechsel des Organs, beziehungsweise der Grund für die Expressierung noch nicht vollständig erforscht ist (Mardani et al. 2019). Es wird vermutet, dass Perilipin2 eine stabilisierende Funktion für die *Lipid droplets* hat. Eine weitere Bezeichnung für dieses, nur mit *Lipid droplets* assoziierte Protein, ist *Adipophilin* (DiDonato und Brasaemle 2003). Funktion der Perilipine ist in erster Linie der Schutz der *Lipid droplets* vor dem Einfluss von Lipasen, dabei sind ihre Expression und ihre Schutzfunktion an die spezifischen Körperzellen und das dort vorherrschende Gleichgewicht zwischen Lipidspeicherung und Lipidverwendung angepasst. Hierbei kommen auch Kontrollmechanismen zum Einsatz, die wiederum durch Phosphorylierungen moduliert werden können (Sztalryd und Brasaemle 2017).

In Mausmodellen konnte nicht nur eine Variabilität der *Lipid droplet* assoziierten Proteine abhängig vom Gewebetyp festgestellt werden, sondern auch eine Anpassung an den Stoffwechselzustand (Brasaemle et al. 2004). So werden in einem gesättigten Organismus Glucose und Fettsäuren in Adipozyten genutzt, um Triacylglyceride zu synthetisieren. Perilipin1 spielt hier eine wichtige Rolle, da es die Lipolyse blockiert und so eine Bildung von *Lipid droplets* überhaupt ermöglicht (Martinez-Botas et al. 2000). Kommt es nun zu einem erhöhten Energiebedarf, so wird über β -adrenerge Rezeptoren auf der Plasmamembran von Adipozyten, über hormonelle Stimulation die Phosphorylierung von Perilipin1 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase begünstigt und die Lipolyse wird eingeleitet. Ein ähnliches Phänomen ist für Perilipin2 in der Leber und dem Pankreas beschrieben. Hier induzierte eine vermehrte Expression von Perilipin2 eine Verringerung der Leber-Triglyceride und eine erhöhte hepatische Insulinsensitivität, was nahelegt, dass es eine entscheidende Rolle in der Bereitstellung von Energie durch die Fettsäureoxidation spielt (Tong et al. 2020). Die Expression von Perilipin2 im Herzen passt zu diesen Ergebnissen, da auch das Herz einen hohen Energiebedarf hat, den es besonders durch Fettsäureoxidation deckt (Pulinilkunnil et al. 2003). Eine ähnliche Funktion des Perilipin2 in Kardiomyozyten, wie in den Pankreas- und Leberzellen ist also denkbar.

Auch Pathologien wie Übergewicht wirkten sich auf die Oberflächenproteine der *Lipid droplets* aus (Crunk et al. 2013). So änderte sich in Versuchen im Mausmodell, an *Lipid droplets* in Hepatozyten, durch eine Hochfett-Diät im Vergleich zu einer Niedrigfett-Diät

die Zusammensetzung der Oberflächenproteine. Es stellte sich heraus, dass sich diese Proteinzusammensetzung in den metabolischen Eigenschaften der Leber widerspiegelte und so der Energiestoffwechsel von Mäusen beeinflusst wurde. Während die Tiere die eine Niedrigfett-Diät erhielten vor allem Kohlenhydrate als Energiequelle nutzten, war für die Tiere, die eine veränderte Proteinzusammensetzung auf den *Lipid droplets*, in Folge der Hochfett-Diät aufwiesen, die Fettsäureoxidation der primäre Weg der Energiegewinnung (Crunk et al. 2013).

Menschen zeigten Veränderungen der Perilipine in Leber- und Fettgewebsbiopsien, in Patienten die eine Insulinresistenz und eine nichtalkoholische Fettlebererkrankung hatten (Su et al. 2014). Das *Lipid droplet*-Proteom ist einzigartig und reguliert sowohl den Lebenszyklus, als auch die Funktionen der *Lipid droplets*, es ist dabei in die zellulären Proteinqualitätskontrollwege eingebunden, was einen physiologischen Umbau des Proteoms erst ermöglicht (Roberts und Olzmann 2020).

Die genaue Ursache für die Akkumulation von *Lipid droplets* ist noch nicht ausreichend erforscht, ein denkbarer Grund wäre jedoch, dass aufgrund einer anaeroben Stoffwechsellage freie Fettsäuren nicht mehr oxidiert werden und die Zelle vor das Problem stellen toxische Substanzen nicht abbauen zu können. Indem *Lipid droplets* gebildet werden kann die toxische Wirkung der freien Fettsäuren abgemildert werden, ohne Sauerstoff zu verbrauchen. Eine entscheidende Rolle in diesen Prozessen scheint das *Lipid droplet* assoziierte Protein PLIN5 zu spielen. Es reguliert die Fettsäureoxidation herunter und fördert die Bildung intrazellulärer *Lipid droplets*, wodurch ihm im Fall einer Ischämie eine kardioprotektive Wirkung nachgesagt wird (Zheng et al. 2017). So ergibt die Akkumulation nach Ischämien, beispielsweise im Herzmuskel (Barba et al. 2009), durchaus Sinn. Untersuchungen zeigten, dass *Lipid droplets* eine Reduktion des Calcium-Overload und von freien Fettsäuren im Herzen, unter pathologischen Umständen begünstigen (Barba et al. 2009).

Einige Zellen vermitteln auch die Expression der sogenannten CIDE-Proteinfamilie, die eine regulierte Fusion von *Lipid droplets* vermitteln. Teil eines Zelltod-induzierenden Signalweges sind Rab-Guanosintriphosphatasen. Sie sorgen für eine autophagische Clearance (Roberts und Olzmann 2020). Der genaue Mechanismus ist bisher kaum verstanden, es ist allerdings bekannt, dass eine verstärkte Rab10-Aktivität mit einer erhöhten Assoziation autophagischer Membranen an der *Lipid droplet* Oberfläche

einhergeht, während eine Störung der Rab10-Funktion mit einer *Lipid droplet* Akkumulation in Verbindung gebracht wird (Li et al. 2016).

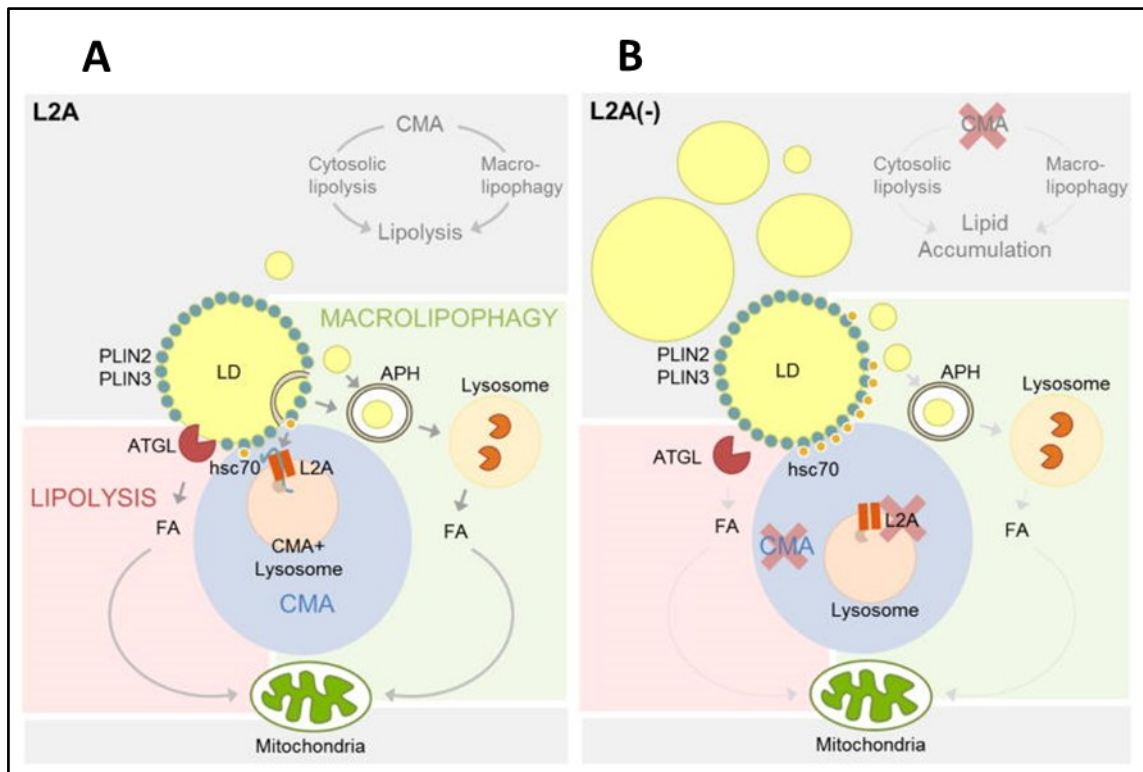


Abb. 10: Schema des Zusammenspiels von CMA mit zytosolischer und lysosomaler Lipolyse durch PLIN2- und PLIN3-Abbau (modifiziert nach Kaushik und Cuervo 2015)

(A): Entfernung und Abbau der mit Lipidtröpfchen (LD) assoziierten Proteine PLIN2 und PLIN3 durch CMA. CMA erleichtert den Zugang des Lipidkerns zur zytosolischen Lipase ATGL. In ähnlicher Weise ermöglicht die Eliminierung von PLINs auch Proteinen, die an der Autophagosomenbildung (ATG) beteiligt sind, sich an den LD zu verankern und die Sequestrierung von LD-Regionen in Autophagosomen (APH) zur Abgabe an Lysosomen zum Abbau (Makrolipophagie) einzuleiten.

(B): Wenn die CMA-Aktivität beeinträchtigt ist, verhindert die Unfähigkeit, PLINs von der Oberfläche des LD zu entfernen, den Zugang von ATGL und ATGs zum Lipidkern und hemmt die Lipolyse über beide Wege (zytosolische Lipasen und Makrolipophagie) (Kaushik und Cuervo 2015).

CMA: Zelladhäsionsmoleküle, ATG: Autophagosomenbildung, PLIN2: Perilipin2, PLIN3: Perilipin 3, LD: Lipid droplet, APH: Autophagosom, FA: Fettsäure, ATGL: Adipöse Triglycerid Lipase, hsc70: heat shock cognate protein 70

Es wird deutlich, dass eine Vielzahl von Prozessen und Interaktionen mit *Lipid droplets* und den *Lipid droplet* assoziierten Proteinen in Verbindung gebracht werden und viele Mechanismen noch einer genaueren Erforschung bedürfen.

1.5.2 Etablierung von *Lipid droplets* in Zellkulturen

Die Etablierung von *Lipid droplets* in Zellkulturen war eines der primären Ziele dieser Arbeit. Gefordert war die Etablierung eines Protokolls, welches die Induktion der Fetttröpfchen in Zellkulturen sicherstellen sollte, sodass weitere Experimente mit den derartig veränderten Zellen möglich sein sollten. *Lipid droplets* werden zwar in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, doch die größten und am einfachsten zu detektierenden finden sich in weißem Fettgewebe (Murphy et al. 2001), während in Kardiomyozyten, die hier untersucht wurden, unter normalen Umständen keine *Lipid droplets* akkumulieren (Barba et al. 2009). Neben ihrer Funktion in Kardiomyozyten, die in dieser Arbeit genauer beleuchtet wird, können *Lipid droplets* als Zellorganellen auch bei nicht kardialen Pathologien eine Rolle spielen. So wurde die Bedeutung bei mehreren Tumorarten des Menschen festgestellt (Leitner et al. 2022), was die Bedeutung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung der LDs unterstreicht. Festzuhalten bleibt allerdings, dass *Lipid droplets* nicht zwingend mit pathologischen Prozessen assoziiert sind, sondern in vielen Geweben unter physiologischen Umständen exprimiert werden und mannigfaltige Aufgaben und Funktionen haben, zu denen auch die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase gehört (Murphy et al. 2001). In der Literatur gibt es verschiedene, jedoch ähnliche, Ansätze, die dies ermöglichen. Im Allgemeinen werden in diesen Ansätzen Zellen zunächst durch Präparationen gewonnen oder Zelllinien kultiviert. Diese Zellen werden dann für eine bestimmte Zeit mit Fettsäuren inkubiert, wobei sich *Lipid droplets* bilden (Barba et al. 2009). Allerdings unterscheiden sich hierbei die verwendeten Mengen der Fettsäuren und die Inkubationsdauer. Besonders erfolgversprechend erschien im Vorfeld dieser Arbeit die Vorgehensweise, die von Barba et al 2009 beschrieben wurde. Die Zellen wurden in diesen Experimenten jeweils mit einer Mischung aus 4% BSA und vierprozentigem Kalbsserummedium inkubiert. Das Oleat wurde mit einer Konzentration von 35mM und 0,2mg/dl BSA in Lösung gegeben, von dieser wurden dann 0,05-2mmol/l den Zellen hinzugegeben. Adaptiert an die jeweiligen Zellen wurde die Inkubationsdauer angepasst, adulte Rattenkardiomyozyten wurden dabei 4h inkubiert, um Dedifferenzierungen zu vermeiden, während HL-1 Zellen über Nacht mit Oleat beladen wurden. Ähnliche Konzentrationen und Inkubationszeiten für das Oleat wurden in weiteren Publikationen verwendet, wobei besonders auf die Relevanz der Komplexbildung mit BSA hingewiesen wurde, denn diese mindere die toxische Wirkung des Oleats auf die Zellen (Jüngst). In einer anderen Publikation wurden Fibroblasten und

eine Zelllinie untersucht. Hierfür wurden die Zellen erneut mit einem Nährmedium kultiviert, das in diesem Fall mit 10% bovinem Serumalbumin versetzt wurde. Die Inkubationsbedingungen waren erneut die standardisierten 37°C und 5% CO₂. Isobutylmethylxanthine wurden in Kombination mit Insulin und einem Cortisonderivat hinzugefügt. Die Konzentration der Isobutylmethylxanthine betrug dabei 0,5mM. Der Hauptbestandteil der Inkubationslösung blieb dabei das Medium, das alle 24h bei einer Gesamtinkubationszeit von 72h gewechselt wurde. Die Fettsäure wurde schließlich in einer Konzentration von 6:1 für 24h hinzugefügt, bevor die Zellen mit Methanol fixiert wurden (DiDonato und Brasaemle 2003). Dieses Experiment macht, im Vergleich zu der Publikation von Barba et al, deutlich, welche Fortschritte in der Erforschung von *Lipid droplets* und besonders ihrer Kultivierung in den letzten Jahrzehnten gemacht wurden. Exemplarisch lässt sich an den Publikationen von Barba et al und DiDonato et al nämlich erkennen, dass es eine Tendenz zu geringeren Inkubationszeiten und deutlich vereinfachten Versuchsprotokollen über die Jahre gab. Anstatt den Versuchsaufbau zu verändern, oder andere Variablen als die Fettsäure zu verändern, wurden vor allem die Fettsäurekonzentration und die Dauer der Inkubation der Zellen mit eben jener modifiziert. Auf diese Weise wurden die Experimente einfacher durchzuführen und weniger zeitaufwendig, was für die Forschung an *Lipid droplets* als extrem hilfreich zu bewerten ist. Auf dasselbe Ergebnis zielte auch diese Arbeit ab, indem versucht wurde eine möglichst kurze Inkubationsdauer der Zellen zu finden, die aber eine Bildung von *Lipid droplets* ermöglichte. Dabei war es auch wichtig eine möglichst geringe Konzentration des Oleats zu finden. So war es das Ziel eine gewisse Effizienz in der Nutzung der Materialien zu erreichen, aber natürlich auch ein zu erwartende Dedifferenzierung der Zellen durch die potentiell toxischen Substanzen, wie Oleat und Ethanol zu vermeiden.

1.5.3 Pathologische Effekte von *Lipid droplets*

Prinzipiell ist das Vorkommen von *Lipid droplets* in nahezu allen Geweben möglich, die für diese Arbeit interessante Akkumulation in Kardiomyozyten scheint jedoch speziell im Zuge pathologischer Prozesse, wie Übergewicht oder Ischämie, eine Rolle zu spielen (Barba et al. 2009). In Studien zeigte sich, dass *Lipid droplets* ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Stressreaktion sind (Jarc und Petan 2019).

Auf biochemischer Ebene sind, vor allem nach pathologischen Prozessen, protektive Wirkungen der *Lipid droplets* beschrieben, wie eine Speicherung toxischer freier Fettsäuren oder auch die Pufferung einer zytosolischen Calciumüberladung durch die Aufnahme von Calciumionen (Barba et al. 2009). Trotzdem ist zu bedenken, dass Lipide neben ihrer interaktiven Funktion mit Zellorganellen, sowie ihrer Rolle im Energiestoffwechsel, in ihrer dysregulierten Form, auch toxisch wirken können (Schaffer 2003).

Neben dem physiologischen Vorkommen der *Lipid droplets* kommt es auch bei vielen Krankheiten mit gestörtem Lipidstoffwechsel zu einer Zunahme von *Lipid droplets* (Krahmer et al. 2013). Besonders häufige Ursachen für die Akkumulation der *Lipid droplets* im Mausmodell, sind Modifikationen der Ernährung und genetische Störungen (Chitraju et al. 2012). Außerhalb des Fettgewebes werden *Lipid droplets* vor allem mit Zellstress assoziiert, der sowohl durch freie Fettsäuren, Nährstoffentzug oder Redox-Ungleichgewicht ausgelöst werden kann. In diesen Zusammenhängen scheinen die *Lipid droplets* protektiv für das betroffene Organ zu wirken (Welte und Gould 2017).

Auch eine Beschränkung auf die positiven Effekte der *Lipid droplets* ist also durchaus denkbar, die unter anderem die Speicherung von toxischen freien Fettsäuren und eine Reduktion des Calcium-Overload nach Ischämie und Reperfusion umfassen (Barba et al. 2009). Außerdem sind sie Bestandteil autophagischer Prozesse und fungieren als Reservoir bioaktiver Lipide, die Entzündungen und Immunität regulieren. Sie sind also, biochemisch betrachtet, zentrale Manager des Lipidstoffwechsels, die als Schutzmechanismen gegen verschiedene Arten von zellulärem Stress fungieren (Jarc und Petan 2019). Beschränkt man sich also nur auf die bekannten biochemischen Funktionen von *Lipid droplets* und lässt die vermuteten mechanischen Auswirkungen außer Acht, würde es sich lohnen sie nicht nur als Symptom pathologischer Prozesse zu betrachten,

sondern sie könnten ebenso, als Kompensationsmechanismus des Herzmuskels charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurden *Lipid droplets* jedoch als Ursache von Pathologien untersucht. Denn auch, wenn *Lipid droplets* erst im Zuge von Pathologien im Herzen auftreten ist es durchaus denkbar, dass sie in einer Art Dominoeffekt weitere pathologische Prozesse hervorrufen, indem sie beispielsweise die zelluläre Integrität von Kardiomyozyten stören.

1.6 Zielsetzung:

Lipid droplets (LD) sind kleine Fetttropfchen, die in Zellen nahezu jeden Gewebes akkumulieren können (Huang et al. 2022). Sie bestehen aus einem neutralen Kern, der vor allem aus Triacylglyceriden (TAGs) und Sterolestern besteht. Dieser Kern wird von einer Schicht Phospholipide umgeben, auf der sich auch verschiedene Proteine, sogenannte *Lipid droplet associated proteins* (LDAP) befinden (Barba et al. 2009). Diese haben verschiedene metabolische Funktionen und ermöglichen zellinterne, sowie endokrinologische Interaktionen der *Lipid droplets*. Das Herz hat einen hohen Energieverbrauch, den es vor allem aus neutralen Lipiden, die in Form von *Lipid droplets* gespeichert werden deckt (Huang et al. 2022). Trotzdem werden dort normalerweise keine LDs akkumuliert (Barba et al. 2009). Nichtsdestotrotz kann es durch Fasten, oder pathologische Umstände wie Ischämie oder Übergewicht zu einer Bildung von *Lipid droplets* im Herzen kommen (Barba et al. 2009). In Studien an Maus- und Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass *Lipid droplets* eine protektive Funktion bei Ischämie und Reperfusion haben können, indem sie, durch die Aufnahme von Calcium und freien Fettsäuren, die Zytotoxizität senken (Barba et al. 2009). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung, sogenannter *Lipid droplets*, auf die Funktion des Herzmuskels untersucht, speziell auf das Sarkomer, also die kleinste kontraktile Einheit des Muskels. Dabei wurde das Protein Titin untersucht, speziell auch die Unterschiede in diabetischen und gesunden Herzen. Auch die Etablierung eines Protokolls zur Induktion von *Lipid droplets* in Zellkulturen mit Kardiomyozyten hatte in diesem Zusammenhang, sowie im Hinblick auf spätere Forschung, eine hohe Relevanz. Die zentralen Fragen, die sich stellten, waren somit, ob eine kurzzeitige Inkubation mit Oleat an adulten Kardiomyozyten der Maus zu einer Akkumulation von *Lipid droplets* führt, welche Folgen diese Akkumulation auf die Zelldimensionen und die Expression, Degradation und akute posttranslationale Modifikation des Sarkomerproteins Titin hat. So sollte eine Aussage getroffen werden können, ob *Lipid droplets* in Kardiomyozyten an den bei diabetischen Herzen beobachteten Veränderungen von Titin beteiligt sein könnten. Hierzu sollten das Titinisoformenverhältnis, als Hinweis auf mögliche Veränderungen der Titinsteifigkeit und die T2/T1-Ratio, das Verhältnis des Gesamttitins zum degradierten Anteil, als Hinweis auf den Titinabbau, bestimmt werden. Zur weiteren Erforschung dieses Zusammenhanges wurden die Titinphosphorylierungen der PEVK-Region untersucht als Marker für eine erhöhte Steifigkeit. Des Weiteren sollte überprüft

werden welchen Einfluss die *LD*-Akkumulation auf die Zellgröße, die Sarkomerlänge und Sarkomerdichte hat. Das Protein Titin wirkt im Herzmuskel wie eine Feder und erhöht adaptiv nach Ischämie und Reperfusion die Steifigkeit der Kardiomyozyten. Dabei spielen vor allem posttranslationale Modifikationen der elastischen I-Band Region eine Rolle. Auf diese Weise wird eine funktionelle Adaption des vitalen Myokardgewebes vermittelt (Kötter et al. 2016). Diese Adaption scheint jedoch in diabetischen Tieren gestört zu sein (Hopf et al. 2018).

2 Material und Methoden:

2.1 Material

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Blebbistatin	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
2,3Butandionmonoxim (BDM)	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Carnitin	Sigma
Creatin	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent) (LösungA und LösungB)	Immobilon
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
FBS (fetales Bovine Serum)	Sigma
Gelatine 1%	VWR
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Heparin	Calbiochem
Heparin-Natrium-25000IE	Ratiopharm
HEPES	Sigma

HCS LipidTox™	Thermo Fischer
Imperial protein stain	Thermo Scientific
Immersionsöl	Roth
Isofluran	Baxter AG
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
KollagenaseTypII	Merck
Laminin	Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x6H ₂ O)	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydroxid	Roth
NGS (Normal Goat Serum)	Thermo Fisher
NonidentP40	Sigma
Oleic acid (Oleat)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
PFA (Paraformaledhyd)	Sigma
Phenolrot	Sigma
PhosphataseinhibitorA	bimake
PhosphataseinhibitorB	bimake
ProLong™ Gold antifade reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Protease	Sigma
Proteaseinhibitor Cocktail (P8340)	Sigma
Proteinladder	Thermo Scientific
Pyruvat	Sigma
Salzsäure 32%	VWR
Saponin	Sigma

Serva Blue	Serva Electrophoresis GMBH
β -Mercaptoethanol	Sigma
Taurin	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris	Roth
Triton	Sigma
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

2.1.2 Puffer und Lösungen

Im Rahmen der Versuche wurde mit den in *Tabelle 2* erwähnten Puffern und Lösungen gearbeitet.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzungen
10xSDS-Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10xTBST (pH 7,4)	0,2M Tris/HCl 1,5M NaCl 1% Tween-20
4xSDS Sammelgelpuffer (pH6,8)	0,5M Tris/HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4xSDS Trenngelpuffer (pH8,8)	1,5M Tris/HCl 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH8,8)	300mM Tris/HCl 100mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x-TBST
Bradford-Reagenz 1L (Coomassie-Lösung)	40% (400ml) Methanol 10% (100ml) Essigsäure 50% (500ml) dH ₂ O 0,1% (1g) Serva Blue
BSA-Lösung (1ml)	0,2mg/ml; 0,04g BSA 20ml dH ₂ O
CaCl ₂ Stock (Tage oder Wochen vorher abwiegen, am Tag des Gebrauch mit Wasser füllen, maximal eine Woche im Kühlschrank lagern)	100M (0.0735g/0.147g) CaCl ₂ Dihydrat – (5mL / 10mL) H ₂ O
Enzym Lösung Kollagenase	0,02000g Kollagenase 20mL H ₂ O
Heparinlösung	4mg Heparin in Perfusionspuffer

Hoch-Kalzium-Lösung	0,4mM CaCl ₂ 1,5mM BSA in Perfusionspuffer
Kathodenpuffer (pH8,7)	300mM Aminocaprinsäure 30mM Tris/HCl
Laminin + 0,5%Gelatine / PBS	5mL 1% Gelatine 5mL PBS 200µL Laminin
LipidSpot-Lösung	Kulturmedium 0,5mM HTC LipidTox™
Oleat-BSA-Lösung	35mM Oleat 0,2mg/mL BSA-Lösung Kulturmedium
Niedrig-Kalziumlösung	0,2mM CaCl ₂ 1.5mM BSA in Perfusionspuffer
Perfusionspuffer (pH7,3)	130mM NaCl 5,4mM KCl 1,25mM MgCl ₂ 0,33mM NaH ₂ PO ₄ 25mM HEPES 20mM Glukose 3mM Pyruvate 5mM Creatin 2mM Carnitin 5mM Taurin
2% PFA in PBS	20µl/ml PFA 980µL/ml PBS
Phosphate buffered saline (PBS)	150mM Natriumchlorid 2.5mM Kaliumchlorid 1.5mM Kaliumdihydrogenphosphat 3mM Natriumdihydrogenphosphat
PufferI	58.44M (1.9g/250mL H ₂ O) NaCl

	74.55M (0.1g/250mL H ₂ O) KCl 203.206M (0.0635g/250mL H ₂ O) MgCl ₂ ·6H ₂ O
PufferII (dunkle Flasche, da HEPES licht-sensitiv ist) (pH7.30-7.35 auf Eis) (30min mit O ₂ auf Eis begasen)	84.01M (0.0336g/100mL H ₂ O) NaH ₂ CO ₃ 238.206M (0.2384g/100mL H ₂ O) HEPES 180.16M (0.5405g/100mL H ₂ O) BDM 180.16M (0,198g/100mL H ₂ O) Glucose – (5mL/100mL H ₂ O) PufferI
PufferIII (pH7.30-7.35)	84.01M (0.034g/100mL H ₂ O) NaH ₂ CO ₃ 238.206M (0.238g/100mL H ₂ O) HEPES 180.16M (0.198g/100mL H ₂ O) Glucose – (5mL/100mL H ₂ O) PufferI
PVDF destain	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
PVDF stain	0.075% Serva Blue in Methanol
Restore Stripping Buffer	Thermo Fischer
Schneidelösung	100nM CaCl ₂ 6U/ml Protease 85U/ml KollagenaseTyp2 1,5mM BSA in Perfusionspuffer
Stripping Buffer	6M Guanidinhydrochlorid 20mM Tris 0.2% NonidentP40 0.1M β-Mercaptoethanol
Titinprobenpuffer (50ml)	8M (24g) Urea 2M (7,6g) Thiourea 12mL Tris (1,5g) 3%SDS (15mg) 0,035Serva blue 5mL 10% Glycerol
3% Triton Lösung	97ml/100ml PBS

	3ml/100ml Triton
Verdauungspuffer	50nM CaCl ₂ 6U/ml Protease 85U/ml KollagenaseTyp2 in Perfusionspuffer
Wasch-Puffer I (niedriges Ca)	20µL CaCl ₂ 0.2g BSA 10mL PufferII
Wasch-Puffer II (mittleres Ca)	40µL CaCl ₂ 0.2g BSA 5mL PufferII 5mL PufferIII
Wasch-Puffer III (hohes Ca)	80µL CaCl ₂ 0.2g BSA 5mL PufferIII

2.1.3 Kulturmedien für Mauskardiomyozyten

Die Mauskardiomyozyten wurden in den in Tabelle 3 aufgeführten Kulturmedien kultiviert.

Tabelle 3: Kulturmedien für Mauskardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium 10% FBS <i>M199 Hank's culture medium</i>	10% FBS superior 1% Penicillin/Streptomycin 5mM Creatin 2mM Carnitin 5mM Taurin 10mM HEPES 12,5nM Blebbistatin
Kulturmedium 4% FBS <i>M199 Hank's culture medium</i>	4% FBS superior 1% Penicillin/Streptomycin 5mM Creatin 2mM Carnitin 5mM Taurin 10mM HEPES 12,5nM Blebbistatin
Resuspensionsmedium <i>M199 Hank's culture medium</i>	10% FBS superior 1% Penicillin/Streptomycin 5mM Creatin 2mM Carnitin 5mM Taurin 10mM HEPES

2.1.4 Laborgeräte

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 4: Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Brutschrank	Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Deckplättchen	CB00120RA120MNZ0	Roth
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Feinwaage	AE163	Mettler
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ti-E	Nikon
Fluoreszenzmikroskop		Keyence
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Magnetrührer	RTC basic	IKA
Mikroskop	AE 2000	Motic
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Mikrozentrifuge	mini CX73.1	Roth
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
Objektträger	ISO8037/1	Marienfeld
PC-Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
Perfusionssystem für isolierte Mäuseherzen	T206	Transonic Systems

pH-Meter	MP 220	Mettler Tornado
Pinzette	chirurgische Pinzette	DUMONT
Pipette	Messpipette	eppendorf
Reagentienschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Spritzenperfusor	Pump 11 Elite	Havard Apparatus
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Thermomixer/Heizblock	Compact 5350	Eppendorf
Thermostate	Thermo C10	Haake
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Mili Q	Milipore
Wasserbad	PF-5500	Grant
Wasserbad	3042	Köttermann
Zellschaber	83.1832	Sarsted
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettrich Zentrifugen

2.1.5 Antikörper

Die für Western Blots und Färbungen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller/ Bestellnummer
Perilipin2 (Plin2) (Immunhistochemie)	1:100	Kaninchen	Abcam #ab52356
alpha-Aktinin (Immunhistochemie)	1:500	Maus	Sigma #A7332
PEVK12022	phospho: 1:2000 pan: 1:3000	Kaninchen	Eurogentec

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller/ Bestellnummer
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase- linked	1:5000 (Standard) 1:3000 (Titin)	Ziege	Cellsignaling #7074
Anti-rabbit IgG Fabc Alexa Fluor555	1:500	Ziege	Cellsignaling #4413
Anti-rabbit IgG Fabc Alexa Fluor488	1:500	Ziege	Cellsignaling #4412
Anti-mouse IgG, HRP- linked Antibody	1:3000	Ziege	Cellsignaling #7076

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Präparation von Mauskardiomyozyten

Die Kardiomyozyten für das Zellkulturmodell wurden aus den Herzen adulter Mäuse vom Stamm C57/BL6, im Alter von 8-12 Wochen, isoliert. Die Tiere wurden durch einen Genickbruch getötet. Über einen Dreiecksschnitt mit einer Schere wurden die Thoraces eröffnet und die Herzen sofort mithilfe von einer Pinzette entnommen. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte, ebenso wie die Entnahme der Organe, durch speziell geschulte Mitarbeiter des Instituts, nach den Vorgaben der örtlichen Behörden. Das gemäß der Versuchstiermeldeordnung vergebene Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität lautet O29/11.

In den Versuchen wurden adulte Mäuse vom Wildtyp und adulte Ratten vom Wildtyp als Tiere zur Probengewinnung gewählt. Um einen Vergleich zu diabetischen Tieren herstellen zu können wurden Mäuse vom db/db Typ verwendet, sowie die entsprechenden db+ Kontrolltiere. Die db/db Tiere sind leptinrezeptordefizient, was bedeutet sie haben einen diabetischen Phänotyp. Die db+ Tiere sind heterozygot, weshalb sie keinen pathologischen Phänotyp entwickeln. Die mutierten Tiere wurden bei der Firma Charles River bestellt und hatten zum Zeitpunkt der Organentnahme ein Alter von 10-12 Wochen. Die zugehörige Tierversuchsnummer lautet AZ 81-02.04.2023.A117.

Zu Beginn wurde eine Laminin+0.5%Gelatine/PBS-Lösung (s. Tabelle 3) hergestellt und jeweils 1mL der Lösung auf ein Well einer 6-Well-Platte aufgebracht. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ für zwei Stunden inkubiert.

Dann wurde ein Langendorffperfusor vorbereitet. Zu diesem Zweck wurde in der Apparatur eine enzymatische Kollagenaselösung bis zum Drei-Wege-Hahn laufen gelassen und sichergestellt, dass keine Luftblasen zurückblieben. Ein Behältnis, welches Puffer II (s. Tabelle 3) enthielt, wurde mittels Eis gekühlt. Die Schläuche wurden erst mit Ethanol, dann mit Wasser und schließlich Medium gespült, wobei sichergestellt wurde, dass keine Luftblasen gebildet wurden. Schließlich wurde eine Spritze mit 150µL Heparin aufgezogen und mit der Spitze in einem mit Puffer II gefüllten Behältnis installiert.

Die Herzen wurden nun für 27 Minuten mithilfe einer Kollagenaselösung verdaut und anschließend mithilfe einer Pinzette abgenommen und vollständig solubilisiert.

Die entstandene Lösung wurde dann für eine Minute bei 500rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt. Zu den verbleibenden Zellen wurden 10mL des Wasch-Puffer II (s. Tabelle 3) hinzugefügt, die Lösung wurde erneut für eine Minute bei 500rpm zentrifugiert und schließlich der Überstand entfernt. Daraufhin wurden den Zellen 10mL des Wasch-Puffer III (s. Tabelle 3) hinzugefügt, die Lösung wurde für eine Minute bei 500rpm zentrifugiert und am Schluss erneut der Überstand entfernt.

Dann wurden zu 10mL Kulturmedium (4% FBS) je 100µL Phosphataseinhibitor A, Phosphataseinhibitor B, Proteaseinhibitor und 10µL Blebbistatin hinzugefügt. Von dem entstandenen Medium wurden 2mL zu den Zellen gefügt. Die 6-Well-Platte wurde aus dem Inkubator genommen und die Lamininlösung abgenommen. Die Wells wurden jeweils mit 1mL PBS gewaschen und dann in jedes Well 1mL des mit Blebbistatin und den Inhibitoren versetzten Mediums pipettiert. Nun wurden die Platten im Inkubator bei 37°C, 21% Sauerstoff und 5% CO₂ für drei Stunden kultiviert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen und so zu verhindern, dass ein toxisches Milieu entstand. Im Anschluss konnten die Zellen ihrer weiteren experimentellen Verwendung zugeführt werden.

2.2.2 Zellkultur und Präparation von Rattenkardiomyozyten

Die Kulturplatten wurden vorbereitet, indem eine Lamininlösung (s. Tabelle 3) hergestellt wurde und die 6-Well-Platten jeweils mit 1ml der Lamininlösung beschichtet wurden. Dann wurden die Platten für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, indem das Laminin abgenommen wurde und jeweils 1mL PBS aufgebracht wurde. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 10% FBS (s. Tabelle 4), mit 1,5mL pro Well, kultiviert und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entnommen, um tote Zellen zu entfernen und die Zytotoxizität zu verringern. Nun wurde Kulturmedium mit 4% FBS (s. Tabelle 4) aufgebracht, welches, gemäß der experimentellen Verwendung der Zellen mit verschiedenen Ingredienzen versetzt war. Für Zellen, die als Kontrolle dienen sollten, wurde reines Medium ohne weitere Zusätze verwendet. Die weitere Inkubation der Zellen überschritt in der finalen Versuchsanordnung nie sechs Stunden.

Eine Langendorffanlage wurde vorbereitet, indem ein Wasserbad auf 40°C vorgeheizt wurde. Der Perfusionspuffer (s. Tabelle 3) wurde 30min mit Sauerstoff begast und aufgewärmt. Die Schläuche des Systems wurden anschließend zunächst mit Ethanol, dann mit Wasser und anschließend mit Perfusionspuffer gespült. Luftblasen wurden entfernt und die Rollpumpe auf eine Geschwindigkeit von 28ml/min eingestellt.

Zur Gewinnung der Zellen wurden Wistar-Ratten mit Isofluran betäubt und heparinisiert, indem ihnen 200µL Heparin pro Kilogramm Körpergewicht injiziert wurden. Anschließend wurden sie durch Dekapitation getötet. Der Bauchraum wurde am Zwerchfell und durch einen Dreiecksschnitt der Thorax eröffnet. Das Herz wurde oberhalb des Aortenbogens abgesetzt, in kalte Heparin Lösung (s. Tabelle 3) gelegt und gewogen.

Die Rollpumpe wurde, nach dem Abwiegen des Herzens, auf eine Geschwindigkeit von 30-32 (entspricht ca. 7ml/min) eingestellt und der Perfusionspuffer wurde laufen gelassen. Das Herz wurde an der Aorta aufgehängt und mit einem Faden fixiert. Nun konnte es für ca. fünf Minuten mit warmen Perfusionspuffer und Heparin (11U/ml) bei 100% Sauerstoffsättigung gespült werden, bis klare Tropfen austraten. Nachfolgend wurde es für 25-38min mit Verdauungspuffer (s. Tabelle 3) perfundiert, wobei die exakte Dauer vom Gewicht des Herzens abhängig gemacht wurde (s. Tabelle 10).

Sobald das Herz durch den Verdau hellrosa verfärbte, wurde es abgenommen, mittels zwei Spitzen Pinzetten in einer Petrischale mit Schneidelösung (s. Tabelle 3) zerkleinert, dann in einen 50mL Falcon mit vorgewärmter Schneidelösung für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und alle fünf Minuten durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch ein Zellsieb, mit 200µm großen Filtern gegossen und dann für 2min bei 500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und den Zellen low Calcium Puffer (s. Tabelle 3) hinzugefügt und bei 500rpm für eine Minute zentrifugiert. Nun wurde wieder der Überstand verworfen, den Zellen high Calcium Puffer (s. Tabelle 3) hinzugefügt und erneut bei 500rpm für eine Minute zentrifugiert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde auch der Überstand verworfen, nun aber vorgewärmtes Resuspensionsmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C für 10min ruhen gelassen. In einem letzten Schritt wurden die Zellen wieder bei 500rpm für 1min zentrifugiert, anschließend der Überstand entfernt und ein Kulturmedium hinzugefügt, das 12,5nM Blebbistatin zur Verhinderung der Kontraktion der Zellen enthielt. Für drei bis sieben Stunden oder über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank bei 21% Sauerstoff, 5% CO₂ und 37°C aufbewahrt und dann experimentellen Behandlungen zugeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.3 Induzierung und Färbung von *Lipid droplets* in der Zellkultur

Um die *Lipid droplets* (LD) in der Zellkultur zu etablieren, wurden die Kulturen drei Stunden nach der Ansetzung, beim Wechsel des Kulturmediums, zum Herausfiltern toter Zellen, mit einer Oleat-BSA-Lösung beimpft. Verwendet wurden verschiedene Zellkultur Platten, mit sechs bis zwölf Vertiefungen, wobei die untersuchten Zellen aus den Herzen von Ratten und Mäusen stammten. Es wurden sowohl Platten mit Deckplättchen für mikroskopische Untersuchungen als auch Platten ohne weitere Vorrichtungen, für proteinbiochemische Untersuchungen verwendet.

Um die Oleat-BSA-Lösung herzustellen wurde die Oleinsäure zunächst auf 37°C erwärmt, bis sie sich vollkommen verflüssigt hatte. Anschließend wurde sie in Aliquots pipettiert und bei -20°C gelagert. Danach wurde eine BSA-Lösung mit 0,2mg/ml BSA in dH₂O hergestellt. Hierfür wurden 0,04g BSA und 20ml dH₂O vermischt. Auch die BSA-Lösung wurde bei -20°C eingelagert.

1mL einer Oleat-NaCl-Lösung, mit einer Verdünnung von 35mmol/l, wurden hergestellt, indem 11,045µL/mL Oleat und 989µL 0,9% NaCl, mithilfe eines Vortex-Gerätes, miteinander vermischt wurden, bis eine milchig weiße Substanz entstand. Dies entspricht einer Menge von 0,24µL Oleat und 21,29µL NaCl pro Vertiefung in den Zellkulturschalen. Diese Mischung wurde anschließend auf 70°C erwärmt und im Verhältnis 1:1 mit der BSA-Lösung vermischt, die vorher auf 37°C erwärmt wurde. Die Verdünnung des Oleats betrug entsprechend 35mM.

Dann wurden 43µL der Oleat-NaCl-BSA-Lösung in 1,5ml Zellkulturmedium (s. Tabelle 3) verdünnt, sodass eine Konzentration von 0,5mmol/l Oleat erreicht wurde. Anschließend wurde die Lösung den Zellkulturen beim ersten Mediumwechsel nach drei Stunden hinzugefügt und für sechs Stunden bei 21% Sauerstoff und 5% CO₂ inkubiert.

Bei den Zellen, die mit einem Deckgläschen besetzt waren, wurde nach Ablauf der gewählten Zeit, das mit Oleinsäure versetzte Medium abgenommen und die Kulturen einmal mit 1,5ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit einer Pinzette aus den Kulturschalen genommen und auf Korkstücke in einer feuchten Kammer transferiert. Diese Kammer besteht aus einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Schale, welche, nach Ende der Behandlung der Deckplättchen, mit einem Deckel verschlossen wurde. Auf diesen Korkstücken konnte jedes Deckplättchen nun mit 100µL einer Lösung aus 2% PFA und PBS beimpft werden. Nach 20min Inkubation bei Raumtemperatur waren die

Zellen fixiert. Das PFA wurde entfernt und es erfolgten drei Waschschr tte mit 100 L PBS für jedes Deckplättchen. Die Zellen konnten nun im Kühlschrank bei 5 C gelagert werden, oder einer sofortigen Verwendung zugeführt werden.

Auch bei den Proben, die kein Deckgläschen enthielten, wurde zunächst die Mischung aus Oleinsäure und Medium abpipettiert und es erfolgte ein Waschschr tt mit 1,5mL PBS. Die Wells der Zellkulturplatten wurden nun mit 100 L Titinprobenpuffer, gemischt mit 40 L dTT pro 800 L Puffer, bestückt und mittels eines Schabers wurden die Zellen vom Untergrund mobilisiert. Die so in Lösung gebrachten Zellen wurden in Eppendorf-Gefäße transferiert und drei min bei 95 C erhitzt. Dann wurden die Proben bei -20 C gelagert, um sie später für die Western-Blot-Analysen zu benutzen.

2.2.4 Gewebeauflösung und Bradford-Assay

Eine Alternative zur Zellgewinnung aus Zellkulturen, ist die Solubilisierung von gefrorenen Kardiomyozyten. Dieses Verfahren wurde zur Herstellung von Kontrollproben, für die Western Blot Analysen der aus den Zellkulturen gewonnenen Proben, angewendet. Für das Verfahren wurde ein Kübel Eis benötigt, sowie 800µL Titinprobenpuffer und 40µL dTT welche vermischt wurden. Außerdem eine Gewebeprobe, eine Uhrenglas, eine Pinzette, ein Eppendorff-Gefäß, ein großes und ein kleines Skalpell.

Zur Vorbereitung wurden alle Materialien in die Eisbox gelegt und Trockeneis auf dem Uhrenglas platziert. Daneben wurde die Gewebeprobe gelegt, von der mithilfe der Skalpelle und der Pinzette ein kleines Stück abgetrennt wurde. Im Anschluss wurden 150µL der Mischung aus Titinprobenpuffer und dTT dem Gewebe hinzugefügt und in der Mixtur wurde die Probe mithilfe der Werkzeuge aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen in der Pufferlösung in ein Eppendorff-Gefäß transferiert und die Proteinkonzentration in der Probe wurde, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, mit dem Bradford-Assay bestimmt.

2.2.4.1 Bradford-Assay

Zur Quantifizierung des Gesamtproteins in den Zellkulturen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Prinzip der Protein-Farbstoff-Bindung genutzt.

Um die Zellkultur analysieren zu können, mussten zunächst die Zellen von den 6-Well-Platten geerntet werden. Aus diesem Grund wurde das Medium mithilfe einer Pipette abgenommen. Dann wurden in einem sauberen Eppendorff-Gefäß 800µL Titinpuffer mit 40µL dTT gemischt. Mit einer Pipette wurden 20µL der Lösung in die Mitte eines Wells transferiert und mit einem Schaber verteilt, sodass die Zellen gelöst wurden. Dann wurde die Platte schräg gehalten und die in der Flüssigkeit enthaltenen Zellen mithilfe des Schabers am unteren Rand gesammelt. Nun konnte die Flüssigkeit in ein sauberes Eppendorff-Gefäß pipettiert werden. So wurde mit allen vorhandenen Wells verfahren.

Dann wurden alle Proben bei 96°C für drei Minuten erwärmt, anschließend in einer kleinen Zentrifuge bei 13000xg zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorff-Gefäße pipettiert. Eine Negativkontrolle aus 800µL Wasser und 200µL Bradford-Lösung

wurde angefertigt, ebenso wie eine Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:5, aus 8µL Wasser und 2µL Probe. Die Durchmischung der Reagenzien erfolgte mittels Vortex und Zentrifuge.

Dann wurden 2µL jeder Lösung zu 800µL Wasser und 200µL Bradford-Reagenz, in einer Küvette, hinzugefügt. Die Verdünnung betrug also 1:2500. Nun wurde das Photometer kalibriert, indem eine leere Küvette zur Kontrolle eingesetzt und eine Messung bei 595nm Extinktion durchgeführt wurde. Dann wurden alle Proben bei derselben Extinktion gemessen und die Ergebnisse notiert.

Mithilfe einer standardisierten Eichkurve wurden die Ergebnisse aufgetragen und die Konzentration des Gesamtproteins berechnet.

2.2.5 HCS LipidTOX Färbung

Um die Induktion von *Lipid droplets* (LD) in der Zellkultur fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können wurden die Proben mit dem Farbstoff „HCS LipidTOX™ Phospholipidose Detection Reagents“ gefärbt. Zu diesem Zweck wurde der Farbstoff zunächst im Verhältnis 1:500 in PBS-Puffer verdünnt.

Dann wurden aus den Zellkulturen, nach Fixierung der Zellen mit 2% PFA, pro Well der 6-Well-Platten je ein Deckgläschen entfernt und auf eine neue Platte, oder ein Korkstück, in einer bereits beschriebenen feuchten Kammer, transferiert. Die verbliebenen Deckgläschen wurden für die spätere Nutzung weiter im Kühlschrank gelagert. Die Zellen wurden dann mit dreimal für 10min mit 100µL PBS gewaschen. Aus einer Pipette wurden nun 100µL der Mischung aus PBS und Farbstoff auf jedes Deckgläschen gegeben und die Platte mit den Deckgläschen daraufhin bei 5°C im Kühlschrank, für 30min, inkubiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden sie in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach 30min wurden die Zellen mithilfe des Einbettmediums ProLong™ Gold antifade reagent auf Deckgläschen fixiert und nach einer Ruhezeit von ca. 12 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Sofern eine Antikörperfärbung indiziert war, wurde der Farbstoff dem sekundären Antikörper beigefügt und entsprechend zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den Deckplättchen inkubiert.

2.2.6 Antikörper Färbung

Neben der Induktion der *Lipid droplets* interessierte in dieser Arbeit auch ihr Einfluss auf die Zellstruktur, speziell das Sarkomer und seine Proteine, wie beispielsweise Titin, sowie ihre Lokalisation. Hierzu wurden neben der Lipidfärbung zusätzlich das Sarkomer durch Anti α -Aktinin, und das *Lipid droplet*-assoziierte Protein Perilipin2 angefärbt.

Das methodische Vorgehen war ähnlich wie bei der Färbung der *Lipid droplets*. Allerdings wurden die Zellen auf den Deckplättchen zunächst mithilfe einer 10% NGS-Lösung für eine Stunde blockiert. 100 μ L einer Lösung, die den primären Antikörper, 2% NGS und 0,2% Saponin in PBS enthielt, wurden auf jedes Deckgläschen pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pro Deckgläschen in drei zehnminütigen Waschschritten mit jeweils 100 μ L 0,2% Saponin/PBS pro Waschschrift gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen. Als Verdünnungsmedium diente hier erneut eine Lösung mit 2% NGS in PBS. Dabei war zu beachten, dass im Falle einer Mehrfachfärbung der Präparate die sekundären Antikörper zu den jeweiligen primären Antikörpern gegen die Immunglobuline unterschiedlicher Tiere gerichtet sein mussten, also die primären Antikörper aus differentiellen Tieren gewonnen sein mussten, um eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln, wobei wieder 100 μ L der NGS/Saponin/PBS-Antikörper-Lösung für ein Deckplättchen verwendet wurden.

Abschließend erfolgte die Fixierung der Deckplättchen auf einem Objektträger. Zwei Deckgläschen wurden pro Objektträger verwendet und mithilfe des Einbettmediums ProLong™ Gold antifade reagent fixiert. Die Objektträger wurden erneut über Nacht im Dunkeln, bei Raumtemperatur, gelagert und konnten am folgenden Tag fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Mikroskop der Marke Nikon, vom Modell Nikon Eclipse Ti-E verwendet. Die vorgefertigten Präparate befanden sich auf Objektträgern und wurden unter 40x-Vergrößerung und 100x-Vergrößerung betrachtet. Für die 100x-Vergrößerung wurde Immersionsöl verwendet.

Die Präparate wurden mit den Deckgläschen in Richtung der Linse auf das Mikroskop gelegt und dann mit den genannten Vergrößerungen betrachtet. Die Lichtmikroskopie fand hierbei keine Anwendung, sondern es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mithilfe einer Fluoreszenzlampe sichtbar gemacht und die angefärbten Strukturen betrachtet.

Mithilfe des Computerprogramms NLS konnten die Bilder, die im Mikroskop sichtbar waren auf dem Computer gezeigt, mit Hilfe der CMOS-Kamera, fotografiert und gespeichert werden. Zunächst wurde das Programm geöffnet und mithilfe der Befehlskette Devices->Manage->Connect die Grundeinstellung geschaffen. Anschließend war darauf zu achten im Kanal Devices die Einstellungen für die Fotoaufnahmen auf AIR100 zu stellen. Nun war es möglich die gewünschten Filter und die passenden Belichtungszeiten am Computer manuell einzustellen. Die verwendeten Filter unterschieden sich abhängig von Präparat und Stärke der Färbung, wurden jedoch in der Beschreibung jedes Bildes dokumentiert. Alle verglichenen Bilder wurden unter denselben Konditionen betrachtet, um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden.

2.2.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde zur Analyse der Proteine aus den Zellkulturen genutzt. Bei der auch als SDS-PAGE bezeichneten Methode, werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Zunächst wurden die in Probenpuffer aufbewahrten Zellen für drei Minuten bei 99°C erhitzt. Auf diese Weise wird eine Denaturierung, also eine Auffaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, erreicht. Proben, die zur mittelfristigen Nutzung bei -20°C gelagert worden waren, wurden aufgetaut, mit weiteren 3µL DTT versetzt und schließlich für drei Minuten bei 50°C erwärmt. Daraufhin wurden die Proben auf die entsprechenden Gele übertragen. Dabei wurden, im Fall von Titin, für die 100µL Probenpuffer pro Well einer 6-Well-Platte, 6µL auf das Gel transferiert. Optional erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration in der Lösung mittels des Bradford-Assay. In diesem Fall wurden die Gele mit einer Menge von 20µg Protein beladen. Da sich Titin durch seine Größe in seinen Eigenschaften von den meisten kleineren Proteinen unterscheidet, wurden für die Größenauftrennung von Titin und seinen Isoformen Agarose-stabilisierte Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamidanteil von 2,1% oder 1,9% verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurden zunächst alle Komponenten (s. Tabelle 6) außer APS und Agarose in einem 50mL-Falcon vermischt und in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 60°C erwärmt. Dann wurde APS, als Radikalstarter der Reaktion, sowie in der Mikrowelle verflüssigte Agarose hinzugefügt. Das Gemisch wurde zügig auf- und abpipettiert, um eine ausreichende Vermischung der Ingredienzen zu erreichen. Schließlich wurde das Gemisch zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,75mm pipettiert und wurde dort für mindestens zwei Stunden auspolymerisieren gelassen.

Die für Titingele eingesetzten Gelelektrophoresesysteme waren Mini-Twin des Herstellers Biometra und Mini-PROTEAN, welches von Biorad hergestellt wird. Die Auftrennung der Proteine erfolgte, für Titin, in einmal-Laufpuffer. Zu Beginn wurden für 20-30 Minuten Stromstärken von 2mA pro Gel eingesetzt, dann für drei Stunden 5mA pro Gel.

Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingele

Lösung	Titingel 2,1%
30% Acrylamidlösung	1.40mL
H ₂ O _{bidest}	6.67mL
4xSDS–Trenngelpuffer	5mL
SDS 20%	100µL
TEMED	11.5µL
APS	150µL
Agarose 1.5%	6.67mL
Gesamtvolumen	20mL

Die meisten Proteine haben jedoch eine deutlich geringere Größe als Titin, sodass zur Auftrennung dieser Proteine ein anderes Verfahren, die diskontinuierliche Gelelektrophorese, eingesetzt wurde.

Zunächst wurde ein Trenngel (s. Tabelle 7), hergestellt, das, abhängig von der Größe der Proteine, 7,5%, 10%, oder 12% Acrylamid enthielt. Bei der Auswahl wurde sich an den Empfehlungen des Herstellers Roth orientiert (s. Tabelle 11). Das fertige Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die einen Abstand von 1mm hatten, wobei die Zugabe von APS und TEMED, die 30 Minuten andauernde, Polymerisation startete. Da der Vorgang unter Ausschluss von Sauerstoff stattfinden musste, wurde auf das Gel eine Schicht Isopropanol gegeben, die nach Ende des Vorgangs sorgfältig, mithilfe von Wasser, ausgespült wurde. So konnte das Trenngel im Anschluss mit einem Sammelgel übergossen werden, das ebenfalls gemäß Tabelle 7 hergestellt wurde.

Die Proteinauftrennung erfolgte, indem in die Taschen des Sammelgels aus 100µL Probenpuffer jeweils 5µL gefüllt wurden. Die Auftrennung wurde mit 15mA pro Gel gestartet und lief dann für 90 Minuten mit 30mA pro Gel. Die Elektrophoreseapparaturen, die verwendet wurden, waren wie bei den Titingelen, Mini-Twin und Mini-PROTEAN.

Tabelle 7: Pipettierschema für 2 SDS-Standardgele/Sammelgele

Lösung	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	3.75mL	5mL	6.25mL	0.0667mL
H ₂ O _{bidest}	7.5mL	6.25mL	5mL	3.025mL
4x-SDS-Trenngelpuffer	3.75mL	3.75mL	3.75mL	–
4x-SDS-Sammelgelpuffer	–	–	–	1.25mL
TEMED	7.5µL	7.5µL	7.5µL	15µL
APS	75µL	75µL	75µL	50µL
Gesamtvolumen	15mL	15mL	15mL	5mL

2.2.9 Western Blot

Um die Proteine, die durch das SDS-PAGE-Verfahren aufgetrennt wurden, weiter zu analysieren, wurde ein semidry Western Blot durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst der Laufpuffer verworfen und die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurden fünf in Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere auf die Anodenplatte der Blotting-Aperatur gelegt und die in Ethanol aktivierte PVDF-Membran darauf platziert. Auf der Membran wiederum, wurde das Polyacrylamidgel zentriert, welches dann von fünf in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren bedeckt wurde.

Nun konnte die Blottingkassette geschlossen werden und ein elektrisches Feld, senkrecht zur Membran, angelegt werden, wodurch der Proteintransfer begonnen wurde. Für Titinproben wurde eine Stromstärke von 1A bei einer Spannung von 20V für eine Dauer von 40 Minuten genutzt. Bei kleineren Proteinen wurden 1,5A, eine Spannung von 20V und eine Dauer von 12 Minuten in Anspruch genommen. Außerdem wurden bei diesen Proben an der Anode und Kathode jeweils vier anstelle von fünf Whatman-Papieren verwendet.

Die PVDF-Membran wurde gewählt, da sie eine höhere Proteinbindungskapazität aufweist als Nitrocellulosemembranen, sodass ein stärkeres Hintergrundsignal erwartet werden konnte.

Anschließend wurde für eine Minute mit PVDF-stain gefärbt und dann in einer TBST-Lösung in der 10% Essigsäure und 40% Ethanol enthalten waren, für 4Minuten entfärbt. Mithilfe von 1x-TBST wurde die in der PVDF-destain enthaltene Essigsäure wieder ausgewaschen. Nun wurde in einem Imager eine Aufnahme des Gesamtproteins gemacht. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert. Dieser als Blocking bezeichnete Schritt wurde durchgeführt, indem die Membranen für mindestens eine Stunde in 2% Rinderserumalbuminlösung (BSA) in TBST inkubiert wurden.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem primären Antikörper (s. Tabelle 5) über Nacht. Dieser Antikörper wurde in einer vorbereiteten Lösung, bestehend aus 3mL 0,5% BSA in TBST-Lösung pro Membran und der entsprechend der Verdünnung benötigten

Menge des Antikörpers, verdünnt. Der primäre Antikörper wurde am folgenden Tag, mithilfe von drei zehnminütigen Waschschritten mit 1x-TBST ausgewaschen.

Dann wurde ein sekundärer Antikörper, der an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet war, zunächst in 0,5% BSA/TBST-Lösung vorbereitet. Mithilfe der Peroxidase und einem Chemilumineszenzreagenz konnten die Banden sichtbar gemacht werden. Die jeweiligen antikörperspezifischen Verdünnungen, sind sowohl für die primären als auch die sekundären Antikörper in der Tabelle 5 dargestellt. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden auf den Western Blot gegeben und anschließend erneut in drei, je zehnminütigen, Waschschritten mit 1 x-TBST gewaschen.

Um die Proteine, gegen die der primäre Antikörper gerichtet war, sichtbar zu machen, wurde Chemilumineszenz verwendet. Für die Visualisierung wurden die Western Blots mit den Chemilumineszenzreagenzien 1 und 2, die vorher im Verhältnis 1:1 vermischt wurden, vollständig bedeckt. Die Signale wurden mit einem Fusion FX Imager, der Firma Vilbert&Lourmat, detektiert.

Um den Phosphorylierungsstatus von Proteinen zu bestimmen wurden Phospho- und pan-Antikörper bestimmt. Im Zuge dessen wurden beide Antikörper auf demselben Western-Blot analysiert. Zunächst wurde der phosphorylierte Anteil des entsprechenden Proteins durch einen Phospho-Antikörper detektiert. Dieser wurde dann durch einen mit β -Mercaptoethanol versetzten Stripping Puffer vom Western Blot gelöst, bei Titin-Gelen kam ein kommerzielle erhältlicher remote Stripping Puffer zum Einsatz. Nun wurde derselbe Blot erneut blockiert und der pan-Antikörper aufgebracht. Nach einer Nacht wurde erneut der entsprechende sekundäre Antikörper aufgebracht und mithilfe der Chemilumineszenz ein Signal detektiert. So konnte das Gesamtprotein im Sinne einer Beladungskontrolle bestimmt werden und ein Verhältnis von phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein hergestellt werden.

Wenn Antikörper, aufgrund von Qualitätseinbußen durch die Anwendung, ein entsprechendes Vorgehen nicht ermöglichten, wurden zwei Gele identisch beladen und die Elektrophorese parallel in derselben Apparatur durchgeführt und das Blotting-Protokoll wurde ohne Unterschied umgesetzt. Im Anschluss wurde dann ein Blot mit einem Phospho-Antikörper und der zweite, identisch beladene Blot, mit einem Pan-Antikörper behandelt. Beide Signale wurden mit dem Programm Image J über

Pixeldarstellung quantifiziert und das Phospho-Signal wurde mit dem jeweiligen Pan-Signal desselben, oder des identischen Blots, ins Verhältnis gesetzt.

Die errechneten Signale wurden normiert und entsprechend als relative Werte angegeben.

2.2.10 Software

Zusätzlich zur bereits explizit erwähnten Software wurde folgende Software genutzt: Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016, Microsoft PowerPoint 2016, Image J, Graph Pad Prism, Adobe Photoshop.

2.2.11 Daten analytische Statistik

Die statistische Signifikanz der erhobenen Daten wurde mittels einfaktorieller Anova (one-way Anova) überprüft. Eine Signifikanz wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen und in den Abbildungen entsprechend markiert.

3 Ergebnisse

Die Experimente im Zuge dieser Arbeit lassen sich grob in zwei Abschnitte unterteilen.

Zum einen die Induktion von *Lipid droplets* in Zellkulturen und den mikroskopischen Nachweis selbiger. Zu den mikroskopischen Nachweisen gehören auch die Bestimmung basaler Zellparameter und der Einfluss der *Lipid droplets* auf das Sarkomer.

Zum anderen die proteinbiochemischen Analysen von Zellen, die mit Oleat behandelt wurden, sodass *Lipid droplets* in den Zellen gebildet wurden und mutmaßlich intrazelluläre Veränderungen hervorgerufen haben.

3.1 Etablierung von *Lipid droplets* in Zellkulturen

3.1.1 Induktion von *Lipid droplets* mittels Ölsäure (Oleat)

Die Ergebnisse des Versuchs mithilfe von Oleat *Lipid droplets* in Zellkulturen zu etablieren sind in den Abbildungen 11, 12 und 13 festgehalten.

Besonders interessant war der Vergleich unbehandelter Kontrollproben der db/db-Tiere mit den Oleatproben der Wildtyp-Mäuse und die durch Oleat induzierten Veränderungen in den db/db-Tieren.

Um die optimalen Bedingungen der Oleatinkubation für die Induktion der *Lipid droplets* herauszufinden, wurden verschiedene Konzentrationen des Oleats zu verschiedenen Inkubationsdauern in einer Versuchsreihe getestet. Getreu den in der Literatur gefundenen Hinweisen wurden Oleatkonzentrationen von 0,5mM und 1mM gewählt und Inkubationszeiten von 16h, 40h und einer Woche. Für die Auswertung mussten zunächst die *Lipid droplets* mikroskopisch definiert werden. Es zeigen sich morphologische Veränderungen in den mit Oleat behandelten Zellen, welche als *Lipid droplets* identifiziert wurden (vgl. Abbildung 11). Vergleichbare Strukturen waren weder in den Zellen, die mit BSA/Ethanol behandelt wurden, noch in den mit Medium inkubierten Kontrollzellen sichtbar (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13). Die Farbintensität erwies sich als unzuverlässiger Parameter um einen Hinweis auf Fettakkumulationen zu erlangen, da diese mit zunehmender Belichtungszeit deutlich abnahm und so eine standardisierte Aufnahme der Farbintensität der Zellen mit einer Kamera nicht möglich war.

Im Bezug auf die Variable Inkubationszeit erwiesen sich die längeren Inkubationsdauern in den Versuchen als nachteilig für die Primärzellen, da sie mit zunehmender Zeit vermehrt Zeichen der Dedifferenzierung aufwiesen. Diese zeigte sich insbesondere durch Abrundungen der Zellen, dem Untergang von Myokarden, sowie einer verminderten Kontrastierung im Vergleich zur Umgebung und daher einer schlechteren Abgrenzbarkeit gegenüber dem Hintergrund. Auch die Zelldichte nahm deutlich ab. Diese Veränderungen wurden auch als Hinweise auf einen veränderten Stoffwechsel der Zellen gewertet. In dem Versuch die optimale Inkubationsdauer zu finden, wurden vor diesem Hintergrund Inkubationszeiten von vier, sechs, acht und zehn Stunden getestet. Während nach acht und zehn Stunden bereits vermehrte Dedifferenzierung der Zellen zu erkennen war, waren nach vier Stunden *Lipid droplets* noch nicht in der gewünschten Dichte und Häufigkeit intrazellulär nachzuweisen (vgl. Abbildung 11). Eine Inkubation der Zellen über sechs Stunden erwies sich als optimal, um die *Lipid droplets* in den Zellen später auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können (vgl. Abbildung 11).

Auffällig war, dass eine Abnahme der Zelldichte und Zunahme dedifferenzierter Zellen in geringem Maße auch durch BSA/Ethanol ohne Oleat hervorgerufen wurde (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Es wurde vermutet, dass eine Verunreinigung des BSA mit Fettsäuren, sowie die Zytotoxizität von Ethanol diese Veränderungen hervorrufen. Aus diesem Grund wurde in den finalen Versuchsansätzen *Fatty acid free* BSA (FAF BSA), sowie 0,9% NaCl anstelle von Ethanol verwendet. So konnten die beschriebenen Nebeneffekte reduziert werden.

Bezüglich der Findung der optimalen Oleatkonzentration für die Induktion von *Lipid droplets* wurde aus den durchgeführten Versuchen rasch deutlich, dass hohe Konzentrationen, insbesondere in Verbindung mit langen Inkubationszeiten unweigerlich zur Dedifferenzierung und dem Sterben der Zellen führen. Es zeigte sich, dass eine kurze Inkubationszeit mit geringen Konzentrationen des Oleats ausreichend ist, um *Lipid droplets* in Zellkulturen zu induzieren. Eindeutig nachweisbar waren *Lipid droplets* bei einer Konzentration des Oleats in einer Lösung aus Oleat/Ethanol, später Oleat/NaCl-Lösung, von 35mM, die auf 0,5mM Oleat in einer BSA-Lösung von 0,2mg/ml und Kulturmedium verdünnt wurde.

Gemäß diesen Ergebnissen wurden sowohl Oleatkonzentration, als auch Inkubationsdauer für das Protokoll reduziert und eine Oleatkonzentration von 0,5mM,

sowie eine Inkubationszeit von sechs Stunden festgelegt. Dieses Protokoll ermöglichte die Induktion von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten unter Minimierung von Dedifferenzierung der Zellen und Reduktion der Versuchszeit.

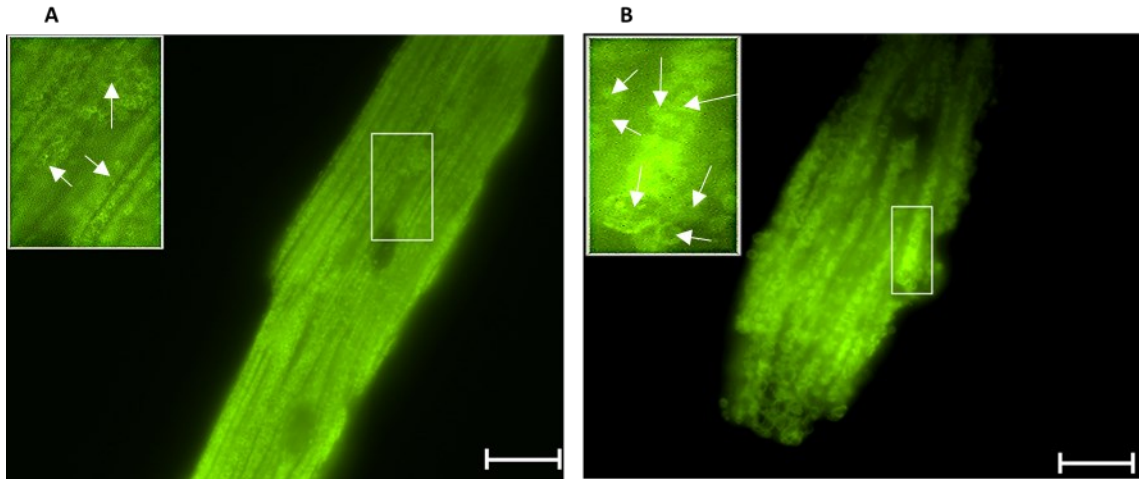


Abb. 11: *Lipid droplets* in Kardiomyozyten aus WT-Mäusen (4h und 6h Oleat)

Die Abbildungen zeigen Zellen mit einer Färbung durch den HTC LipidToxTM – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. *Lipid droplets* sind in der Vergrößerung durch weiße Pfeile markiert. In beiden Ansätzen wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. *Lipid droplets* sind als tropfenförmige Strukturen erkennbar. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A)Kardiomyozyt, der 4h mit Oleat behandelt wurde, (B)Kardiomyozyt, der 6h mit Oleat inkubiert wurde

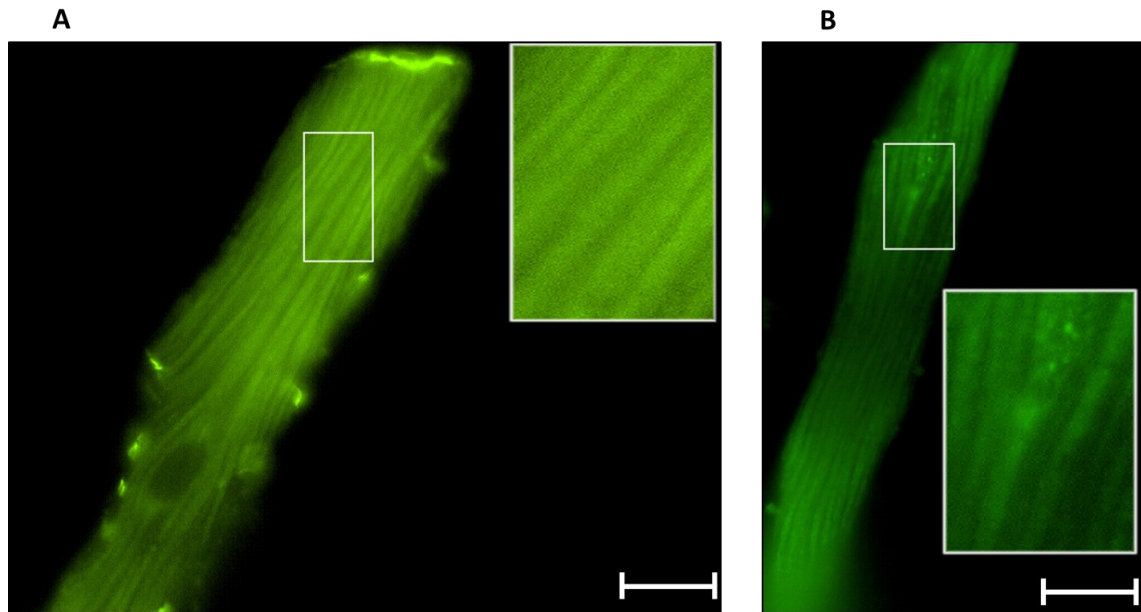


Abb. 12: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen - 4h und 6h in BSA inkubiert

Die Abbildungen zeigen Zellen mit einer Färbung durch den HTC LipidToxTM – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In beiden Ansätzen wurden die Zellen mit BSA/Ethanol, in einer Konzentration von 0,5mM, in 1,5mL 4% FBS-Medium, behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A) zeigt einen Kardiomyozyt, der 4h mit BSA/Ethanol behandelt wurde; **(B)** zeigt einen Kardiomyozyt, der 6h mit BSA/Ethanol inkubiert wurde

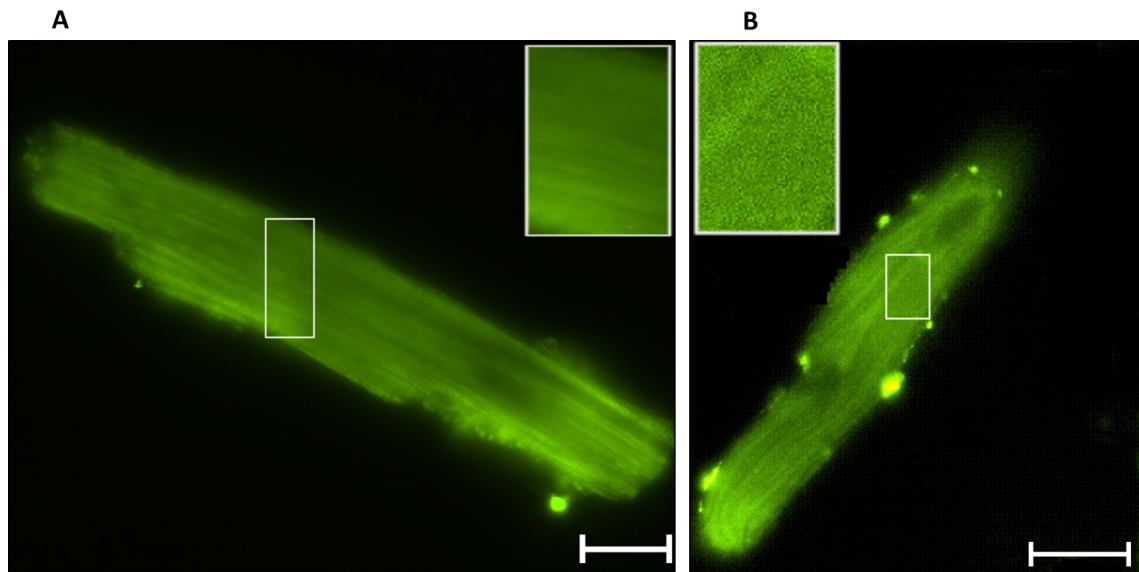


Abb. 13: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen – 4h und 6h in Medium inkubiert

Die Abbildungen zeigen Zellen mit einer Färbung durch den HTC LipidTox™ – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In beiden Ansätzen wurden die Zellen ausschließlich mit 1,5mL 4% FBS Medium, behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A) zeigt einen Kardiomyozyt, der 4h mit Medium behandelt wurde; **(B)** zeigt einen Kardiomyozyt, der 6h mit Medium inkubiert wurde

3.1.2 Färbung der Zellen mit HCS LipidTOX™

Für die Färbung der Zellen mit HCS LipidTOX™ wurde weitestgehend nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Allerdings erwies sich die vom Hersteller vorgeschlagene Verdünnung des Farbstoffes von 1:200 als zu stark, sodass eine weitere Verdünnung des Farbstoffes in 0,2% Saponin/PBS als sinnvoll erachtet wurde. Besonders gute Ergebnisse in der Färbung wurden bei Verdünnungen von 1:500 erreicht. Es zeigte sich, dass der Farbstoff zwar bevorzugt an die neutralen Fettsäuren bindet, für die er auch die höchste Affinität hat, jedoch auch andere Strukturen anzufärben scheint. Dies schien zu einer Überfärbung der Zellen und dem Anfärben von zahlreichen Zellstrukturen zu führen.

Verschiedene Konzentrationen wurden getestet, um die optimale Farbstoffkonzentration und Färbedauer zu finden.

Bei einer Inkubationsdauer von 30min wurden Farbstoffkonzentrationen von 1:1000 und 1:500 ausprobiert und die Menge der Färbelösung wurde zwischen 30µL, 50µL und 100µL pro Deckplättchen variiert. Es zeigte sich, dass eine Färbung von 1:1000 zwar für eine schwächere Anfärbung der Zielstrukturen sorgte, nicht jedoch die Anzahl der Färbeartefakte oder die Stärke der Hintergrundfärbung merklich verringern konnte. Außerdem reichten 30µL und 50µL der Färbelösung nicht für eine sichere und vollständige Färbung der Deckplättchen aus, was sich in ungefärbten Bereichen der Deckplättchen und schwacher Anfärbung der Zellen widerspiegelte. Aus diesem Grund wurde die Färbung final mit einer Konzentration von 1:500 und 100µL pro Deckplättchen für 30min durchgeführt (vgl. Abbildung 14, 15 und 16).

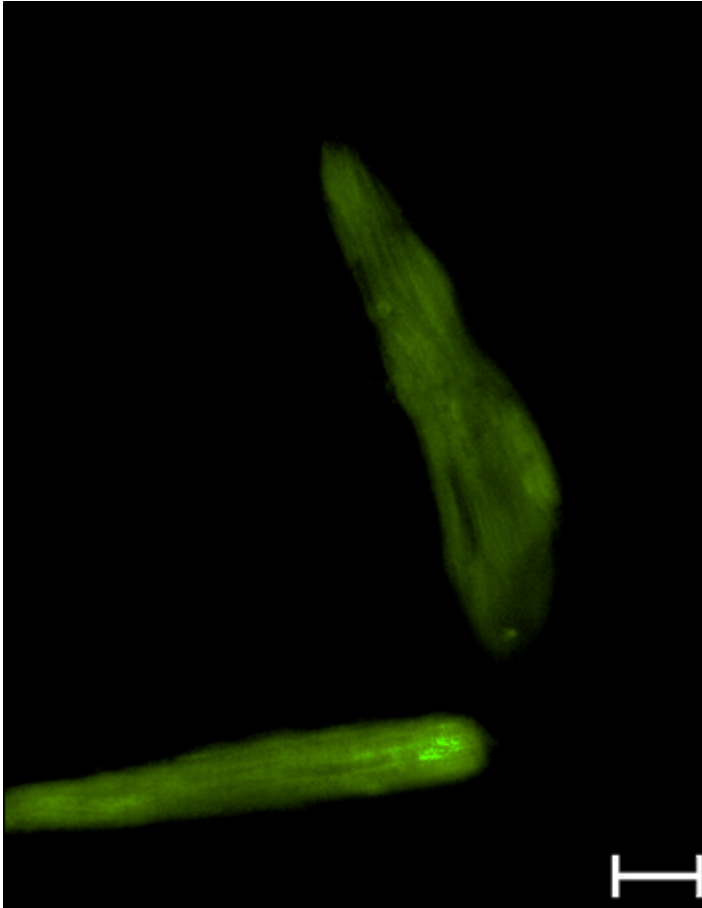


Abb. 14: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 40h in 1mM Oleat inkubiert

Die Abbildung zeigt Zellen mit einer Färbung durch den HTC LipidToxTM – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 1mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Inkubationsdauer betrug 40h. Die Bilder wurden bei 40x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10μm.

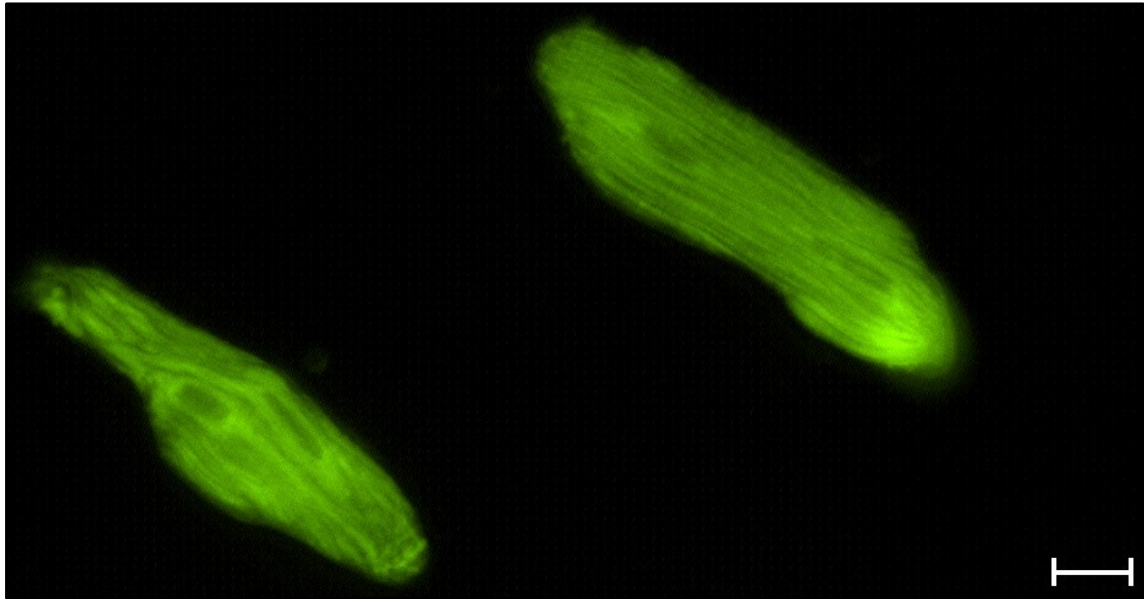


Abb. 15: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 40h in 0,5mM Oleat inkubiert

Die Abbildung zeigt Zellen mit einer Färbung durch den HTC LipidToxTM – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Inkubationsdauer betrug 40h. Als Zeichen der Dedifferenzierung ist nach 40h Behandlung mit Oleat bereits eine Abrundung der Zellen zu erkennen. Die Bilder wurden bei 40x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

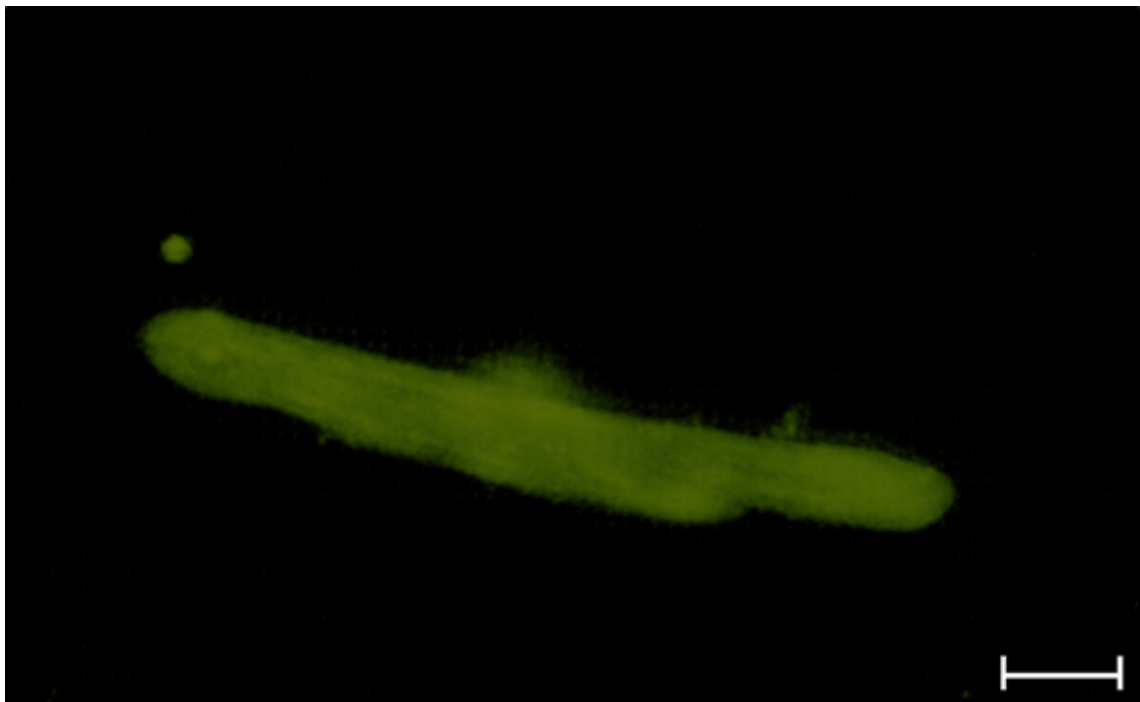


Abb. 16: Kardiomyozyten aus WT-Ratten - 1 Woche in 1mM Oleat inkubiert

Die Abbildung zeigt eine Zelle, die 1 Woche mit 1mM Oleat behandelt wurde und mit einer Farbstoffkonzentration von 1:1000 für 30min gefärbt wurde. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 1mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Inkubationsdauer betrug 40h. Die Bilder wurden bei 40x Vergrößerung mit dem Filter „Fitc“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

Mit diesem Vorgehen konnte die Anfärbung der Zellen optimiert, sowie die Anfärbung des Hintergrundes minimiert werden. Die Methodik der Färbung erfolgte wie beschrieben (vgl. 3.2.5).

Zusätzlich wurden auch Färbungen für α -Aktinin und PLIN2 (vgl. Abbildung 17 und 18) durchgeführt. Dies sollte die Untersuchung der Sarkomerstruktur und die durch Oleat induzierten Veränderungen ermöglichen. Auch die genaue Lokalisation und Anzahl von *Lipid droplets* sollte durch die Anfärbung der für diese Strukturen spezifischen Proteine untersucht werden können. Die Anfärbung der Sarkomere durch α -Aktinin erwies sich als gut durchführbar. Allerdings war eine Anfärbung der *Lipid droplets* durch PLIN2, ebenso wie die Färbung mithilfe der LipidTox-Färbung nicht spezifisch genug, um eine Quantifizierung der *Lipid droplets* zu erlauben. Auch eine Veränderung der

Sarkomerstruktur durch die Fetttröpfchen war mikroskopisch in dieser Vergrößerung nicht ersichtlich.

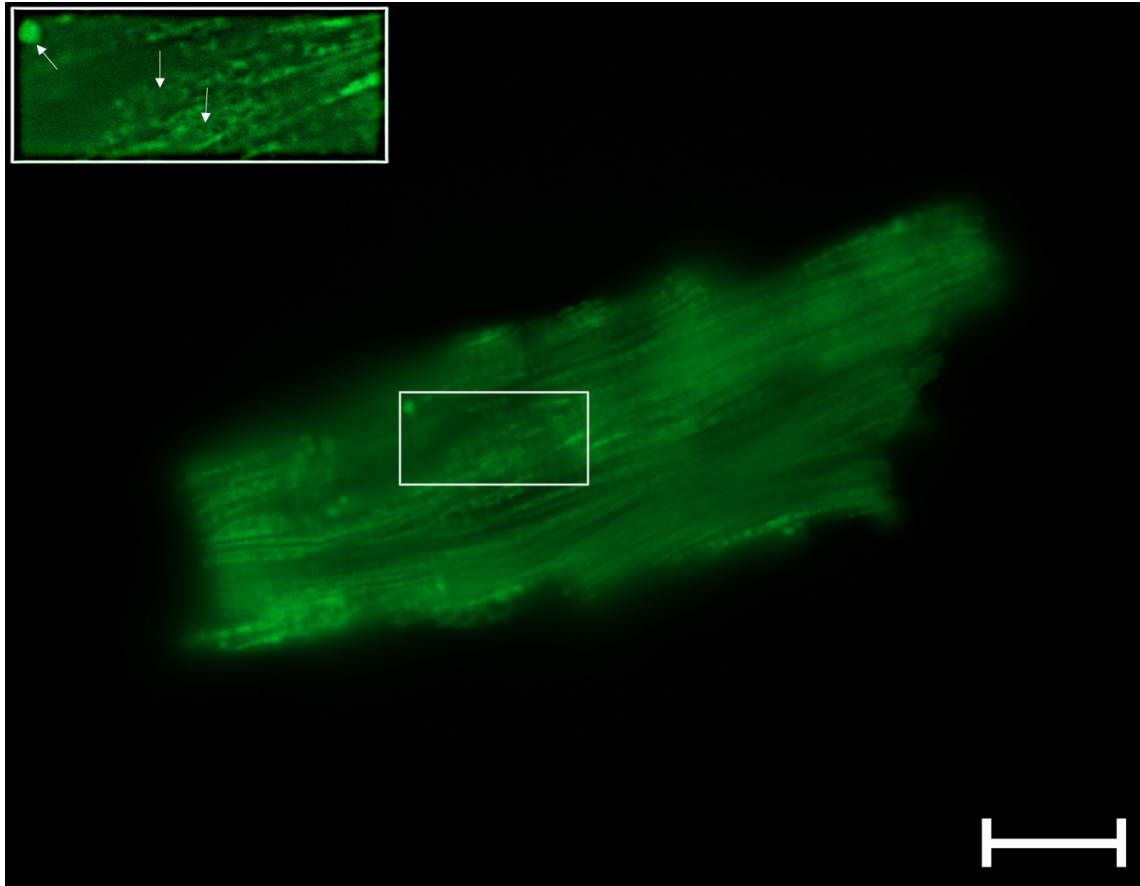


Abb. 17: Kardiomyozyt einer WT-Maus - PLIN2-Färbung

Die Abbildung zeigt eine Zelle, einer Wildtypmaus, nach einer sechsständigen Behandlung mit Oleat, mit anschließender Fixierung und einer Inkubation mit Plin2-Antikörpern. *Lipid droplets* sind als tropfenförmige stark grün gefärbte Bereiche erkennbar und in der Vergrößerung mit weißen Pfeilen markiert. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 40x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 20µm.

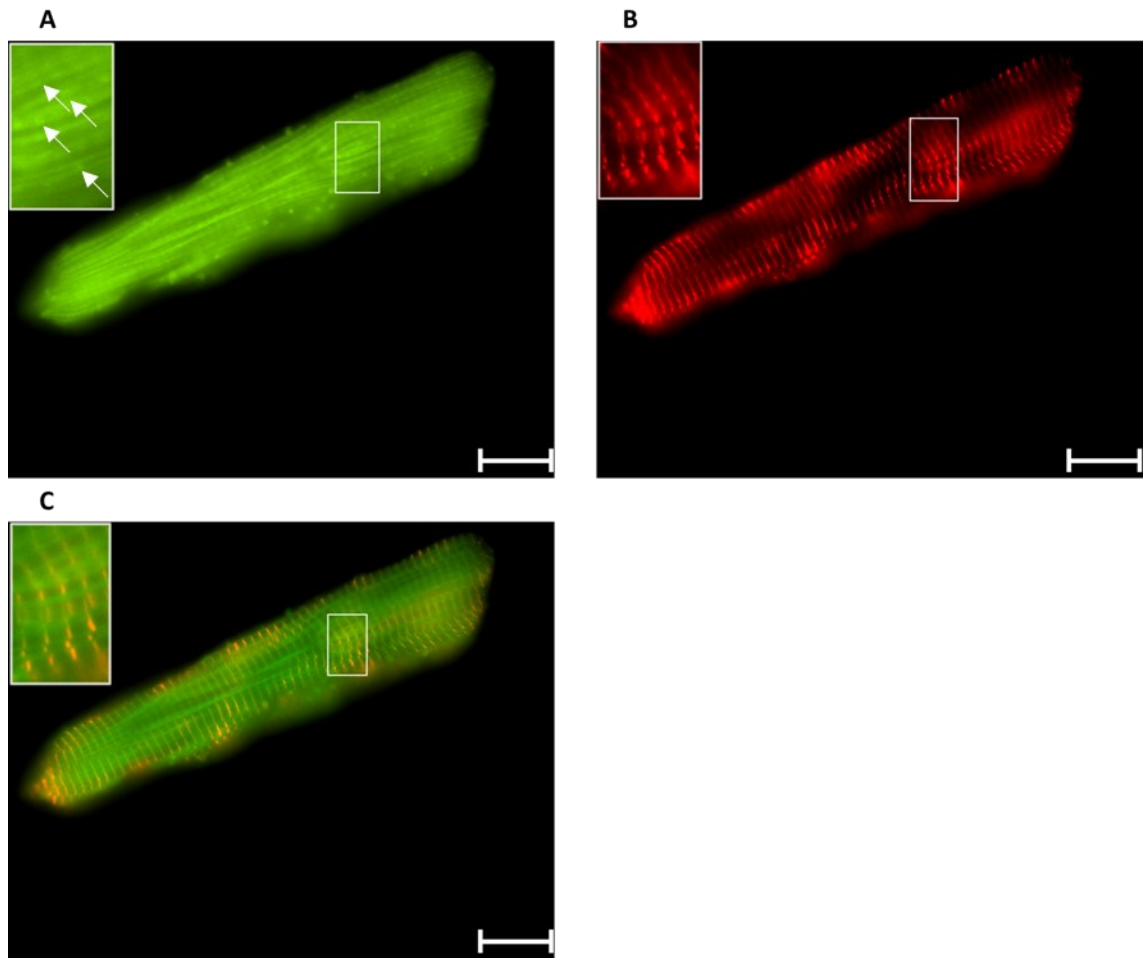


Abb. 18: Rattenkardiomyozyten α -Aktinin-Färbung

Die Abbildungen zeigen eine Rattenkardiomyozyte nach einer Behandlung mit Oleat über 6h und anschließender α -Aktinin und LipidTox-Färbung gemäß dem Protokoll. Es sind Zellen zu sehen, die mit den Filtern für LipidTox, grün (A), α -Aktinin, rot (B) und einer Kombination der Bilder (C) fotografiert wurden. *Lipid droplets* sind in der Vergrößerung mit weißen Pfeilen markiert. Bei den in (A) und (C) sichtbaren longitudinalen grünen Schlieren handelt es sich vermutlich um Fettakkumulationen an den Sarkomeren. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 2 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=2). Der Größenstandard beträgt 10 μ m.

Um dennoch eine Untersuchung der Zellparameter durchzuführen, wurde nun eine Messung der Zellen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden (3.1.3) beschrieben werden.

3.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung erbrachte den Nachweis von *Lipid droplets* in den Zellkulturen, die mit Oleat behandelt wurden, sodass das verwendete Protokoll als etabliert betrachtet werden konnte. In den Zellen, die mit Oleat behandelt wurden zeigten sich in der Mikroskopie eindeutige morphologische Veränderungen, in Form von tropfenartigen Strukturen, die in keiner der Kontrollen zu sehen waren.

Auffällig war die starke Anfärbung jeglicher Strukturen der Zellen, die nicht mit Oleat behandelt waren und mutmaßlich weniger Fett enthielten. Besonders bei geringen Belichtungszeiten waren die Unterschiede zwischen Kontrollen und Proben deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 19). Es zeigte sich jedoch auch, dass die Behandlung mit BSA/Ethanol im Vergleich zu den normalen Kontrollen durchaus ebenfalls einen Effekt, nämlich die vereinzelte Bildung von *Lipid droplets*, auf die Zellen hatte. Die mikroskopisch sichtbare Bildung von *Lipid droplets* in den mit Oleat beladenen Zellen war jedoch deutlicher und morphologisch eindeutiger abgrenzbar.

In den Zellen der Wildtypiere zeigte sich eine Akkumulation der *Lipid droplets* in den Oleatproben, sowohl intrazellulär, mit den Sarkomerstrukturen assoziiert, als auch an den Membranen. Eine ähnliche membranöse Akkumulation angefärbter Strukturen konnte auch in den Kontrollproben, mehrheitlich in jenen mit BSA/Ethanol-Behandlung, nachgewiesen werden, auch bei Zellen die eine Dedifferenzierung aufwiesen. Morphologisch intakte Zellen zeigten jedoch in den Kontrollen nur schwache Anzeichen der Akkumulation von *Lipid droplets* (vgl. Abbildung 21). So wurde angenommen, dass der Zelltod, beispielsweise in Form einer Ethanol induzierten Pyroptose, zu einer Zerstörung der Zellen führte, die in der Folge auch Lipide freisetzten, die den Farbstoff banden. Allerdings war ein stärkeres Fluoreszenzsignal in den mit Oleat behandelten Zellen als in den unbehandelten Zellen oder in den mit BSA/Ethanol behandelten Zellen nachweisbar.

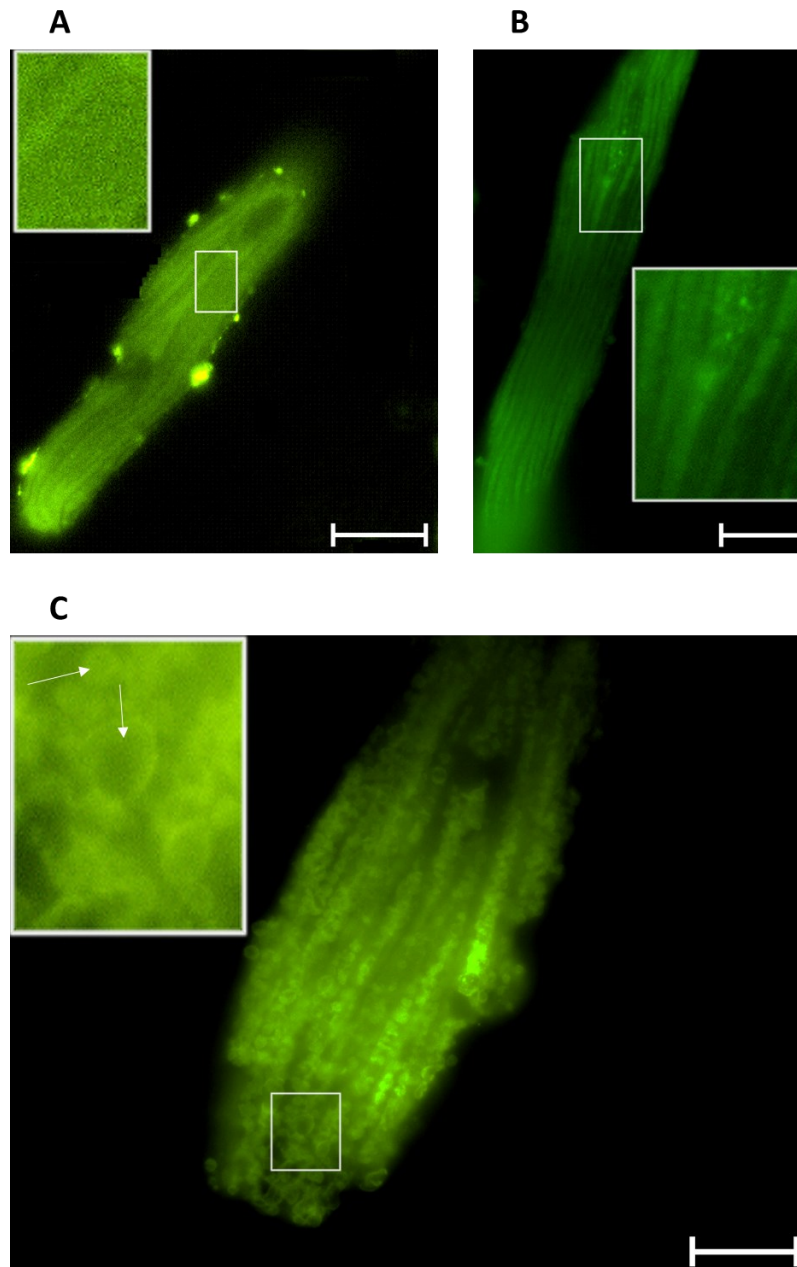


Abb. 19: Kardiomyozyten aus Wildtypmäusen 6h Behandlung (Medium-BSA-Oleat)

Die Abbildungen zeigen die Effekte einer Behandlung von Kardiomyozyten aus Wildtypmäusen über 6h mit Oleat, BSA/Ethanol und ausschließlich Medium. Die Belichtungszeit betrug für jedes Bild 10ms. *Lipid droplets* sind in der Vergrößerung mit weißen Pfeilen markiert. Die Färbung erfolgte durch den HTC LipidTox™ – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A)Kardiomyozyt, der 6h mit Medium behandelt wurde, (B)Kardiomyozyt, der 6h mit BSA/Ethanol inkubiert wurde, (C)Kardiomyozyt, der 6h mit Oleat behandelt wurde

Zusätzlich wurden auch Zellen aus den Herzen von homozygot Leptinrezeptor defizienten Mäusen (db/db) und zur Kontrolle aus heterozygoten Geschwistertieren (db/+) untersucht. Es zeigten sich in beiden Zellen weniger eindeutige Veränderungen als in den Wildtypmäusen (vgl. Abbildung 19, 20 und 21). Jedoch zeigten sich in den Zellen der db/+ Tiere deutlichere Unterschiede zwischen den Kontrollkonditionen BSA/Ethanol und unbehandelten Zellen, im Vergleich zu den oleatbehandelten Zellen (vgl. Abbildung 21). Allerdings waren in den Zellen der db/db-Tiere in der Mikroskopie unter allen Bedingungen einzelne *Lipid droplets* nur schwer abgrenzbar (vgl. Abbildung 20).

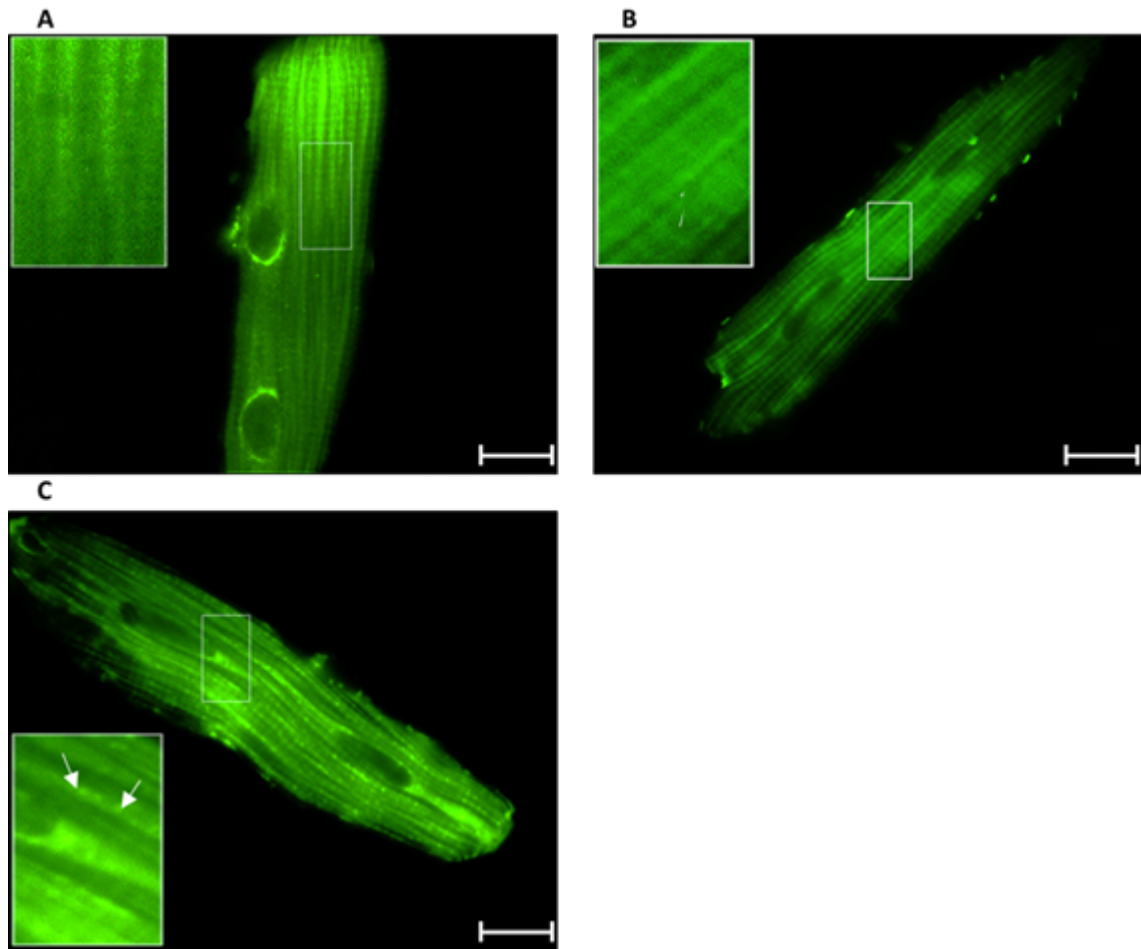


Abb. 20: Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen 6h Behandlung (Medium-BSA -Oleat)

Die Abbildungen zeigen die Effekte einer Behandlung von Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen über 6h mit Oleat, BSA/Ethanol und ausschließlich Medium. Die Belichtungszeit betrug für jedes Bild 40ms. Eindeutig abgrenzbare *Lipid droplets* sind in der Vergrößerung mit weißen Pfeilen markiert. Bedingt durch den diabetischen Phänotyp der Versuchstiere, finden sich *Lipid droplets* in allen getesteten Konditionen. Die Färbung erfolgte durch den HTC LipidTox™ – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 2 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=2). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A)Kardiomyozyt, der 6h mit Medium behandelt wurde, (B)Kardiomyozyt, der 6h mit BSA/Ethanol inkubiert wurde, (C)Kardiomyozyt, der 6h mit Oleat behandelt wurde

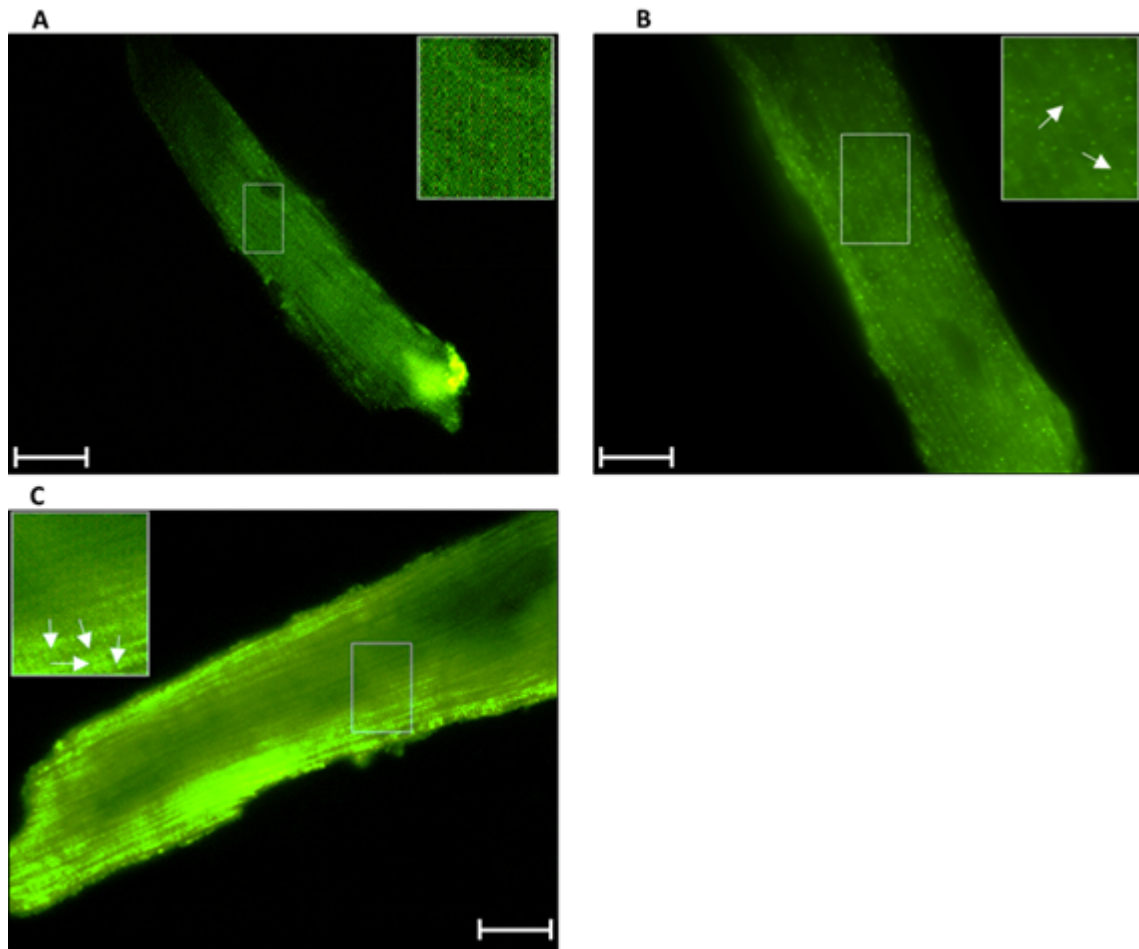


Abb. 21: Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen 6h Inkubation (Medium-BSA -Oleat)

Die Abbildungen zeigen die Effekte einer Behandlung von Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen über 6h mit Oleat, BSA/Ethanol und ausschließlich Medium. Die Belichtungszeit betrug in jedem Bild 10ms. *Lipid droplets* sind in der Vergrößerung mit weißen Pfeilen markiert. Die Behandlung mit BSA und Ethanol führte in diesem Ansatz ebenso wie die Behandlung mit Oleat zu einer Bildung von *Lipid droplets*. Die Färbung erfolgte durch den HTC LipidTox™ – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden an Zellen aus 2 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=2). Der Größenstandard beträgt 10µm.

(A)Kardiomyozyt, der 6h mit Medium behandelt wurde, (B)Kardiomyozyt, der 6h mit BSA/Ethanol inkubiert wurde, (C)Kardiomyozyt, der 6h mit Oleat behandelt wurde

Die Behandlung mit BSA/NaCl hatte im Vergleich zu einer Nutzung von Ethanol multiple positive Effekte. So war eine verringerte Neigung der Zellen zu Zelltod und Entdifferenzierung ersichtlich. Auch die Anfärbung der Zellen war im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Proben und auch zu den mit Oleat behandelten Zellen deutlich

geringer. Zusätzlich konnten auch die *Lipid droplet* ähnlichen Ansammlungen in den BSA/NaCl-Kontrollen im Vergleich zu den BSA/Ethanol-Kontrollen reduziert werden, was die These, dass auch die Verwendung von *FAF-BSA* einen Einfluss auf den Zellmetabolismus hat, stützte.

3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie – Analyse der Auswirkungen der *Lipid droplets* auf die Zellgröße und die Sarkomerstruktur

Um zu testen, ob die *Lipid droplet* Akkumulation einen Einfluss auf die Zellgröße hat, wurde in allen Versuchsgruppen mit Hilfe der Aufnahmesoftware NIS-Elements der Firma Nikon die Fläche (Area) und die Breite (Length) gemessen (vgl. Abbildung 22). Anschließend wurde der Flächeninhalt durch die Breite der Zellen geteilt, um zu prüfen, ob die Zellen durch die Akkumulation von *Lipid droplets* gewachsen waren. Die Bildung des Quotienten war wichtig, um zu unterscheiden, ob sich ein hoher Flächeninhalt gegebenenfalls durch longitudinal hypertrophierte Zellen ergab.

Die Analyse wurde an fixierten, fotografierten Zellen durchgeführt. Um für jede Kondition (BSA/Ethanol, unbehandelt, Oleat) eine ausreichende Anzahl an Zellen zu analysieren, wurden drei Versuche pro Kondition durchgeführt und jeweils ein Foto gemacht. Auf jedem Foto wurden mindestens 12 Zellen analysiert. So konnten pro Gruppe je zwischen 108 und 150 Zellen ausgewertet werden.

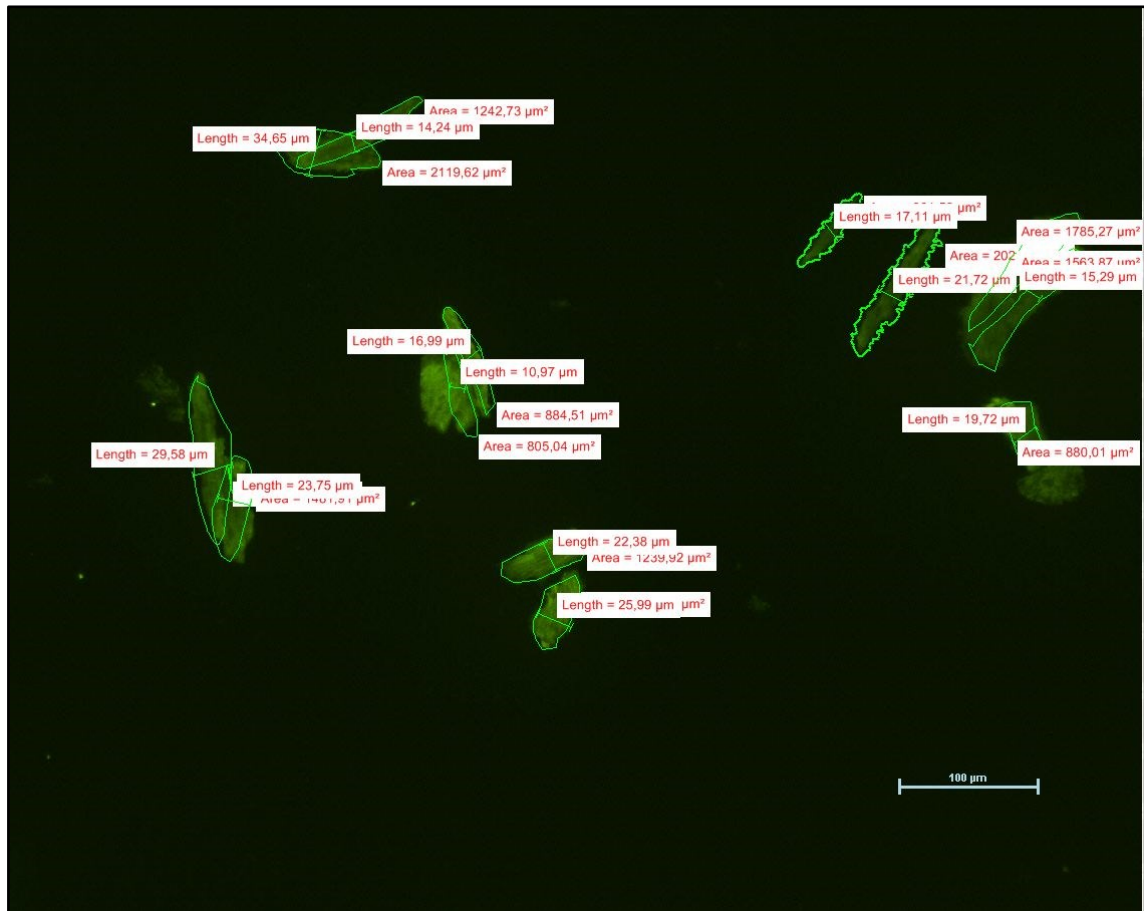


Abb. 22: Kardiomyozyten aus WT-Mäusen - Zellmessungen

Die Bilder zeigen beispielhaft Zellmessungen, an Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen. Es wurden jeweils der Flächeninhalt und die Breite der Zellen bestimmt. Später wurde der Quotient gebildet. Dieser Wert wurde in die Analyse der Zellgröße einbezogen. Die Färbung erfolgte durch den HTC LipidTox™ – Farbstoff, in der Konzentration 1:500 für 30min. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Bilder wurden bei 10x Vergrößerung mit dem Filter „Fite“ fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Versuche wurden für den Phänotyp Wildtyp an Zellen aus 3 verschiedenen Tieren durchgeführt (n=3).

In keiner der Proben zeigte sich eine signifikante Änderung der genannten Parameter durch den Einsatz von Oleat (vgl. Abbildung 23).

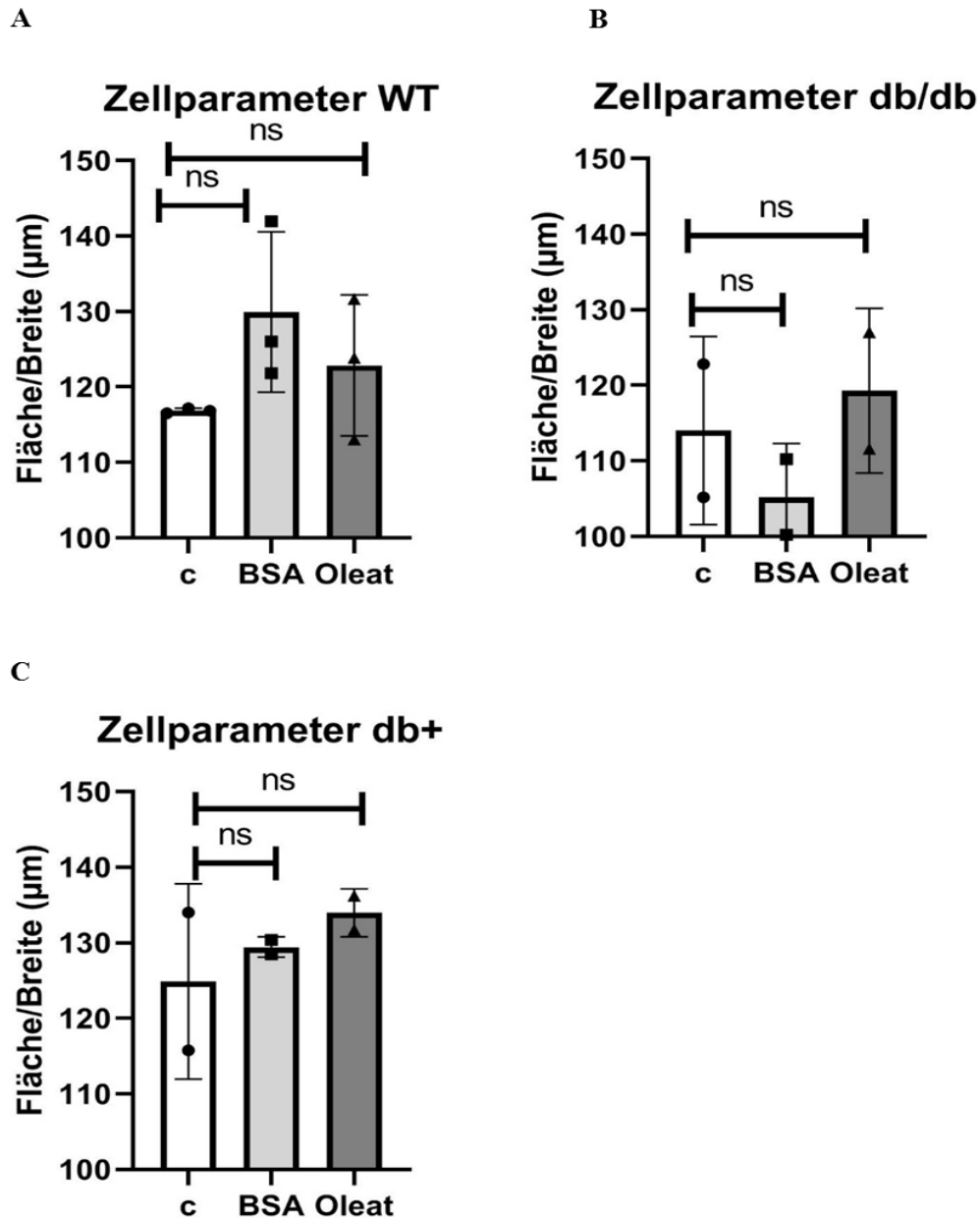


Abb. 23: Statistische Auswertung der Zellfläche im Verhältnis zur jeweiligen Zellbreite

Die Abbildung zeigt, graphisch, die Größenverteilung der Zellen für die jeweiligen Phänotypen (A) Wildtyp, (B) db/db und (C) db/+ in Abhängigkeit der getesteten Konditionen Kontrolle (c, nur Medium), BSA und Oleat. In den jeweiligen Kontrollen erfolgten die Behandlungen mit derselben Menge BSA/Ethanol, ohne das Oleat, und ausschließlich Medium. Es wurden jeweils zwei Proben von db/db-Mäusen und db/+ -Mäusen untersucht (n=2). Außerdem wurden drei Proben von WT-Mäusen, nach 6h begutachtet (n=3). Jedes untersuchte Tier ist als ein Punkt im Graphen dargestellt. Zur statistischen Untersuchung wurde die Fläche durch die Breite dividiert und mit den entstehenden Quotienten ein one-way-Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3.2 Proteinbiochemische Analysen von Titin in Zellen mit *Lipid droplets*

3.2.1 SDS-Page - Gelelektrophorese - Analyse der Isoformen N2B und N2BA

Die Expression der Titinisoformen N2B und N2BA wurde mittels proteinbiochemischer Analysen untersucht und die densitometrische Auswertung der Signale für alle Versuchsgruppen miteinander verglichen (vgl. Abbildung 24, 26 und 28).

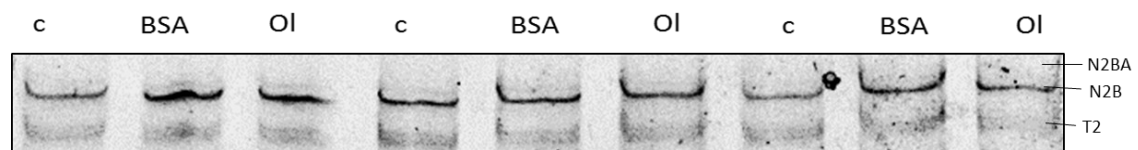


Abb. 24: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen

Exemplarische Darstellung der kardialen Titinisoformen einer Wildtypmaus, nach Proteinauftrennung mittels SDS PAGE und Coomassie-Färbung der Proteine. Von links nach rechts wird dreimal die Probenabfolge Kontrolle-BSA-Oleat wiederholt. Es sind die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa) (T1), sowie die Degradationsbande (T2) erkennbar. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Es wurden fünf Proben von WT-Mäusen, nach 6h, begutachtet (n=5).

Die Western-Blot Analyse der Titinisoformen N2B und N2BA ergab in Proben aus Wildtyp-Mäusen keine signifikante Veränderung des Isoformenverhältnisses in den Zellen, in denen *Lipid droplets* gebildet wurden, im Vergleich zu den Kontrollen. Im Vergleich zwischen den Kontrollen (unbehandelte Zellen vs BSA/Ethanol) zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Isoformen Zusammensetzung. Das Verhältnis der Isoformen zeigte über alle Proben und Konditionen in der Analyse eine geringfügige Varianz, die auf Messungenauigkeiten und biologische Varianzen zurückzuführen sind. Das Verhältnis der Isoformen lag zwischen 80-90% N2B und 10-20% N2BA (vgl. Abbildung 25).

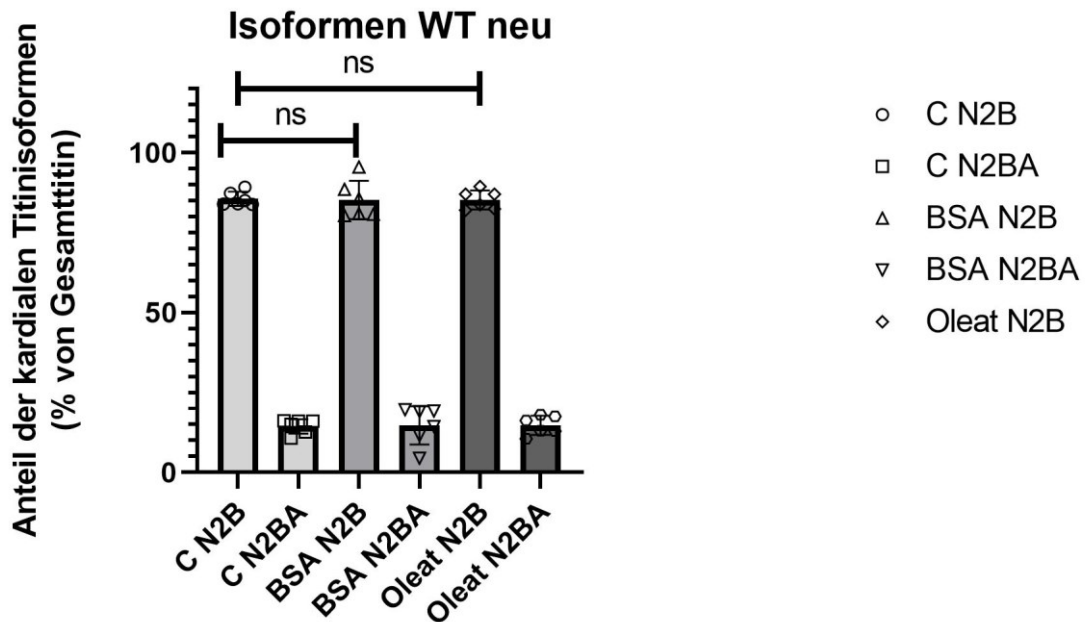


Abb. 25: Titinisoformen Wildtyp – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der N2B- und N2BA-Isoform in Proben aus WT-Mäusen im Vergleich zwischen mit Oleat, BSA und Medium (c) behandelten Zellen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen. Es wurden fünf Proben von WT-Mäusen, nach 6h, begutachtet (n=6). Zur statistischen Untersuchung wurde ein one-way-Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Neben den Zellen aus Wildtypmäusen wurden mit derselben Methode auch Zellen der db/db-Mäuse untersucht (vgl. Abbildung 26).

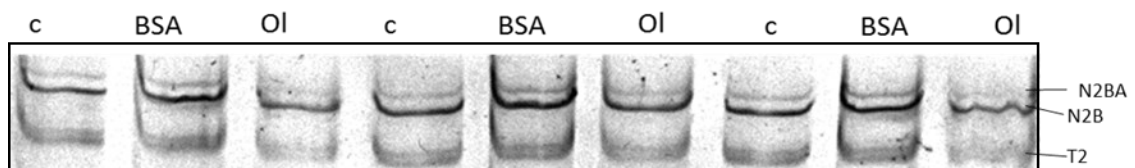


Abb. 26: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen

Titinisoformen einer db/db-Maus, nach Proteinauftrennung mittels SDS PAGE und Coomassie-Färbung der Proteine. Von links nach rechts wird dreimal die Probenabfolge Kontrolle (c, nur Medium) -BSA-Oleat (Ol) wiederholt. Es sind die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa) (T1), sowie die Degradationsbande (T2) erkennbar. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Es wurden zwei Proben von db/db-Mäusen, nach 6h Oleatbehandlung, begutachtet (n=2).

In den db/db-Proben führten die getesteten Konditionen zur Lipidakkumulation nicht zu signifikanten Unterschieden in der Titin Isoformen Komposition (vgl. Abbildung 27).

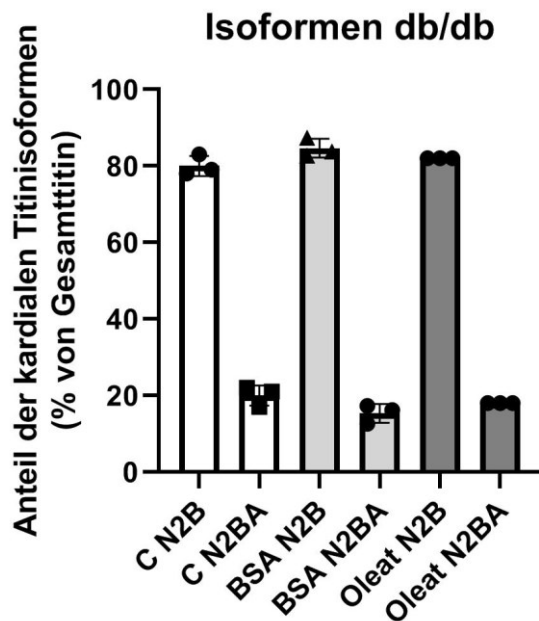


Abb. 27: Titinisoformen db/db – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der N2B- und N2BA-Isoform in Proben aus db/db-Mäusen im Vergleich zwischen mit Oleat, BSA und Medium (c) behandelten Zellen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen. Es wurden drei Proben von db/db-Mäusen, nach 6h Oleatbehandlung, analysiert (n=3). Zur statistischen Untersuchung wurde ein one-way-Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Ebenso wurden die Proben der db/+ -Mäuse mit derselben Methode hinsichtlich der Titinisoformenzusammensetzung untersucht (vgl. Abbildung 28).

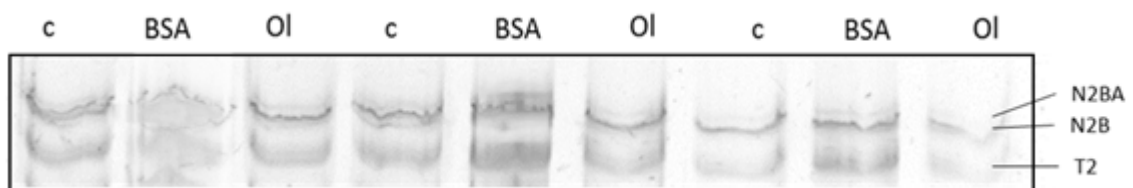


Abb. 28: Titinisoformen in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen

Titinisoformen einer db/+ -Maus, nach Proteinauftrennung mittels SDS PAGE und Coomassie-Färbung der Proteine. Von links nach rechts wurde dreimal die Probenabfolge Kontrolle (c, nur Medium) -BSA-Oleat (Ol) wiederholt. Es sind die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa) (T1), sowie die Degradationsbande (T2) erkennbar. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Es wurde eine Probe einer db/+ -Maus, nach 6h Oleatbehandlung, analysiert (n=1)

Auch in den db/+ -Proben führten die getesteten Konditionen zur Lipidakkumulation nicht zu signifikanten Unterschieden in der Titin Isoformen Komposition (vgl. Abbildung 29).

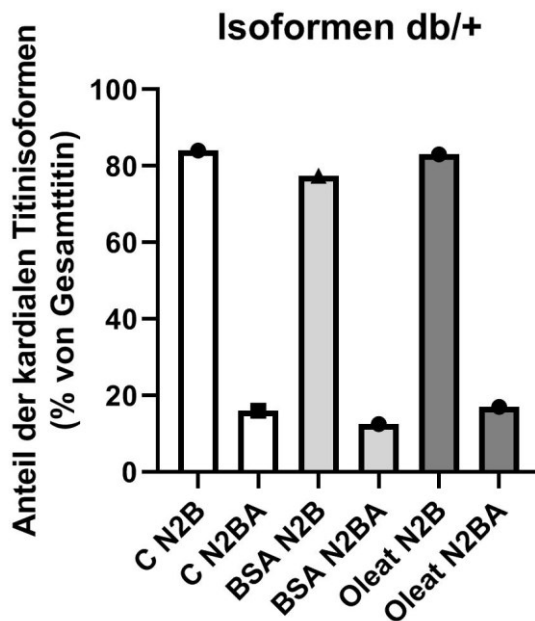


Abb. 29: Titinisoformen db/+ – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der N2B- und N2BA-Isoform in Proben aus db/+ -Mäusen im Vergleich zwischen mit Oleat, BSA und Medium (c) behandelten Zellen. Es wurden eine Probe von db/+ -Mäusen, nach 6h, begutachtet (n=1). Eine statistische Untersuchung war aufgrund der geringen Versuchszahl nicht möglich. Ein Trend zu einer Veränderung der Isoformenkomposition ließ sich nicht ableiten.

Auch zwischen unbehandelten Zellen der db/+ und der db/db Mäuse fanden sich keine Änderungen in der Titin Zusammensetzung, die auf einen statistisch signifikanten Unterschied hindeuten. Allerdings war die Anzahl der erfolgreichen Experimente mit db/+ -Mäusen zu gering für eine statistische Auswertung. In beiden Genotypen war die durchschnittliche Verteilung der Titin Isoformen bei 15-20% N2BA und 80-85% N2B (vgl. Abbildung 27, 29 und 30).

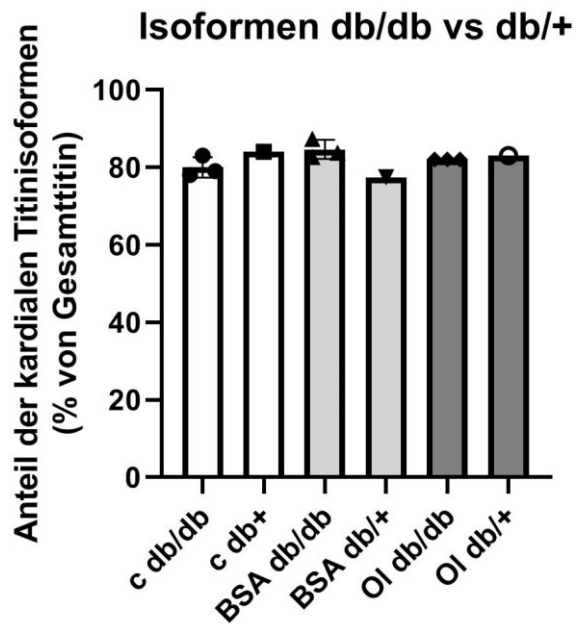


Abb. 30: Titinisoformen db/db vs. db/+ – graphische Darstellung der prozentualen Isoformenanteile

Die Abbildung zeigt die Unterschiede der prozentualen Anteile von N2B des kardialen Gesamttitins in Proben aus Herzen der verschiedenen Phänotypen db/db und db/+ im Vergleich der jeweiligen Konditionen Oleat, BSA und Medium (c) zueinander. Eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Anzahl an Proben aus der db/+ -Gruppe nicht durchführbar. Es wurden eine Probe von db/+ -Mäusen, nach 6h, begutachtet (n=1) und drei Proben aus db/db -Mäusen (n=3).

3.2.2 Western-Blot Analyse der Phosphorylierung von PEVK

Um eine schnelle Regulation und Anpassung der Kardiomyozyten an die *Lipid droplet* Akkumulation zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung der Domäne PEVK an Titin mittels Western Blot Verfahren untersucht. Die untersuchten Proben stammten aus isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp-, db/db- und db/+ -Mäusen, die unter Zellkulturbedingungen für jeweils sechs Stunden entweder mit Medium (Kontrolle, c), BSA oder Oleat behandelt wurden (Abbildung 31, 33 und 35). Eine gesteigerte Phosphorylierung der PEVK-Domäne ist in der Regel mit einer erhöhten passiven Steifigkeit der Muskelzellen verbunden (Labeit et al. 1997).

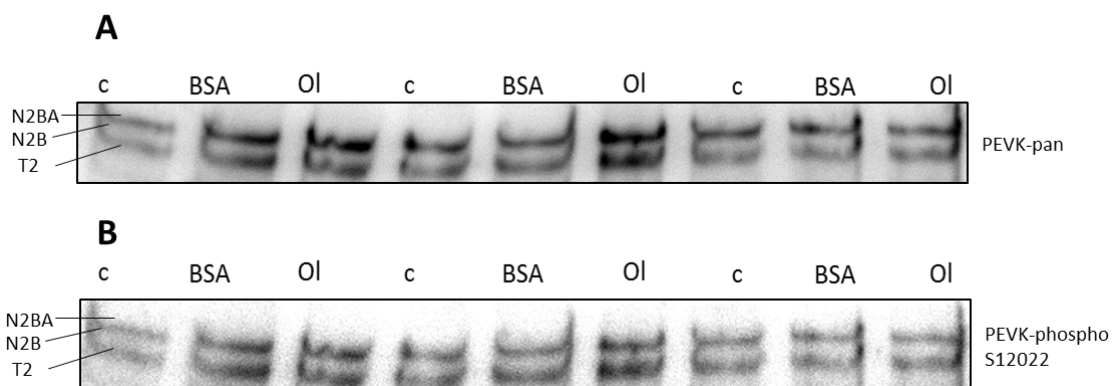


Abb. 31: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus WT-Mäusen

Anfärbung der PEVK-Domäne aus Kardiomyozyten einer Wildtypmaus mit einem pan-Antikörper (oben). Von links nach rechts sind die Proben folgendermaßen aufgetragen: Kontrolle(c, nur Medium) -BSA-Oleat (Ol). Anfärbung der PEVK-Domäne aus Kardiomyozyten einer Wildtypmaus, in (B) mit einem phospho-Antikörper für die Phosphorylierungsstelle 12022 und in (A) mit einem pan-Antikörper. Es wurden eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese an Titingelen und eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Es wurden drei Proben von WT-Mäusen, nach 6h, begutachtet (n=3). In beiden Abschnitten der Abbildung sind jeweils die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa), in Summe T1, sowie die Degradationsbande T2 dargestellt.

Bezüglich der Phosphorylierung der PEVK-Domäne ergaben sich in Proben aus Wildtyp-Mäusen im Vergleich zwischen Kontrollzellen und *Lipid droplet* beladenen Zellen signifikante Unterschiede in der relativen Phosphorylierung ($p=0,0048$). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigte sich, dass die Phosphorylierung der PEVK-Domäne, in den mit Oleat behandelten Zellen, mit hoher Wahrscheinlichkeit erhöht ist. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen zeigten die Zellen, die mit BSA/Ethanol behandelt wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen der Phosphorylierung der PEVK-Domäne (vgl. Abbildung 32).

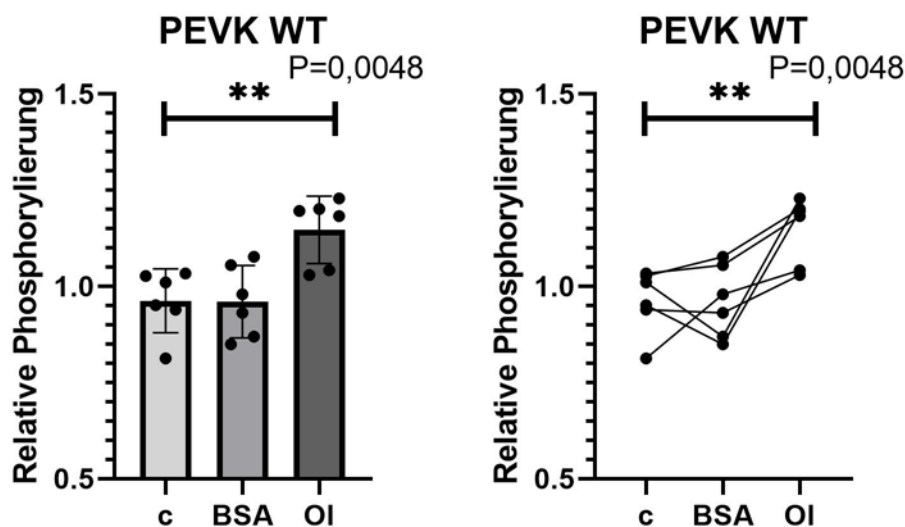


Abb. 32: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen

Graphische Darstellung des Anteiles der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Kontroll- (c, Medium), BSA und Oleatproben (OI) im Vergleich zu den Kontrollproben. In (A) ist das Verhältnis als Säulendiagramm dargestellt, in (B) sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche zueinander in Bezug gesetzt. Der Versuch wurde mit Proben aus drei verschiedenen WT-Tieren durchgeführt ($n=6$). Zur statistischen Untersuchung wurde ein one-way-Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Oleat- behandelten Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

In den Versuchen mit db/db-Mäusen, wies die graphische Auftragung der Ergebnisse auf eine Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne hin. Zwischen den Kontrollgruppen und den mit Oleat behandelten Zellen, sowie in geringerem Ausmaß, zwischen den mit BSA behandelten Zellen und den Kontrollzellen (vgl. Abbildung 34). Aufgrund der geringen Versuchszahl war eine statistische Überprüfung nicht möglich. Es wurden Zellen aus den Herzen von zwei db/db-Mäusen für die Experimente verwendet (n=2).

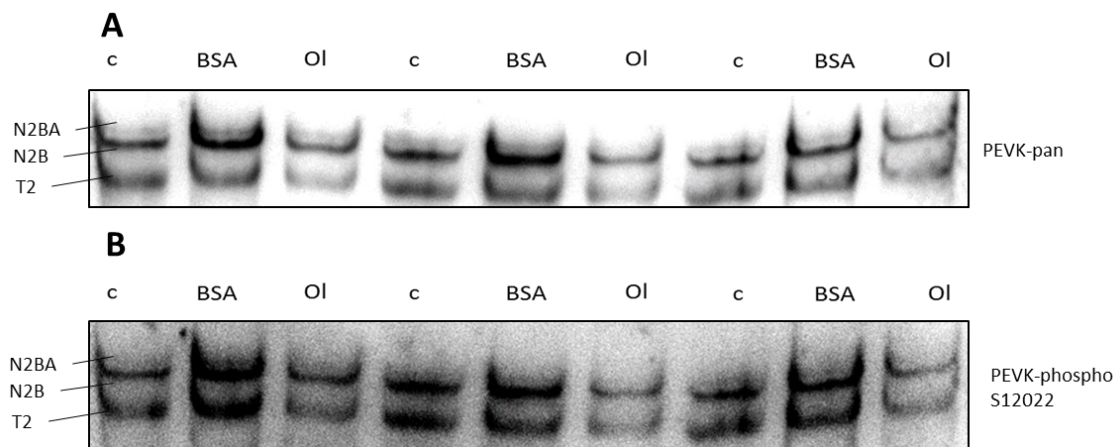


Abb. 33: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen

Anfärbung der PEVK-Domäne aus Kardiomyozyten einer db/db-Maus mit einem pan-Antikörper (**A**) und einem phospho-Antikörper für die Phosphorylierungsstelle 12022 (**B**). Es wurden eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese an Titingelen und eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt. Von links nach rechts sind die Proben folgendermaßen aufgetragen: Kontrolle (c, nur Medium) -BSA-Oleat (Ol). In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Versuche wurden an Zellen aus den Herzen zwei verschiedener Tiere durchgeführt (n=2). In beiden Abschnitten der Abbildung sind jeweils die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa), in Summe T1, sowie die Degradationsbande T2 dargestellt.

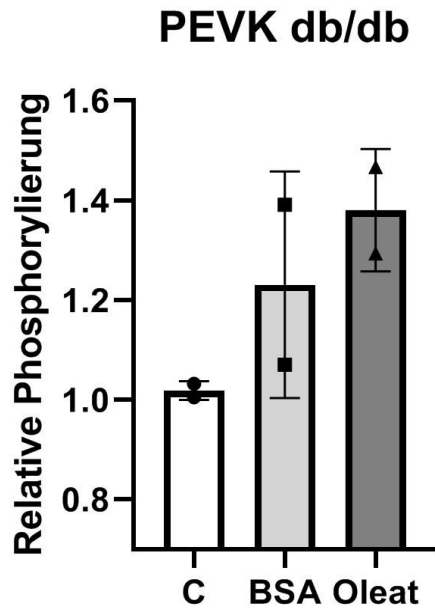


Abb. 34: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen

Graphische Darstellung des Anteiles der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Kontroll- (c, Medium), BSA und Oleatproben im Vergleich zu den Kontrollproben. Der Versuch wurde mit Zellen aus zwei verschiedenen db/db-Tieren durchgeführt (n=2). Zur statistischen Untersuchung wurde ein one-way-Anova durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne zwischen Kontrollen und Zellen, die mit Oleat behandelt wurden. Zwischen den Zellen, die mit BSA behandelt wurden und den Kontrollen waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

In db/+-Mäusen ergaben sich Hinweise auf eine Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne (vgl. Abbildung 36). Das Experiment konnte in db/+-Mäusen mit Zellen aus einem Tier erfolgreich durchgeführt werden (n=1).

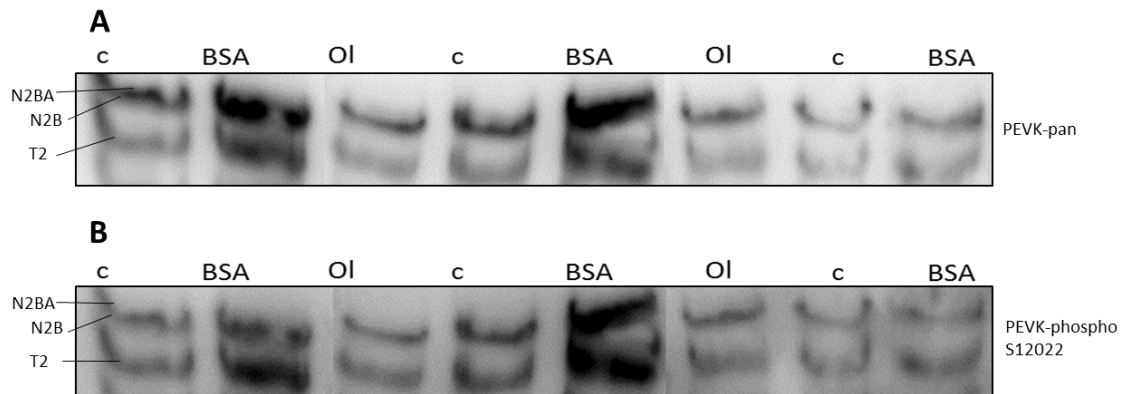


Abb. 35: relative PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+-Mäusen

Anfärbung der PEVK-Domäne aus Kardiomyozyten einer db/+-Maus mit einem pan-Antikörper (**A**) und einem phospho-Antikörper für die Phosphorylierungsstelle 12022 (**B**). Es wurden eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese an Titingelen und eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt. Von links nach rechts sind die Proben folgendermaßen aufgetragen: Kontrolle (c, nur Medium) -BSA-Oleat (Ol). Die Abbildung zeigt die Banden eins bis acht des Blots. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Die Versuche wurden an Zellen aus den Herzen eines Tieres durchgeführt (n=1). In beiden Abschnitten der Abbildung sind jeweils die Banden N2BA (~3300 kDa) und N2B (~3000 kDa), in Summe T1, sowie die Degradationsbande T2 dargestellt.

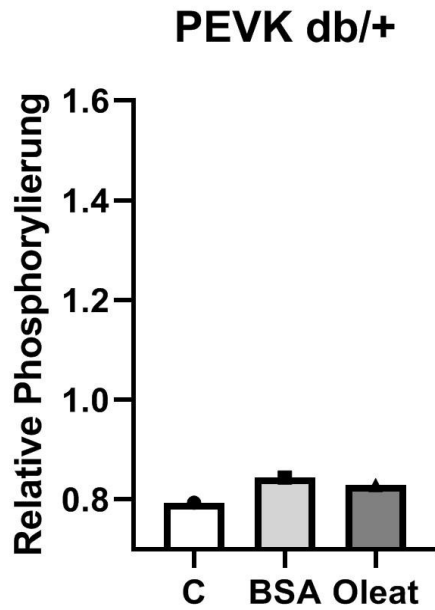


Abb. 36: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen

Graphische Darstellung des Anteiles der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Kontroll- (c, Medium), BSA und Oleatproben im Vergleich zu den Kontrollproben. Der Versuch wurde mit Proben aus einem db/+ -Tier durchgeführt (n=1). Aufgrund der geringen Versuchszahl konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

Der Vergleich der Ergebnisse beider Genotypen zeigte Hinweise auf eine höhere Phosphorylierung der PEVK-Domäne in db/db-Mäusen im Vergleich zu db/+ -Mäusen, in allen getesteten Konditionen (vgl. Abbildung 37). Aufgrund der geringen Versuchsanzahl war eine statistische Auswertung nicht möglich.

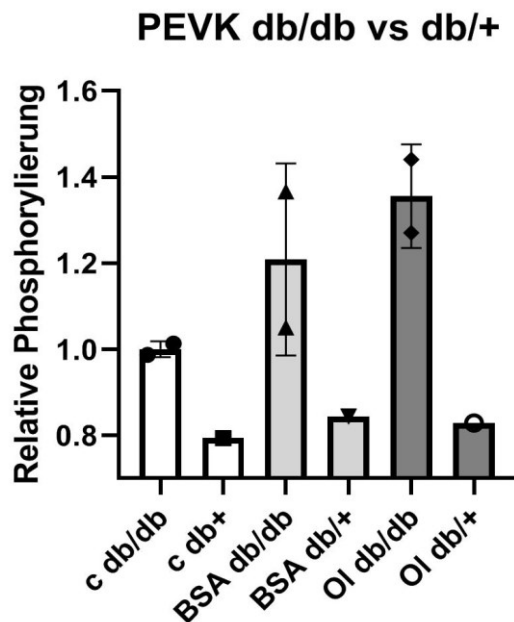


Abb. 37: graphische Darstellung der relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen im Vergleich zur relativen PEVK-Phosphorylierung in Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen

Die Abbildung zeigt den Vergleich der PEVK-Phosphorylierung zwischen Proben aus db/db-Mäusen und db/+ -Mäusen, im Hinblick auf die Konditionen, Kontrolle (c, Medium), BSA und Oleat (Ol). Als Referenz diente die Phosphorylierung der Kontrolle aus der db/db-Maus. Es wurden Proben aus einem db/db-Tier und dem entsprechenden db/+ -Geschwistertier verglichen (n=1). Es zeigt sich ein Trend zu einer höheren Phosphorylierung der PEVK-Domäne der db/db-Mäuse in allen getesteten Konditionen. Eine statistische Auswertung war bei dieser Versuchsanzahl nicht möglich.

3.2.3 Western-Blot Analyse der Titin-T2:T1-Ratio

Als Maß für die Degradation des Titinfilaments wurde die T2/T1-Ratio in Kardiomyozyten von Wildtyp-, db/db- und db/+ -Mäusen untersucht und unter drei verschiedenen Konditionen (6h Medium, 6h BSA/Ethanol, 6h Oleat) miteinander verglichen.

Es zeigte sich in Wildtyp-Mäusen unter keiner Bedingung eine signifikante Veränderung der T2/T1-Ratio, wobei erneut die Kontrollproben mit Medium als Referenz galten (vgl. Abbildung 40). Ein vermehrter Titinabbau durch das Oleat konnte nicht nachgewiesen werden.

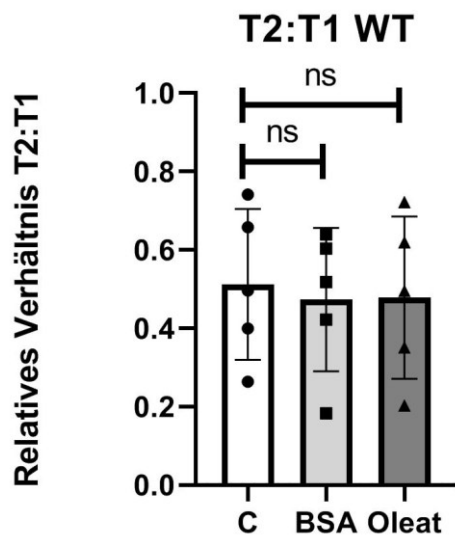


Abb. 38: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen

Die Abbildung zeigt das relative Verhältnis der Degradationsbande T2 zur Titinbande T1, in Kontroll- (c, nur Medium), BSA- und Oleatproben. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Nachdem eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese durchgeführt worden war, konnten die Titingele mit einer Coomassie-Färbung angefärbt werden, sodass die Banden N2BA, N2B (zusammen T1) und T2 (Degradationsbande) sichtbar waren. Die Banden wurden in einem Imager fotografiert und anschließend quantitativ durch ein Computerprogramm ausgewertet und graphisch aufgetragen. Untersucht wurden Kardiomyozyten aus drei verschiedenen Wildtypmäusen (n=3). Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way-Anova, ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Konditionen. Untersucht wurden Kardiomyozyten aus drei verschiedenen Wildtypmäusen (n=3).

Auch in db/db-Mäusen konnte unter keiner Bedingung eine signifikante Veränderung der T2/T1-Ratio festgestellt werden, wobei die Kontrollproben mit Medium als Referenz galten (vgl. Abbildung 41). Ein vermehrter Titinabbau durch das Oleat konnte nicht festgestellt werden.

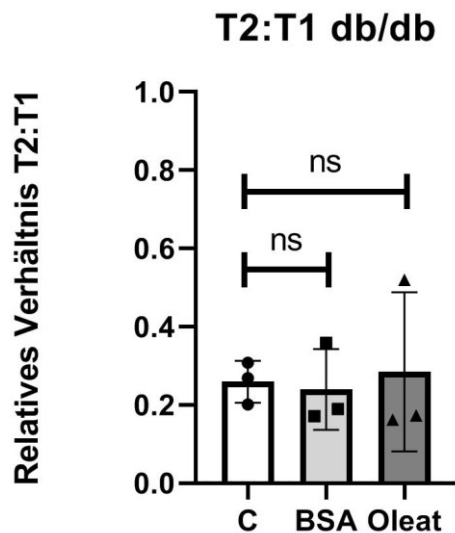


Abb. 39: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen

Die Abbildung zeigt das relative Verhältnis der Degradationsbande T2 zur Titinbande T1, in Kontroll- (c, nur Medium), BSA und Oleatproben. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Nachdem eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese durchgeführt worden war, konnten die Titingele mit einer Coomassie-Färbung angefärbt werden, sodass die Banden N2BA, N2B (zusammen T1) und T2 (Degradationsbande) sichtbar waren. Die Banden wurden in einem Imager fotografiert und anschließend quantitativ durch ein Computerprogramm ausgewertet und graphisch aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way-Anova, ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Konditionen. Untersucht wurden Kardiomyozyten aus drei db/db-Mäusen (n=3).

In db/+-Mäusen konnte unter keiner Bedingung eine Veränderung der T2/T1-Ratio festgestellt werden. Die Kontrollproben mit Medium galten als Referenz (vgl. Abbildung 42). Ein vermehrter Titinabbau durch das Oleat konnte nicht beobachtet werden.

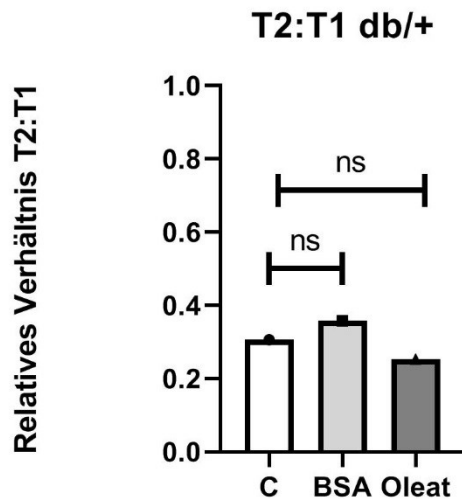


Abb. 40: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/+-Mäusen

Die Abbildung zeigt das relative Verhältnis der Degradationsbande T2 zur Titinbande T1, in Kontroll- (c, nur Medium), BSA- und Oleatproben. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Nachdem eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese durchgeführt worden war, konnten die Titingele mit einer Coomassie-Färbung angefärbt werden, sodass die Banden N2BA, N2B (zusammen T1) und T2 (Degradationsbande) sichtbar waren. Die Banden wurden in einem Imager fotografiert und anschließend quantitativ durch ein Computerprogramm ausgewertet und graphisch aufgetragen. Hinweise auf eine Veränderung der Degradation des Proteins Titin durch eine Behandlung mit Oleat ergaben sich nicht. Eine statistische Analyse war aufgrund der geringen Versuchszahl nicht möglich. Untersucht wurden Kardiomyozyten aus einer db/+-Maus (n=1).

Auch im Vergleich der Genotypen db/db und db/+ ergaben sich keine Hinweise auf Veränderungen im Verhältnis des degradierten und intakten Titin (vgl. Abbildung 43). Das Experiment konnte in db/+-Mäusen in Ermangelung weiterer Proben nur einmal durchgeführt werden.

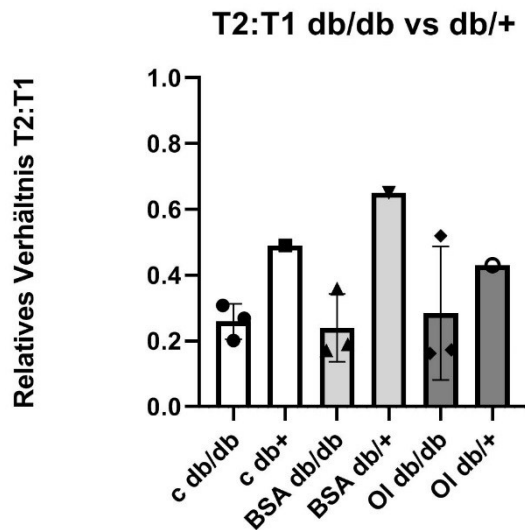


Abb. 41: graphische Darstellung des relativen Verhältnisses von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen im Vergleich zum relativen Verhältnis von T2:T1 in Kardiomyozyten aus db/+ Mäusen

Die Abbildung zeigt das Verhältnis der T2:T1-ratio des Titin im Vergleich zwischen den Phänotypen db/db und db/+, sowie in Abhängigkeit der verschiedenen Konditionen des Experiments: Medium (Kontrolle, c), BSA und Oleat (Ol). In diesem Ansatz wurden die Zellen mit Oleat, in einer Konzentration von 0,5mM, gelöst in BSA/Ethanol, in 1,5mL 4% FBS-Medium behandelt. Nachdem eine Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese durchgeführt worden war, konnten die Titingele mit einer Coomassie-Färbung angefärbt werden, sodass die Banden N2BA, N2B (zusammen T1) und T2 (Degradationsbande) sichtbar waren. Die Banden wurden in einem Imager fotografiert und anschließend quantitativ durch ein Computerprogramm ausgewertet und graphisch aufgetragen. Es ergaben sich Hinweise auf eine höhere Degradation in den Proben aus db/+-Mäusen in allen getesteten Konditionen. Eine statistische Analyse war aufgrund der geringen Versuchszahl nicht möglich. Untersucht wurden Kardiomyozyten aus drei db/db-Mäusen (n=3) und einer db/+-Maus (n=1).

4 Diskussion:

4.1 Oleat induziert *Lipid droplets* in kultivierten adulten Kardiomyozyten der Maus

Ziel der vorliegenden Arbeit war die erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur *Lipid droplet* Akkumulation in adulten Kardiomyozyten der Maus, welche die Analyse der Auswirkungen der *Lipid droplets* auf das Sarkomerprotein Titin erlaubt. In vivo akkumulieren Kardiomyozyten *Lipid droplets* nur unter pathologischen Bedingungen, wie Hypoxie oder Hyperlipidämie (Barba et al. 2009).

Die erfolgreiche Induktion von *Lipid droplets* in Zellkulturen wurde bereits mehrfach beschrieben (Barba et al. 2009; Li et al. 2020; Ferroni et al. 2019).

Ein Unterschied der meisten bisher publizierten Versuche zur Induktion von *Lipid droplets* zu dieser Arbeit ist die Wirtszelle. Besonders hepatisches Gewebe oder Adipozyten wurden bisher häufig zur Untersuchung von *Lipid droplets* gewählt (Zheng et al. 2018; Zhang et al. 2000; Yamaki et al. 1997). Diese Gewebe akkumulieren unter physiologischen Bedingungen *Lipid droplets*. Sie unterscheiden sich in dieser Eigenschaft, sowie in Aufbau und Funktion deutlich von den hier untersuchten Kardiomyozyten. Aus diesem Grund sind die vorbeschriebenen Vorgehensweisen nur bedingt mit den Versuchen in dieser Arbeit vergleichbar. Besonders hinsichtlich des Lösungsmittels unterscheiden sich die Vorgehensweisen verschiedener Autoren (Barba et al. 2009; Zhang et al. 2000; Pawella et al. 2010). So nutzte Zhang 10% FBS-Medium, zur Induktion von *Lipid droplets* in Adipozyten. Barba et al. verwendeten, wie auch die hier präsentierte Arbeit, 4% FBS-Medium zur Induktion der *Lipid droplets* in Kardiomyozyten.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass in diabetischen Tiermodellen mit db/db-Mäusen *Lipid droplets* in hoher Dichte in den Kardiomyozyten zu finden sind (Funk et al. 2022). Die Vorteile eines Zellkulturmodells, das den Zustand diabetischer Tiere nachahmt sind finanzieller und praktikabler Natur. Denn in diabetischen Tieren sind die Auswirkungen von *Lipid droplets* nur Teil vieler weiterer metabolischer Veränderungen, die mit der Erkrankung Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) einhergehen. Auch ist eine kurzfristige Wirkung der *Lipid droplets* nicht isoliert zu betrachten, da die Tiere über einen längeren Zeitraum erkrankt sind und so bereits proteinregulatorische

Kompensationsmechanismen in Gang gesetzt werden könnten, die die Auswirkungen der *Lipid droplets* modifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Induktion von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten das bereits an Rattenkardiomyozyten beschriebene Protokoll von Barba et al., ebenfalls zunächst an Rattenkardiomyozyten, durchgeführt (Barba et al. 2009). Dieses Vorgehen erschien einerseits sinnvoll, da es bereits erprobt war und andererseits, da die Präparation von Rattenkardiomyozyten, aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, für eine höhere Zellausbeute und somit mehr Material zum Erproben der Methode liefert, als es mit Kardiomyozyten der Maus möglich gewesen wäre.

Bei der Etablierung des Protokolls gab es verschiedene Problematiken zu berücksichtigen. Hinsichtlich der optimalen Kulturbedingungen zur Induktion von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten erwiesen sich die Nutzung von Ethanol als Lösungsmittel und BSA als Komplexbildner als problematisch. Aus der Literatur bekannt ist, dass Ethanol *Lipid droplets* in Hepatozyten induzieren kann (Zuo et al. 2019). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde besonders in den Kontrollen, die BSA/Ethanol-Mischungen enthielten beobachtet, dass es zu einer Bildung von *Lipid droplets* kam. Dieser Effekt war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als bei den zusätzlich mit Oleat behandelten Zellen. Dennoch wurde hier in den nachfolgenden Experimenten die Ethanol-Menge zunächst minimiert und schließlich durch NaCl ersetzt. Dies geschah mit der Intention ethanolinduzierte Veränderungen der Zellen zu minimieren und letztlich auszuschließen. Zusätzlich wurde das zunächst verwendete Standard BSA durch fettsäurefreies (*fatty acid free*) BSA ersetzt, um unerwünschte Nebeneffekte durch das Trägermedium zu vermeiden und den Zellen der Kontrollgruppe keine undefinierten Lipide zur Verfügung zu stellen.

Nachdem verschiedene Konzentrationen des Oleats, sowie unterschiedliche Inkubationszeiten getestet worden waren, erwies sich eine Inkubation der Zellen mit 0,5mM Oleat für sechs Stunden als sinnvoll zur Induktion der *Lipid droplets*. Dieses Vorgehen konnte sowohl in Ratten-, als auch für Mauskardiomyozyten angewendet werden. Auch eine Inkubationszeit von vier Stunden führte bereits zur geringfügigen Induktion von *Lipid droplets*, allerdings wurde für eine deutlichere Veränderung der Zellen eine längere Inkubationszeit und damit eine höhere Rate an dedifferenzierten oder apoptotischen Zellen in Kauf genommen.

Auch die Konzentration des FBS ist ein zu berücksichtigender Parameter. Im Vergleich der hier vorliegenden Arbeit mit Studien die andere Wirtszellen wie Adipozyten oder Hepatozyten verwendeten, wäre es denkbar, dass eine höhere Konzentration des FBS für eine höhere Toleranz der Zellen gegenüber Oleat in Kardiomyozyten sorgen könnte. Dies könnte ein längeres Überleben der Zellen sicherstellen. Während für die Untersuchung der Kardiomyozyten, nach kurzen Intervallen der Oleatbehandlung, eine Konzentration von 4% FBS als ausreichend für eine deutliche Lipidakkumulation erwies, könnte für Untersuchungen über längere Zeiträume eine höhere FBS Konzentration sinnvoll sein.

Bei der Diskussion der hier vorgestellten Daten gilt es zu beachten, dass die beobachteten unmittelbaren Auswirkungen der LD auf die Sarkomerstruktur und speziell das Protein Titin die komplexen Veränderungen der Kardiomyozyten der Typ 2 Diabetes Tiere und Patienten nicht vollständig widerspiegeln können. Die Lipidaufnahme über einen Zeitraum von sechs Stunden ist, im Vergleich zu der Zeit die Kardiomyozyten in chronisch kranken Patienten einer Hyperlipidämie ausgesetzt sind, extrem kurz. Einen zuverlässigen Rückschluss auf die Veränderungen bei chronischer Lipidakkumulation bieten die hier diskutierten Ansätze also nicht.

Womöglich könnte es eine Option sein, die Zellen, nachdem sie sechs Stunden mit Oleat behandelt wurden, wieder unter normalen Kulturbedingungen zu inkubieren und so die Effekte die *Lipid droplets* mittel-, bis langfristig auf die Zellen haben zu untersuchen.

Da primäre Zellkulturen von Kardiomyozyten jedoch generell eher ungeeignet für Langzeitstudien sind wäre der Erfolg eines solchen Ansatzes fraglich. Ungeeignet für eine solche Fragestellung erscheinen vor diesem Hintergrund, insbesondere solche Kulturbedingungen, die zur Induktion von *Lipid droplets* deutlich höhere Konzentrationen von Ethanol und Oleat verwenden (Zhu et al. 2020), da diese das Überleben der Zellen deutlich herabsetzen könnten. Somit ist gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit die reine Induktion von *Lipid droplets* nicht problematisch. Die eigentliche Problematik besteht darin, die toxische Wirkung freier Fettsäuren und der Komplexbildner des Oleats soweit zu mildern, dass die Zellen in der Kultur nicht dedifferenzieren und dem Zelltod anheimfallen, sodass verwertbare Ergebnisse entstehen (Barba et al. 2009; DiDonato und Brasaemle 2003; Jüngst).

Dedifferenzierung beschreibt den Prozess, bei dem Zellen ihre strukturelle Integrität verlieren. Mikroskopisch zeigen sich häufig eine Abrundung der Zellen, der Verlust der

Zellkerne und eine schlechtere Abgrenzbarkeit der Zellen gegenüber dem Hintergrund. Metabolisch finden bereits in frühen Stadien der Dedifferenzierung Umbauprozesse in den kontraktile Myofilamenten statt (Nippert et al. 2017). Titin ist eines der ersten Proteine, die in diesem Prozess abgebaut oder umgebaut werden (Müller et al. 2021).

Die hier vorgestellte Studie zeigt, dass in dem hier verwendeten Modell adulter Mausmyozyten die optimale Inkubationszeit zur Induktion von *Lipid droplets* bei sechs Stunden liegt. Zwar konnten bereits nach vier Stunden Inkubation *Lipid droplets* nachgewiesen werden, wie auch von Barba et al für Rattenkardiomyozyten beschrieben. Auch die Inkubation über deutlich längere Zeiträume, beispielsweise 16h oder 40h führte durchaus zu einer Induktion der Fett-Tröpfchen. Ebenso gelang es in Versuchen mit Oleatkonzentrationen von 1mM statt 0,5mM ebenfalls *Lipid droplets* zu induzieren. Allerdings waren die Nebeneffekte, wie Zelldedifferenzierung oder Abnahme der Zelldichte, in den Versuchen mit hohen Oleatkonzentrationen und langen Inkubationsdauern zu stark, oder die Akkumulation der *Lipid droplet* in den Versuchen mit einer Dauer von vier Stunden, zu gering. Die Behandlung der Zellen über sechs Stunden mit Oleat erwies sich als gutes Vorgehen, um die Effektstärke der *Lipid droplet*-Induktion zu optimieren, ohne dabei bereits übermäßige mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Zellen tolerieren zu müssen.

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Induktion von *Lipid droplets* in Kardiomyozyten der Ratte und der Maus möglich und eine Etablierung im Zellkulturmodell erfolgreich zu bewerkstelligen ist. Problematisch ist die Anpassung des Modells an spezifische Experimente, besonders, wenn diese längerfristig ausgelegt sind, da die erwähnten Methoden, neben *Lipid droplets*, auch Zelltod und Zelldedifferenzierung induzieren.

4.2 HCS LipidTOXTM ermöglicht den Nachweis von *Lipid droplets* in adulten Kardiomyozyten der Maus

Um die Induktion von *Lipid droplets* in den Kardiomyozyten nachzuweisen wurde ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis gewählt. Während Barba et al eine Färbung mit dem Farbstoff Nilrot beschrieben (Barba et al. 2009), wurde in der hier diskutierten Arbeit HCS LipidTOXTM als Farbstoff gewählt. Dieser bot den Vorteil nach einer Dauer von nur 30 Minuten Inkubation an die Zielstruktur gebunden zu haben und weniger starke Hintergrundanfärbung durch eine Reaktion mit dem Kulturmedium zu verursachen.

Mithilfe der Anregung im grünen Farbspektrum (490-575nm) gelang es intrazelluläre *Lipid droplets* in den behandelten Zellen nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch auch bei Anwendung des LipidTox-Farbstoffes eine unspezifische Anfärbung des Hintergrundes, was die Abgrenzung der *Lipid droplets* erschwerte und auch in Kontrollzellen ein schwaches diffuses Signal induzierte (vgl. Abbildung 16).

Neben den Kardiomyozyten von adulten Mäusen und Ratten vom Wildtyp wurden auch Mäuse mit einer genetischen Veränderung, sogenannte db/db-Mäuse verwendet. Als Kontrolle dienten Geschwistertiere, db/+ -Mäuse, die anstelle der homozygoten Mutation einen heterozygoten Phänotyp aufweisen.

Diese Proben wurden beispielhaft untersucht, um zu überprüfen, ob die Lipidakkumulation in Zellkulturen mit Kardiomyozyten aus Wildtypmäusen nach der Oleatbehandlung vergleichbar zu den intrazellulären Lipidansammlungen in den Kardiomyozyten der diabetischen Tieren ist. Die Färbung von Kardiomyozyten der db/db-Mäuse zeigte nur vereinzelt abgrenzbare *Lipid droplets*, jedoch eine sehr starke Anfärbung und große Farbstoffakkumulationen in den Zellen. Es ist anzunehmen, dass in den Kardiomyozyten der db/db-Tier die *Lipid droplets* akkumulieren oder sehr dicht gelagert sind. Der Farbstoff findet in diesen Zellen so viele Targets, dass eine Abgrenzung einzelner *Lipid droplets* nicht mehr möglich ist. Selbiges gilt auch für die behandelten Zellen von Wildtypmäusen, in denen diese Auffälligkeit ebenfalls beobachtet werden konnte, sowie die mit Oleat behandelten db/+ -Mauskardiomyozyten. Die Kardiomyozyten der db/+ -Mäuse, die nicht mit Oleat behandelt wurden, zeigten dagegen keine Auffälligkeiten und waren vergleichbar zu unbehandelten Kardiomyozyten von Wildtypmäusen.

In den Kardiomyozyten der db/db-Mäusen gelang eine Abgrenzung einzelner *Lipid droplets* in den Kontrollzellen nur eingeschränkt, während sich im Vergleich dazu in den mit Oleat behandelten Zellen der db/db-Mäuse einzelne große *droplets* vom Hintergrund abhoben. Diese waren in ihrer Morphologie vergleichbar mit den *Lipid droplets*, die durch eine Oleatbehandlung in Wildtypmäusen hervorgerufen werden konnten, jedoch deutlich vereinzelter im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Scheinbar ruft die Oleatbehandlung der Kardiomyozyten von db/db-Mäusen eine zusätzliche *Lipid droplet*-Bildung hervor. Da vereinzelte *droplets* zuverlässig abgrenzbar sind, was in den Kontrollzellen seltener gelang, wird in der hier diskutierten Studie der Schluss gezogen, dass die *Lipid droplets* durch die Behandlung mit Oleat zusätzlich freie Fettsäuren anreichern, die dann als Target für den HCS-LipidTOXTM Farbstoff dienen, sodass die am meisten gefüllten *Lipid droplets* deutlicher hervortreten. Im Umkehrschluss ist davon auszugehen, dass die *Lipid droplets* die in diabetischen Tieren bereits ohne Oleatbehandlung akkumulieren alle ähnliche Konzentrationen freier Fettsäuren beinhalten. Ob die voneinander abweichenden Konzentrationen freier Fettsäuren in den *Lipid droplets* der mit Oleat behandelten Zellen jedoch nur eine kurzfristige Reaktion auf die hohe Fettaufnahme der Kardiomyozyten ist, die mittelfristig reguliert wird, sodass die Konzentration in allen *Lipid droplets* wieder ähnlich ist, oder ob es sich um ein Zeichen für eine Überladung der Kardiomyozyten und der *Lipid droplets* mit freien Fettsäuren handelt wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Farbstoff HCS-LipidTOXTM sich gut für den Nachweis von *Lipid droplets* in kultivierten Kardiomyozyten eignet. *Lipid droplets* konnten mithilfe des Farbstoffes in Kardiomyozyten von db/db- db/+ und Wildtypmäusen nach einer Behandlung mit Oleat nachgewiesen werden. In db/db-Mäusen erfolgte der Nachweis auch in den Kontrollproben, da diese Tiere aufgrund ihres diabetischen Phänotyps auch ohne zusätzliche Behandlung *Lipid droplets* in ihren Kardiomyozyten akkumulieren. Eine zusätzliche Behandlung dieser Kardiomyozyten mit Oleat sorgt für eine deutlichere optische Abgrenzbarkeit der *Lipid droplets* in den Zellen, mutmaßlich durch Schwankungen der Fettsäurekonzentration in den *Lipid droplets*.

4.3 PLIN-2 eignet sich als Marker für die Induktion von *Lipid droplets*

Die Proteine der Perilipinfamilie werden ausschließlich von *Lipid droplets* exprimiert, was sie für deren Detektion zu wertvollen Biomarkern macht (Zhu et al. 2020).

Dazu zählen Perilipin 2 (Plin2) und Plin3, die ubiquitär exprimiert werden, sowie Plin4 in oxidativen Geweben und Plin5, welches ausschließlich in Muskelgewebe exprimiert wird (Rosas-Rodríguez et al. 2022).

Plin2 wurde zuvor als gut geeignetes Markerprotein für die *Lipid droplets* in Kardiomyozyten beschrieben (Mardani et al. 2019). Für die Färbung der *Lipid droplets* wurde ein Farbstoff verwendet, der an neutrale Fettsäuren bindet, aus denen die *Lipid droplets* bestehen. Die Färbung von Oleat-behandelten Wildtyp-Kardiomyozyten sowie von Kardiomyozyten aus db/db-Mäusen mit Plin2-Antikörpern, erbrachte, ebenso wie die Färbung mit dem fettsäureaffinen Farbstoff, einen mikroskopischen Nachweis von *Lipid droplets*. Da Plin2 ein Oberflächenprotein ist, das auf *Lipid droplets* in kardialen Gewebe exprimiert wird, wurde erwartet, kranzförmige Ansammlungen um die Tropfen erkennen zu können. Dies erwies sich allerdings als Fehleinschätzung. Es zeigten sich vielmehr kleine Punkte und Akkumulationen. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass sich nach einer Inkubation von sechs Stunden noch keine große Anzahl an Plin2 Proteinen gebildet hat, beziehungsweise die Bildung möglicherweise noch nicht abgeschlossen ist.

Die beschriebenen Ergebnisse passen in die aktuelle Studienlage zu den *Lipid droplet* assoziierten Proteinen der Perilipinfamilie. Die Proteine eignen sich prinzipiell als Marker für *Lipid droplets*, insbesondere die Proteine, die gewebespezifisch exprimiert werden (Zhang et al. 2022). Das zu erwartende Signal durch die Proteine ist jedoch weniger stark, als die Anfärbung der *Lipid droplets* selbst. Die Tropfen haben viele verschiedene Oberflächenproteine, die je nach Metabolismus der Zelle exprimiert werden und von denen spezifische Proteine stets nur einen kleinen Teil ausmachen.

Zusammenfassend können *Lipid droplets* in Kardiomyozyten durch eine Anfärbung mit einem gegen Plin2 gerichteten Antikörper mikroskopisch nachgewiesen werden. Der Nachweis mit dem Antikörper stellt jedoch keine Verbesserung gegenüber dem Farbstoff HCS-LipidTOX™ (s. 4.3) dar, der direkt gegen die Fettsäuren der *Lipid droplets* gerichtet ist. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der Nachweis mit dem Plin2 Antikörper im Vergleich zu dem Lipidfarbstoff eine geringere Sensitivität aufweist.

4.4 *Lipid droplets* beeinflussen nicht die Zellgröße, aber die Sarkomerstruktur in Kardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob *Lipid droplets* die Zellgröße beeinflussen wurde die Zellmorphologie analysiert. Dabei wurden der Flächeninhalt und die Breite der Zelle bestimmt. Auf diese Weise wurde deutlich, dass es durch die Oleat-induzierte Lipidakkumulation zu keinem signifikanten Größenunterschied der behandelten Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollzellen kam. Dies galt auch für Oleat-behandelte Kardiomyozyten der db/db- und db/+ -Tiere.

Die biochemischen Einflüsse von *Lipid droplets* in Zellen, wie eine verminderte Insulinsensitivität durch *Lipid droplets*, oder eine Pufferung hoher intrazellulärer Calciumspiegel (Gemmink et al. 2017; Barba et al. 2009) sind gut erforscht und beschrieben. Ebenso die mit Diabetes einhergehenden Veränderungen in Kardiomyozyten, sowie die Einflüsse von Insulin auf Kardiomyozyten. Dazu zählen eine veränderte Titinphosphorylierung und damit einhergehende Veränderungen der passiven Steifigkeit der Herzmuskelzellen (Hopf et al. 2018; Gemmink et al. 2017; Neagoe et al. 2002), während zu den mechanischen Einflüssen von *Lipid droplets* auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten wenig bis gar nichts bekannt ist. Nachgewiesen ist allerdings, dass eine statische Dehnung von und durch Adipozyten zu Differenzierungsreaktionen der Adipozyten und des umliegenden Gewebes führt (Shoham und Gefen 2012). In weitestführenden Studien konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre *Lipid droplets* die effektive Steifigkeit von Adipozyten während ihres Reifungsprozesses verändern (Shoham et al. 2014). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bereits geringfügige Versteifungen im Mikromaßstab der Zellen einen starken Einfluss auf deren mechanische Umgebung im Makromaßstab haben (Shoham et al. 2014).

Lipid droplets spielen vielfältige Rollen in intrazellulären Signalwegen. Diese sind nach gegenwärtiger Studienlage unter physiologischen Bedingungen positiv für den Organismus zu bewerten. So wirken sie zellunabhängig präventiv gegen Lipotoxizität, können in Kontakt mit Lysosomen Mikrolipophagie begünstigen, was bei Glukoseentzug das Überleben der Zellen sicherstellt. Sie schützen vor Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums, wie Ungleichgewichten in der Proteinfaltungskapazität und wirken protektiv gegen mitochondriale Schäden während der Autophagie (Olzmann

und Carvalho 2019). Allerdings kann eine Dysregulation der *Lipid droplets* auch schädliche Auswirkungen haben. Besonders zu hohe Konzentrationen wie sie bei Erkrankungen wie Adipositas, nicht alkoholischer Fettlebererkrankung oder Herzkreislauferkrankungen auftreten können begünstigen negative Einflüsse der *Lipid droplets* (Olzmann und Carvalho 2019). Diese resultieren häufig aus der Akkumulation von Fetttropfen und der sterischen Behinderung die sich so in den Zellen ergibt (Olzmann und Carvalho 2019). Auch eine Reorganisation des Zytoskeletts durch *Lipid droplet*-Akkumulation wurde beschrieben (Zhou et al. 2000; Hall und Almahbobi 1997).

Lipid droplets scheinen auf verschiedene Weise intrazelluläre Signalwege und Pathologien zu beeinflussen. Ein Beispiel ist die Wirkung des SPART-Gens, welches mutiert für eine Vielzahl hereditärer Erkrankungen verantwortlich ist. Die Hauptfunktionen des SPART-Gens, das für das Protein Spartin codiert, sind jedoch sowohl im Endosomentransport und der Mikrotubuliorganisation, als auch im Fettsäuremetabolismus angesiedelt (Cusenza et al. 2022). Dies legt nahe, dass *Lipid droplets* auch Auswirkungen auf die Mikrotubulodynamik haben könnten. Zusätzlich sind auch Beeinträchtigungen biochemischer Signalwege durch fehlerhafte Expression *Lipid droplet* assoziierter Proteine, wie eine verminderte Expression von Perilipin 2, möglich (Zhou et al. 2022).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die *Lipid droplets* die zelluläre Integrität beeinträchtigen. Da in Kardiomyozyten nur begrenzt viel Platz für die verschiedenen Zellorganellen und die Sarkomerstruktur ist (Sweeney und Hammers 2018), ist zu vermuten, dass die *Lipid droplets* aufgrund ihrer Beanspruchung von Raum einen negativen Effekt auf die mechanische Funktion der Kardiomyozyten haben, indem sie die Sarkomerstruktur verändern. Dies steht damit entgegen der positiven biochemischen Funktion, die *Lipid droplets* bei einer akuten Stressreaktion, wie einem Myokardinfarkt, im Herzen ausüben (Barba et al. 2009), deckt sich jedoch mit den mechanischen Beeinträchtigungen, die bereits in der Literatur, für Hepatozyten, Tumorzelllinien und Skelettmuskelzellen, beschrieben sind (Olzmann und Carvalho 2019; Zhou et al. 2000; Hall und Almahbobi 1997).

Es ist beschrieben, dass es in humanen Herzen übergewichtiger Patienten zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten kommt, bei einer gleichzeitig signifikant erhöhten Dichte von *Lipid droplets* (Saito et al. 2013). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen

dieser Arbeit ist es wahrscheinlich, dass diese Vergrößerung der Kardiomyozyten auf eine Belastung des Herzens und den entsprechend bekannten Mechanismus der Myokardhypertrophie zurückzuführen sind. Inwiefern die Lipid droplet Dichte durch Beeinträchtigung der kontraktilen Funktion auch ursächlich an der Hypertrophie der Kardiomyozyten beteiligt sein kann, ist aktuell noch nicht untersucht. In den hier gezeigten Untersuchungen führte die kurzfristige *Lipid droplet* Akkumulation nicht zu Veränderungen der zellulären Dimensionen.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine längerfristige Akkumulation der *Lipid droplets* durch eine mechanische Beeinträchtigung der Sarkomere an einer kompensatorischen Hypertrophie der Myofilamente und damit der Kardiomyozyten beteiligt sind.

4.5 kurzfristige *Lipid droplet* Akkumulation induziert keine Veränderungen in der Titinisoformen Komposition

Eine Veränderung der Titin Isoformenzusammensetzung kann expressions- oder degradationsbedingt entstehen. Degradationsbedingt kann nach einer akuten Schädigung, wie einem Myokardinfarkt, eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinase2 (MMP2) zu einem vermehrten Abbau von N2B führen und so eine Veränderung der Isoformenzusammensetzung hervorrufen (Ali et al. 2010).

Eine Veränderung der Isoformenzusammensetzung von Titin entsteht expressionsbedingt aufgrund von Fehlern beim alternativen Spleißen der prä-mRNA (Zhu et al. 2017). Hierbei spielen beispielsweise hohe Insulinspiegel, wie sie bei Diabetes vorkommen eine Rolle, da Insulin das Spleißen der prä-mRNA beeinflusst und für eine vermehrte N2B-Expression sorgt (Krüger et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass als Zeichen einer systolischen Herzinsuffizienz, also einer Druckbelastung des Myokards, N2BA vermehrt exprimiert wird (Neagoe et al. 2002). In Herzen mit einer diastolischen Herzinsuffizienz, einer Volumenbelastung des Myokards, wird hingegen vermehrt N2B Titin exprimiert (Katz und Zile 2006). So zeigte sich als Folge eines akuten Schadens des Herzens, wie einem Myokardinfarkt, häufig ein Isoformenswitch zu N2B, verbunden mit einer höheren passiven Steifigkeit, während eine chronische Beeinträchtigung des Herzens mit einer vermehrten N2BA-Expression einhergeht (Neagoe et al. 2002). Funktionell könnte ein Wechsel zu der steiferen Isoform N2B eine erhöhte Arbeit des Myokards kompensieren, indem durch die erhöhte passive Steifigkeit der Verringerung der Schlagkraft des Herzens (Inotropie) durch den Verlust von Kardiomyozyten entgegengewirkt wird. Allerdings haben Mäuse bereits naturgemäß einen mit 80% N2B deutlich höheren Anteil der steiferen Isoform als ein humanes Herz mit etwa 60% N2B Titin. (Kötter et al. 2016). Es wird vermutet, dass ein steiferes Titin die Kontraktilität der kleinen und sehr schnell schlagende Mäuseherzen unterstützt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe einer adaptierten Gelelektrophorese Proteinlysate der behandelten Kardiomyozyten auf einem 2,1%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch eine Coomassiefärbung dargestellt. Gele dieser Art trennen besonders große Proteine im Molekulargewichtsbereich von >2500kDa auf, so dass durch diese Methode das Protein Titin mit einem Molekulargewicht von 3000 bis 4000kDa als alleiniges Protein in diesem Molekulargewichtsbereich isoformenspezifisch aufgetrennt und quantifiziert werden kann. Es konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Isoformenzusammensetzung des Titin in Kardiomyozyten von Wildtypmäusen durch eine sechsstündige Behandlung mit 0,5mM Oleat nachgewiesen werden. Auch für db/db-Mäuse und db/+ -Mäuse wurden gleiche Isoformenzusammensetzungen gefunden.

Eine Veränderung des alternativen Spleißens der prä-mRNA von Titin ist, nach nur sechs Stunden in den Zellkulturen, eher nicht zu erwarten gewesen. Bislang wurde eine Halbwertszeit von Titin von drei bis fünf Tagen angenommen (Müller et al. 2021), während Abbauprozesse von Titin über die Matrix-Metalloproteinase (MMP2) innerhalb von zwei bis fünf Minuten stattfinden (Ali et al. 2010). Dementsprechend wäre jegliche Veränderung des Isoformenverhältnisses allenfalls degradations- jedoch höchstwahrscheinlich nicht expressionsbedingt.

In Herzen humaner diabetischer Patienten, wurde allerdings eine vermehrte Expression der Isoform N2BA beschrieben (Hopf et al. 2018). So wäre auch eine expressionsbedingte Veränderung der Isoformenzusammensetzung in den Zellen der diabetischen db/db-Mäuse zu erwarten gewesen.

Allerdings waren die db/db-Tiere, die in dieser Studie untersucht wurden, mit acht bis zwölf Wochen noch relativ jung, was sie von den Daten aus humanen Herzen und Rattenmodellen unterscheidet. Dementsprechend wiesen sie auch noch keine signifikanten Änderungen der kardialen Funktionsparameter auf. Eine mögliche Erklärung für die unveränderte Isoformenkomposition in diesen Tieren ist, dass vermehrte Insulinproduktion zu einer vermehrten Expression der Isoform N2B von Titin führt (Krüger et al 2010). Die vermehrte Insulinproduktion ist charakteristisch für das frühe Stadium von T2DM. Es wäre möglich, dass das Alter der Tiere in der Studie genau in den Zeitraum fällt, indem sich ein chronischer Phänotyp mit einer Veränderung hin zu

mehr N2BA ausbildet, diese Veränderungen jedoch zunächst kaschiert werden, durch hohe Insulinlevel mit hoher Anteil N2B Bildung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Veränderung der Isoformenzusammensetzung von Titin in Wildtypmäusen wahrscheinlich nur degradationsbedingt auftreten kann und eine Steigerung des Anteils von N2BA zufolge hätte. Allerdings ist der zugrundeliegende Mechanismus, die Aktivierung von MMP2 bislang lediglich für einen akuten Schaden durch Ischämie und Reperfusion beschrieben (Ali et al. 2010). Ob *Lipid droplets* ebenfalls für eine Aktivierung dieses Enzyms sorgen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

4.6 *Lipid droplets* führen zu keiner signifikant erhöhten Degradation von Titin

Lipid droplets spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Stress des endoplasmatischen Retikulums oder Stress der Mitochondrien (Olzmann und Carvalho 2019), sie spielen eine Rolle in der Regulation der Genexpression (Gallardo-Montejano et al. 2016), der Histonbindung (Cermelli et al. 2006), Viren-Replikation (Miyanari et al. 2007) und der Arzneimittelaktivität (Dubey et al. 2020). Eine Unter- oder Überproduktion der *Lipid droplets* spielt in der Ätiologie verschiedener Krankheiten eine Rolle, wie Herzkreislauferkrankungen, nicht alkoholischer Fettlebererkrankung oder Adipositas (Krahmer et al. 2013; Olzmann und Carvalho 2019). Diese Zellorganellen haben eine sehr vielfältige Zusammensetzung ihres Lipidkerns, der nahelegt, dass sie viele Prozesse beeinflussen, die über ihre Aufgaben im Energiestoffwechsel hinausgehen und für das Überleben der Zellen, in denen sie lokalisiert sind, notwendig sind (Roberts und Olzmann 2020). Es besteht die Möglichkeit, dass *Lipid droplets* selbst eine Aktivierung des Proteasoms induzieren und so zum intrazellulären Proteinabbau beitragen (Roberts und Olzmann 2020). Auch in Pflanzen wurde ein solcher Proteinabbauweg bereits postuliert (Kretschmar et al. 2018).

Das Protein Titin kann, im Falle einer Schädigung der Kardiomyozyten durch Ischämie und Reperfusion, sehr schnell, im Zeitraum von 2h, degradiert werden (Ali et al. 2010). Aufgrund seiner Größe muss es zunächst vorverdaut werden, da das Herauslösen des Titin aus dem kontraktile Sarkomer, um das Protein für die weitere Prozessierung zugänglich zu machen, eine erste proteolytische Spaltung erfordert. Dies geschieht beispielsweise durch Calpaine und die MatrixMetalloproteinase2 (MMP2) (Müller et al. 2021; Ali et al. 2010). Schließlich kommt es zur Verdauung des Proteins durch das autolysosomale und proteasomale System (Müller et al. 2021). Als Indikator für eine vermehrte Degradation von Titin wird das Verhältnis der kumulierten Isoformen N2B und N2BA (T1) und der Degradationsbande von Titin (T2) genutzt.

Funktionell kann der Abbau von Titin ein Hinweis auf eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit des Herzmuskels sein, da ohne das molekulare Federprotein eine Kontraktion nicht mehr möglich ist (Wu et al. 2018b).

Die Degradation von Titin in Proben aus Herzen von Wildtypmäusen wurde hier mittels der Analyse der T2/T1-Ratio an SDS PAGE Gelen untersucht. Verschiebt sich der

Quotient in Richtung eins findet eine vermehrte Degradation statt. Nähert sich der Quotient null an findet weniger Degradation statt. Dies kann beispielsweise ein Hinweis auf eine Störung der Proteinqualitätskontrolle sein. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen keine statistisch signifikante Steigerung oder Verminderung der Degradation des Titin, in Zellen, die mit Oleat oder BSA behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch in Kardiomyozyten von db/db-Tieren konnte keine Veränderung der Titindegradation durch Oleatbehandlung gezeigt werden. Im Vergleich zwischen db/db-Mäusen und db/+ -Mäusen zeigten sich dagegen Hinweise, dass die Titindegradation in den Kardiomyozyten der db/+ -Mäuse in allen Konditionen höher als in den Kardiomyozyten der db/db-Tiere war. In diabetischen Herzen kommt es zu einer Anpassung der Protein-Qualitätskontrolle (PQC) in Kardiomyozyten (Kaur et al. 2020). Durch oxidativen Stress wird eine überschießende Proteinhomöostase verhindert (He et al. 2018) und es kommt in Folge der diabetischen Kardiomyopathie zu verminderter Proteinfaltung und –degradation (Kaur et al. 2020).

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der aktuellen Studienlage, insofern, als dass *Lipid droplets* zunächst protektive Funktionen in Zellen übernehmen (Olzmann und Kopito 2011). Bei einer Überlastung der Zellen mit *Lipid droplets* sind auch pathologische Einflüsse dieser Zellorganellen, wie bei Morbus Parkinson (Licker et al. 2014; Sharon et al. 2001) (Fanning et al. 2019) beschrieben. *Lipid droplets* können intrazelluläre Funktionen wie den endosomalen Transport, Rezeptordegradation, Mikrotubuliinteraktion, Zytokinese und den Fettsäuremetabolismus beeinträchtigen (Cusenza et al. 2022; Zhou et al. 2022) und somit biochemische und direkte mechanische Einflüsse (Zhou et al. 2000; Hall und Almahbobi 1997) auf Kardiomyozyten haben. Das in dieser Arbeit keine signifikante Steigerung der Titindegradation gezeigt werden konnte, obwohl eine solche innerhalb des Zeitintervalls von sechs Stunden prinzipiell möglich wäre (Ali et al. 2010), könnte ein Hinweis darauf sein, dass es im Zuge der kurzfristigen *Lipid droplet*-Akkumulation noch nicht zu einer Aktivierung der MMP2 kommt. Beschrieben ist die Aktivierung des Enzyms im Fall einer akuten Ischämie- und Reperfusionsverletzung des Herzens (Ali et al. 2010). Diese Kondition wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die vermehrte Zelldegradation in den db/+ -Tieren im Vergleich zu den db/db-Mäusen könnte auf eine bessere Anpassungsfähigkeit der Kardiomyozyten der db/db-Tiere an zellulären Stress als Reaktion auf die langfristige *Lipid droplet*-Akkumulation

zurückzuführen sein. *Lipid droplets* können unter anderem Schäden durch Calciumüberladung oder toxische freie Fettsäuren abpuffern (Olzmann und Carvalho 2019; Barba et al. 2009). Möglich ist aber auch, dass die Degradationsunterschiede auf Schwankungen im Zellkulturmodell zurückzuführen sind, da nur Kardiomyozyten einer db/+ -Maus untersucht wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine vermehrte Degradation des Proteins Titin nach sechs Stunden Behandlung mit Oleat nicht festgestellt werden konnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Belastung der Kardiomyozyten durch *Lipid droplets* über einen längeren Zeitraum einen vermehrten Abbau von Titin begünstigt und so in den Herzen von diabetischen Patienten für Funktionseinschränkungen sorgt. Dies müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.7 *Lipid droplets* induzieren Phosphorylierung der elastischen Titin-Region PEVK

Veränderungen des Metabolismus in Kardiomyozyten gehen häufig mit einer erhöhten titinbasierten Myofilamentsteifigkeit einher (Zeng und Chen 2019). Auch Kardiomyozyten in diabetischen Herzen weisen eine hohe titinbasierte Myofilamentsteifigkeit auf (Hopf et al. 2018; Bai et al. 2019). Die diabetische Kardiomyopathie erhöht das Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln (Schütt und Marx 2017), die in menschlichen Herzen mit einer erhöhten relativen Phosphorylierung der der Titin PEVK-Domäne an der Position S12022 einhergeht (Hamdani et al. 2013). In Herzen von Mäusen und Schweinen kam es durch die Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin zu einer erhöhten myokardialen Steifigkeit (Hidalgo et al. 2009; Hudson et al. 2010).

In Mauskardiomyozyten von db/db-Mäusen, dem diabetischen Tiermodell, konnte eine hohe Dichte von *Lipid droplets* nachgewiesen werden (Funk et al. 2022), die unter physiologischen Bedingungen im Herzen nicht akkumulieren (Barba et al. 2009). Dementsprechend war es ein Ziel dieser Arbeit einen möglichen Zusammenhang zwischen der massiven *Lipid droplet*-Akkumulation und der erhöhten titinbasierten Myofilamentsteifigkeit in diabetischen Herzen herzustellen.

Die Untersuchung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin an Position S12022 im Vergleich zwischen unbehandelten Proben und Proben bei denen Oleat hinzugefügt wurde, erbrachte bei den Tieren vom Wildtyp eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der PEVK-Domäne im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 31). In der BSA/Ethanol-Kontrolle konnte keine solche Veränderung festgestellt werden. Bei den Proben der db/db-Mäuse ergaben sich ebenfalls Hinweise auf eine Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne durch eine Behandlung mit Oleat. In Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen konnten ebenfalls Anzeichen auf eine Veränderung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne durch Oleat festgestellt werden. Im Vergleich zwischen den Gruppen ergaben sich Hinweise auf eine höhere relative Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Kardiomyozyten aus db/db- als bei Kardiomyozyten aus db/+ -Mäusen.

In der Literatur ist eine erhöhte passive Steifigkeit durch eine erhöhte Phosphorylierung der Titindomäne PEVK bei Akutereignissen wie einem Herzinfarkt beschrieben (Kötter

et al. 2016). Im Falle einer chronischen Herzschrädigung kommt es eher zu einer Phosphorylierung der N2Bus-Domäne, vermutlich, um eine höhere Elastizität zu gewährleisten (Neagoe et al. 2002). Die Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2 ist durch eine Insulinresistenz gekennzeichnet. Zunächst sind chronisch hohe Insulinspiegel die Folge, die eine zeitlich begrenzte Kompensation der Insulinresistenz ermöglichen (Morbach et al. 2017). Insulin erhöht die Steifigkeit in Kardiomyozyten durch eine vermehrte Expression der Titinisoform N2B, und sorgt auch für eine vermehrte Phosphorylierung der PEVK-Domäne, während die N2Bus-Domäne vermindert phosphoryliert wird (Hopf et al. 2018). Allerdings kommt es im Verlauf der Erkrankung mit Diabetes mellitus Typ 2 zu einer verminderten Insulinproduktion durch eine Erschröpfung der β -Zellen des Pankreas. So kommt es zu einer Unterversorgung der Muskelzellen mit Glukose (Morbach et al. 2017). Dies legt nahe, dass die Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit in diabetischen Herzen nicht alleine von Insulin abhängig ist, sondern womöglich durch weitere Faktoren, womöglich eine *Lipid droplet*-Akkumulation, begünstigt wird.

Die Hypothese, dass *Lipid droplet*-Akkumulationen eine erhöhte Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin in den mit Oleat behandelten Kardiomyozyten von Wildtypmäusen hervorrufen, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die posttranslationale Modifikation auch eine erhöhte titinbasierte Myofilamentsteifigkeit zur Folge hat. Da eine kurzfristige Belastung des Herzens meist mit einer Erhöhung der passiven Steifigkeit einhergeht, beispielsweise auch nach einem Myokardinfarkt, deckt sich dieses Ergebnis mit vorangegangenen Studien (Kötter et al. 2016).

Die molekulare Ursache für eine erhöhte relative Phosphorylierung der PEVK-Domäne durch *Lipid droplet*-Akkumulation in Kardiomyozyten ist noch nicht erforscht. Möglicherweise spielt die mechanische Belastung, die durch die *Lipid droplets* ausgelöst wird und vermutlich in einer verminderten Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten resultiert, eine entscheidende Rolle (vgl. 4.4). Kompensatorisch könnte es zu einer Erhöhung der passiven titinbasierten Myofilamentsteifigkeit kommen, da durch die *Lipid droplet* Akkumulation vermutlich die Funktion der Sarkomere beeinträchtigt wird (vgl. 4.4), sodass, ähnlich wie nach einem Herzinfarkt, die verminderte Inotropie durch eine Erhöhung der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten reguliert wird.

Lipid droplets können Calcium aufnehmen und somit eine Rolle in der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration spielen (Barba et al. 2009). Es wird vermutet, dass dieses Calcium durch den Abbau von *Lipid droplets* frei wird und zu einer gesteigerten Aktivierung der Ca-abhängigen Proteinkinase C (PKC) führen kann. Diese wiederum wird auch für die Phosphorylierung des hier untersuchten Serinrestes S12022 in der Titin PEVK Region verantwortlich gemacht (Hudson et al. 2010). Desweiteren haben *Lipid droplets* eine Vielzahl sogenannter *membrane contact sites (MCS)* zum endoplasmatischen Retikulum (Wu et al. 2018a), die entscheidend für Calciumfreisetzung sind (Wu et al. 2018a). Es ist denkbar, dass *Lipid droplets* auch über diesen Weg eine vermehrte Calciumfreisetzung und somit eine Aktivität der Proteinkinase C begünstigen können. In diabetischen Herzen kommt es zu einer vermehrten Oxidation von Fettsäuren und einem eingeschränkten Glukosemetabolismus, was in einem erhöhten Sauerstoffbedarf für die ATP-Produktion resultiert (Mishra et al. 2017). Das Herz bildet entsprechend weniger ATP, sodass es zu einer Einschränkung der *sarcoplasmic/endoplasmatic reticulum calcium-ATPase 2a* (SERCA2a) kommt. Auf diese Weise wird der Rücktransport von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum vermindert und die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht (Mishra et al. 2017). Es ist wahrscheinlich, dass auch auf diese Weise eine vermehrte Aktivierung der PKC und somit eine erhöhte Phosphorylierung der PEVK-Domäne begünstigt wird.

Da *Lipid droplets* in vielfältigen Signalwegen eine Rolle spielen ist auch eine biochemische Ursache der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit denkbar. Es konnte nachgewiesen werden, dass Lipidakkumulationen zu einer Erhöhung von calciumbasierten Signalwegen führen (Ali und Petrovsky 2019). Ein solcher Mechanismus würde in Kardiomyozyten vermutlich zu einer vermehrten Aktivierung der PKC führen, die für die Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin verantwortlich ist.

Bezieht man diese intrazellulären Signalwege auf das Modell von Kardiomyozyten aus diabetischen Herzen, die *Lipid droplets* akkumulieren und nicht-diabetischen Herzen, die keine *Lipid droplets* akkumulieren, so ergeben sich im Hinblick auf die Regulationsfähigkeiten des Herzmuskels im Fall einer akuten Schädigung wie einem Myokardinfarkt unterschiedliche Gegebenheiten. Es wäre denkbar, dass *Lipid droplets* in Kardiomyozyten diabetischer Herzen die Regulationsmechanismen, die bei einem Herzinfarkt in Kardiomyozyten aus nicht-diabetischen Herzen greifen, bereits zur

Anwendung kommen lassen, sodass im Falle einer akuten Herzschädigung keine Regulationsmöglichkeiten mehr bestehen. Die Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit nach einem Herzinfarkt könnte funktionell protektiv sein, da durch den Infarkt Kardiomyozyten zerstört werden. Anstelle des funktionellen Muskelgewebes wird Kollagen gebildet, dass in Form einer Narbe keine Funktion für die Kontraktion des Herzmuskels hat (Thygesen et al. 2019).

Da das Herz also einen Teil der aktiven Kontraktionskraft verliert ist nur eine schwächere Kontraktion möglich. Eine höhere passive Steifigkeit des Muskels verringert die Dehnbarkeit. Kompensationsmechanismen bei denen aufgrund einer hohen Vordehnung des Herzmuskels mehr Volumen gepumpt und somit mehr Arbeit verrichtet werden muss, wie der Frank-Starling-Mechanismus, sind nur eingeschränkt möglich (Mitu und Mitu 1999).

Bei zu hoher Füllung des Herzens oder zu großen Belastungen ist die Kompensation durch eine Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit vermutlich nicht mehr ausreichend, was langfristig eine dilatative Kardiomyopathie begünstigt (Herold 2021).

Sollte der Kompensationsmechanismus der Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne zur Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit in diabetischen Herzen jedoch bereits vor einer Schädigung des Herzmuskels greifen, würde nach einer Schädigung sofort ein Zustand eintreten, indem eine Kompensation nicht mehr möglich wäre. Ist eine Kompensation nicht mehr möglich, ist die Ejektionsfraktion eingeschränkt, die Vorlast steigt und es kommt, in diabetischen Herzen womöglich schneller als in nicht-diabetischen Herzen, zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Zoueiri et al. 2013).

Passend zu der Hypothese, dass in diabetischen Tieren der Kompensationsmechanismus der Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit bereits genutzt wird bevor es zu einer akuten Schädigung in Form eines Myokardinfarktes kommt, zeigten Ergebnisse dieser Arbeit bei db/db-Mäusen ebenfalls Hinweise auf eine erhöhte relative Phosphorylierung der PEVK-Domäne. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Regulationsmechanismen in diabetischen Herzen (Hopf et al. 2018) und vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe an den db/db Tieren (Funk et al. 2022).

Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz ist bisher vor allem symptomatischer Natur. Je nach Stadium werden verschiedenen Medikamente verabreicht, die alle auf unterschiedliche Weise, die Herzarbeit verringern, sodass es nach Möglichkeit nicht zu

einer Erschöpfung des Herzmuskels, also einem dekompensierten Stadium kommt (Ponikowski et al. 2016). Eine kausale Behandlung erfolgt durch die Behandlung der Grunderkrankung, die der Auslöser für die Herzinsuffizienz war, nicht jedoch durch eine Therapie, die an den muskulären Veränderungen ansetzt, die letztlich zu der eingeschränkten Leistungsfähigkeit des Herzens führen (Hasenfuß et al. 2013).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist anzunehmen, dass es sinnvoll wäre präventiv die Akkumulation von *Lipid droplets* im Herzen, beispielsweise durch eine Lebensstilanpassung des Patienten, zu verhindern, um auf diese Weise keine verfrühte erhöhte relative Phosphorylierung der PEVK-Domäne hervorzurufen. Sollte dies jedoch nicht gelingen, könnte zur Bekämpfung der Akkumulation von *Lipid droplets* eine vermehrte Lipolyse durch Modifikation der Proteine der Perilipinfamilie induziert werden. Diese Proteinfamilie reguliert die Synthese und den Abbau von *Lipid droplets* (Olzmann und Carvalho 2019; Zechner et al. 2017). So könnte gegebenenfalls die mechanische Belastung der Kardiomyozyten, sowie die *Lipid droplet* induzierte titinbasierte Myofilamentsteifigkeit reduziert werden. Die Leistungsfähigkeit und Modifikationsmöglichkeiten des Herzmuskels würden dadurch vorraussichtlich gesteigert werden.

Zusammenfassend konnte die Hypothese, dass *Lipid droplets* in Kardiomyozyten zu einer erhöhten relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin beitragen bestätigt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielt dieser Prozess eine wichtige Rolle in der Erhöhung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit in diabetischen Herzen. Dieser kurzfristige Mechanismus der erhöhten Myofilamentsteifigkeit wurde bereits als Kompensationsmechanismus nach akuten Schädigungen des Herzmuskels, wie einem Myokardinfarkt beschrieben. In diabetischen Herzen könnte die Anpassung der Titinsteifigkeit bereits vor einer akuten Schädigung dazu führen, dass diabetische Patienten nach einem Myokardinfarkt eine schlechtere Adaption des Herzmuskels und ein schlechteres Outcome aufweisen.

Diese Arbeit beschreibt die erfolgreiche Etablierung eines Zellkulturmodells zur Induktion von *Lipid droplets* in adulten Mausekardiomyozyten. Das Modell ist sehr gut geeignet, um akute *Lipid droplet* bedingte Veränderungen der Zellhomöostase zu untersuchen. Veränderungen der zellulären Dimensionen zeigten sich in diesem Kurzzeitmodell nicht. Auch ein Abbau der Myofilamente konnte in dem Modell nicht gezeigt werden, als einer der ersten Marker für diesen Prozess wurde die Titindegradation untersucht. Es zeigte sich eine Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin. Mit hoher Wahrscheinlichkeit bedingt diese eine erhöhte titinbasierte Myofilamentsteifigkeit, womöglich um die Myofilamente zu stabilisieren oder die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zu verbessern.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, könnten weiterführende Studien die relative Phosphorylierung der N2B-Domäne des Titin untersuchen, um zu verifizieren, dass die Erhöhung der relativen Phosphorylierung der PEVK-Domäne zu einer erhöhten Myofilamentsteifigkeit führt. Auch Kraftmessungen an den Kardiomyozyten wären denkbar. Des Weiteren könnte eine Untersuchung der PKC-Aktivität interessant sein, um den Mechanismus der PEVK-Phosphorylierung zu bestimmen. Womöglich wäre auch eine Bestimmung der proteasomalen Aktivität von Interesse. Um die durch *Lipid droplets* hervorgerufenen homöostatischen Veränderungen zu charakterisieren, könnte eine Untersuchung der Gesamtphosphorylierung von Zellen die mit Oleat behandelt wurden und unbehandelten Zellen im Vergleich vorgenommen werden, sodass eine Bestimmung der veränderten Proteine möglich wäre.

5 Literaturverzeichnis

- (2014, 2010). Physiologische Grundlagen. In: Hans-Wilhelm Müller-Wohlfahrt/Peter Ueblicher/Lutz Hänsel (Hg.). Muskelverletzungen im Sport. 2. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- (2021). LARSENS ANSTHESIE UND INTENSIVMEDIZIN FR DIE FACHPFLEGE. Plus. [S.l.], SPRINGER.
- (2023). Products - Health E Stats - Overweight, Obesity, and Extreme Obesity Among Adults 2007-2008. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_adult_07_08/obesity_adult_07_08.htm (abgerufen am 05.01.2023).
- Adewale, Adeleye O./Ahn, Young-Hoon (2021). Titin N2A Domain and Its Interactions at the Sarcomere. *International journal of molecular sciences* 22 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147563>.
- Ali, Eunus S./Petrovsky, Nikolai (2019). Calcium Signaling As a Therapeutic Target for Liver Steatosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 30 (4), 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.02.005>.
- Ali, Mohammad A. M./Cho, Woo Jung/Hudson, Bryan/Kassiri, Zamanah/Granzier, Henk/Schulz, Richard (2010). Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 122 (20), 2039–2047. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222>.
- Aumüller, Gerhard/Aust, Gabriela/Engel, Jürgen/Kirsch, Joachim/Maio, Giovanni/Mayerhofer, Artur/Mense, Siegfried/Reißig, Dieter/Salvetter, Jürgen/Schmidt, Wolfgang/Schmitz, Frank/Schulte, Erik/Spänel-Borowski, Katharina/Wennemuth, Gunther/Wolff, Werner/Wurzinger, Laurenz J./Zilch, Hans-Gerhard (2017). *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Bai, Bo/Yang, Wulin/Fu, Yanyun/Foon, Hannah Lee/Tay, Wan Ting/Yang, Kangmin/Luo, Cuiting/Gunaratne, Jayantha/Lee, Philip/Zile, Michael R./Xu, Aimin/Chin, Calvin W. L./Lam, Carolyn S. P./Han, Weiping/Wang, Yu (2019). Seipin Knockout Mice Develop Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC. Basic to translational science* 4 (8), 924–937. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2019.07.008>.
- Barba, Ignasi/Chavarria, Laia/Ruiz-Meana, Marisol/Mirabet, Maribel/Agulló, Esperanza/Garcia-Dorado, David (2009). Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *The Journal of physiology* 587 (Pt 6), 1331–1341. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163311>.
- Beckendorf, Lisa/Linke, Wolfgang A. (2015). Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *Journal of muscle research and cell motility* 36 (1), 25–36. <https://doi.org/10.1007/s10974-014-9392-y>.
- Behrends, Jan C./Bischofberger, Josef/Deutzmann, Rainer/Ehmke, Heimo/Frings, Stephan/Grissmer, Stephan/Hoth, Markus/Kurtz, Armin/Leipziger, Jens/Müller, Frank/Pedain, Claudia/Rettig, Jens/Wagner, Charlotte/Wischmeyer, Erhard (2017). *Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

- Bers, Donald M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415 (6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>.
- Bersuker, Kirill/Olzman, James A. (2017). Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1862 (10 Pt B), 1166–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.006>.
- Bogomolovas, Julius/Fleming, Jennifer R./Franke, Barbara/Manso, Bruno/Simon, Bernd/Gasch, Alexander/Markovic, Marija/Brunner, Thomas/Knöll, Ralph/Chen, Ju/Labeit, Siegfried/Scheffner, Martin/Peter, Christine/Mayans, Olga (2021). Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Reports* 22 (10). <https://doi.org/10.15252/embr.201948018>.
- Borbély, Attila/van Heerebeek, Loek/Paulus, Walter J. (2009). Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circulation research* 104 (1), 12–14. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.191130>.
- Brasaemle, Dawn L./Dolios, Georgia/Shapiro, Lawrence/Wang, Rong (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 279 (45), 46835–46842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409340200>.
- Bulankina, Anna V./Deggerich, Anke/Wenzel, Dirk/Mutenda, Kudzai/Wittmann, Julia G./Rudolph, Markus G./Burger, Koert N. J./Höning, Stefan (2009). TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *The Journal of cell biology* 185 (4), 641–655. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812042>.
- Burke, Michael A./Cook, Stuart A./Seidman, Jonathan G./Seidman, Christine E. (2016). Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 68 (25), 2871–2886. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>.
- Cazorla, O./Freiburg, A./Helmès, M./Centner, T./McNabb, M./Wu, Y./Trombitás, K./Labeit, S./Granzier, H. (2000). Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circulation research* 86 (1), 59–67. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>.
- Cazorla, O./Wu, Y./Irving, T. C./Granzier, H. (2001). Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circulation research* 88 (10), 1028–1035. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.10.1028>.
- Cermelli, Silvia/Guo, Yi/Gross, Steven P./Welte, Michael A. (2006). The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current biology : CB* 16 (18), 1783–1795. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.062>.
- Chitraju, Chandramohan/Trötz Müller, Martin/Hartler, Jürgen/Wolinski, Heimo/Thallinger, Gerhard G./Lass, Achim/Zechner, Rudolf/Zimmermann, Robert/Köfeler, Harald C./Spener, Friedrich (2012). Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress. *Journal of lipid research* 53 (10), 2141–2152. <https://doi.org/10.1194/jlr.M028902>.
- Ciechanover, A./Schwartz, A. L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 95 (6), 2727–2730.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2727>.
- Cole, Nelson B./Murphy, Diane D./Grider, Theresa/Rueter, Susan/Brasaemle, Dawn/Nussbaum, Robert L. (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 277 (8), 6344–6352.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M108414200>.
- Crocini, Claudia/Gotthardt, Michael (2021). Cardiac sarcomere mechanics in health and disease. *Biophysical reviews* 13 (5), 637–652. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00840-7>.
- Crunk, Amanda E./Monks, Jenifer/Murakami, Aya/Jackman, Matthew/Maclean, Paul S./Ladinsky, Mark/Bales, Elise S./Cain, Shannon/Orlicky, David J./McManaman, James L. (2013). Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet. *PloS one* 8 (7), e67631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067631>.
- Cusenza, Vincenza Ylenia/Bonora, Elena/Amodio, Nicola/Frazzi, Raffaele (2022). Spartine: At the crossroad between ubiquitination and metabolism in cancer. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1877 (6), 188813.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188813>.
- DiDonato, Deanna/Brasaemle, Dawn L. (2003). Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51 (6), 773–780.
<https://doi.org/10.1177/002215540305100608>.
- Dorn, Gerald W./Force, Thomas (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 115 (3), 527–537.
<https://doi.org/10.1172/JCI24178>.
- Dubey, Ramin/Stivala, Craig E./Nguyen, Huy Quoc/Goo, Young-Hwa/Paul, Antoni/Carette, Jan E./Trost, Barry M./Rohatgi, Rajat (2020). Lipid droplets can promote drug accumulation and activation. *Nature chemical biology* 16 (2), 206–213. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0447-7>.
- Ellis, Jessica M./Mentock, Shannon M./Depetrillo, Michael A./Koves, Timothy R./Sen, Shiraj/Watkins, Steven M./Muoio, Deborah M./Cline, Gary W./Taegtmeyer, Heinrich/Shulman, Gerald I./Willis, Monte S./Coleman, Rosalind A. (2011). Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biology* 31 (6), 1252–1262. <https://doi.org/10.1128/MCB.01085-10>.
- Falcão-Pires, Inês/Hamdani, Nazha/Borbély, Attila/Gavina, Cristina/Schalkwijk, Casper G./van der Velden, Jolanda/van Heerebeek, Loek/Stienen, Ger J. M./Niessen, Hans W. M./Leite-Moreira, Adelino F./Paulus, Walter J. (2011). Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 124 (10), 1151–1159. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270>.
- Fanning, Saranna/Haque, Aftabul/Imberdis, Thibaut/Baru, Valeriya/Barrasa, M. Inmaculada/Nuber, Silke/Termine, Daniel/Ramalingam, Nagendran/Ho, Gary P. H./Noble, Tallie/Sandoe, Jackson/Lou, Yali/Landgraf, Dirk/Freyzon, Yelena/Newby, Gregory/Soldner, Frank/Terry-Kantor, Elizabeth/Kim, Tae-

- Eun/Hofbauer, Harald F./Becuwe, Michel/Jaenisch, Rudolf/Pincus, David/Clish, Clary B./Walther, Tobias C./Farese, Robert V./Srinivasan, Supriya/Welte, Michael A./Kohlwein, Sepp D./Dettmer, Ulf/Lindquist, Susan/Selkoe, Dennis (2019). Lipidomic Analysis of α -Synuclein Neurotoxicity Identifies Stearoyl CoA Desaturase as a Target for Parkinson Treatment. *Molecular cell* 73 (5), 1001–1014.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.028>.
- Ferroni, Letizia/Gardin, Chiara/Bellin, Gloria/Vindigni, Vincenzo/Mortellaro, Carmen/Zavan, Barbara (2019). Bovine pericardium membrane as new tool for mesenchymal stem cells commitment. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 13 (10), 1805–1814. <https://doi.org/10.1002/term.2931>.
- Freiburg, A./Gautel, M. (1996). A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *European journal of biochemistry* 235 (1-2), 317–323. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00317.x>.
- Freundt, Johanna K./Linke, Wolfgang A. (2019). Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 126 (5), 1474–1482. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00865.2018>.
- Funk, Florian/Kronenbitter, Annette/Isić, Malgorzata/Flocke, Vera/Gorreßen, Simone/Semmler, Dominik/Brinkmann, Maximilian/Beck, Katharina/Steinhoff, Oliver/Srivastava, Tanu/Barbosa, David Monteiro/Voigt, Katharina/Wang, Luzhou/Bottermann, Katharina/Kötter, Sebastian/Grandoch, Maria/Flögel, Ulrich/Krüger, Martina/Schmitt, Joachim P. (2022). Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 173, 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.09.002>.
- Gallardo-Montejano, Violeta I./Saxena, Geetu/Kusminski, Christine M./Yang, Chaofeng/McAfee, John L./Hahner, Lisa/Hoch, Kathleen/Dubinsky, William/Narkar, Vihang A./Bickel, Perry E. (2016). Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1 α /SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nature communications* 7, 12723. <https://doi.org/10.1038/ncomms12723>.
- Gautel, Mathias (2011). The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Current opinion in cell biology* 23 (1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.12.001>.
- Gemmink, Anne/Goodpaster, Bret H./Schrauwen, Patrick/Hesselink, Matthijs K. C. (2017). Intramyocellular lipid droplets and insulin sensitivity, the human perspective. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1862 (10 Pt B), 1242–1249. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.010>.
- Gontier, Yves/Taivainen, Anu/Fontao, Lionel/Sonnenberg, Arnoud/van der Flier, Arjan/Carpen, Olli/Faulkner, Georgine/Borradori, Luca (2005). The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *Journal of cell science* 118 (Pt 16), 3739–3749. <https://doi.org/10.1242/jcs.02484>.
- Gordon, A. M./Homsher, E./Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80 (2), 853–924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>.

- Granzier, Henk L./Labeit, Siegfried (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circulation research* 94 (3), 284–295. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8>.
- Greenberg, A. S./Egan, J. J./Wek, S. A./Garty, N. B./Blanchette-Mackie, E. J./Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *The Journal of biological chemistry* 266 (17), 11341–11346.
- Gregorio, C. C./Trombitás, K./Centner, T./Kolmerer, B./Stier, G./Kunke, K./Suzuki, K./Obermayr, F./Herrmann, B./Granzier, H./Sorimachi, H./Labeit, S. (1998). The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *The Journal of cell biology* 143 (4), 1013–1027. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.4.1013>.
- Hall, Peter F./Almahbobi, Ghanim (1997). Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microscopy Research and Technique* 36 (6), 463–479. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970315\)36:6<463::AID-JEMT4>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970315)36:6<463::AID-JEMT4>3.0.CO;2-J).
- Hamdani, Nazha/Herwig, Melissa/Linke, Wolfgang A. (2017). Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophysical reviews* 9 (3), 225–237. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0263-9>.
- Hamdani, Nazha/Krysiak, Judith/Kreusser, Michael M./Neef, Stefan/Dos Remedios, Cristobal G./Maier, Lars S./Krüger, Markus/Backs, Johannes/Linke, Wolfgang A. (2013). Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circulation research* 112 (4), 664–674. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300105>.
- Hasenfuß, G./Anker, S./Bauersachs, J./Böhm, M./Hoppe, U. C./Pieske, B./Scheidt, W. von/Wachter, R. (2013). Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Der Kardiologe* 7 (2), 105–114. <https://doi.org/10.1007/s12181-013-0491-6>.
- Hayat, Sajad A./Patel, Billal/Khattar, Rajdeep S./Malik, Rayaz A. (2004). Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clinical science (London, England : 1979)* 107 (6), 539–557. <https://doi.org/10.1042/CS20040057>.
- He, Yang/Zhou, Lingyun/Fan, Zhiqiang/Liu, Shikun/Fang, Weijin (2018). Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N-acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Disease* 9 (5), 568. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0593-y>.
- Henderson, Christine A./Gomez, Christopher G./Novak, Stefanie M./Mi-Mi, Lei/Gregorio, Carol C. (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Comprehensive Physiology* 7 (3), 891–944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>.
- Herold, Gerd (2021). Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2021 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln, Gerd Herold.

- Hidalgo, Carlos/Hudson, Bryan/Bogomolovas, Julius/Zhu, Yi/Anderson, Brian/Greaser, Marion/Labeit, Siegfried/Granzier, Henk (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circulation research* 105 (7), 631-8, 17 p following 638. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>.
- Hopf, Anna-Eliane/Andresen, Christian/Kötter, Sebastian/Isić, Małgorzata/Ulrich, Kamila/Sahin, Senem/Bongardt, Sabine/Röll, Wilhelm/Drove, Felicitas/Scheerer, Nina/Vandekerckhove, Leni/Keulenaer, Gilles W. de/Hamdani, Nazha/Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2018). Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circulation research* 123 (3), 342–355. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312166>.
- Hossain, Parvez/Kawar, Bisher/El Nahas, Meguid (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *The New England journal of medicine* 356 (3), 213–215. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>.
- Huang, Weiwei/Gao, Fei/Zhang, Yuting/Chen, Tianhui/Xu, Chen (2022). Lipid Droplet-Associated Proteins in Cardiomyopathy. *Annals of nutrition & metabolism* 78 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1159/000520122>.
- Hudson, Bryan D./Hidalgo, Carlos G./Gotthardt, Michael/Granzier, Henk L. (2010). Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (5), 972–978. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.12.006>.
- Huppelsberg, Jens/Walter, Kerstin/Huckstorf, Christine (2003). *Kurzlehrbuch Physiologie. Nach dem neuen GK1* ; 42 Tabellen. Stuttgart, Thieme.
- HUXLEY, H./HANSON, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173 (4412), 973–976. <https://doi.org/10.1038/173973a0>.
- Jarc, Eva/Petan, Toni (2019). Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *The Yale journal of biology and medicine* 92 (3), 435–452.
- Jüngst, Christian. Untersuchung der Dynamik von Lipid Droplets in lebenden humanen Zellen. Untersuchung der Dynamik von Lipid Droplets in lebenden humanen Zellen. Online verfügbar unter <http://kops.uni-konstanz.de/handle/123456789/25949>.
- Katz, Arnold M./Zile, Michael R. (2006). New molecular mechanism in diastolic heart failure. *Circulation* 113 (16), 1922–1925. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.620765>.
- Kaur, Namrita/Raja, Rida/Ruiz-Velasco, Andrea/Liu, Wei (2020). Cellular Protein Quality Control in Diabetic Cardiomyopathy: From Bench to Bedside. *Frontiers in cardiovascular medicine* 7, 585309. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.585309>.
- Kaushik, Susmita/Cuervo, Ana Maria (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature cell biology* 17 (6), 759–770. <https://doi.org/10.1038/ncb3166>.

- Kellermayer, Dalma/Smith, John E./Granzier, Henk (2019). Titin mutations and muscle disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 471 (5), 673–682. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02272-5>.
- Kellermayer, M. S./Smith, S. B./Bustamante, C./Granzier, H. L. (1998). Complete unfolding of the titin molecule under external force. *Journal of structural biology* 122 (1-2), 197–205. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3988>.
- Kenny, Helena C./Abel, E. Dale (2019). Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation research* 124 (1), 121–141. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311371>.
- Kirk, Jonathan A./Holewinski, Ronald J./Crowgey, Erin L./van Eyk, Jennifer E. (2016). Protein kinase G signaling in cardiac pathophysiology: Impact of proteomics on clinical trials. *Proteomics* 16 (5), 894–905. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500401>.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, Aikaterini/Ackermann, Maegen A./Bowman, Amber L./Yap, Solomon V./Bloch, Robert J. (2009). Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiological reviews* 89 (4), 1217–1267. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2009>.
- Kooij, Viola/Stienen, Ger J. M./van der Velden, Jolanda (2011). The role of protein kinase C-mediated phosphorylation of sarcomeric proteins in the heart-detrimental or beneficial? *Biophysical reviews* 3 (3), 107. <https://doi.org/10.1007/s12551-011-0050-y>.
- Koser, Franziska/Loescher, Christine/Linke, Wolfgang A. (2019). Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *The FEBS journal* 286 (12), 2240–2260. <https://doi.org/10.1111/febs.14854>.
- Kötter, Sebastian/Andresen, Christian/Krüger, Martina (2014). Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biological chemistry* 395 (11), 1341–1352. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0178>.
- Kötter, Sebastian/Gout, Laurence/Frieling-Salewsky, Marion von/Müller, Anna Eliane/Helling, Stefan/Marcus, Katrin/Dos Remedios, Cristobal/Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2013). Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovascular research* 99 (4), 648–656. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt144>.
- Kötter, Sebastian/Kazmierowska, Malgorzata/Andresen, Christian/Bottermann, Katharina/Grandoch, Maria/Gorressen, Simone/Heinen, Andre/Moll, Jens M./Scheller, Jürgen/Gödecke, Axel/Fischer, Jens W./Schmitt, Joachim P./Krüger, Martina (2016). Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation research* 119 (9), 1017–1029. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685>.
- Kötter, Sebastian/Krüger, Martina (2022). Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Frontiers in physiology* 13, 914296. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.914296>.
- Krahmer, Natalie/Farese, Robert V./Walther, Tobias C. (2013). Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO molecular medicine* 5 (7), 973–983. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100671>.

- Kretzschmar, Franziska K./Mengel, Laura A./Müller, Anna O./Schmitt, Kerstin/Blersch, Katharina F./Valerius, Oliver/Braus, Gerhard H./Ischebeck, Till (2018). PUX10 Is a Lipid Droplet-Localized Scaffold Protein That Interacts with CELL DIVISION CYCLE48 and Is Involved in the Degradation of Lipid Droplet Proteins. *The Plant cell* 30 (9), 2137–2160. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00276>.
- Krüger, Martina/Babicz, Kamila/Frieling-Salewsky, Marion von/Linke, Wolfgang A. (2010). Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (5), 910–916. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.012>.
- Krüger, Martina/Kötter, Sebastian (2013). Titin — sensibler Riese der Muskelzellen. *BIOspektrum* 19 (4), 360–362. <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0319-8>.
- Krüger, Martina/Kötter, Sebastian/Grützner, Anika/Lang, Patrick/Andresen, Christian/Redfield, Margaret M./Butt, Elke/dos Remedios, Cris G./Linke, Wolfgang A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circulation research* 104 (1), 87–94. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184408>.
- Krüger, Martina/Linke, Wolfgang A. (2011). The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 286 (12), 9905–9912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.173260>.
- Krysiak, Judith/Unger, Andreas/Beckendorf, Lisa/Hamdani, Nazha/Frieling-Salewsky, Marion von/Redfield, Margaret M./dos Remedios, Cris G./Sheikh, Farah/Gergs, Ulrich/Boknik, Peter/Linke, Wolfgang A. (2018). Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nature communications* 9 (1), 262. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02483-3>.
- Labeit, S./Kolmerer, B./Linke, W. A. (1997). The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circulation research* 80 (2), 290–294. <https://doi.org/10.1161/01.res.80.2.290>.
- Lange, Stephan/Xiang, Fengqing/Yakovenko, Andrey/Vihola, Anna/Hackman, Peter/Rostkova, Elena/Kristensen, Jakob/Brandmeier, Birgit/Franzen, Gereon/Hedberg, Birgitta/Gunnarsson, Lars Gunnar/Hughes, Simon M./Marchand, Sylvie/Sejersen, Thomas/Richard, Isabelle/Edström, Lars/Ehler, Elisabeth/Udd, Bjarne/Gautel, Mathias (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science (New York, N.Y.)* 308 (5728), 1599–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1110463>.
- Leitner, N./Hlavatý, J./Ertl, R./Gabner, S./Fuchs-Baumgartinger, A./Walter, Ingrid (2022). Lipid droplets and perilipins in canine osteosarcoma. Investigations on tumor tissue, 2D and 3D cell culture models. *Veterinary research communications* 46 (4), 1175–1193. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09975-8>.
- LeWinter, Martin M./Granzier, Henk L. (2013). Titin is a major human disease gene. *Circulation* 127 (8), 938–944. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.139717>.
- Li, Xiaoya/Wang, Tian-Xiang/Huang, Xinmei/Li, Yue/Sun, Tiange/Zang, Shufei/Guan, Kun-Liang/Xiong, Yue/Liu, Jun/Yuan, Hai-Xin (2020). Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by

- suppressing liver lipotoxicity. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 40 (6), 1378–1394. <https://doi.org/10.1111/liv.14428>.
- Li, Zhipeng/Schulze, Ryan J./Weller, Shaun G./Krueger, Eugene W./Schott, Micah B./Zhang, Xiaodong/Casey, Carol A./Liu, Jun/Stöckli, Jacqueline/James, David E./McNiven, Mark A. (2016). A novel Rab10-EHBP1-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets. *Science advances* 2 (12), e1601470. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601470>.
- Licker, Virginie/Turck, Natacha/Kövari, Enikő/Burkhardt, Karim/Côte, Mélanie/Surini-Demiri, Maria/Lobrinus, Johannes A./Sanchez, Jean-Charles/Burkhard, Pierre R. (2014). Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in Parkinson's disease pathogenesis. *Proteomics* 14 (6), 784–794. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300342>.
- Linke, Wolfgang A. (2008). Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular research* 77 (4), 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>.
- Linke, Wolfgang A./Hamdani, Nazha (2014). Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circulation research* 114 (6), 1052–1068. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301286>.
- Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2010). The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda, Md.)* 25 (3), 186–198. <https://doi.org/10.1152/physiol.00005.2010>.
- Lopaschuk, Gary D./Ussher, John R./Folmes, Clifford D. L./Jaswal, Jagdip S./Stanley, William C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews* 90 (1), 207–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>.
- Lüllmann-Rauch, Renate/Asan, Esther (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Mardani, Ismena/Tomas Dalen, Knut/Drevinge, Christina/Miljanovic, Azra/Ståhlman, Marcus/Klevstig, Martina/Scharin Täng, Margareta/Fogelstrand, Per/Levin, Max/Ekstrand, Matias/Nair, Syam/Redfors, Björn/Omerovic, Elmir/Andersson, Linda/Kimmel, Alan R./Borén, Jan/Levin, Malin C. (2019). Plin2-deficiency reduces lipophagy and results in increased lipid accumulation in the heart. *Scientific reports* 9 (1), 6909. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43335-y>.
- Martin, Thomas G./Kirk, Jonathan A. (2020). Under construction: The dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. *Journal of molecular and cellular cardiology* 148, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.08.018>.
- Martinez-Botas, J./Anderson, J. B./Tessier, D./Lapillonne, A./Chang, B. H./Quast, M. J./Gorenstein, D./Chen, K. H./Chan, L. (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nature genetics* 26 (4), 474–479. <https://doi.org/10.1038/82630>.

- Methawasin, Mei/Granzier, Henk (2018). Softening the Stressed Giant Titin in Diabetes Mellitus. *Circulation research* 123 (3), 315–317.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313396>.
- Mishra, Paras K./Ying, Wei/Nandi, Shyam Sundar/Bandyopadhyay, Gautam K./Patel, Kaushik K./Mahata, Sushil K. (2017). Diabetic Cardiomyopathy: An Immunometabolic Perspective. *Frontiers in endocrinology* 8, 72.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00072>.
- Mitu, M./Mitu, F. (1999). Insuficiența cardiacă de cauză ischemică--mecanisme adaptative. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* 103 (1-2), 16–23.
- Miyanari, Yusuke/Atsuzawa, Kimie/Usuda, Nobuteru/Watashi, Koichi/Hishiki, Takayuki/Zayas, Margarita/Bartenschlager, Ralf/Wakita, Takaji/Hijikata, Makoto/Shimotohno, Kunitada (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology* 9 (9), 1089–1097.
<https://doi.org/10.1038/ncb1631>.
- Morbach, Stephan/Müller, Eckhard/Reike, Heinrich/Risse, Alexander/Rümenapf, Gerhard/Spraul, Maximilian (2017). Diabetisches Fußsyndrom. *Diabetologie und Stoffwechsel* 12 (S 02), S181-S189. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115979>.
- Mudd, James O./Kass, David A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451 (7181), 919–928. <https://doi.org/10.1038/nature06798>.
- Muhle-Goll, C./Habeck, M./Cazorla, O./Nilges, M./Labeit, S./Granzier, H. (2001). Structural and functional studies of titin's fn3 modules reveal conserved surface patterns and binding to myosin S1--a possible role in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Journal of molecular biology* 313 (2), 431–447.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5017>.
- Müller, Erik/Salcan, Senem/Bongardt, Sabine/Barbosa, David Monteiro/Krüger, Martina/Kötter, Sebastian (2021). E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Scientific reports* 11 (1), 21134. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00618-7>.
- Murphy, Denis J./Hernández-Pinzón, Inmaculada/Patel, Kanu (2001). Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *Journal of Plant Physiology* 158 (4), 471–478. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00359>.
- Neagoe, Ciprian/Kulke, Michael/del Monte, Federica/Gwathmey, Judith K./Tombe, Pieter P. de/Hajjar, Roger J./Linke, Wolfgang A. (2002). Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106 (11), 1333–1341.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029803.93022.93>.
- Nippert, Franziska/Schreckenberger, Rolf/Schlüter, Klaus-Dieter (2017). Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (128). <https://doi.org/10.3791/56634>.
- Okoshi, Katashi/Guimarães, Julliano F. Campos/Di Muzio, Bruno Paulino/Fernandes, Ana Angélica H./Okoshi, Marina Politi (2007). Miocardiopatia diabética. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 51 (2), 160–167.
<https://doi.org/10.1590/s0004-27302007000200004>.

- Olzmann, James A./Carvalho, Pedro (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
- Olzmann, James A./Kopito, Ron R. (2011). Lipid droplet formation is dispensable for endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of biological chemistry* 286 (32), 27872–27874. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.266452>.
- Pagan, Julia/Seto, Tiffany/Pagano, Michele/Cittadini, Antonio (2013). Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Circulation research* 112 (7), 1046–1058. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300521>.
- Pape, Hans-Christian/Kurtz, Armin/Silbernagl, Stefan (2019). *Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Pawella, L. M./Hashani, M./Schirmacher, P./Straub, B. K. (2010). Lipidtropfen-assoziierte Proteine bei Steatose. Effekte einer Induktion und siRNA-vermittelten Herunterregulation von PAT-Proteinen in hepatozytären Zellkulturmodellen. *Der Pathologe* 31 Suppl 2, 126–131. <https://doi.org/10.1007/s00292-010-1322-1>.
- Ponikowski, Piotr/Voors, Adriaan A./Anker, Stefan D./Bueno, Héctor/Cleland, John G. F./Coats, Andrew J. S./Falk, Volkmar/González-Juanatey, José Ramón/Harjola, Veli-Pekka/Jankowska, Ewa A./Jessup, Mariell/Linde, Cecilia/Nihoyannopoulos, Petros/Parissis, John T./Pieske, Burkert/Riley, Jillian P./Rosano, Giuseppe M. C./Ruilope, Luis M./Ruschitzka, Frank/Rutten, Frans H./van der Meer, Peter (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal* 37 (27), 2129–2200. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>.
- Poornima, Indu G./Parikh, Pratik/Shannon, Richard P. (2006). Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation research* 98 (5), 596–605. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000207406.94146.c2>.
- Pulinilkunnil, Thomas/Qi, Dake/Ghosh, Sanjoy/Cheung, Claudia/Yip, Patsy/Varghese, Jospy/Abrahani, Ashraf/Brownsey, Roger/Rodrigues, Brian (2003). Circulating triglyceride lipolysis facilitates lipoprotein lipase translocation from cardiomyocyte to myocardial endothelial lining. *Cardiovascular research* 59 (3), 788–797. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00469-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00469-3).
- Roberts, Melissa A./Olzmann, James A. (2020). Protein Quality Control and Lipid Droplet Metabolism. *Annual review of cell and developmental biology* 36, 115–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-031320-101827>.
- Rosas-Rodríguez, Jesús A./Virgen-Ortiz, Adolfo/Ruiz, Enrico A./Ortiz, Rudy M./Soñanez-Organis, José G. (2022). Perilipin Isoforms and PGC-1 α Are Regulated Differentially in Rat Heart during Pregnancy-Induced Physiological Cardiac Hypertrophy. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 58 (10). <https://doi.org/10.3390/medicina58101433>.
- Saito, Tsunenori/Asai, Kuniya/Sato, Shigeru/Takagi, Gen/Takano, Hitoshi/Takahashi, Hiroshi/Yasutake, Masahiro/Mizuno, Kyoichi (2013). Myocardial alterations and clinical implications associated with recovery of cardiac function in dilated

- cardiomyopathy with obesity. *International journal of cardiology* 168 (1), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.046>.
- Schaffer, Jean E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current opinion in lipidology* 14 (3), 281–287. <https://doi.org/10.1097/00041433-200306000-00008>.
- Schmidt, M./Kloetzel, P. M. (1997). Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (14), 1235–1243. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.14.9409542>.
- Schott, Micah B./Weller, Shaun G./Schulze, Ryan J./Krueger, Eugene W./Drizyte-Miller, Kristina/Casey, Carol A./McNiven, Mark A. (2019). Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *The Journal of cell biology* 218 (10), 3320–3335. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803153>.
- Schünke, Michael/Schulte, Erik/Schumacher, Udo/Voll, Markus/Wesker, Karl H. (2018). *PROMETHEUS Innere Organe*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Schütt, K./Marx, N. (2017). Diabetes und Herzinsuffizienz : Update 2017. *Herz* 42 (3), 329–340. <https://doi.org/10.1007/s00059-017-4558-1>.
- Servier Medical Art (2023). SMART - Servier Medical ART. Online verfügbar unter <https://smart.servier.com/> (abgerufen am 17.08.2023).
- Sharon, R./Goldberg, M. S./Bar-Josef, I./Betensky, R. A./Shen, J./Selkoe, D. J. (2001). alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (16), 9110–9115. <https://doi.org/10.1073/pnas.171300598>.
- Shoham, Naama/Gefen, Amit (2012). Mechanotransduction in adipocytes. *Journal of biomechanics* 45 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.10.023>.
- Shoham, Naama/Girshovitz, Pinhas/Katzengold, Rona/Shaked, Natan T./Benayahu, Dafna/Gefen, Amit (2014). Adipocyte stiffness increases with accumulation of lipid droplets. *Biophysical journal* 106 (6), 1421–1431. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.045>.
- Sorger, Daniel/Athenstaedt, Karin/Hrastnik, Claudia/Daum, Günther (2004). A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. *The Journal of biological chemistry* 279 (30), 31190–31196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403251200>.
- Spänig, Sabine/Kellermann, Kristina/Dieterlen, Maja-Theresa/Noack, Thilo/Lehmann, Sven/Borger, Michael A./Garbade, Jens/Barac, Yaron D./Emrich, Fabian (2019). The Ubiquitin Proteasome System in Ischemic and Dilated Cardiomyopathy. *International journal of molecular sciences* 20 (24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246354>.
- Su, Wen/Wang, Yang/Jia, Xiao/Wu, Wenhan/Li, Linghai/Tian, Xiaodong/Li, Sha/Wang, Chunjong/Xu, Huamin/Cao, Jiaqi/Han, Qifei/Xu, Shimeng/Chen, Yong/Zhong, Yanfeng/Zhang, Xiaoyan/Liu, Pingsheng/Gustafsson, Jan-Åke/Guan, Youfei (2014). Comparative proteomic study reveals 17β-HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 111 (31), 11437–11442.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1410741111>.
- Sweeney, H. Lee/Hammers, David W. (2018). Muscle Contraction. Cold Spring Harbor perspectives in biology 10 (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>.
- Sztalryd, Carole/Brasaemle, Dawn L. (2017). The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids 1862 (10 Pt B), 1221–1232.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.009>.
- Thygesen, Kristian/Alpert, Joseph S./Jaffe, Allan S./Chaitman, Bernard R./Bax, Jeroen J./Morrow, David A./White, Harvey D. (2019). Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). European heart journal 40 (3), 237–269.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>.
- Tong, Xin/Dai, Chunhua/Walker, John T./Nair, Gopika G./Kennedy, Arion/Carr, Rotonya M./Hebrok, Matthias/Powers, Alvin C./Stein, Roland (2020). Lipid Droplet Accumulation in Human Pancreatic Islets Is Dependent On Both Donor Age and Health. Diabetes 69 (3), 342–354. <https://doi.org/10.2337/db19-0281>.
- Toplak, Hermann/Hoppichler, Friedrich/Wascher, Thomas C./Schindler, Karin/Ludvik, Bernhard (2016). Adipositas und Typ 2 Diabetes. Wiener klinische Wochenschrift 128 Suppl 2, S196-200. <https://doi.org/10.1007/s00508-016-0986-9>.
- van der Vusse, G. J./van Bilsen, M./Glatz, J. F. (2000). Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. Cardiovascular research 45 (2), 279–293.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00263-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00263-1).
- Walther, Tobias C./Farese, Robert V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. Annual review of biochemistry 81, 687–714.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>.
- Wang, Yibin (2007). Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. Circulation 116 (12), 1413–1423.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589>.
- Wang, Zhexin/Grange, Michael/Wagner, Thorsten/Kho, Ay Lin/Gautel, Mathias/Raunser, Stefan (2021). The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. Cell 184 (8), 2135-2150.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.047>.
- Welte, Michael A./Gould, Alex P. (2017). Lipid droplet functions beyond energy storage. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids 1862 (10 Pt B), 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>.
- Willemsen, Nienke/Arigoni, Isabel/Studencka-Turski, Maja/Krüger, Elke/Bartelt, Alexander (2022). Proteasome dysfunction disrupts adipogenesis and induces inflammation via ATF3. Molecular metabolism 62, 101518.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101518>.
- Wu, Haoxi/Carvalho, Pedro/Voeltz, Gia K. (2018a). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. Science (New York, N.Y.) 361 (6401).
<https://doi.org/10.1126/science.aan5835>.
- Wu, Ming-Ping/Chang, Nen-Chung/Chung, Chi-Li/Chiu, Wan-Chun/Hsu, Cheng-Chen/Chen, Hui-Min/Sheu, Joen-Rong/Jayakumar, Thanasekaran/Chou, Duen-

- Suey/Fong, Tsorng-Harn (2018b). Analysis of Titin in Red and White Muscles: Crucial Role on Muscle Contractions Using a Fish Model. *BioMed research international* 2018, 5816875. <https://doi.org/10.1155/2018/5816875>.
- Yamaki, T./Tsu-ura, Y./Watanabe, K./Fukuda, T./Suzuki, T. (1997). Acute and reversible fatty metamorphosis of cultured rat hepatocytes. *Pathology international* 47 (2-3), 103–111. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1997.tb03728.x>.
- Zechner, Rudolf/Madeo, Frank/Kratky, Dagmar (2017). Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (11), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.76>.
- Zeng, Heng/Chen, Jian-Xiong (2019). Sirtuin 3, Endothelial Metabolic Reprogramming, and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of cardiovascular pharmacology* 74 (4), 315–323. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000719>.
- Zhang, H. H./Kumar, S./Barnett, A. H./Eggo, M. C. (2000). Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions. *The Journal of endocrinology* 164 (2), 119–128. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1640119>.
- Zhang, Weihua/Elimban, Vijayan/Nijjar, Mohinder S./Gupta, Suresh K./Dhalla, Naranjan S. (2003). Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Experimental & Clinical Cardiology* 8 (4), 173–183.
- Zhang, Xinqing/Xu, Wu/Xu, Rui/Wang, Zhen/Zhang, Xinyan/Wang, Peng/Peng, Ke/Li, Meiling/Li, Jing/Tan, Yanfei/Wang, Xiong/Pei, Haifeng (2022). Plin5 Bidirectionally Regulates Lipid Metabolism in Oxidative Tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022, 4594956. <https://doi.org/10.1155/2022/4594956>.
- Zheng, Pengfei/Xie, Zhonglin/Yuan, Yuan/Sui, Wen/Wang, Chao/Gao, Xing/Zhao, Yuanlin/Zhang, Feng/Gu, Yu/Hu, Peizhen/Ye, Jing/Feng, Xuyang/Zhang, Lijun (2017). Plin5 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury by reducing oxidative stress through inhibiting the lipolysis of lipid droplets. *Scientific reports* 7, 42574. <https://doi.org/10.1038/srep42574>.
- Zheng, Yi-Yuan/Wang, Miao/Shu, Xiang-Bing/Zheng, Pei-Yong/Ji, Guang (2018). Autophagy activation by Jiang Zhi Granule protects against metabolic stress-induced hepatocyte injury. *World journal of gastroenterology* 24 (9), 992–1003. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i9.992>.
- Zhou, Q./Melkounian, Z. K./Lucktong, A./Moniwa, M./Davie, J. R./Strobl, J. S. (2000). Rapid induction of histone hyperacetylation and cellular differentiation in human breast tumor cell lines following degradation of histone deacetylase-1. *The Journal of biological chemistry* 275 (45), 35256–35263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003106200>.
- Zhou, Yunting/Wang, Yuming/Ni, Chengming/Wang, Huiying/Zhou, Junming/Wan, Bingying/Li, Huiqin/Li, Fengfei/Huang, Rong/Xu, Wei/Shan, Ting/Cai, Tingting/Kong, Xiaoceng/Liu, Bingli/Liu, Xiaomei/Sun, Zilin/Ma, Jianhua (2022). Perilipin 2 Protects against Lipotoxicity-Induced Islet Fibrosis by Inducing Islet Stellate Cell Activation Phenotype Changes. *BioMed research international* 2022, 4581405. <https://doi.org/10.1155/2022/4581405>.

- Zhu, Chaoqun/Yin, Zhiyong/Tan, Bihua/Guo, Wei (2017). Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (9), 2363–2371. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.023>.
- Zhu, Yunxia/Ren, Chenxi/Zhang, Mingliang/Zhong, Yuan (2020). Perilipin 5 Reduces Oxidative Damage Associated With Lipotoxicity by Activating the PI3K/ERK-Mediated Nrf2-ARE Signaling Pathway in INS-1 Pancreatic β -Cells. *Frontiers in endocrinology* 11, 166. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00166>.
- Zouein, Fouad A./Castro Brás, Lisandra E. de/da Costa, Danielle V./Lindsey, Merry L./Kurdi, Mazen/Booz, George W. (2013). Heart failure with preserved ejection fraction: emerging drug strategies. *Journal of cardiovascular pharmacology* 62 (1), 13–21. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31829a4e61>.
- Zoula, S./Rijken, P. F. J. W./Peters, J. P. W./Farion, R./van der Sanden, B. P. J./van der Kogel, A. J./Décorps, M./Rémy, C. (2003). Pimonidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection. *British journal of cancer* 88 (9), 1439–1444. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600837>.
- Zuo, Along/Wang, Shuangqing/Liu, Lei/Yao, Youli/Guo, Jianpeng (2019). Understanding the effect of anthocyanin extracted from *Lonicera caerulea* L. on alcoholic hepatosteatosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 117, 109087. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109087>.
- Zuo, Anju/Zhao, Xiaoyu/Li, Tingting/Li, Jun/Lei, Shengyun/Chen, Jiying/Xu, Dan/Song, Chengxiang/Liu, Tianjiao/Li, Cuigang/Guo, Yuan (2020). CTRP9 knockout exaggerates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy through inhibiting the LKB1/AMPK pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* 24 (4), 2635–2647. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14982>.

6 Anhang

Tabelle 8: Perfusionszeiten nach Herzgewicht

Herzgewicht (g)	Zeit (min)	Herzgewicht (g)	Zeit (min)
0,1	5	1,3	21
0,2	5	1,4	23
0,3	5	1,5	25
0,4	7	1,6	26
0,5	8	1,7	28
0,6	10	1,8	30
0,7	12	1,9	31
0,8	13	2,0	33
0,9	15	2,1	35
1,0	16	2,2	36
1,1	18	2,3	38
1,2	20	2,4	40

Tabelle 9: Trennbereiche von SDS-Gelen (carloth.com)

Acrylamidkonzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Trennbereich (kDa)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

Lizenzhinweise zu verwendeten Abbildungen

In dieser Dissertation wurden Abbildungen verwendet, die unter offenen Lizenzen (insbesondere der Creative Commons Attribution 4.0 International License – CC BY 4.0) veröffentlicht wurden.

Diese Lizenzen erlauben die Nutzung, Vervielfältigung, Verbreitung, Bearbeitung und Veröffentlichung der Inhalte in jedem Format, sofern die jeweilige Originalquelle ordnungsgemäß genannt, ein Link zur Lizenz angegeben und ggf. vorgenommene Änderungen kenntlich gemacht wurden.

Sofern keine separate Quellenangabe erfolgt, handelt es sich um eigene Abbildungen oder um Grafiken, die auf Basis frei zugänglicher Daten neu erstellt wurden.

Tabelle 10: Auflistung der Lizenzen zur Nutzung von Abbildungen

Abb.-Nr	Quelle (Autor, Titel, Jahr)	Originalveröffentlichung	Lizenz	Lizenztext	Modifikation
Abb . 1	<i>Servier Medical Art</i>	<i>Servier Medical Art</i> , https://smart.servier.com/	CC BY 3.0	Creative Commons Attribution 3.0 Unported	Zuschnitt verändert
Abb . 2	<i>Servier Medical Art</i>	<i>Servier Medical Art</i> , https://smart.servier.com/	CC BY 3.0	Creative Commons Attribution 3.0 Unported	Zuschnitt verändert
Abb . 3	Adewale und Ahn, <i>Overview of sarcomere and titin structure</i> (2021)	<i>Int J Mol Sci.</i> 2021 Jul 15;22(14):7563. doi: 10.3390/ijms22147563.	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert
Abb . 4	Koser et al., <i>Titin isoform N2BA and phosphosites</i> (2019)	<i>FEBS J.</i> 2019 Jun;286(12):2240-2260. doi: 10.1111/febs.14854.	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert
Abb . 5	Müller et al., <i>Titin ubiquitination</i> (2021)	<i>Sci Rep.</i> 2021 Oct 26;11(1):21134. doi: 10.1038/s41598-021-00618-7.	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert
Abb . 6	Krüger et al., <i>Insulin effect on titin isoform composition</i> (2010)	<i>J Mol Cell Cardiol.</i> 2010 May;48(5):910-6. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.02.012. Epub 2010 Feb 23.	Traditionelles Copyright (Elsevier)	Nutzung in der Dissertation erlaubt für wissenschaftliche Zwecke mit vollständiger Quellenangabe. Keine CC-Lizenz. Für andere Nutzungen (z.B.	Zuschnitt verändert

				Publikation, kommerzielle Verwendung) ist eine Genehmigung von Elsevier erforderlich.	
Abb . 7	Lopaschuk et al., <i>Overview of fatty acid β-oxidation in heart</i> (2010)	<i>Physiol Rev.</i> 2010 Jan;90(1):207-58. doi: 10.1152/physrev.00015.2009.	CC BY-NC	Creative Commons Attribution-NonCommercial License	Zuschnitt verändert
Abb . 8	Schott et al., <i>Lipid droplets</i> (2019)	<i>J Cell Biol.</i> 2019 Oct 7;218(10):3320-3335. doi: 10.1083/jcb.201803153. Epub 2019 Aug 7.	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert
Abb . 9	Jarc und Petan, <i>Functions of Perilipin 5</i> (2019)	Yale J Biol Med. 2019 Sep 20;92(3):435-452. eCollection 2019 Sep.	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert
Abb . 10	Kaushik und Cuervo, <i>CMA and lipolysis interaction</i> (2015)	<i>Nat Cell Biol.</i> 2015 May 11;17(6):759–770. doi: 10.1038/ncb3166	CC BY 4.0	Creative Commons Attribution 4.0 International License	Zuschnitt verändert

7 Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Entstehung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martina Krüger, die mich durch ihre engagierte Betreuung, ihre stetige Erreichbarkeit für Fragen sowie durch ihre unermüdliche Bereitschaft, neue Impulse zu geben, entscheidend geprägt hat. Ihre wissenschaftliche Expertise und ihr Vertrauen in meine Arbeit haben diese Dissertation in ihrer jetzigen Form erst möglich gemacht.

Ebenso danke ich Katharina Voigt herzlich für ihre geduldige Einarbeitung im Labor, ihre kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für ihre hilfreichen Rückmeldungen zu den ersten Entwürfen dieser Arbeit. Ihre fachliche und persönliche Begleitung war für mich von unschätzbarem Wert.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des Krüger-Labors, das mich mit großer Hilfsbereitschaft und einer stets freundlichen und motivierenden Arbeitsatmosphäre empfangen hat. Dank euch sind selbst lange Labortage in positiver Erinnerung geblieben.

Ich danke außerdem dem Sonderforschungsbereich 116 (SFB116) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums. Diese Förderung hat mir nicht nur die Bearbeitung dieser Dissertation erleichtert, sondern auch die Entscheidung für ein Freisemester ermöglicht.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums mit uneingeschränkter Unterstützung, Vertrauen und Rückhalt begleitet hat.

Ebenso danke ich meinen Freundinnen und Freunden, die mich in schwierigen Momenten aufgemuntert, mich mit Ablenkung versorgt und mich immer wieder daran erinnert haben, auch das Leben außerhalb des Labors und des Schreibtischs zu genießen – oder mich einfach mal liebevoll zurück auf den Boden der Tatsachen geholt haben. Ohne euch wäre dieser Weg um ein Vielfaches schwerer gewesen.

Nicht zuletzt danke ich Kathi, die mich in der Endphase dieser Arbeit mit großem Engagement beim Korrekturlesen und der Formatierung in Word unterstützt hat. Deine Hilfe hat mir den letzten Schritt sehr erleichtert.

Vielen Dank euch allen.

.