

Einfluss von induzierter Ceramidsynthese auf Zellphysiologie und
Metabolismus *in vitro*.

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller- Universiät Jena

Von M.Sc. Tom Kretschmar
geboren am 10.09.1987 in Riesa

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. med. P. Christian Schulze, Jena
2. Apl. Prof. Dr. med. habil. Regine Heller, Jena
3. Prof. Dr. med. Michael Lehrke, Aachen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.04.2022

1 Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
2 Zusammenfassung.....	1
3 Einleitung.....	2
3.1 Anatomie und Physiologie des Herzens	2
3.2 Herzerkrankungen: Arten, Symptomatik und Behandlung	3
3.2.1 Koronare Herzerkrankung.....	3
3.2.2 Herzinsuffizienz	4
3.3 Myokardiale Fibrose.....	5
3.3.1 Kardiale Fibroblasten	5
3.3.2 Differenzierung: Vom Fibroblast zum Myofibroblast	6
3.3.3 Arten der myokardialen Fibrose.....	7
3.4 Ursachen der myokardialen Fibrose	8
3.5 Doxorubicin verursachte Kardiomyopathie.....	8
3.6 Ceramide.....	9
3.6.1 Struktur und Synthese	9
3.6.2 Ceramidsynthasen	11
3.6.3 Expression und Regulation verschiedener CerS	14
3.7 Ceramidsynthase 2 (CerS2).....	15
3.8 Mitochondrien vermittelte Apoptose.....	16
3.9 Mitochondrialer Metabolismus.....	16
4 Ziele der Arbeit	18
5 Methodik.....	19
5.1 Methoden.....	19
5.1.1 p3xFLAG-CMV-7 Überexpressionsplasmid	19
5.1.2 Bakterientransformation.....	19
5.1.3 Minipräp/Maxipräp	20
5.1.4 Plasmidverdau und Agarosegelelektrophorese	20
5.1.5 Transfektion mittels Lipofectamine 3000	20
5.1.6 Zellkultur.....	21
5.1.7 RNA- Isolation, cDNA- Synthese, qPCR	22
5.1.8 Proteinisolation, SDS- PAGE, Western Blot	23
5.1.9 Massenspektrometrie.....	26

5.1.10	Immunfluoreszenz	27
5.1.11	Elektronenmikroskopie	29
5.1.12	Seahorse Analysis	29
5.1.13	Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)	30
5.1.14	Statistik.....	31
5.2	Materialien.....	31
6	Ergebnisse.....	38
6.1	Murine Kardiomyozyten (HL-1)	38
6.1.1	Dox erhöht die CerS2- Expression.....	39
6.1.2	Dox erhöht langkettige und sehr langkettige Ceramide.....	40
6.1.3	Durch Dox erhöhte mitochondriale ROS- Level sind reversibel durch die Vorbehandlung mit MitoTempo	41
6.1.4	Dox vermittelte Mitochondrienschädigung.....	43
6.1.5	Dox initiiert Mitochondrien- vermittelte Apoptose	47
6.2	CerS2- Überexpression in HL-1	49
6.2.1	Transformation kompetenter E. coli mit p3xFLAG-TK und p3xFLAG-CerS2	49
6.2.2	Transfektion muriner Kardiomyozyten mit Lipofektamin 3000.....	50
6.2.3	Ceramidlevel in FLAG-TK und FLAG-CerS2	51
6.2.4	Mitochondriale ATP- Produktion von FLAG-CerS2 (HL-1)	52
6.3	Humane Vorhautfibroblasten (hFSF)	54
6.3.1	Dox erhöht dosisabhängig CerS2- Expression und in der Konsequenz langkettige und sehr langkettige Ceramide.....	54
6.3.2	Dosisabhängige Erhöhung mitochondrialer ROS- Level.....	56
6.3.3	Schädigung der Mitochondrienstruktur und -Funktion durch Dox.....	57
6.3.4	Dox initiiert die Apoptose in hFSF	62
6.3.5	Dox fördert die Fibrose durch Erhöhung von Fibrosemarker	63
6.3.6	Verbesserung der Mitochondrienstruktur durch Reduktion proinflammatorischer Ceramide mit Fumonisin B1	65
6.3.7	Verringerung der Apoptose durch FuB.....	69
6.3.8	Reduktion Fibrose- assoziierter mRNA Expressionen durch FuB.....	70
6.4	CerS2 Überexpression in hFSF	72
6.4.1	Transfektion humaner Fibroblasten und Evaluation mittels Western Blot und Immunfluoreszenz.....	72
6.4.2	Ceramidkonzentrationen in FLAG-CerS2	74
6.4.3	FuB reduziert durch FLAG-CerS2 erhöhte Ceramidkonzentrationen	74

6.4.4	CerS2- Überexpression führt zur mitochondrialen ROS- Erhöhung sowie zu strukturellen und funktionellen Mitochondrienschädigungen	75
6.4.5	CerS2- Überexpression initiiert die Mitochondrien- vermittelte Apoptose	79
6.4.6	Erhöhte Ceramide erhöhen mRNA-Level von MMP9 aber nicht die Konzentration im Zellüberstand	80
7	Diskussion.....	82
7.1	Effekte von Dox auf Ceramidsynthese	82
7.2	Mitochondrienschädigung in Struktur und Funktion durch erhöhte mitochondriale ROS- Level verursacht durch Ceramide.....	83
7.3	Beeinträchtigung der mitochondrialen Homöostase durch Dox erhöhte Ceramide ..	84
7.4	Initiierung der Apoptose durch Dox	89
7.5	Dox fördert die Fibrose.....	90
7.6	Spezifisch induzierte CerS2 Überexpression	92
7.7	Ceramide schädigen Mitochondrien in Struktur und Funktion	93
7.8	Ceramide fördern die Apoptose.....	96
7.9	Einfluss erhöhter Ceramide auf die Fibrose	96
7.10	Limitierungen und Ausblick.....	97
8	Schlussfolgerung.....	99
9	Quellenverzeichnis.....	100
10	Anhang	109
10.1	Publikationsliste (Stand 10/2021).....	109
10.2	Danksagung	110
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	111

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
αSMA	alpha smooth muscle actin
ADP	Adenosin Diphosphat
ATGL	Adipozyten- Triglycerid- Lipase
ATP	Adenosin Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	Cluster of Differentiation
CerS	Ceramidsynthase
CMV	Zytomegalievirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
CPT1B	Carnitine Palmitoyltransferase- 1b
ddcT	deltadelta cycle treshhold
DDR2	Discoidin Receptor 2
DGAT1/2	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
Dox	Doxorubicin
DRP1	Dynamamin-1- like protein
ELMI	Elektronenmikroskopie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FIS1	Mitochondrial fission 1 protein
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hFSF	humane Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts)
HOX	homeobox- like
IL	Interleukin
LVAD	Left ventricular assistant device
MDB	membrane desalting buffer
Mff	Mitochondrial fission factor
MFN1/2	Mitofusin

MMP	Matrix- Metalloproteinase
OCR	Oxygen Consumption Rate
OPA1	OPA1 mitochondrial dynamin like GTPase
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PDK4	Pyruvat dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4
PKC	Phosphokinase
rel.	relative
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM-MHC	smooth muscle myosin heavy chain
TAVR	Transaortic valve replacement
TGF- β	transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
UOG-1	upstream of growth and differentiation factor -1
Vim	Vimentin
Vinc	Vinculin

2 Zusammenfassung

Doxorubicin (Dox) ist ein Anthacycline und aggressives Chemotherapeutikum, welches durch Kardiotoxizität als Nebenwirkung charakterisiert ist. Die Ursachen dieser Kardiotoxizität sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt das Dox proinflammatorische Ceramide erhöht, welche bisher als weitere Nebenwirkung des Anthacyclines behandelt werden. Ceramide sind eine spezielle Art von Fetten, bestehend aus einem Sphingosinrückgrat und einer angehefteten Fettsäure. Die Kettenlänge der angefügten Fettsäure beeinflusst maßgeblich die Funktion der Ceramide. Aufgrund dieser Diversität werden Ceramide von unterschiedlichen Proteinen synthetisiert und sind in einer Vielzahl von Signalwegen z.B. Zellvitalität und Apoptose involviert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von proinflammatorischen Ceramiden in der Dox-vermittelten Kardiotoxizität v.a. in Hinblick auf mitochondrialer Homöostase und Fibrose zu untersuchen und zu erklären.

Dazu wurden murine Kardiomyozyten und humane Fibroblasten mit Dox behandelt und anschließend auf zellschädigende Effekte in Form von erhöhten Ceramiden untersucht. Fokussiert wurde sich primär auf die Auswirkungen von erhöhten proinflammatorischen Ceramiden auf die strukturelle und funktionelle Integrität der Mitochondrien. Parallel wurde in den humanen Fibroblasten Ceramidsynthase 2, ein Protein, welches für die Synthese von langkettigen Ceramiden verantwortlich ist, überexprimiert. Weiterhin wurden Ceramide durch die Vorbehandlung mit Fumonisin B1 reduziert.

Dadurch war es möglich, eine direkte Verbindung zwischen spezifisch erhöhten Ceramiden und den kardiotoxischen Nebenwirkungen von Dox herzustellen. Dies ermöglichte ebenso eine differenzierte und umfassende Erforschung der initialen Hypothese.

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Ceramide nicht nur eine weitere Nebenwirkung von Dox, sondern an dessen Effekten beteiligt sind. Eine Verringerung von Ceramiden durch beispielsweise Fumonisin B1, ermöglicht eine Verbesserung der mitochondrialen Homöostase und Zellvitalität, als auch Verringerung der Fibrose.

Die Regulation der Ceramidexpression könnte somit ein wertvoller Therapieansatz für die Behandlung von Dox- induzierter Kardiotoxizität darstellen.

3 Einleitung

3.1 Anatomie und Physiologie des Herzens

Das Herz ist eines der essenziellsten Organe im menschlichen Körper und verantwortlich für die Versorgung aller Organe mit Blut (G. Aumüller 2017). Funktionell entspricht das Herz einer Verdrängerpumpe. Hierbei wird das Blut über Ventile aus der unteren Hohlvene angesaugt, wobei ein Rückstrom des Blutes durch die Herzklappen verhindert wird.

Das Herz besteht aus 2 vollständig von dem Septum voneinander getrennten Herzhälften. Beide bestehen wiederum jeweils aus einem Atrium und Ventrikel, welche rechts von der Trikuspidalklappe und links von der Mitralklappe voneinander getrennt sind (Abb. 1). Die rechte Herzhälfte saugt dabei das Blut aus der Hohlvene in das rechte Atrium und in den rechten Ventrikel und wird von da aus über die Pulmonalklappe und Lungenarterie in die Lunge gepumpt. Dort wird an das in den Erythrozyten befindliche Hämoglobin Sauerstoff gebunden und das Blut wird zurück über die linke Pulmonalvene in das linke Atrium und den linken Ventrikel transportiert. Durch die Kontraktion des linken Ventrikels wird das mit Sauerstoff gesättigte Blut über die Aorta im ganzen Körper verteilt und gewährleistet damit die Funktionalität aller Organe.

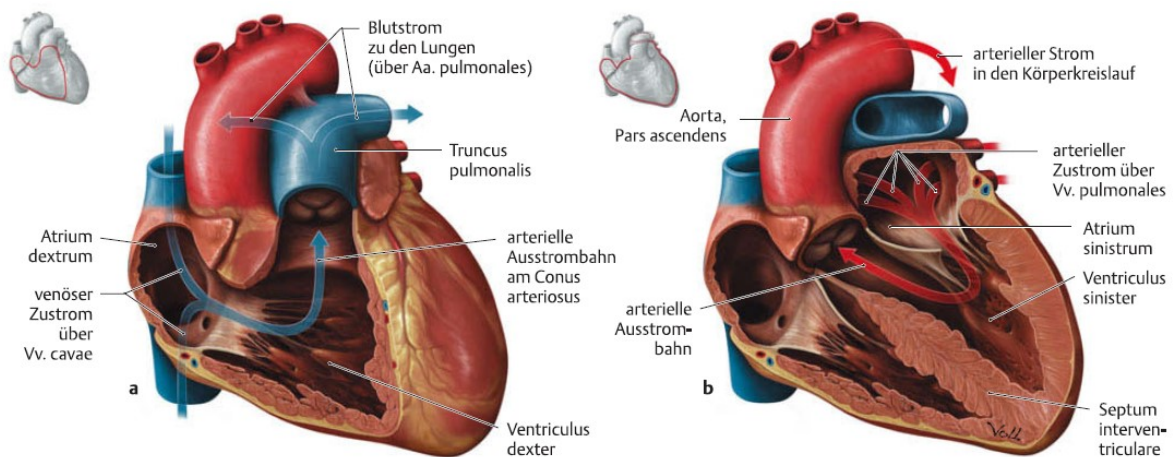


Abb. 1: Herzaufbau und Blutstrom (G. Aumüller 2017)

3.2 Herzerkrankungen: Arten, Symptomatik und Behandlung

Die Funktion des Herzens ist unabdinglich für die Überlebensfähigkeit des menschlichen Körpers. Erkrankungen des Herzens jedweder Art sind deshalb schwerwiegend und beeinflussen maßgeblich das Wohlbefinden und die Gesundheit des Patienten. Der Überbegriff „Herzerkrankung“ beschreibt dabei alle Zustände und Ursachen, die es dem Herzen nicht ermöglichen die erforderliche Menge an sauerstoffgesättigten Blut durch den Körper zu transportieren. Todesfälle verursacht durch Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten in der westlichen Hemisphäre. 2015 gab es weltweit 422,7 Mio. Patienten mit einer Herzerkrankung, von denen 17,92 Mio zum Tode führten (Roth et al. 2017). In Deutschland belief sich die Zahl der Todesfälle verursacht durch Herz- Kreislaufferkrankungen im Jahr 2018 auf 338856 Menschen (37,2%) (Kardiologie 2019).

Die Ursachen einer Herzerkrankung können so verschieden wie komplex sein. Zu den verschiedenen Arten der Herzerkrankungen gehören, unter anderem, Koronare Herzerkrankungen, Herzklappenerkrankungen, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und angeborene Herzfehler (Kardiologie 2019).

3.2.1 Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung beschreibt die Atherosklerose der Herzkranzgefäße und ist durch eine steigende Mortalität im zunehmenden Alter charakterisiert (Libby et al. 2019). Durch verschiedene Ablagerungen, z.B. LDL an der Intima der Gefäße, kommt es mit der Zeit zu einer Verengung durch einen Plaque, welcher zu einer Angina pectoris führt. Unbehandelt kommt es zu einer Ruptur der Plaques und dadurch zum Herzinfarkt. Durch einen Herzkranzkatheter kann das verstopfte Gefäß mittels eines Stents (Ring 2001) bzw. Ballondilatation (Sachin Khambadkone 2009) wieder ausgedehnt werden. Weiterhin kann durch eine Bypass- Operation (Passaroni et al. 2015), das verstopfte Gefäß umgangen (engl.: *to bypass*) werden. Alle 3 Methoden ermöglichen es, dass dem Patienten schnell geholfen und die Durchblutung der Gefäße verbessert bzw. wiederhergestellt werden kann.

3.2.2 Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz werden alle Krankheitsbilder zusammengefasst, welche zu einer Schwächung des Herzens führen. Vergleichbar mit der koronaren Herzerkrankung steigt die Morbidität im Alter und ist unabhängig vom Geschlecht. Durch verbesserte Behandlungsmethoden und der Entwicklung neuer Medikamente ist die Mortalität seit einigen Jahren rückläufig (Kardiologie 2017).

Eine spezielle Unterkategorie der Herzinsuffizienz ist die Kardiomyopathie und bezieht sich auf alle Erkrankungen des Herzmuskels (Maron et al. 2006). Das Krankheitsbild ist charakterisiert durch eine Vergrößerung, Verdickung und Verhärtung des Herzmuskels, einhergehend mit einem zunehmenden Funktionsverlust und letztentlichem Herzversagen (Schultheiss und Kuhl 2006, Wexler et al. 2009). Die weiteren Unterteilungen sind vielfältig und jeweils durch verschiedene Ursachen und Symptome charakterisiert und definiert (Bossone et al. 2013, Smith und Squiers 2013, Hershberger und Morales 1993). Zu den bekanntesten Arten der Herzmuskelerkrankungen gehören die dilatative Kardiomyopathie und Myokarditis (Hershberger und Morales 1993, Schultheiss und Kuhl 2006).

3.2.2.1 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie tritt mit einer Inzidenz von 1/2500 auf und betrifft vor allem den linken Vorhof und die linke Kammer und entwickelt sich über einen längeren Zeitraum (Taylor et al. 2006, Weintraub et al. 2017). Dabei vergrößert sich zunehmend der Herzmuskel, wodurch die linke Kammer ausgedehnt wird. Dadurch verursacht, verliert der Herzmuskel an Kontraktilität und kann so das Blut schlechter in die Aorta und somit in den Körperkreislauf pumpen. Im Zusammenhang damit entstehen Symptome wie Kurzatmigkeit, Schwindel und Anschwellen der Extremitäten (Schultheiss et al. 2019). Die Ursachen der dilatativen Kardiomyopathie sind umfangreich und beinhalten unter anderem Alkoholmissbrauch, metabolische Dysfunktionen und virale Infektionen (Schultheiss et al. 2019). Die genauen involvierten Signalwege sind vielfältig und durch langjährige intensive Forschung wurden neue Nachweis-, Behandlungs- und Therapiemethoden entwickelt und etabliert (McNally und Mestroni 2017).

3.2.2.2 Myokarditis

Die Myokarditis kann sowohl akut als auch chronisch verlaufen und infektiös, toxisch oder autoimmun verursacht werden (Naegeli 2004). Viele betroffene Patienten sind symptomlos bzw. asymptomatisch. Die übrigen Patienten zeigen Thoraxschmerz, Müdigkeit und Atemnot. Myokarditis ist jedoch nicht, wie bei der dilatativen Kardiomyopathie, durch eine Vergrößerung des linken Ventrikels charakterisiert. Unbehandelt kann die Myokarditis sich von einer Herzinsuffizienz bis hin zu einem kardiogenen Schock entwickeln (Naegeli 2004). Falls keine oder eine zu späte Behandlung erfolgt, können Herzerkrankungen zum Herzversagen und somit zum Tod führen. Operative Eingriffe wie das Einsetzen eines Bypasses (Serruys et al. 2009, Samadashvili et al. 2019), Stents (McKavanagh et al. 2018) oder das Implantieren eines LVAD (Yancy et al. 2013, Kamboj und Kazory 2019) bzw. TAVR (Jones et al. 2019, Aalaei-Andabili und Bavry 2019) retten dem Patienten das Leben und verbessern die Lebensqualität erheblich. Doch selbst nach einer erfolgreichen OP und/oder medikamentösen Behandlung sind die meisten Patienten lange in ihrer gewohnten Lebensweise eingeschränkt bzw. müssen diese ändern, um ein weiteres Herzversagen zu verhindern. Ein großes Problem bei beispielsweise einem postmyokardialen Infarkt ist die durch Fibroblasten verursachte und vermittelte Fibrose.

3.3 Myokardiale Fibrose

3.3.1 Kardiale Fibroblasten

Das Myokardium besteht aus einer Vielzahl verschiedenen Zelltypen von denen die kardialen Fibroblasten die größte Zellpopulation darstellen (Fan et al. 2012). Sie entstammen mesenchymalen Ursprungs und sind in jedem Gewebe identifizierbar (Souders et al. 2009, Krenning et al. 2010). Von der Form her, sind Fibroblasten flache und spindelförmige Zellen mit einer Größe von ungefähr 50-70 μm (Abercrombie 1978, Williams 1998). Basierend auf dem Gewebe, in dem sie exprimiert sind, haben Fibroblasten unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen (Fries et al. 1994). Beispielsweise ist Vimentin ein intermediäres Filament in Fibroblasten und ist, obwohl es auch in Endothelzellen nachweisbar ist, ein verlässlicher Marker, um Fibroblasten zu identifizieren und nachzuweisen (Camelliti et al. 2004, Camelliti et al. 2005). DDR2 ist ein Kollagenrezeptor und vor allem in mesenchymalen Zellen exprimiert. Dieser Rezeptor ist aufgrund seiner Proteintyrosinkinasefunktion in den verschiedensten Prozessen involviert, wie Proliferation, Migration und Differenzierung.

DDR2 ist spezifischerer Marker als Vimentin für kardiale Fibroblasten, da es nicht in Kardiomyozyten oder in kardialen Endothelzellen exprimiert wird (Schlessinger 1997).

Eine der wesentlichsten Aufgaben der Fibroblasten ist die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix, welche essenziell für die Funktionalität des Herzens ist. Durch die parallele Synthese und Segregation von Proteinen die diese Matrix auf- als auch abbauen, wie MMP und TIMP, entsteht ein sensibles Gleichgewicht, welches maßgeblich für die extrazelluläre Matrix- Homöostase verantwortlich ist (Fan et al. 2012, Moore et al. 2012, Cui et al. 2017).

3.3.2 Differenzierung: Vom Fibroblast zum Myofibroblast

Als Folge entsprechender pathogener Stimuli, meistens einer myokardialen Grunderkrankung, differenzieren die kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten (Petrov et al. 2002). Diese differenzierten Zellen sind kontraktiler und produzieren Proteine für die extrazelluläre Matrix und sind im gesunden Myokardium zumeist nicht identifizierbar (Fan et al. 2012). Sie exprimieren verschiedene glatte Muskulaturmarker wie α SMA, SM-MHC, Vinculin, Paxillin und Tensin (Santiago et al. 2010). Weiterhin reagieren sie sehr stark auf Chemokine und migrieren dadurch an den Ort der Verletzung und segregieren ihrerseits verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie unter anderem IL-1 β , IL-6 und TNF α (Baum und Duffy 2011). Die Differenzierung der kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten wird durch verschiedene Faktoren begünstigt bzw. reguliert. So sind unter anderem TGF- β und verschiedene Zytokine essenziell für diesen Prozess (Tamaoki et al. 2005, Walker et al. 2004, Butt et al. 1995).

Verursacht durch diese Differenzierung, kommt es zur Begünstigung des extrazellulären Matrix- *turnover*. Dabei kommt es zur kardialen Umstrukturierung durch erhöhte Segregation von MMPs, welche die extrazelluläre Matrix abbauen und so die Ablagerung von fibrotischem Material, wie beispielsweise Kollagen, ermöglichen und fördern. Die Akkumulation fibrotischen Materials ersetzt oder verdrängt gesunde Kardiomyozyten bzw. stört deren Interaktion. Das führt zu einer zunehmenden Beeinträchtigung der myokardialen Funktion (Zamilpa und Lindsey 2010). Dieser Prozess und der daraus entstehende Phänotyp wird allgemein als Fibrose bezeichnet und ist definiert und charakterisiert durch die „Vernarbung“ des entsprechenden Gewebes und dem damit resultierenden Funktionsverlust (Wynn 2008, Krenning et al. 2010).

3.3.3 Arten der myokardialen Fibrose

Die myokardiale Fibrose stellt ein großes Problem bei Patienten mit Herzinsuffizienz dar und ist verantwortlich für mehrere hunderttausend Tote im Jahr weltweit (Hinderer und Schenke-Layland 2019, Writing Group et al. 2016, Timmis et al. 2018). Typischerweise tritt diese nach einem Myokardinfarkt auf, jedoch kann die kardiale Fibrose auch als Folge anderer Ursachen wie zum Beispiel diabetischer Hypertrophy oder dilatativer Kardiomyopathie auftreten (Hinderer und Schenke-Layland 2019).

Weiterhin ist die Unterteilung in unterschiedliche Arten möglich. Bei der reaktiven interstitiellen Fibrose kommt es zu Bluthochdruck und Kardiomyopathie aufgrund von fibrotischen Ablagerungen ohne einen großen Verlust von Kardiomyozyten (Disertori et al. 2017).

Eine weitere Variante ist die infiltrative interstitielle Fibrose. Charakterisiert ist diese durch Anreicherung von Glykolipiden in unterschiedlichen Zelltypen des Herzens. Beobachtbar ist dies vor allem bei Morbus Fabry, einer angeborenen Lipidstoffwechselstörung (Tian et al. 2017, Overbeek et al. 2010).

Nach einem Myokardinfarkt tritt am häufigsten die Ersatzfibrose auf. Die dabei geschädigten Kardiomyozyten werden vor allem durch Kollagen Typ I- Ablagerungen ersetzt, was zu einem Funktionsverlust führt (Mewton et al. 2011). Sowohl bei der reaktiven interstitiellen als auch der infiltrativen interstitiellen Fibrose kommt es über einen längeren unbehandelten Zeitraum ebenfalls zur Ersatzfibrose.

Zusätzlich zu den gravierenden Folgen der Fibrose, ist diese auch schwer zu detektieren. In der Vergangenheit war standardmäßig die Detektion der Fibrose nur mit der Histopathologie des erkrankten Gewebes möglich (Espeland et al. 2018). Dabei gestattete die Färbung mit Pikro-Siriusrot die Darstellung von fibrillären Kollagen und damit der Ausbreitung der Fibrose (Schmitz et al. 2010). Die Nachteile dieser Diagnostik waren die Notwendigkeit von invasivem Biopsiematerial und die nur geringe Genauigkeit bei lokalisierter Fibrose (Mewton et al. 2011). Abgelöst wurde diese Technik durch die kardiale Magnetresonanztomographie. Dabei handelt es sich um ein nicht- invasives Bildgebungsverfahren, welches durch ein geeignetes Kontrastmittel, z.B. Gadolinium, es ermöglicht, die genaue Zusammensetzung und das Ausmaß der Fibrose zu untersuchen und zu diagnostizieren (Mewton et al. 2011, Haaf et al. 2016).

3.4 Ursachen der myokardialen Fibrose

Obwohl die Fibrose durch die Vernarbung des Gewebes und den daran anschließenden Funktionsverlust schwerwiegende Folgen für den Patienten hat, ist dieser Prozess bis zu einem gewissen Punkt essenziell für die Wundheilung. Eine unregulierte und -kontrollierte Wundheilung wird maladaptiv, woraus sich die Fibrose entwickelt. Für die Behandlung ist es also wichtig, die zugrunde liegenden Ursachen der Fibrose zu untersuchen und diese zu verstehen. Aufgrund dieses Verständnisses ist es möglich, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, welche die physiologischen Heilungsprozesse unterstützen aber nicht das pathophysiologische *remodelling*, die Fibrose, fördern (Hinderer und Schenke-Layland 2019). Im Laufe der Jahre wurden viele Medikamente und Behandlungsmethoden entwickelt, welche sich der Problematik der Fibrose auf verschiedenste Arten und Weisen angenommen haben (Ertl und Frantz 2005, Bujak und Frangogiannis 2007, Hinderer et al. 2015). Dennoch bleibt die Fibrose bis heute ein kompliziertes und komplexes Problem, welches weiterer Forschung im Bereich der Ursachen und der Entwicklung neuer Medikamente benötigt.

3.5 Doxorubicin verursachte Kardiomyopathie

Die Arten und Verläufe der unterschiedlichen Kardiomyopathien und deren Folgen, wie myokardialer Fibrose, sind ebenso vielfältig, wie deren Ursachen. Zu den häufigsten Auslösern einer Herzerkrankung gehören ungesunde Lebensweise und Bluthochdruck. Jedoch kann die Kardiomyopathie auch als Nebenwirkung bzw. als Begleiterscheinung, bei der medikamentösen Behandlung von verschiedenen Karzinomen auftreten. Eines der Bekanntesten und in Bezug auf Wirkungsweise und Nebenwirkungen am längsten erforschten Chemotherapeutika, ist Doxorubicin (Dox). Dieses Krebspräparat ist ein Derivat von Daunorubicin und ist durch seine interkalante Wirkungsweise und als Folge dessen, Zytotoxizität charakterisiert. Es wird zur Behandlung verschiedenster Tumore wie Leukämien oder Brustkrebs eingesetzt. Aufgrund seiner schweren Nebenwirkungen, vor allem der Kardiotoxizität, wird es nur in begrenzter und kontrollierter Dosis angewendet und nur falls es keine bessere Alternative gibt (Tacar et al. 2013). Die Langzeitanwendung von Dox führt zu einer dilatativen Kardiomyopathie mit all den bereits vorher beschriebenen Konsequenzen, inklusive der Fibrose nach dem Absetzen des Medikaments (Chatterjee et al. 2010, Arola et al. 2000).

Es gibt viele Forschungen und Publikationen, die sich mit der Dox- vermittelten Kardiotoxizität beschäftigen und es konnte gezeigt werden, dass unter anderem oxidativer Stress und p53- regulierte Apoptose involviert sind (Chatterjee et al. 2010, Renu et al. 2018). Als Ergebnis der jahrelangen intensiven Forschung wurde Dexrazoxane entwickelt und hat sich als Medikament der Wahl zur Abmilderung der kardiotoxischen Nebenwirkungen von Dox etabliert. Es wird jedoch nur in bestimmten Fällen eingesetzt (Lipshultz et al. 2004, Barbar et al. 2019). Die zugrunde liegenden Mechanismen von Dox- vermittelter Kardiomyopathie sind trotz langjähriger Forschung noch immer nicht vollständig geklärt. Auch sind dessen Auswirkungen und Einfluss auf die Fibrose weiterhin Gegenstand der Forschung (Levick et al. 2019, Pei et al. 2014, El-Agamy et al. 2019). Dennoch wird Dox seit über 30 Jahren eingesetzt und gehört damit zu den konstantesten und wirksamsten Chemotherapeutika weltweit (Tacar et al. 2013).

3.6 Ceramide

3.6.1 Struktur und Synthese

Eine Möglichkeit wie Dox die Kardiotoxizität vermittelt, könnte mit Ceramiden in Zusammenhang stehen. Ceramide sind spezielle, wachsartige Fette, die aus einem Sphingosinrückgrat und an einer daran gehefteten Fettsäure bestehen. Sphingosin ist ein aus 18 Kohlenstoffatomen bestehender ungesättigter Aminoalkohol, welcher eine Amino- und zwei Hydroxylgruppen beinhaltet (Pubchem Sphingosine). Am zweiten C-Atom ist eine Fettsäure adhäriert, welche über eine Amidgruppe an Sphingosin gebunden ist. (Abb. 2).

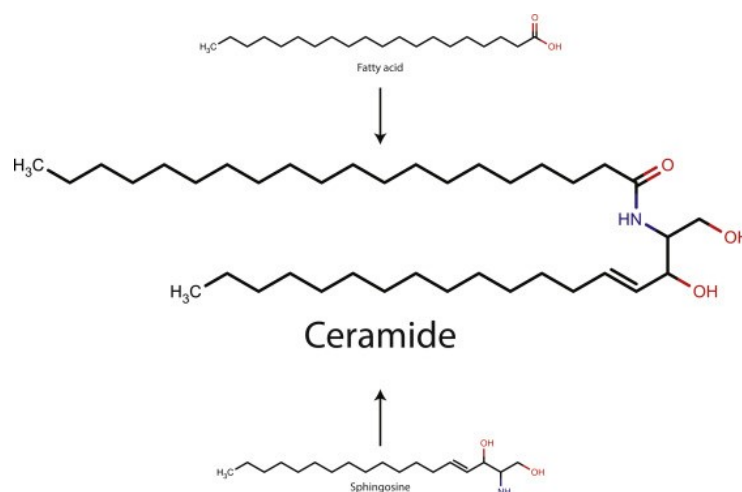


Abb. 2: Schematische Ceramidstruktur (Meckfessel und Brandt 2014)

Ceramide sind primär Intermediate und vor allem in der Biomembran eukaryotischer Zellen lokalisiert. Aufgrund des Sphingosins sind Ceramide ein wesentlicher Bestandteil der Lipiddoppelschicht (Meckfessel und Brandt 2014). Ceramide werden über 3 verschiedene Synthesewege synthetisiert.

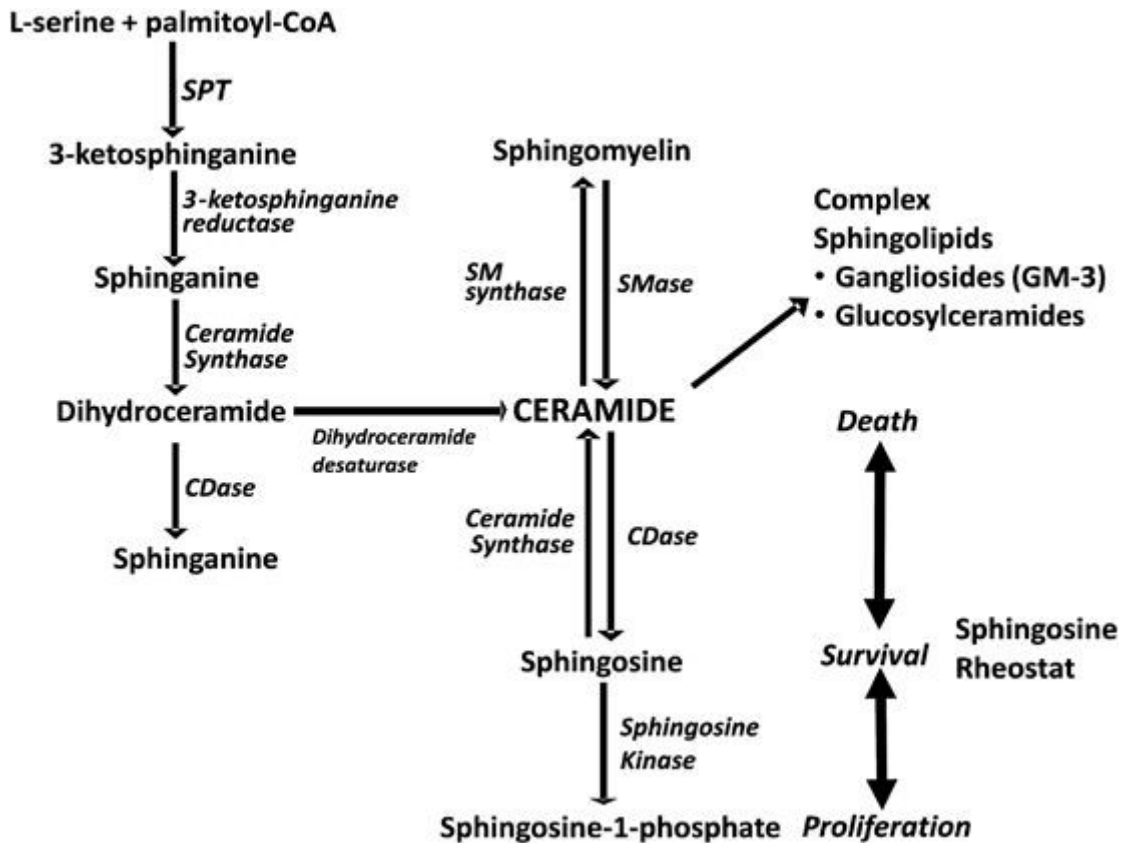


Abb 3: Ceramidsynthesewege (Brozinick et al. 2013)

Der *de novo* Signalweg beginnt mit der Kondensation von Palmitoyl- CoA und Serine zu 3-Ketosphinganine. Dieser Schritt wird von Serine-Palmitoyl-transferase (SPT) katalysiert, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym des gesamten Syntheseweges. Durch die Involvierung weiterer Enzyme und der Entstehung vieler Zwischenprodukte, welche wieder in andere Signalwege integriert werden können, entstehen am Ende Ceramide. Die Kettenlänge der Ceramide ist dabei abhängig von der angehefteten Fettsäure (Merrill 2002).

Der *salvage* Signalweg ist charakterisiert durch den konstanten Abbau von Sphingolipiden, Glucosylceramide und Sphingomyelin zu Ceramiden und Sphingosin. Diese Abbauprozesse geschehen in pH niedrigen Zellorganellen, wie z.B. Endosomen und Lysosomen. In diesen Prozess sind ebenfalls eine Vielzahl verschiedener Enzyme beteiligt, unter anderem Sphingomyelinase und verschiedene Ceramidasen (Kitatani et al. 2008).

Der letzte Syntheseweg von Ceramiden basiert auf der Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramiden. Sphingomyelin ist ebenfalls ein Sphingolipid, welches vor allem in der Myelinscheide einiger Neuronen vorzufinden ist (Barenholz und Thompson 1999). Wie bei den meisten Sphingolipiden ist auch Sphingomyelin in der Zellmembran integriert und in verschiedene Signalwege involviert (Andrieu-Abadie und Levade 2002, Tepper et al. 2000) und eine pathologische Akkumulation ist mit vor allem neurologischen Erkrankungen assoziiert (Wanikawa et al. 2019).

3.6.2 Ceramidsynthasen

Es gibt verschiedene Signalwege und Ausgangssubstrate um Ceramide zu synthetisieren. Prinzipiell funktioniert dies entweder katabolisch, durch den Abbau von Sphingolipiden zu Sphingosin und Ceramide oder anabolisch, durch die Anlagerung einer beliebig langkettigen Fettsäure an Sphingosin.

Eine der wesentlichsten Enzymgruppen verantwortlich für die Adhärerung der Fettsäure an Sphingosin, egal welchen Ursprungs, sind Ceramidsynthasen (CerS) (Levy und Futerman 2010). Diese Klasse von Enzymen umfasst 6 Isoformen und das humane Gen wurde 1991 erstmalig nachgewiesen und noch als UOG-1 bezeichnet (Lee 1991). Es dauerte bis 2002 um UOG-1 als erste Ceramidsynthase (CerS1) zu definieren und klassifizieren. Dies geschah aufgrund der spezifischen Überexpression von UOG-1, welche in der singulären Erhöhung von C18 Ceramiden, Sphingosin mit einer 18-kettigen Fettsäure (=Stearinsäure), resultierte (Venkataraman et al. 2002). Strukturell weist CerS1 eine charakteristische C- terminale Domäne, die TLC- Domäne, auf. Diese wurde nach den 3 Proteinfamilien benannt (Tram, Lag, CLN8), in der sie erstmalig identifiziert wurde. Die detailliertere Erforschung dieser charakteristischen Domäne ermöglichte die Identifizierung weiterer Isoformen. So konnten beispielsweise die Tram- Homologe trh1 und trh4 ebenfalls als eigenständige ceramidproduzierende Enzyme definiert und als CerS4 (trh1) und CerS5 (trh4) klassifiziert werden (Riebeling et al. 2003). 2005 und 2006 erfolgte die Entdeckung und Beschreibung der Isoformen CerS3 (Mizutani et al. 2006) und CerS6 (Weinmann et al. 2005). Die Entdeckung und Charakterisierung von CerS2 im Jahr 2008 vervollständigte die CerS- Proteinfamilie (Laviad et al. 2008). Je nach Isoform sind Ceramidsynthasen auf unterschiedlichen Chromsomen lokalisiert. (Tabelle1)

Tabelle 1: Chromosomale Lokalisation humaner Ceramidsynthasen (Mullen et al. 2012)

CerS name	Other names	Chromosome location	Number of transcripts	Notes
CerS1	Lass1/UOG1	19p12	2	Transcript variant 1 includes GDF1 and a longer CerS1; transcript variant 1 has a shorter and distinct C-terminus
CerS2	Lass2/TRH3	1q21.3	2	Transcript variants encode the same protein, but variant 2 has an alternative splice site in the 5'-UTR
CerS3	Lass3/T3I	15q26.3	1	–
CerS4	Lass4/TRH1	19p13.2	1	–
CerS5	Lass5/TRH4	12q13.12	1	–
CerS6	Lass6/T1I	2q24.3	1	–

Neben der TLC- Domäne weisen alle CerS auch 5-6 Transmembrandomänen auf, wobei CerS6 die einzige mit 5 Transmembrandomänen ist (Mizutani et al. 2005). Basierend auf dem Algorithmus von Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), sind die anderen CerS durch 6 Transmembrandomänen charakterisiert, welche noch experimentell bestätigt werden müssen. Ebenfalls teilen alle Ceramidsynthasen eine Glykosylierungsstelle am N-Terminus und einen cytosolischen C-Terminus. Lokalisiert sind sie größtenteils in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und vereinzelt in der Mitochondrienmembran (Kageyama-Yahara und Riezman 2006, Mullen et al. 2012, Siskind 2005).

Mehrere funktionelle Domänen konnten im Laufe der Zeit identifiziert und beschrieben werden. Die am besten untersuchte und anscheinend am wichtigsten für die Funktionalität von CerS ist Lag1p und dessen Homologe. Lag1p ist ein Teil der TLC- Domäne im C-Terminus. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der konservierten Region von Lag1p zu einem Aktivitätsverlust in CerS1 und CerS5 führen (Spasieva et al. 2006).

Eine weitere Domäne, die wichtig für die Aktivität und Funktionalität der Ceramidsynthasen zu sein scheint, ist die HOX- Domäne. Die genaue Funktion der HOX- Domäne ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion von 12 bestimmten Aminosäuren, welche HOX flankieren aber selbst nicht innerhalb der HOX- Domäne liegen, zum kompletten Funktionsverlust von CerS5 und CerS6 führt (Mesika et al. 2007). Basierend auf den vorherigen Forschungsergebnissen, ergibt sich nachfolgend folgende schematische Struktur einer Ceramidsynthase.

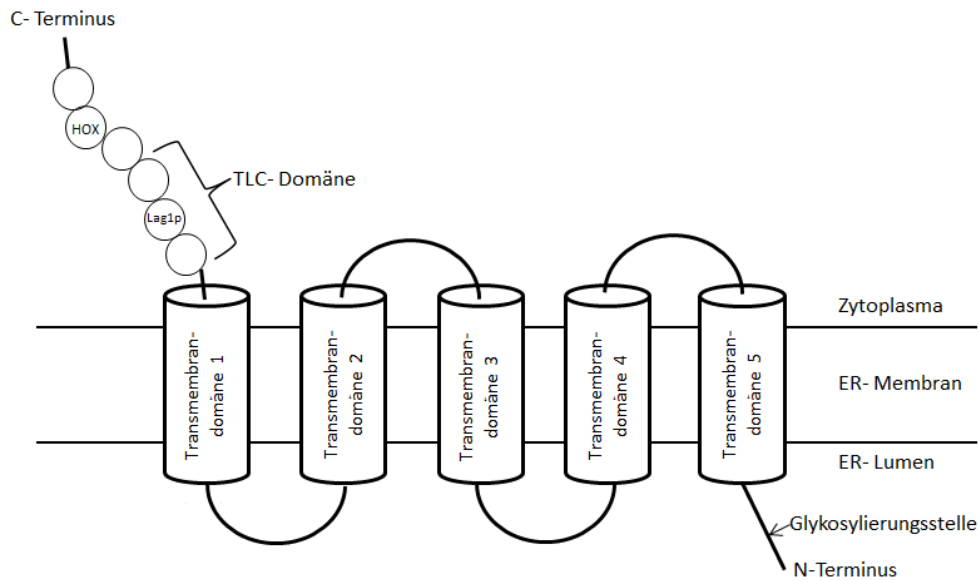


Abb 4: Schematische und repräsentative Darstellung einer Ceramidsynthasestruktur (Kretzschmar et al. 2021)

C-Terminus= bei allen CerS, HOX- Domäne= in CerS5 und CerS6 nachgewiesen, TLC-Domäne/Lag1p= identifizierbar in allen CerS, Transmembrandomänen 1-5 = charakteristisch für CerS6, Glykosylierungsstelle= charakteristisch für alle CerS, N- Terminus= für alle CerS nachweisbar

Die primäre Funktion der Ceramidsynthasen besteht in der Anlagerung bestimmter Acyl-CoAs an Sphingosin über N-Acetylierung. Dementsprechend hat jede einzelne Ceramidsynthase annähernd die gleiche Bindungsaffinität zu seinem Substrat (K_m - Wert) (Lahiri et al. 2007). Als Folge dessen, erkennen alle Ceramidsynthasen auch die gleiche Bindungsstelle in Sphingosin. Bezüglich der Länge der angehefteten Acyl-CoA bevorzugt jede CerS andere Fettsäuren. Der Grund dieser Präferenzen ist noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Forschungen (Wattenberg 2018). Eine Auflistung präferierter Acyl-CoAs ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die Regulierung der Ceramidsynthaseexpression passiert sowohl auf mRNA- Ebene, als auch posttranskriptional. Expressionsänderungen auf mRNA- Ebene geschehen vor allem durch die Induktion von Stress. Viele Stressfaktoren wie $TNF\alpha$, ROS oder verschiedene Inhibitoren führen zur Erhöhung der jeweiligen CerS in dem entsprechenden Gewebe (Jin et al. 2008, Jin et al. 2009)

Tabelle 2: Ceramidsynthasen und ihre bevorzugten Acyl-CoAs komprimiert von (Mullen et al. 2012)

Ceramidsynthase	Bevorzugte Acyl-CoA <i>in vitro</i>
CerS1	C _{18:0} C _{20:0}
CerS2	C _{20:0} C _{22:0} C _{24:0} C _{26:0}
CerS3	C _{16:0} C _{18:0} C _{22:0} C _{24:0}
CerS4	C _{18:0} C _{20:0} C _{22:0} C _{24:0} C _{26:0}
CerS5	C _{14:0} C _{16:0} C _{18:0} C _{18:1}
CerS6	C _{14:0} C _{16:0} C _{18:0}

CerS= Ceramidsynthase. C_{18:0} = Kohlenstoffkette mit 18 C- Atomen ohne Doppelbindung. C_{18:1} = Kohlenstoffkette mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung.

3.6.3 Expression und Regulation verschiedener CerS

Die vollständige Regulation auf posttranslationaler Ebene ist noch weitestgehend ungeklärt. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass CerS1 durch PKC- vermittelte Phosphorylierung reguliert werden kann (Sridevi et al. 2009). Daraufhin wurden die anderen Ceramidsynthasen auf Phosphorylierungsstellen untersucht und es konnten ebenfalls welche für CerS2-6 nachgewiesen werden. Dabei wurde eine gemeinsame Aminosäuresequenz am C-Terminus identifiziert, die von Casein kinase 2 erkannt und phosphoryliert wird (Sassa et al. 2016). Die Identifizierung weiterer posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung etc. ist noch nicht vollständig abgeschlossen. Jedoch rücken beispielsweise Sirtuine immer mehr in diesen Fokus (Novgorodov et al. 2016).

Die Expression der verschiedenen Ceramidsynthasen ist abhängig von dem entsprechenden Gewebe bzw. der Zelle. So zeigt CerS1 die höchste Expression im Gehirn, wurde aber auch in der Haut und in den Testikeln identifiziert. Die hohe Expression im Gehirn und die Affinität für C₁₈- Ceramide impliziert, dass CerS1 vor allem für die Synthese der Biomembran von Neuronen verantwortlich ist, welche größtenteils aus C₁₈- Sphingolipiden besteht. Ein

Funktionsverlust von CerS1 geht einher mit der Apoptose von Neuronen und Schrumpfung des Hirngewebes (Ginkel et al. 2012). CerS3 ist vor allem in Keratinozyten und in den Testikeln exprimiert. Funktionell ist CerS3 wichtig für die Spermatogenese und die Permeabilität der Haut (Mizutani et al. 2006, Mizutani et al. 2008). Die Expression von CerS4 konnte in vielen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden. CerS4 wurde in der Haut, Leber, Herzen und vor allem Muskelzellen detektiert. Die Funktion von CerS4 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnten erhöhte mRNA Level in Brustkrebs nachgewiesen werden (Schiffmann et al. 2009). CerS5 ist vor allem im Lungengewebe exprimiert und für die Synthese der pro- apoptotischen C₁₆- Ceramide verantwortlich. Aufgrund dieser Funktion, ist eine Erhöhung der Aktivität für die Behandlung von Lungenkarzinomen interessant (Levy und Futerman 2010). CerS6 zeigt eine hohe Homologie mit CerS5, da es die gleichen Ceramide synthetisiert. Es ist jedoch weitaus weniger über dessen Funktionalität bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass CerS6 von p53 reguliert wird, indem es an den CerS6- Promotor bindet. Dadurch wird die Transkription von CerS6 gesteigert, was die Apoptose begünstigt (Fekry et al. 2016).

3.7 Ceramidsynthase 2 (CerS2)

Im Fokus dieser Arbeit steht CerS2. Zusammen mit CerS4 ist sie verantwortlich für die Synthese von sehr langkettigen Ceramiden mit einer Acyl-CoA- Länge von mehr als 20 C- Atomen, welche als proinflammatorisch gelten. CerS2 zeigt eine weite Verbreitung in nahezu allen Geweben, jedoch mit den höchsten Konzentrationen in Leber und Niere. Eine weitere Besonderheit ist die Regulation durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P), einem Lipidmediator für Proliferation und Überleben der Zellen (Sattler und Levkau 2009, Kurano und Yatomi 2018). In der Sequenz von CerS2 befinden sich 2 Bindungsstellen für S1P, welche die Ceramidsynthase vollständig inhibieren (Lahiri et al. 2009). Demnach ist es möglich, dass das Überleben der Zelle von dem Verhältnis aus S1P und CerS2 beeinflusst wird (Huwiler und Pfeilschifter 2006, Takabe et al. 2008, Van Brocklyn und Williams 2012). Durch die weitreichende Gewebeverteilung von CerS2 ergeben sich auch viele mögliche Assoziationen mit verschiedenen Krankheiten, wie beispielsweise Brustkrebs. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass langkettige Ceramide, welche vor allem von CerS2 synthetisiert werden, zur Kardiotoxizität und damit zum Herzversagen führen (Law et al. 2018).

3.8 Mitochondrien vermittelte Apoptose

Die Akkumulation von Ceramiden begünstigt die Mitochondrien- vermittelten Apoptose (Siskind 2005). Bei dieser Form der Apoptose, welcher auch als intrinsischer Weg bezeichnet wird, kommt es durch eine Schädigung der Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom C. Dieses ca 17 kDa große Protein ist ein wichtiger Bestandteil der Atmungskette und als solches unerlässlich für die ATP- Synthese (Picard et al. 2013). Das unter anderem freigesetzte Cytochrom C bewirkt eine Spaltung und somit Aktivierung der Initiatorcaspase 9. Dadurch werden die Effektorcaspasen 3, -6 und -7, ebenfalls durch Spaltung, aktiviert. Diese Effektorcaspasen bauen nachfolgend die Zelle ab und führen zu den charakteristischen Merkmalen der Apoptose, wie u.a. Zellschrumpfung und Zellkernfragmentierung.

Ob Ceramide direkt oder indirekt an der Schädigung der Mitochondrien beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Ebenfalls ist die Rolle der jeweiligen CerS an sich ebenfalls noch Gegenstand der Forschung. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Akkumulation zytotoxischer Lipide, zu denen auch Ceramide gehören, zu einem erhöhten Calciumflux aus dem ER in die Mitochondrien führt (Vande Velde et al. 2000, Egnatchik et al. 2014). Der erhöhte Calciumlevel in den Mitochondrien führt zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Struktur und Funktion bis hin zur Apoptose.

3.9 Mitochondrialer Metabolismus

Die primäre Funktion der Mitochondrien ist die Produktion von ATP. Dies geschieht durch die Atmungskette, auch Elektronentransportkette genannt, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Die Atmungskette besteht aus 5 individuellen Komplexen und synthetisiert in ihrer Gesamtheit ATP aus NADH. Dieses stammt aus dem Zitronensäurezyklus, der Fettsäureoxidation oder der Glutamatoxidation.

Die Atmungskette ist eine Folge von Redoxreaktionen bei denen Elektronen entlang der Mitochondrienmembran transportiert werden, um letztendlich Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren. Die dabei freiwerdenden Protonen werden von der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt um ADP zu phosphorylieren und dadurch ATP herzustellen (Lemarie und Grimm 2011).

Bezüglich der Kardiomyozyten stellt die Fettsäureoxidation den primären und wichtigsten Lieferanten für die ATP- Synthese dar. Bei der Fettsäure β - oxidation werden zirkulierende Fettsäuren über Fettsäuretransporter, z.B. CD36, in die Zellen transferriert (Nickerson et al.

2009). Nachfolgend werden die Fettsäuren zu Acyl- CoA konvertiert und an Carnitine gebunden. Das so entstandene Acylcarnitine wird in die innere Mitochondrienmatrix transportiert, wo Acyl- CoA abgespalten und das freie Carnitine wieder ins Zytosol transportiert wird (Gomez et al. 2012). Das freie Acyl- CoA wird unter kontinuierlicher Thiolyse in Acetyl- CoA gespalten (Kiema et al. 2014). Bei jedem Thiolysezyklus werden 5 ATP generiert und dieser Prozess wird als Fettsäure β - Oxidation bezeichnet. Das Acetyl- CoA dient als Substrat für den Krebszyklus und somit zur weiteren ATP Produktion. Die Fettsäure β - oxidation ist somit die effizienteste und ergiebigste Art der ATP Synthese.

Der mitochondriale Metabolismus ist sehr empfindlich und reagiert mit als erstes auf verschiedenste pathogene Stimuli. Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase ist somit ein wesentlicher Indikator für die Vitalität der Zellen und maßgeblich für die Überlebensfähigkeit der Zellen verantwortlich.

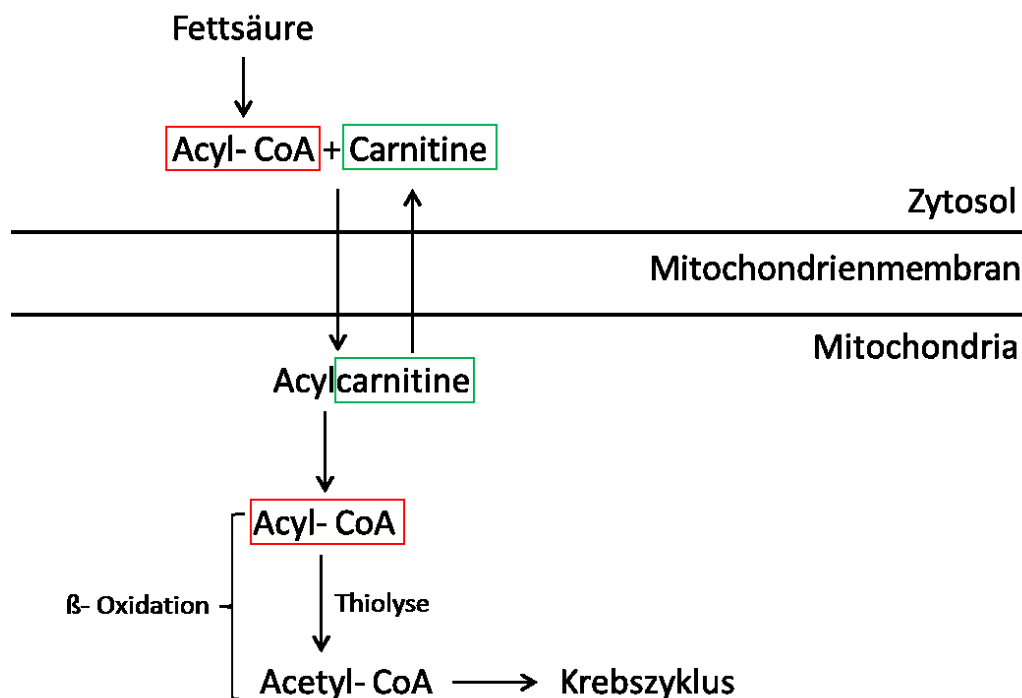


Abb 5: Schematische und simplifizierte Darstellung der Fettsäure β - Oxidation.

Durch die Akkumulation von Ceramiden, welche zu einer Lipotoxizität führt und der damit zusammenhängenden Mitochondrien- vermittelten Apoptose, ist die Regulation von Ceramidlevel ein vielversprechender Therapieansatz für die Behandlung verschiedenster Krankheiten (Law et al. 2018). Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob Ceramide allein in der Lage sind diesen Prozess zu initiieren oder ob eine zu Grunde liegende Krankheit notwendig ist.

Eine Erhöhung von Ceramiden und die damit einhergehende Apoptose sind positiv für die Behandlung verschiedener Karzinome, wie Brust- oder Lungenkrebs. Im Gegensatz dazu, ist die Erniedrigung von Ceramiden vorteilhaft gegen Entzündungen oder anderen pathogenen Stimuli, wie bei der Kardiotoxizität. Ein weiterer noch nicht vollständig geklärter Faktor ist der Einfluss von Ceramiden auf die kardiale Fibrose.

4 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte von Doxorubicin auf die Ceramidlevel und den damit im Zusammenhang stehenden Effekten auf Mitochondrien und Apoptose in murinen Kardiomyozyten und humanen Fibroblasten zu untersuchen.

Weiterhin soll durch die spezifische Überexpression von Ceramidsynthase 2 in humanen Fibroblasten untersucht werden, ob die Effekte von Doxorubicin im direkten Zusammenhang mit spezifisch erhöhten Ceramiden stehen. Dabei wurde der Fokus auf Mitochondrienfunktion, -metabolismus und die Auswirkungen auf Zelltod und Fibrose gelegt. Durch diese mögliche Korrelation und Kausalität zwischen der Doxorubicin- vermittelten Kardiotoxizität und der spezifischen CerS2- Überexpression, könnten sich potenziell neue Medikamente und Behandlungsmethoden für Doxorubicin behandelte Patienten ergeben. Dadurch sollen auch neue Erkenntnisse über die Rolle von Ceramiden bei der Entstehung und Progression von Kardiomyopathien gewonnen werden.

5 Methodik

5.1 Methoden

5.1.1 p3xFLAG-CMV-7 Überexpressionsplasmid

Für die spezifische Überexpression von CerS2 wurde das p3xFLAG-CMV-7 verwendet und von Genewiz akquiriert. Dabei handelt es sich um ein aus 4,7 kbp bestehendes Plasmid inklusive Ampicillinresistenzgen und CMV Promotor. Dem Promotor nachgeschaltet befindet sich die Kodierung für das Reporterprotein FLAG in dreifacher Ausführung. Auf Proteinebene besteht FLAG aus der Aminosäuresequenz: DYKDDDDK (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys). FLAG ist mit dem zu überexprimierenden Protein (CerS2) fusioniert und fungiert als Marker und Nachweis für eine erfolgreiche Überexpression. Nach dem FLAG-TAG folgt die *Multiple Cloning Site* mit den darin integrierten Sequenzen für die verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Das Plasmid wurde zwischen Sal I und SmaI geschnitten, wodurch ein *sticky*- und ein *blunt*-end entstand. Zwischen diese beiden Enden wurde das passend zugeschnittene *CERS2* (NCBI: 29956) (Tabelle 5) integriert (FLAG-CerS2). Als Transfektionskontrolle (FLAG-TK) wurde der leere Vektor ohne Insert verwendet.

5.1.2 Bakterientransformation

FLAG-TK und FLAG-CerS2 wurden zur Amplifikation in kompetenten *E. coli* transformiert. Dazu wurden 50 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 µL der jeweiligen Plasmid- DNA gemischt. Das Gemisch wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Durch den nachfolgenden Hitzeschock bei 42 °C für 30 sek. wurde die Bakterienmembran kurzzeitig porös, wodurch die Plasmid-DNA in die Bakterien diffundieren konnte. Anschließend wurden die Bakterien zurück aufs Eis gestellt und für weitere 5 min inkubiert. Verursacht durch diesen Kälteschock, wurde die Bakterienmembran wieder verschlossen. Im Anschluss wurden 250 µL SOC- Medium zu den Bakterien gegeben und 1h bei 225 rpm und 37° C horizontal geschüttelt. Während dieser Inkubationszeit wurde die Ampicillinresistenz ausgebildet. Letztendlich wurden 50 µl, 75 µl und 125 µl der Bakteriensuspension auf jeweils einem ampicillinhaltigen Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 1 Kolonie für die Minipräp bzw. Maxipräp selektiert und in ampicillinhaltigen Flüssigagar für weitere 24h kultiviert.

5.1.3 Minipröp/Maxipröp

Für die Präparation der Plasmid- DNA wurde jeweils 1 Kolonie von FLAG-TK und FLAG-CerS2 in Ampicillin (1:100)- haltigem Flüssigmedium über Nacht bei 37° C und unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach 24h wurde aus der proliferierten Bakteriensuspension die Plasmid- DNA isoliert.

Die Minipröp wurde von GE Healthcare kommerziell erworben und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Maxipröp wurde von Qiagen akquiriert und ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA- Konzentration der verschiedenen Plasmid- Präparate wurde mittels Nanodrop gemessen. Die isolierte Plasmid- DNA wurde bei -20° C gelagert

5.1.4 Plasmidverdau und Agarosegelelektrophorese

Die isolierte Plasmid- DNA wurde mittels Plasmidverdau auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts getestet. Dazu wurde 1 µg der Plasmid- DNA mit 15 µl RNase freiem Wasser, 2 µl 10x TANGO- Puffer und jeweils 1 µl von SmaI und SalI gemischt und für 1h bei 30° C in einem Thermoblock inkubiert. In dieser Zeit wurde das Plasmid an der jeweiligen Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen geschnitten und das CerS2- Insert freigesetzt. Im Anschluss wurde der Verdau auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 25 min aufgetrennt. CerS2 hat eine Größe von 1155 Basenpaaren (bp) während die Transfektionskontrolle eine Bandengröße von 4,7 kbp aufweist.

5.1.5 Transfektion mittels Lipofectamine 3000

Die Transfektion der Fibroblasten bzw. Kardiomyozyten mit Lipofectamine 3000 basiert auf dem Prinzip der Lipofektion. Dabei wird Fremd- DNA mittels Liposomen in die Zelle transfiziert. Ein zumeist positiv geladenes Lipid aggregiert mit der negativ geladenen DNA zu einem Liposom. Dieses fusioniert mit der Zellmembran und inseriert dabei die DNA in die Zelle. Die Plasmid- DNA wird dabei nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern nur transient transfiziert. Aufgrund des im Plasmid enthaltenen CMV- Promotors wird *CERS2* vermehrt translatiert, was zu einer Überexpression des Proteins führt.

Für die Transfektion wurde eine Konzentration von 1 µg Plasmid- DNA/ µl Lipofektamin über einen Zeitraum von 24h in OptiMEM eingesetzt. Die Zellzahl wurde entsprechend dem jeweiligen Experiment angepasst.

5.1.6 Zellkultur

5.1.6.1 Fibroblasten (hFSF)

Humane Vorhaut- Fibroblasten wurden von ATCC (SCRC-1041TM) erworben und verwendet. Die Zellen wurden im adäquaten Wachstumsmedium kultiviert (3.2 Materialien). Zum ablösen und passagieren der Zellen wurde 0,25 % Trypsin- EDTA verwendet. Dabei wurden 1,4 ml bei einer kleinen Flasche (T25) oder 3 ml bei einer großen Flasche (T75) auf die Zellen gegeben und für 3 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Durch die nachfolgende Applizierung minimalen physikalischen Stresses auf die Flasche, wurden die Zellen abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin mit dem doppelten des eingesetzten Volumens an Wachstumsmediums inaktiviert und in ein 15ml Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 1000x g für 5 min zentrifugiert und nachfolgend in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mit Trypanblau und dem Countess II FL (Life Technologies) gezählt und auf die entsprechend benötigte Zellzahl eingestellt.

5.1.6.2 Kardiomyozyten

Murine Kardiomyozyten (HL-1) wurden von Merck (SCC065) gekauft. Die Zellen wurden in speziell benötigtem Wachstumsmedium kultiviert (3.2 Materialien). Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05% Trypsin- EDTA eingesetzt. Die Zellen wurden einmal kurz mit 0,05 % Trypsin- EDTA gespült und anschließend mit 1,4 ml 0,05 % Trypsin- EDTA für 2 min bei 37 °C und 5% CO₂ für 2 min inkubiert. Das Trypsin- EDTA wurde entfernt und durch die gleiche Menge Trypsin- EDTA ersetzt. Die Kardiomyozyten wurden erneut bei 37° C und 5% CO₂ für 3 min inkubiert und anschließend durch leichtes Klopfen gegen die Flasche vom Flaschenboden abgelöst. Dem folgend wurde das 0,05% Trypsin- EDTA mit dem gleichen Volumen an Soybean Trypsin Inhibitor inaktiviert. Danach wurden 3 ml Waschmedium dazugegeben und die Suspension wurde bei 500x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und dem Countess II FL gezählt und auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

5.1.7 RNA- Isolation, cDNA- Synthese, qPCR

5.1.7.1 RNA- Isolation

Der NucleoSpin RNA Kit zur RNA- Isolation wurde von Machery Nagel kommerziell erworben und verwendet. Die Zellen aus einer Probe wurden in 350 µL RA1- Puffer und 3,5 µl β- Mercaptoethanol lysiert und anschließend auf die mitgelieferte violette Säule überführt und bei 11000x g für 1 min. zentrifugiert. Das daraus gewonnene Filtrat wurde mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und durch mehrmaliges vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt, bis die vorher sichtbaren Schlieren verschwanden. Das Gemisch wurde auf die im Kit enthaltene blaue Säule gegeben und bei 11000x g für 30 sek. zentrifugiert. Das Filtrat wurde entsorgt und die im Filter der blauen Säule lokalisierte RNA und DNA wurde mit 350 µl MDB für 1 min bei 11000x g zentrifugiert und gewaschen. Auf besagten Filter wurden 95 µl der frisch angesetzten DNase (10 rDNase + 90 µl *reaction buffer*) gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl RAW2 Puffer auf die Säule gegeben und bei 11000x g für 30 sek zentrifugiert. Nachfolgend wurden 600 µl RA3 Puffer auf die Säule pipettiert und erneut bei 11000x g für 30 sek. gewaschen. Danach wurden 250 µl RA3 Puffer auf die Säule gegeben und final für 2 min bei 11000x g zentrifugiert und gewaschen. Letztendlich wurde die RNA mit 20 µl RNase freiem Wasser bei 11000x g für 1 min zentrifugiert und dadurch aus dem Filter isoliert. Die RNA- Konzentration wurde mit Nanodrop gemessen und die Proben wurden bei -80°C gelagert.

5.1.7.2 cDNA- Synthese

Die cDNA- Synthese wurde mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* absolviert. 0,5 µg der zuvor gemessenen RNA wurden mit 1 µl Oligo (dT)₁₈- Primer und der entsprechenden Menge Nuclease- freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl eingestellt. Der Ansatz wurde 5 min bei 65° C inkubiert, um GC-haltige oder andere Sekundärstrukturen aufzuspalten. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und der Master Mix bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP und 1 µl RevertAid M-MuLV RT dazu pipettiert. Dieser komplette Ansatz wurde bei 42 ° C für 60 min inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte die eigentliche cDNA- Synthese. Im letzten Schritt wurde die Reaktion bei 70° C für 5 min inaktiviert.

5.1.7.3 qPCR

Die qPCR ermöglicht einen quantitativen Nachweis der Genexpression auf mRNA- Ebene. Dazu wurde die zuvor synthetisierte cDNA amplifiziert und die spezifische Genexpression mittels Fluoreszenz nachgewiesen und quantifiziert. Dazu wurde 1 µl cDNA mit einem Master Mix bestehend aus 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer, 3 µl Nuclease- freiem Wasser und 5 µl 2x SYBR Green gemischt. Die qPCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt.

1. 95° C, 10 min Denaturierung möglicher doppelsträngiger DNA
2. 95° C, 10 sek Primer Annealing
3. 60° C, 30 sek Amplifikation
 Wiederholung von Schritt 2 und 3 für insgesamt 40 Zyklen
4. 100° C, 30 sek Inaktivierung der Polymerase

Mit jedem Zyklus wird die cDNA verdoppelt, wodurch immer mehr Fluoreszenz- gekoppelte Nukleotidtriphosphate in die doppelsträngige DNA eingebaut werden. Dadurch steigt das detektierbare Fluoreszenzsignal, bis es einen vorher definierten Grenzwert überschreitet. Das Überschreiten des besagten Grenzwertes ist durch den spezifischen PCR- Zyklus detektierbar und abhängig von der entsprechenden Expression des Gens in der ursprünglichen mRNA. Anhand der jeweiligen Zyklen und der Berechnung von ddcT kann das Expressionsverhalten der Gene berechnet werden.

5.1.8 Proteinisolation, SDS- PAGE, Western Blot

5.1.8.1 Proteinisolation

Vorher trypsinierte und pelletierte Zellen wurden mit 80 µl RIPA- Lysispuffer lysiert. Vor der Nutzung wurde dem Lysisbuffer 1:500 verdünnter Protease Inhibitor Cocktail und 1:50 Phosphatase Inhibitor Cocktail zugegeben. Anschließend wurden die Zellen Scherstress ausgesetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde danach bei 15000 rpm für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Die im Überstand lokalisierten Proteine wurden vom pelletierten Zelldebris entfernt und in ein neues 1,5ml Gefäß überführt. Die Proben wurden bei -80° C gelagert.

5.1.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge wurde mit dem Bradfordassay durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, basierend auf einem Absorptionsshift von Coomassie Blau von kationisch (rötlich- braun, 470 nm) nach anionisch (blau, 595 nm). Durch die Bindung des Farbstoffes an die Carboxylgruppe der Aminosäure durch van der Waal Kräfte entsteht ein stabiler nicht kovalenter Komplex, welcher durch eine blaue Farbe charakterisiert ist. Dabei ist die Intensität und Stabilität dieses Farbkomplexes direkt proportional zu der Menge an vorhandenen Aminosäuren bzw. Proteinen. Die Intensität wird photometrisch gemessen und anhand einer mitgeführten Eichkurve wird die Proteinkonzentration berechnet.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde BSA in absteigender Konzentration von 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml und 0 mg/ml verwendet. Die zu messenden Proteinproben wurden mit PBS 1:10 verdünnt und anschließend 1:10 mit Bradfordreagenz verdünnt. Die Extinktion des entstandenen blauen Farbstoffes wurde bei 595 nm am Clariostar gemessen. Die Konzentration der Proben wurde anhand des Anstieges des linearen Bereiches der Standardkurve berechnet.

5.1.8.3 Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine basierend auf deren Größe wurde die SDS-PAGE verwendet. Dabei wird die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine durch β - Mercaptoethanol denaturiert, sodass sie linear in Primär- und Sekundärstruktur vorliegen. Durch das zugegebene Sodiumdodecylsulfat werden die Proteine umschlossen und erhalten eine negative Ladung. Verursacht durch die gleichmäßig verteilte negative Ladung wandern die Proteine im Gel von der Kathode zur Anode. Durch das enge und dichte Maschennetzwerk des Gels wandern kleinere Proteine schneller durch das Gel als größere. Die Auftrennung der Proteine geschieht also nur aufgrund ihrer jeweiligen Größe und nicht aufgrund ihrer Ladung. Je nach zu detektierendem Protein und dessen Größe wurde eine Proteinmenge zwischen 30 μ g und 60 μ g eingesetzt und mit 5x Ladepuffer versetzt. Standardmäßig wurde ein 12% Polyacrylamidgel verwendet.

Tabelle 3: Gelrezeptur für SDS-PAGE

Komponente	Sammelgel	Trenngel
	12%	4%
40% Bisacrylamid	4,5 ml	3,00 ml
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8	3,75 ml	
0,5 M TRIS- HCl pH 6,8		3,75 ml
10% SDS	150 µl	150 µl
dd H ₂ O	6,45 ml	7,95 ml
10% APS	150 µl	150 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Das Gel wurde bei einer Spannung von 100 V für 120 min laufen gelassen. Anschließend wurde der Western Blot durchgeführt.

5.1.8.4 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots basiert auf dem Prinzip der Übertragung (*blotting*) von Proteinen von einem Gel auf eine Trägermembran, hier: Nitrocellulose. Die negative Ladung der Proteine ermöglicht, dass sie innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode auf die Nitrocellulosemembran wandern.

Verwendet wurde der Semidry- Blot. Dieser ermöglicht einen gleichmäßigen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran bei minimaler Verwendung von Transferpuffer. Der Blot wurde nach dem Sandwich- Prinzip aufgebaut. 3 Whatmanpaper wurden gleichmäßig mit Transferpuffer benetzt und auf der Anode platziert. Daran anschließend wurde die Nitrocellulosemembran ebenfalls in Transferpuffer getaucht und auf die Whatmanpaper gelegt. Mit dem Gel, welches die aufgetrennten Proteine beinhaltet, wurde identisch verfahren und anschließend auf die Trägermembran platziert. Um den Sandwichkomplex abzuschließen, wurden erneut 3 in Transferpuffer getauchte Whatmanpaper auf das Gel gelegt. Der entstandene Sandwichkomplex wurde unter der Verwendung von gleichmäßig appliziertem mittelstarkem Druck zusammengedrückt, um überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen zu entfernen. Überstehende Gelränder wurden entfernt. Verwendet wurde eine Membran mit

einer Fläche von ca 36 cm² (4,3 cm * 8,5 cm). Als Richtwert für die Einstellung der Stromstärke galten 2 mA/cm². Die Blot- Zeit betrug 1 Stunde.

Nach dem blotten wurde die Nitrocellulosemembran in Blockierungspuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter kontinuierlich horizontaler Rotationsbewegung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer 1:500 – 1:1000 verdünnten primären Antikörperlösung, ebenfalls in 5% BSA bzw. 5% *non-fat dried milk*, über Nacht bei 4° C auf einem Rotationsshaker inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal für 15 min in Waschpuffer gewaschen. Nach Beendigung des dritten Waschschrilles wurde die Membran in HRP- gekoppelten sekundären Antikörper für 1 Std. bei Raumtemperatur und Rotationsshaker inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist dabei gegen das F_c- Fragment des primären Antikörpers gerichtet. Nach 3 erneuten Waschschrillen zu je 5 min, wurde 1:2 verdünnte HRP Substratlösung auf die Membran gegeben. Die Lösung besteht aus dem Substrat für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich- Peroxidase. Zusätzlich enthält sie Luminolenhancer zur Verstärkung des Lichtsignals. Nach einer finalen 5-minütigen Inkubation wurde die Intensität der entstandenen Chemiluminescence am LAS 4000 gemessen. Die Quantifizierung der visualisierten Banden wurde mit MultiGauge durchgeführt.

5.1.9 Massenspektrometrie

Die Ceramidkonzentrationen wurden mit Massenspektrometrie analysiert und quantifiziert. 1 Million Zellen wurden nach ihrer jeweiligen Behandlung isoliert und in 1 ml PBS resuspendiert und gewaschen. Die Zellen wurden lysiert in 300 µl HCl, 1 ml CH₃OH und 2 ml CHCl₃ und anschließend gevortext und für 3 min bei 300x g zentrifugiert. Die in der Chloroformphase befindlichen Ceramide wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml CHCl₃ gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 10x Geschwindigkeit geschüttelt und anschließend 3 min bei 3000x g zentrifugiert. Erneut wurde die Chloroformphase mit den Ceramiden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einer Vakuumzentrifuge bei 13000x g für 45 min zentrifugiert. Die am Boden des Gefäßes befindlichen Ceramide wurden anschließend mit einem Chloroform: Methanol- Gemisch (1:4) resuspendiert und mit dem HPLC/MS gemessen. Die Ceramide in der Probe wurden mit *High Performance Liquid Chromatography* aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgetrennt. Dabei wurde die Probe mit einem Laufmittel (mobile Phase) durch die stationäre Phase geführt. Aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären Phase, dem

Siedepunkt der Substanz und den Diffusionseigenschaften der Substanz kommt es zur Retention der einzelnen Moleküle. Dadurch benötigen die unterschiedlichen Moleküle unterschiedliche Zeiten brauchen, um die stationäre Phase zu durchqueren.

Angeschlossen an die HPLC folgte die erste Phase der Massenspektrometrie, die Elektrospray- Ionisation (ESI). Die zu untersuchenden Analyte wurden dabei durch eine Kapillare geführt, deren Spitze unter Spannung stand. Das sich daraus ergebende elektrische Feld durchdringte die Lösung und ionisierte die darin befindlichen und zu analysierenden Moleküle. Da die Ionen alle die gleiche Ladung haben, kommt es innerhalb der Probe zu Abstoßungen und mit Hilfe eines Taylor- Kegels zur Bildung eines feinen Aerosols. Die Ladung der Ionen ist abhängig von der Polarität der an der Kapillare angelegten Spannung. Eine positive Ladung erzeugt positive Ionen und *vice versa*. Das Aerosol wurde anschließend in den Analysator geleitet. Dieser trennt die ionisierten Moleküle aufgrund ihres Masse- Ladungs- Verhältnis auf. Hier wurde ein Quadrupol- Massenspektrometer verwendet, welches die Ionen durch ein elektrisches Feld entlang einer Achse zwischen 4 parallel liegenden Stabelektroden beschleunigt. Innerhalb dieser Quadrupol- Stäben kommt es zur besagten m/q- Selektierung, sodass nur Ionen mit einem bestimmten Masse- Ladungs- Verhältnis das Feld durchqueren können. Um die Selektivität und Sensitivität zu verbessern, wurden mehrere Quadrupole im Tandem hintereinandergeschaltet. Im ersten Quadrupol wurden die Ionen isoliert. Im Zweiten wurden sie angeregt. Dazu wurde ein Stoßgas, beispielsweise Argon, Helium oder Stickstoff, hinzugefügt. Dieses Stoßgas fragmentiert die Probe weiter, aufgrund der Kollision mit den Ionen aus der Probe. Das letzte Quadrupol ermöglichte die Detektion der zuvor fragmentierten Ionen. Durch diese Tandem- Massenspektrometrie konnten die Ceramide selektiv aufgetrennt und durch Mitführung eines internen Standards identifiziert und quantifiziert werden.

5.1.10 Immunfluoreszenz

5.1.10.1 Proteinfärbung

Visualisierungen der verschiedenen Proteinexpressionen *in vitro* wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt. 30000-50000 Zellen wurden auf das *glass cover slip* einer 24- Wellplatte ausgesät und über Nacht im entsprechenden Wachstumsmedium zum Adhärenz inkubiert. Die zuvor entsprechend behandelten Zellen wurden fixiert und permeabilisiert mit Methanol: Aceton (4:3) für 1 Std. bei -20°C.

Anschließend wurden die Proben 3- mal mit 0,01% PBS-Triton für 3 min bei Raumtemperatur und horizontaler Rotationsbewegung gewaschen. Daran folgend wurden die Zellen mit 0,02% BSA in PBS-T für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und geblockt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden bzw. zu minimieren. Der jeweilige Primärantikörper wurde in der gleichen Blockierungslösung in einer entsprechenden Verdünnung angesetzt und über Nacht inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Proben 3- mal mit 0,01% PBS-T gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper in einer 1:200 verdünnten Blockierungslösung für 1 Std. inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten wurde der Nucleus mit 1:5000 in PBS verdünnten Hoechst gefärbt. Final wurden die Proben noch 2-mal gewaschen und anschließend mit Glycerilgelatine eingedeckt und mit *confocal Laser Scanning Microscopy* (cLSM, Zeiss) untersucht.

5.1.10.2 ROS Färbung

Visualisierung der mitochondrialen ROS- Produktion wurde mit MitoSOX durchgeführt. MitoSOX diffundiert in die Mitochondrien und wird von den darin befindlichen reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert. Die dadurch entstehende Fluoreszenz kann bei 532 nm gemessen werden.

30000-50000 Zellen wurden auf das *glass cover slip* einer 24- Wellplatte ausgesät und über Nacht im entsprechenden Wachstumsmedium inkubiert. Die Zellen wurden 1 Std. vor und während der Messung in ihrem jeweiligen serumfreien Medium inkubiert. Anschließend wurde mitochondriales ROS mit 1:1000 verdünnten MitoSOX für 30 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Der Zellkern wurde mit 1:1000 verdünnten Hoechst für 2 min bei 37° C gefärbt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit cLSM (Zeiss) visualisiert und analysiert.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit der ZEN software von Zeiss quantifiziert.

5.1.10.3 Mitochondrienfärbung

Zur Verbildlichung der mitochondrialen Struktur und Integrität wurde der grüne Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker verwendet. 30000-50000 Zellen wurden auf das *glass cover slip* einer 24- Wellplatte ausgesät und über Nacht im entsprechenden Wachstumsmedium inkubiert. Für die Dauer des Experiments wurden die Zellen in serumfreien Medium inkubiert. MitoTracker wurde in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt und für 20 min bei

37° C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Nukleus mit Hoechst in einer Verdünnung von 1:5000 für 5 min bei 37° C und 5% CO₂ gefärbt. Die komplette Färbelösung wurde entfernt und die Zellen wurden in serumfreien Medium gewaschen und weiter kultiviert. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit dem Apoptom (Zeiss) visualisiert.

5.1.11 Elektronenmikroskopie

Zur detaillierten Darstellung der Mitochondrienstruktur und –integrität, wurden die Zellen mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Ca. 2000000 Zellen wurden mit 50 ml einer frisch angesetzten Fixierlösung für 1h bei Raumtemperatur und horizontaler Rotation behandelt. Die Fixierlösung wurde entfernt und die Zellen wurden mit Spüllösung 3mal für 15 min bei Raumtemperatur und gleichmäßiger Rotation gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden den Zellen nochmals 30 ml Spüllösung zugesetzt und mittels eines Zellschabers resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem 50ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C für bis zu einer Woche gelagert. Die Proben wurden auf Eis transportiert und der Elektronenmikroskopie übergeben und gemäß dem dort etablierten Standardprotokoll weiterverarbeitet.

5.1.12 Seahorse Analysis

Metabolische Analysen wurden mit dem Seahorse Analyser XFe96 von Agilent durchgeführt. Verwendet wurde der MitoStress Kit und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Test wurden 10000 Zellen/Well der mitgelieferten 96- Wellplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Für den Test wurden 2 µM Oligomycin, 0,3 µM FCCP und je 0.5 µM Rotenone und Antimycin eingesetzt. Oligomycin hemmt den Komplex V der Atmungskette in den Mitochondrien, welche für die Phosphorylierung von ADP zu ATP verantwortlich ist. Durch diese Inhibition kann kein ATP mehr synthetisiert werden, was im direkten Zusammenhang mit dem Sauerstoffverbrauch der Zellen steht, was zu einem Abfall der Oxygen Consumption Rate (OCR) führt. FCCP ist ein Hydroniumionenentkoppler und bewirkt den massiven Einstrom von Hydroniumionen in die Mitochondrien. Die einzige Möglichkeit dies zu kompensieren, ist durch vermehrten Sauerstoffverbrauch die H⁺- Ionen zu Wasser zu katalysieren. Dies ist durch einen sprunghaften Anstieg der OCR charakterisiert und ist ein direktes Maß für die Vitalität der Mitochondrien. Die Kombination aus Rotenon

und Antimycin inhibiert sowohl Komplex I als auch Komplex III der Atmungskette, was die Mitochondrienaktivität und Vitalität komplett negiert.

Zur Auswertung wurde die von Agilent bereit gestellte Software „Wave“ verwendet.

5.1.13 Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Die ELISAs zum Nachweis von MMP8 und MMP9 wurden von R&D Systems gekauft und nach Herstellerangaben verwendet. Die Überstände von den entsprechenden Inkubationen wurde gesammelt und bei -80°C gelagert. Der mitgelieferte Standard wurde laut Protokoll in einer absteigenden Konzentration zur Erstellung der benötigten Eichkurve verwendet und frisch vor dem ELISA angesetzt. 100 µl Assay Diluent RD1-34 wurden in die mitgelieferte 96- Well Platte vorgelegt und anschließend 100 µl des jeweiligen Standards bzw. Probe dazupipettiert. Die Platte wurde mit dem ebenfalls mitgelieferten Klebestreifen versiegelt und für 2h bei Raumtemperatur und kontinuierlichem schütteln inkubiert. Während dieser Zeit bindet das im Zellüberstand befindliche MMP8 oder MMP9 an die am Boden lokalisierte Anti-MMP- Antikörper und formen einen Antikörper- Antigen- Komplex. Die Platte wurde nach der Inkubation 4-mal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend kurz getrocknet. Nachfolgend wurden 200 µl des humanen MMP- Konjugats in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde mit neuem Klebestreifen verschlossen und erneut 1 Std. bei Raumtemperatur und schütteln inkubiert. Das Konjugat beinhaltet anti-MMP Antikörper, an dem ein Enzym gekoppelt wurde, welcher ebenfalls an das immobilisierte MMP bindet. Daraus entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper- Komplex, auch Sandwich genannt. Die vorher beschriebenen Waschschrte wurden in gleicher Art und Weise wiederholt. Im darauffolgenden Schritt wurden 200 µl Substrat auf jede Probe gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Das Substrat wird von dem am sekundären Antikörper gekoppelten Enzym katalysiert, wodurch es zu einer blauen Farbentwicklung kommt. Die Intensität des blauen Farbstoffes ist direkt proportional zu der Konzentration an MMP die im Zellüberstand vorhanden war.

Nach den 30 min. wurden 50 µl Stopplösung zu den Vertiefungen gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Durch die in der Stopplösung befindlichen Säure und der dadurch verursachten pH- Erniedrigung kommt es zu einem Farbwechsel in den Wells von blau zu gelb. Die Intensität wurde mit dem Tecan plate reader gemessen.

5.1.14 Statistik

Alle Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt und angegeben. Die Daten wurden auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1% H₂O) bzw. FLAG-TK normalisiert, falls nicht anders angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der t-test ($p < 0,05$) verwendet.

(* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$). Statistik und Grafiken wurden mit SigmaPlot 14 erstellt.

5.2 Materialien

Tabelle 4: Liste aller verwendeten Komponenten, Kits und Chemikalien.

<u>Produkt</u>	<u>Produktnummer</u>	<u>Firma</u>
<u>Transfektion</u>		
p3x FLAG-CMV7		Genewiz
Kompetente <i>E. coli</i>	DH10B	New England BioLabs
SOC Outgrowth Medium	B9020S	New England BioLabs
LB Agar, powder	22700041	ThermoFisher
LB Broth Base, flüssig	12780-029	ThermoFisher
Ampicillin	10835242001	Merck
Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit	28-9042-69	GE Healthcare
EndoFree Plasmid Kit	12362	Qiagen
SmaI	ER0661	ThermoFisher
Sall	ER0641	ThermoFisher
10x TBE	15581044	ThermoFisher
1 kb DNA Ladder	G5711	Promega
Lipofectamine 3000	L3000-008	Invitrogen
OptiMEM	31985-070	Gibco
<u>Zellkultur</u>		
DMEM	41965-039	Gibco
Fetales Kälberserum	F7524	Merck
Nichtessenzielle Aminosäuren	M7145	Merck
L- Glutamin	G7513	Merck
Natriumpyruvat	S8636	Merck
Pen/Strep	P4333	Merck
Trypsin- EDTA	25200-072	Gibco
Trypanblau	T10282	ThermoFisher
Claycomb Medium	51800C	Merck

Fetales Kälberserum HL-1 geeignet	TMS-016-B	Merck
Norepinephrine	407453	Merck
Ascorbinsäure	A4544	Merck
Soybean Trypsin Inhibitor	T6414	Merck
Doxorubicin	D1515	Merck
Fumonisin B1	F1147	Merck
MitoTempo	SML0737	Merck
<u>RNA-, Proteinisolation</u>		
NucleoSpin RNA Kit	740955.250	Machery Nagel
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1622	ThermoFisher
PowerUP SYBR Green Master Mix	A25742	ThermoFisher
EZblock Protease Inhibitor Cocktail	K271-500	BioVision
EZBlock Phosphatase Inhibitor Cocktail	K273-1	BioVision
Bradford	B6916	Merck
Precision Plus Protein Kaleidoskop	1610375	BioRad
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	7727	Cell Signaling
Immobilon Western HRP Substrat	P90720	Merck
<u>Immunfluoreszenz</u>		
Goat Anti- Rabbit IgG H&L (Cy5)	ab6564	abcam
Goat Anti- Mouse IgG H&L (Cy5)	ab97037	abcam
Goat Anti- Mouse IgG H&L (Cy3)	ab97035	abcam
Hoechst	H3570	Life Technologies
MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator	M36008	ThermoFisher
MitoTracker Green FM	M7514	ThermoFisher
Ethidium Homodimer-2	E3599	ThermoFisher
<u>Seahorse Analysis</u>		
Seahorse XF Cell Mito Stress	103015-100	Agilent

Test Kit		
Seahorse XFe96 FluxPak mini	102601-100	Agilent
Seahorse XF DMEM	103575-100	Agilent
<u>ELISA</u>		
Human Total MMP8 Quantikine ELISA	DMP800	R&D Systems
Human Total MMP9 Quantikine ELISA	DMP900	R&D Systems
<u>Chemikalien</u>		
Agarose	11406.02	Serva
TBE	15581-044	Invitrogen
TRIS	4855.5	Roth
NaCl	9265.2	Roth
SDS	8029.3	Roth
Glycin	3908.4	Roth
Tween	9127.1	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	8076.4	Roth
Magermilchpulver (nonfat dried milk)	T145.2	Roth
PBS	D8537	Merck
Glutaraldehyd	23114.01	Serva
HEPES	H4034	Merck
KCl	6781.1	Roth
MgSO ₄ 7 H ₂ O	63138	Merck
CaCl ₂ 2 H ₂ O	C-3881	Merck
Natriumcacodylat	15540.01	Serva
Rotiphorese	T802.1	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.3	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	T9281	Merck
Methanol	8388.1	Roth
Aceton	650501	Merck
Glucose	G-8270	Merck
Natriumpyruvat	P5280	Merck
β- Mercaptoethanol	M6250	Merck

Tabelle 5: CerS2- Sequenz des p3xFLAG-CMV7 Vektors

Plasmid- Insert	Sequenz
CerS2	5'- GTCGACATGCTGCAGACCCTGTACGATTACTTCTGGT GGGAGAGGCTCTGGCTGCCCGTGAACCTGACCTGGG CCGACCTGGAGGACAGAGACGGCAGGGTGTACGCC AAGGCCAGCGACCTCTATATCACCCCTGCCCTGGCC CTGCTGTTCCCTCATCGTCAGGTA CTTCTTCGAGCTGT ATGTGGCTACCCCCCTGGCCGCCCTGCTGAACATCA AGGAGAAGACCAGGCTGAGGGCCCCTCCCAATGCC ACCCTGGAGCATTCTATCTGACCAGCGGAAAGCAG CCAAGCAGGTTCGAGGTGGAGCTGCTCAGCAGACA GTCCGGACTGAGCGGAAGACAGGTGGAGAGGTGGT TCAGGAGGAGGAGGAACCAGGACAGACCCTCCCTG CTCAAGAAGTTCAGGGAGGCCAGCTGGAGGTTTACC TTCTACCTGATCGCCTTTATCGCCGGCATGGCCGTGA TCGTGGATAAGCCCTGGTTCTACGACATGAAAAGG TGTGGGAGGGCTACCCCATCCAGAGCACCATCCCCT CCCAGTACTGGTACTACATGATCGAACTCAGCTTCT ACTGGTCCCTGCTGTTCTCCATCGCCAGCGACGTGA AGAGGAAGGACTTCAAGGAGCAAATCATCCACCAC GTGGCCACAATCATCCTGATCTCCTTCAGCTGGTTTG CCAACTACATCAGAGCCGGCACCCTGATCATGGCTC TGCACGACAGCAGCGATTACCTCCTGGAGAGCGCTA AGATGTTCAACTACGCCGGCTGGAAGAACACCTGCA ATAACATCTTCATTGTGTTTCGCCATCGTGTTTCATCAT CACCAGACTGGTGATTCTGCCCTTCTGGATCCTGCAC TGCACCCTCGTGTACCCCCTGGAGCTCTATCCCGCCT TCTTCGGCTACTACTTCTTTAACTCCATGATGGGCGT GCTCCAGCTGCTGCATATTTTCTGGGCCTACCTGATC CTGAGGATGGCCACAAGTTCATCACCGGCAAGCTG GTGGAGGATGAGAGGAGCGACAGGGAAGAGACCGA GAGCAGCGAAGGAGAGGAGGCTGCCGCTGGAGGAG GAGCTAAAAGCAGGCCTCTGGCCAACGGACACCCC ATCCTGAACAATAACCATAGAAAAACGATTGACCC GGG-3'

Tabelle 6: Rezepte

<u>Arbeitsmittel</u>	<u>Komponenten</u>
Agarosegel (1,5%)	0,6g Agarose 40ml TBE (10x)
Wachstumsmedium (Fibroblasten)	500 ml DMEM 15% FKS 1% Nichtessenzielle Aminosäuren 1% L- Glutamin 1% Natriumpyruvat 0,5% Pen/Strep
Wachstumsmedium (Kardiomyozyten)	50 ml Claycomb Medium 10% FKS (HL-1 geeignet) 1% Norepinephrine 1% L- Glutamin 1% Pen/Strep
Waschmedium (Kardiomyozyten)	50 ml Claycomb Medium 5% FKS (HL-1 geeignet) 1% Pen/Strep
RIPA- Lysispuffer	50 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 0,1% SDS 0,5 % Deoxycholate
10x SDS- Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 35 mM SDS (1% w/v)
10x TBS	100 mM Tris 1 M NaCl pH 7,6
Blockierungspuffer	1x TBS + 0,1% Tween 5% BSA oder 5% Magermilchpulver
10x Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% SDS (w/v) 15% Methanol (v/v)
ELMI Fixierlösung	2,5% Glutaraldehyd 20 mM HEPES pH 7,4 145 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,5 mM CaCl ₂
ELMI Spüllösung	0,1 M Caco- Puffer pH 7,4

Tabelle 7: Primersequenzen der detektierten Gene

<u>Gen (Maus)</u>	<u>Richtung</u>	<u>Sequenz</u>
GAPDH	Vorwärts	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAA
	Rückwärts	TTGTGGGTGCAGCGAACTTTA
CD36	Vorwärts	TGGGCTGTGATCGGAACTGT
	Rückwärts	ATAAGCATGTCTCCGACTGGC
DGAT1	Vorwärts	GTTTCCGTCCAGGGTGGTAGT
	Rückwärts	GCACCTCAGATCCCAGTAGCC
DGAT2	Vorwärts	TGGCTACGTTGGCTGGTAACT
	Rückwärts	TCTTCAGGGTGACTGCGTTCT
PDK4	Vorwärts	AGCTGCTGGACTTTGGTTCAG
	Rückwärts	CTGCACCGAAGGAGTGTTC
ATGL	Vorwärts	CTTCCTCGGGGTCTACCACAT
	Rückwärts	CGGGCCTCCTTGGACACCT
CPT1B	Vorwärts	CATGTATCGCCGCAAACCTGG
	Rückwärts	CCTGGGATGCGTGTAGTGTT
<u>Gen (human)</u>	<u>Richtung</u>	<u>Sequenz</u>
GAPDH	Vorwärts	GAAGACGGGCGGAGAGAAAC
	Rückwärts	GCCCAATACGACCAAATCCG
CD36	Vorwärts	CCTCTGGCAACAAACCACAC
	Rückwärts	AACTGCAGTCCTCAGTACA
DGAT	Vorwärts	GGTCCGAGGGTGTCAATA
	Rückwärts	TCTGGCACTCGCCCTT
DGAT2	Vorwärts	CAGCTCCAGGTGTCCTAGCC
	Rückwärts	AGTAGGCGGCTATGAGGGTC
PDK4	Vorwärts	GGGTGGGCGTCAAGATGAA
	Rückwärts	GCGAGAAATGCTCCACCTCT
ATGL	Vorwärts	CTCCCCGTTTTTCATGGCCT
	Rückwärts	TAAGCAGGCGGTACATACA
CPT1B	Vorwärts	AGGAGTGAACCCGAGCTGT
	Rückwärts	ATGCGGATCAGGCGTTTCTT
TIMP1	Vorwärts	CTTCCAGTCCCGTCACCTTG
	Rückwärts	GGGCAGGATTCAGGCTATCT
TIMP2	Vorwärts	TCTCGACATCGAGGACCCAT
	Rückwärts	TGGACCAGTCGAAACCCTTG
Vim	Vorwärts	GGACCAGCTAACCAACGACA
	Rückwärts	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG
TGF- β	Vorwärts	ATGGAGAGAGGACTGCGGAT
	Rückwärts	TAGTGTTCCCCACTGGTCCC
DDR2	Vorwärts	GCTCCTTACCAGCAAAGTG
	Rückwärts	CCCCAGGCAACTTGTAGGTC
MMP8	Vorwärts	CCCTGAAGACGCTTCCATTTT
	Rückwärts	TCCAGGTAGTCCTGAACAGTTTTT

MMP9	Vorwärts	CAGTCCACCCTTGTGCTCTT
	Rückwärts	CGACTCTCCACGCATCTCTG
MMP14	Vorwärts	GGCGGGTGAGGAATAACCAA
	Rückwärts	ACGCCTCATCAAACACCCAA
MFN1	Vorwärts	AGTTGGAGCGGAGACTTAGCA
	Rückwärts	TCGCCTTCTTAGCCAGCAC
MFN2	Vorwärts	GGCAGCAGAGGCGTAAGG
	Rückwärts	GTCCTGACTTCACCTTCCCG
OPA1	Vorwärts	TGTGAGGTCTGCCAGTCTTTA
	Rückwärts	TGTCCTTAATTGGGGTCGTTG
DRP1	Vorwärts	TTTGACACTTGTGGATTTGCCA
	Rückwärts	AGTGACAGCGAGGATAATGGA
FIS1	Vorwärts	GTCCAAGAGCACGCAGTTTG
	Rückwärts	ATGCCTTTACGGATGTCATCATT
Mff	Vorwärts	ACTGAAGGCATTAGTCAGCGA
	Rückwärts	TCCTGCTACAACAATCCTCTCC

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Produktnummer</u>	<u>Firma</u>
FLAG	ab1162	abcam
CerS2	ab227501	abcam
CerS5	ab87131	abcam
CerS6	ab79509	abcam
Vinculin	ab129002	abcam
Cytochrome C	ab110325	abcam
Goat pAb to Ms IgG H&L	ab6789	abcam
Goat pAb to Rb IgG H&L	ab6721	abcam
Pan-/ cleaved Caspase 3	9662S	Cell Signaling
Pan-/ cleaved Caspase 9	9502S	Cell Signaling

6 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Korrelation und Kausalität zwischen erhöhten proinflammatorischen Ceramiden und den kardiotoxischen Nebenwirkungen von Doxorubicin (Dox) herzustellen und zu untersuchen. Fokussiert wurde sich dabei vor allem auf CerS2, welche unter anderem, aber nicht exklusiv, für die Generierung sehr langkettiger und somit proinflammatorischer Ceramide ($C \geq 20$) verantwortlich ist.

6.1 Murine Kardiomyozyten (HL-1)

Bei den HL-1 Zellen handelt es sich um murine atriale Kardiomyozyten, die für kontinuierliche Kultivierung immortalisiert wurden. Die Zellen exprimieren die spezifischen kardialen Marker α MHC, α -Aktinin und MLC2a, welche mit Western Blot in regelmäßigen Abständen nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden mit 4 verschiedenen Konzentrationen (0,01 μ M, 0,25 μ M, 0,4 μ M und 0,7 μ M) von Dox über einen Zeitraum von 24h inkubiert. Die Konzentrationen wurden aufgrund des Ethidiumhomodimer Assay (Eth-H2) ausgewählt. Die Eth-H2 Färbung zeigte einen dosisabhängigen Anstieg toter Zellen mit steigender Dox- Konzentration (Abb. 6) mit dem häufigsten Auftreten toter Zellen (grün) bei 0,7 μ M Dox.

Nachfolgende Visualisierungen wurden mit 0,01 μ M Dox, 0,25 μ M Dox und 0,7 μ M Dox durchgeführt. WB, qPCR, Seahorse etc. beinhalteten zusätzlich noch 0,4 μ M Dox zur besseren Darstellung der Dosisabhängigkeit.

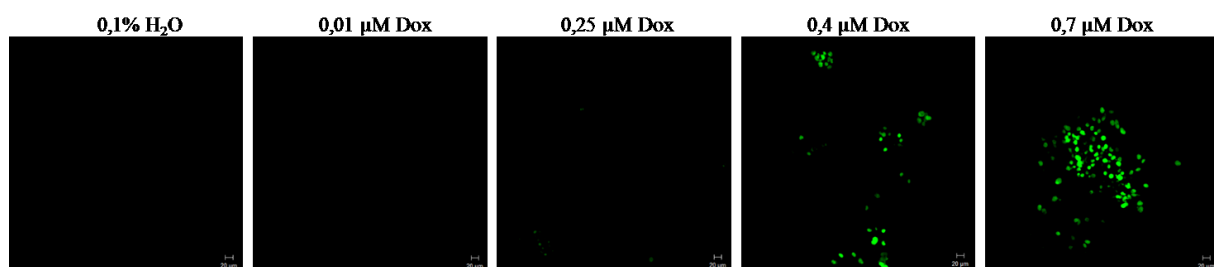


Abb. 6: Zellletalität von Dox dargestellt mit Eth- H2 und LSM. HL-1 Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Dox inkubiert. Anschließend wurde die Letalität mit Eth-H2 und LSM visualisiert.

6.1.1 Dox erhöht die CerS2- Expression

HL-1 Zellen wurden für jedes der nachfolgenden Experimente für 24h mit den zuvor bestimmten aufsteigenden Konzentrationen von Dox behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, CerS2 gefärbt und anschließend mittels LSM visualisiert, gemessen und quantifiziert.

LSM zeigte einen dosisabhängigen Anstieg der CerS2 Expression mit $1,21 \pm 0,14$ ($p=0,06$) für $0,01 \mu\text{M}$ Dox, $1,82 \pm 0,10$ ($p<0,01$) für $0,25 \mu\text{M}$ Dox und $2,25 \pm 0,10$ ($p<0,01$) für $0,7 \mu\text{M}$ Dox (Abb. 7).

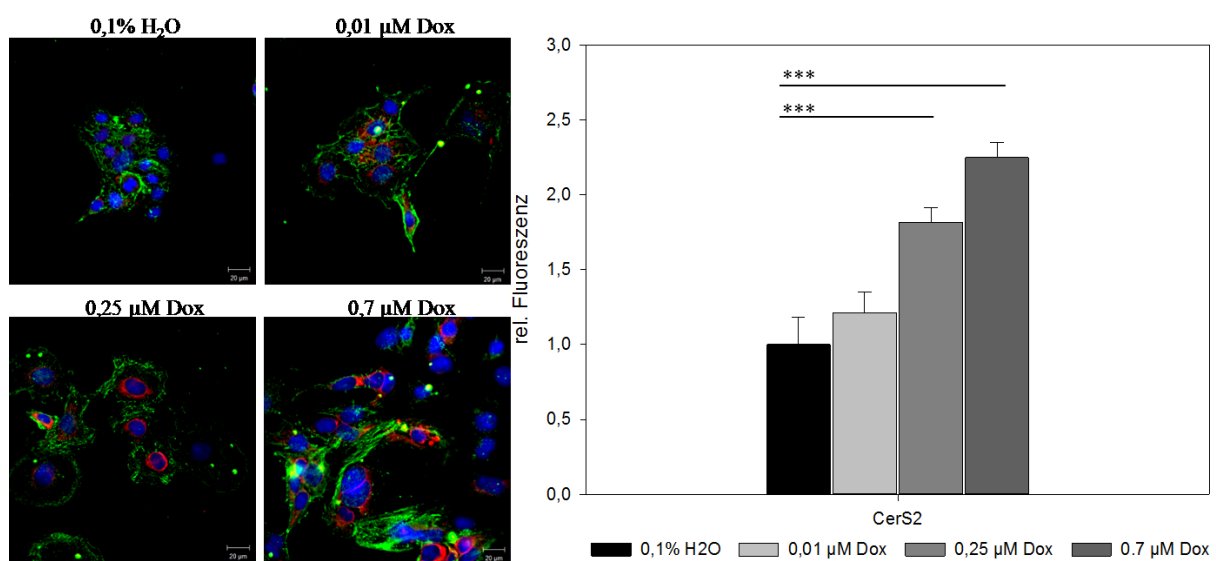


Abb. 7: CerS2- Proteinexpression dargestellt und quantifiziert mit LSM. HL-1 Zellen wurden 24h mit 3 verschiedenen Konzentrationen von Dox inkubiert und anschließend wurde CerS2 (rot) gefärbt. Zusätzlich wurden α - Actinin (grün) und der Nukleus (blau) dargestellt. Die Intensität der roten Fluoreszenz wurde gemessen und quantifiziert mit LSM. Die Bilder repräsentieren 1 von 3 biologischen Replikaten. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikanz wurde mit t-Test ($p<0,05$) berechnet.

Die Proteinexpressionsbestimmung mittels Western Blot hat ebenfalls eine dosisabhängige Expressionserhöhung von CerS2 (Abb. 8, Tabelle 9) ergeben. Die geringeren Konzentrationen von $0,01 \mu\text{M}$ und $0,25 \mu\text{M}$ Dox zeigte keine signifikante Veränderung. Mit den beiden höheren Konzentrationen war eine erhöhte CerS2- Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle $0,1\% \text{H}_2\text{O}$ nachweisbar (Abb. 8). Die höchste Expression war bei $0,7 \mu\text{M}$ Dox zu verzeichnen (Tabelle 9).

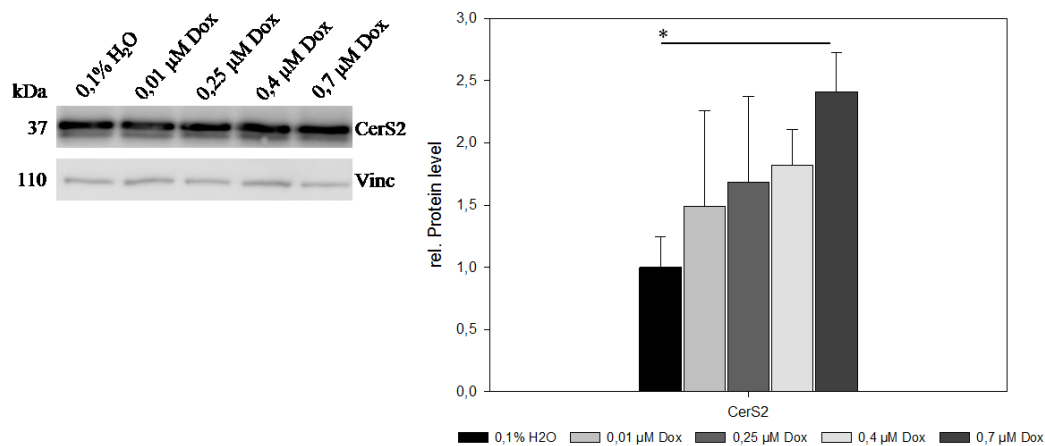


Abb. 8: CerS2 Proteinexpression dargestellt mit Western Blot. Links abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot. Graphisch dargestellt sind Mittelwertung und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

Tabelle 9: CerS2 Proteinexpression

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7 µM Dox
CerS2	1,0 ± 0,24	1,49 ± 0,76 ($p=0,55$)	1,68 ± 0,69 ($p=0,43$)	1,82 ± 0,29 ($p=0,12$)	2,41 ± 0,32 ($p=0,03$)

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus der Abb. 8. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$)

6.1.2 Dox erhöht langkettige und sehr langkettige Ceramide

Dox erhöht CerS2, welche spezifisch für die Produktion von langkettigen und sehr langkettigen verantwortlich ist. Deshalb wurden die Expressionslevel der entsprechenden Ceramide ($C_{14} - C_{24:1}$) mittels Massenspektrometrie gemessen. Die Messung zeigte eine dosisabhängige Erhöhung der langkettigen ($C > 14$) und sehr langkettigen Ceramide ($C > 20$) entsprechend der Erhöhung von CerS2 (Tabelle 10).

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Ceramidwerte nach 24-stündiger Dox- Inkubation

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7µM Dox
Totale Ceramide (C _{14-24:1})	1,0 ± 0,06	1,07 ± 0,03 (p=0,002)	1,04 ± 0,07 (p=0,18)	1,29 ± 0,09 (p<0,001)	1,29 ± 0,03 (p<0,001)
C _{16:0}	1,0 ± 0,10	1,11 ± 0,05 (p=0,009)	1,21 ± 0,13 (p=0,003)	1,71 ± 0,14 (p<0,001)	1,87 ± 0,04 (p<0,001)
C _{18:0}	1,0 ± 0,05	1,02 ± 0,02 (p=0,20)	1,03 ± 0,06 (p=0,23)	1,18 ± 0,06 (p<0,001)	1,24 ± 0,02 (p<0,001)
C _{20:0}	1,0 ± 0,06	0,97 ± 0,04 (p=0,14)	0,95 ± 0,04 (p=0,03)	1,0 ± 0,04 (p=0,92)	1,01 ± 0,04 (p=0,62)
C _{22:0}	1,0 ± 0,09	1,05 ± 0,05 (p=0,13)	1,02 ± 0,08 (p=0,63)	1,18 ± 0,13 (p=0,008)	1,18 ± 0,09 (p=0,002)
C _{22:1}	1,0 ± 0,14	1,07 ± 0,07 (p=0,19)	1,0 ± 0,09 (p=0,88)	1,3 ± 0,13 (p<0,001)	1,25 ± 0,05 (p<0,001)
C _{24:0}	1,0 ± 0,06	1,10 ± 0,02 (p<0,001)	1,04 ± 0,08 (p=0,25)	1,27 ± 0,09 (p<0,001)	1,25 ± 0,02 (p<0,001)
C _{24:1}	1,0 ± 0,06	1,08 ± 0,02 (p<0,001)	1,04 ± 0,08 (p=0,18)	1,26 ± 0,09 (p<0,001)	1,27 ± 0,03 (p<0,001)

HL-1 Zellen wurden für 24h mit aufsteigender Konzentration von Dox behandelt. Anschließend wurden Ceramide mittels Massenspektrometrie gemessen. Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

6.1.3 Durch Dox erhöhte mitochondriale ROS- Level sind reversibel durch die Vorbehandlung mit MitoTempo

Langkettige und sehr langkettige Ceramide haben proinflammatorische Eigenschaften, welche unter anderem durch erhöhte ROS- Produktion charakterisiert sind. Mit Fokus auf die mitochondriale Homöostase, wurde die mitochondriale ROS- Produktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX in Dox behandelten HL-1 Zellen gemessen. Parallel wurde durch die zweistündige Vorinkubation mit 20 µM MitoTempo überprüft, ob diese ROS- Level reversibel waren (Abb.9). MitoTempo ist ein spezifischer mitochondrialer ROS- Scavenger und eine Vorinkubation, gefolgt von anschließender Dox- Behandlung, zeigte bessere Resultate in Bezug mitochondrialer ROS- Erniedrigung als eine Postinkubation.

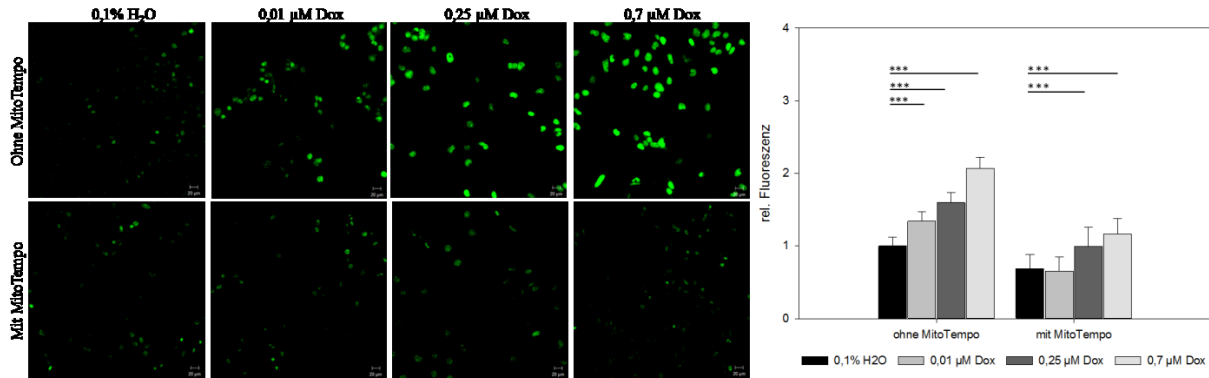


Abb. 9: Mitochondriale ROS-Level ohne und mit Vorbehandlung von MitoTempo gemessen mit MitoSOX und cLSM. Die Bilder repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Messungen. Im Diagramm dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Alle Konditionen wurden auf 0,1% H₂O normalisiert. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Tabelle 11: Aufgelistete Signifikanzen zwischen ohne und mit MitoTempo vorbehandelten HL-1 Zellen aus Abb. 9.

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,7 µM Dox
0,1% H ₂ O (20 µM MitoTempo, 2h)	$p < 0,001$			
0,01 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	$p < 0,001$	$p < 0,001$		
0,25 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	$p = 0,93$		$p < 0,001$	
0,7 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	$p = 0,005$			$p < 0,001$

Tabellarisch dargestellt sind die mit t-Test ($p < 0,05$) berechneten Signifikanzen zwischen den einzelnen Konditionen.

Die Messung und Quantifizierung mitochondrialer ROS- Level zeigte eine dosisabhängige Erhöhung mit steigender Dox- Konzentration (Abb. 9). Dabei konnte ein signifikanter Anstieg bereits nach der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,01 µM Dox nachgewiesen werden ($1,34 \pm 0,12$, $p < 0,001$) im Vergleich 0,1% H₂O ($1,0 \pm 0,12$). Eine Erhöhung, war auch für 0,25 µM Dox detektierbar ($1,59 \pm 0,14$, $p < 0,001$). Die höchste mitochondriale ROS-Produktion wurde für 0,7 µM Dox gemessen ($2,07 \pm 0,15$, $p < 0,001$).

Die dosisabhängige mitochondriale ROS- Erhöhung war auch nach der zweistündigen Vorinkubation mit 20 µM MitoTempo detektierbar (Abb.9). Ein signifikanter Anstieg konnte innerhalb der mit MitoTempo vorbehandelten Zellen für die Konzentrationen von 0,25 µM Dox ($p < 0,001$) und 0,7 µM Dox ($p < 0,001$) im Vergleich zur vorbehandelten 0,1% H₂O Kontrolle nachgewiesen werden. Normalisiert auf 0,1% H₂O (ohne MitoTempo) ($1,0 \pm 0,12$) war für 0,1% H₂O (mit MitoTempo) ($0,69 \pm 0,19$) und 0,01 µM Dox (ohne MitoTempo) ($0,65$

$\pm 0,19$) eine signifikante ROS- Erniedrigung nachweisbar. $0,25 \mu\text{M}$ Dox (mit MitoTempo) ($1,0 \pm 0,26$) zeigte keine signifikante Änderung. Die $0,7 \mu\text{M}$ Dox (mit MitoTempo) ($1,17 \pm 0,21$) Kondition zeigte wieder einen signifikanten Anstieg. (Abb. 9, Tabelle 9). Weiterhin war eine deutlich signifikante Erniedrigung im direkten Vergleich der einzelnen Inkubationen untereinander nachweisbar und verdeutlicht die ROS verringernden Effekte von MitoTempo. (Tabelle 11).

6.1.4 Dox vermittelte Mitochondrienschädigung

Erhöhte mitochondriale ROS- Level stehen im Zusammenhang mit Strukturschädigung. Die Konsequenz ist eine Ruptur der ausgeprägten mitochondrialen netzartigen Struktur, gefolgt von der Beeinträchtigung der Funktionalität der Atmungskette und somit mitochondrialen ATP- Produktion. Um die verursachten Effekte erhöhter mitochondrialer ROS zu bestätigen, wurde die Mitochondrienstruktur mit Immunfluoreszenz charakterisiert und anschließend mit Seahorse Analysis die Funktion überprüft.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit MitoTracker illustrierte eine fortschreitende Ruptur des mitochondrialen Netzwerks mit steigender Dox- Konzentration (Abb. 10). Bei der Lösungsmittelkontrolle ($0,1\% \text{H}_2\text{O}$) ist die mitochondrielle Struktur vollkommen intakt. Das ist durch weit verteiltes und verzweigtes Mitochondriennetzwerk in der Zelle charakterisiert. Mit steigender Dox- Konzentration wird die strukturelle Integrität zunehmend gestört. Die Verteilung der Mitochondrien ist nicht mehr netzartig zusammenhängend, sondern punktuell in der ganzen Zelle.

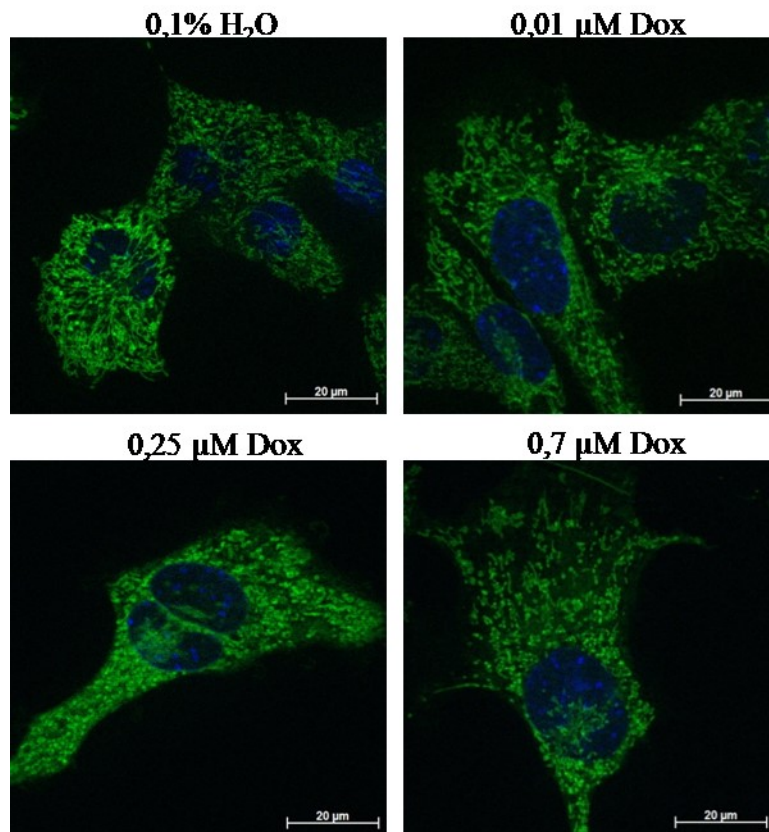


Abb. 10: Qualitative Visualisierung der Mitochondrienstruktur mit MitoTracker und LSM. Dargestellt ist eine representative Messung. Die Mitochondrien sind grün dargestellt (MitoTracker), während der Nucleus blau (Hoechst) gefärbt wurde.

Die Schädigung der Struktur hat direkten Einfluss auf die mitochondriale ATP- Produktion. Mittels Seahorse Analysis konnte dieser Effekt gemessen und quantifiziert werden. (Abb. 11). Seahorse Analysis ermöglicht die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen (*Oxygen Consumption Rate*, OCR) in Echtzeit und durch Verwendung verschiedenster Inhibitoren der Atmungskette, die Quantifizierung der mitochondrialen ATP-Produktion.

Seahorse Analysis zeigte eine dosisabhängige Verringerung der mitochondrialen ATP-Produktion (Abb. 11). Die geringste eingesetzte Dox- Konzentration von 0,01 µM zeigte keine signifikante Änderung ($0,87 \pm 0,47$, $p=0,59$) im Vergleich zu 0,1% H₂O ($1,0 \pm 0,22$). Die 0,25 µM Dox- Konzentration zeigte eine Erniedrigung der ATP- Produktion auf $0,52 \pm 0,24$ ($p=0,007$) und 0,4 µM Dox auf $0,37 \pm 0,22$ ($p<0,001$). Bei 0,7 µM Dox war die Verringerung der ATP- Produktion am deutlichsten ausgeprägt, mit einer Erniedrigung auf $0,20 \pm 0,19$ ($p<0,001$).

Die zweistündige Vorinkubation mit 20 µM MitoTempo führte zu einer Verringerung der mitochondrialen ROS- Level. Daraufhin wurde mittels Seahorse Analysis getestet, ob die positiven Effekte von MitoTempo auch Einfluss auf die ATP- Produktion hatte (Abb. 11). Seahorse Analysis zeigte eine Verbesserung der ATP- Produktion in den mit MitoTempo

vorbehandelten HL-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Obwohl Dox immer noch gravierende Effekte auf die Mitochondrien hat, konnten diese durch MitoTempo teilweise abgemildert werden (Abb. 11). Dennoch ist auch innerhalb der MitoTempo vorbehandelten Proben eine dosisabhängige Erniedrigung der mitochondrialen ATP-Produktion beobachtbar (Abb. 11).

Bezogen auf 0,1 % H₂O (ohne MT) zeigten 0,1% H₂O (mit MT) ($1,72 \pm 0,11$, $p=0,004$) und 0,01 μM Dox (mit MT) ($1,74 \pm 0,33$, $p=0,04$) eine signifikante Steigerung der mitochondrialen ATP-Produktion. 0,25 μM Dox (mit MT) ($0,91 \pm 0,34$, $p=0,68$) und 0,4 μM (mit MT) ($0,74 \pm 0,12$, $p=0,13$) zeigten keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zu 0,1% H₂O (ohne MT). Für 0,7 μM (mit MT) ($0,52 \pm 0,19$, $p=0,003$) war wieder eine signifikante Erniedrigung nachweisbar. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Konditionen sind in Tabelle 12 dargestellt. Obwohl MitoTempo die mitochondriale ATP-Produktion für die geringen Konzentrationen von Dox nachweislich verbessert, führen die hohen Konzentrationen dennoch zu einer signifikanten Erniedrigung.

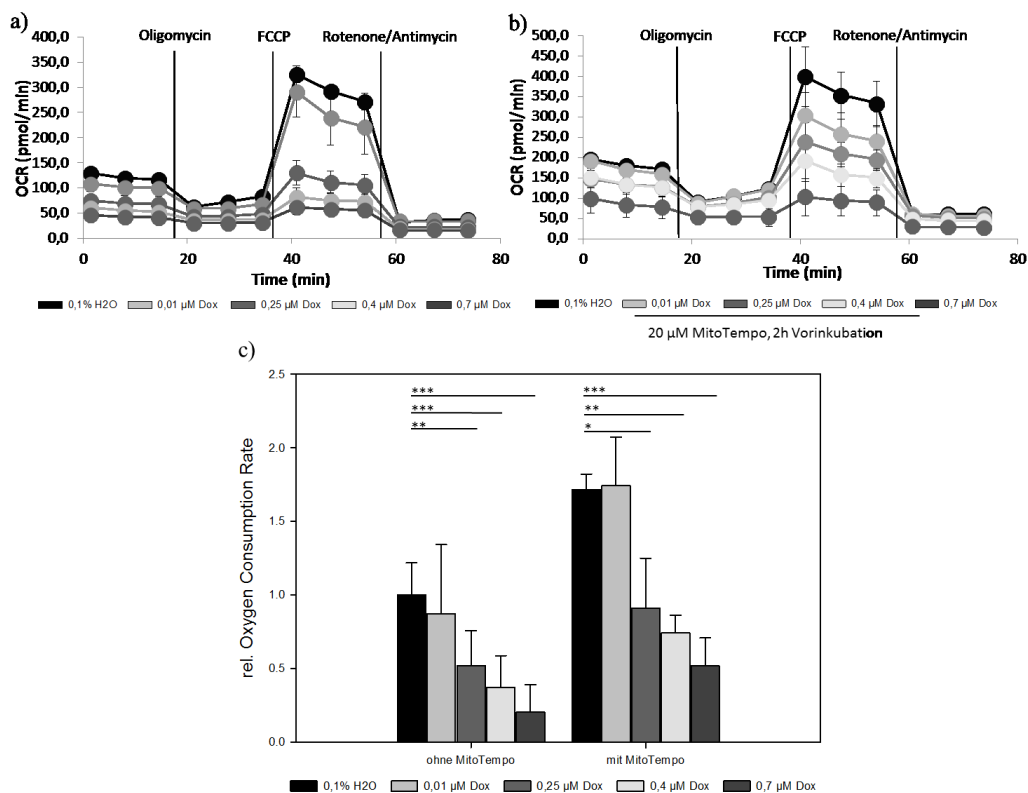


Abb. 11: Seahorse Messung der HL-1 Zellen. **a)** Dargestellt ist eine repräsentative Seahorse Messung ohne MitoTempo Vorbehandlung. Vertikale Linien zeigen die Zugabe des entsprechenden Inhibitors. **b)** Dargestellt ist eine repräsentative Seahorse Messung von MitoTempo vorbehandelten HL-1 Zellen. Vertikale Linien zeigen die Zugabe des entsprechenden Inhibitors. **c)** Graphisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der 3 biologischen Replikaten aus den jeweiligen Vorbehandlungen. Alle Werte wurden auf 0,1% H₂O (ohne MitoTempo) normalisiert. Signifikanz wurde mit t-Test ($p<0,05$) berechnet.

Tabelle 12: Aufgelistete Signifikanzen der mitochondrialen ATP- Produktion zwischen ohne und mit MitoTempo vorbehandelten HL-1 Zellen.

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7 µM Dox
0,1% H ₂ O (20 µM MitoTempo, 2h)	p=0,004				
0,01 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	p=0,04	p=0,10			
0,25 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	p=0,68		p=0,11		
0,4 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	p=0,13			p=0,005	
0,7 µM Dox (20 µM MitoTempo, 2h)	p=0,003				p<0,001

Tabellarisch dargestellt sind die mit t-Test berechneten Signifikanzen ($p < 0,05$).

Zusätzlich wurde die Expression metabolisch assoziierter Gene für die Dox behandelten HL-1 Zellen mittels qPCR durchgeführt, um die Auswirkungen der reduzierten Mitochondrienfunktion auf den zellulären Metabolismus zu untersuchen.

Tabelle 13: mRNA- Level Metabolismus- assoziierter Gene.

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7 µM Dox
DGAT1	1,0 ± 0,37	0,85 ± 0,37 (p=0,47)	1,20 ± 0,52 (p=0,51)	1,28 ± 0,36 (p=0,27)	2,59 ± 0,73 (p=0,05)
DGAT2	1,0 ± 0,51	0,40 ± 0,45 (p=0,08)	2,78 ± 0,88 (p=0,14)	1,38 ± 0,45 (p=0,20)	5,84 ± 0,59 (p=0,02)
ATGL	1,0 ± 0,38	1,02 ± 0,59 (p=0,94)	1,75 ± 0,64 (p=0,13)	1,30 ± 0,60 (p=0,41)	2,20 ± 0,28 (p=0,007)
CD36	1,0 ± 0,98	0,99 ± 1,06 (p=0,98)	0,98 ± 0,75 (p=0,97)	0,67 ± 0,82 (p=0,54)	0,87 ± 0,08 (p=0,84)
CPT1B	1,0 ± 0,15	0,78 ± 0,07 (p=0,03)	0,88 ± 0,24 (p=0,36)	0,73 ± 0,15 (p=0,02)	0,83 ± 0,24 (p=0,21)
PDK4	1,0 ± 0,53	0,81 ± 0,59 (p=0,52)	1,06 ± 0,59 (0,87)	0,89 ± 0,54 (p=0,72)	1,80 ± 0,10 (p=0,04)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanz von mindestens 3 biologischen Replikaten, normalisiert auf 0,1% H₂O. DGAT1 = Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1, DGAT2 = Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2, ATGL = Adipozyten-Triglycerid-Lipase, CD36 = Cluster of Differentiation 36, CPT1B = Carnitine Palmitoyltransferase 1B, PDK4 = Pyruvatdehydrogenase Lipoamide Kinase Isoenzym 4

Die qPCR demonstrierte eine Erhöhung der mit der Fettsäureoxidation- assoziierten Gene *DGAT1* und *DGAT2*, mit der jeweils höchsten Expression bei 0,7 μM Dox. Vergleichbar erhöht war auch die Erhöhung von *ATGL*, einem Gegenregulator der Fettsäureakkumulation. Auch hier war die höchste Expressionsänderung bei 0,7 μM Dox nachweisbar. Der Fettsäuretransporter *CD36* zeigte keine signifikante Expressionsänderung. *CPT1B*, ebenfalls involviert in die Fettsäureoxidation, zeigte eine signifikante Erniedrigung für 3 der 4 Konzentrationen. *PDK4* zeigte für 0,01 μM Dox, 0,25 μM Dox und für 0,4 μM Dox keine Expressionsänderung. Nur für 0,7 μM Dox war eine signifikante Erhöhung nachweisbar. (Tabelle 13)

6.1.5 Dox initiiert Mitochondrien- vermittelte Apoptose

Die gesammelten Daten zeigten, dass Dox zu einer Erhöhung proinflammatorischer Ceramide führt. Diese Inflammation verursachte eine vermehrte mitochondriale ROS- Produktion, welche die Mitochondrien in Struktur und Funktion schädigte. Durch die strukturellen Schäden lag die Vermutung nahe, dass dadurch die Mitochondrien- vermittelte Apoptose initiiert wurde. Die durch Mitochondrien ausgelöste und regulierte Apoptose ist durch die Translokation von Cytochrom C ins Zytoplasma charakterisiert, wodurch es im Verlauf der Reaktionskaskade zur Spaltung der apoptotisch inaktiven Caspase 3 (Casp3) zur aktiven gespaltenen Caspase 3 (Cleav.Casp3) kommt. Aktivierte Cleav.Casp3 fördert und katalysiert u.a. den Abbau der Zellmembran.

Um zu überprüfen, ob die durch Dox erhöhten Ceramide die Apoptose initiieren, wurde die Translokation von Cytochrom C mittels Immunfluoreszenz und das Verhältnis von Cleav.Casp3 und Casp3 durch Western Blot bestimmt (Abb. 12).

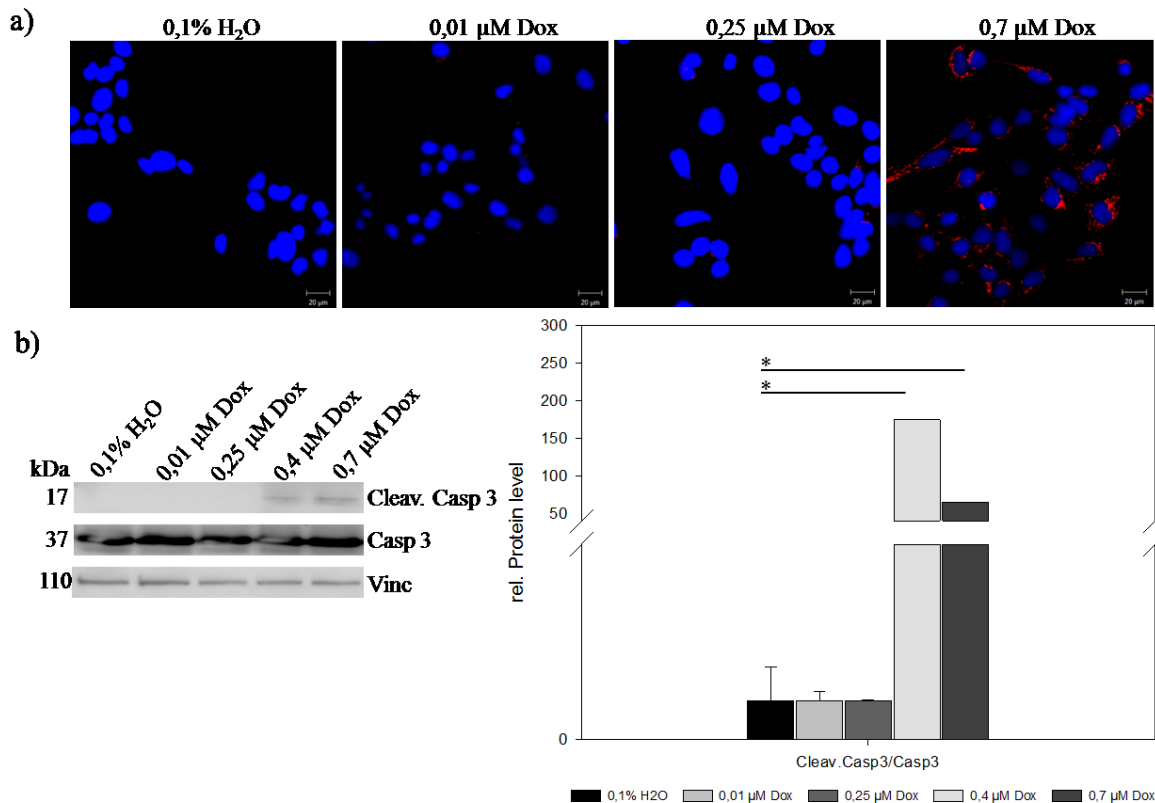


Abb. 12: Immunfluoreszenz und Western Blot Apoptose- assoziierter Proteine. **a)** Dargestellt ist eine repräsentative Cytochrom C- Färbung (rot) und des Zellkerns (blau), visualisiert mit cLSM. **b)** Dargestellt ist 1 von 3 repräsentativen Western Blots zur Detektion von gespaltenen (Cleav.Casp 3) und ungespaltenen Caspase 3 (Casp 3). Graphisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten des Cleav.Casp3/Casp3- Verhältnisses. Die Signifikanz wurde mit t- Test ($p < 0,05$) berechnet.

Die Immunfluoreszenz zeigte einen positiven Nachweis für Cytochrom C im Zellplasma bei einer Konzentration von 0,7 µM Dox im Vergleich zu 0,1% H₂O, während bei den anderen Konzentrationen der Nachweis negativ bzw. sehr schwach war. Western Blot zeigt einen deutlichen Anstieg der gespaltenen Caspase 3 für 0,4 µM Dox ($174,36 \pm 0,65$, $p = 0,04$) und 0,7 µM Dox ($64,85 \pm 0,61$, $p = 0,04$) im Vergleich zu 0,1% H₂O ($1,0 \pm 0,86$). Für 0,01 µM Dox, 0,25 µM Dox wurden minimale bis keine Werte detektiert, aufgrund der nicht vorhandenen gespaltenen Caspase 3. Aus diesem Grund wurden die Werte auf 1 gesetzt und nur die Standardabweichung angegeben.

6.2 CerS2- Überexpression in HL-1

Die gewonnenen Daten in HL-1 indizieren, dass Dox über die Erhöhung von proinflammatorischen Ceramiden die Mitochondrien in Struktur und Funktion schwerwiegend schädigt. Das führt zur Initiation der Apoptose, welche wiederum die Progression der Herzinsuffizienz begünstigt und fördert. Um eine direkte Korrelation und Kausalität zwischen proinflammatorischen Ceramiden und den Effekten von Dox herzustellen, wurden die HL-1 Zellen mit einem CerS2- überexprimierenden Plasmid transfiziert. Dieses Protein synthetisiert spezifisch langkettige und somit proinflammatorische Ceramide und war in Dox behandelten HL-1 Zellen erhöht.

6.2.1 Transformation kompetenter *E. coli* mit p3xFLAG-TK und p3xFLAG-CerS2

Kompetente *E. coli* wurden von New England Biolabs und p3xFLAG-CerS2 und der entsprechende Leervektor von Genewiz design und akquiriert. Die Plasmide FLAG-CerS2 und FLAG-TK wurden mittels Hitzeshock in die Bakterien transformiert. Amplifikation der genetisch veränderten *E. coli*s geschah mit Maxipröp und Isolation der Plasmid- DNA mit dem EndoFree Plasmid Kit. Das isolierte Plasmid wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen SmaI und SalI verdaut und nachfolgend mit Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, um das Vorhandensein des CerS2- Inserts nachzuweisen. Nach Herstellerangaben und Zertifikat von Genewiz hat das inserierte CerS2 eine Größe von 1155 bp und wurde zwischen den Schnittstellen von SmaI und SalI in das Plasmid p3xFLAG integriert.

Plasmidverdau und Agarosegelelektrophorese von FLAG-TK und FLAG-CerS2 zeigten eine Bande bei ca. 1155 bp in den mit FLAG-CerS2 transformierten *E. coli* im Vergleich zu denen mit FLAG-TK transformierten Bakterien, welche das Insert nicht aufweisen und bei ca. 1100 bp keine Bande haben (Abb. 13). Das bestätigte die Präsenz von CerS2 in den entsprechenden Bakterien im Vergleich zum Leervektor, welcher auf gleicher Höhe keine spezifische Bande aufwies. Auf eine Sequenzierung des CerS2- Inserts wurde aufgrund des mitgelieferten Zertifikats von Genewiz verzichtet.

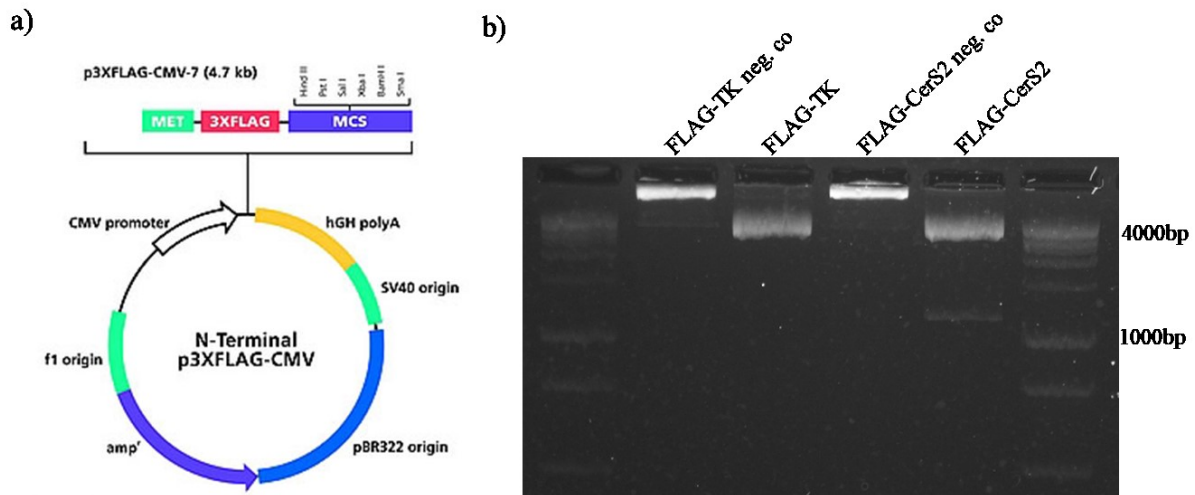


Abb. 13: Plasmidstruktur und -verdau. **a)** Dargestellt ist die schematische Struktur des p3xFLAG-CMV Plasmids (<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/SIGMA/E7408>). **b)** Dargestellt ist ein repräsentativer Plasmidverdau nach Plasmidamplifizierung mit Maxipröp und Plasmidisolation. FLAG-TK neg. co und FLAG-CerS2 neg. co bezeichnen den Verdau ohne Restriktionsendonukleasen. FLAG-TK und FLAG-CerS2 bezeichnen das jeweils mit SalI und SmaI geschnittene Plasmid. Als Marker wurde der 1kb DNA Ladder von Promega verwendet.

6.2.2 Transfektion muriner Kardiomyozyten mit Lipofektamin 3000

HL-1 Zellen wurden mit den vorher amplifizierten und getesteten Plasmiden FLAG-TK und FLAG-CerS2 unter der Verwendung von Lipofektamin 3000 für 24h transfiziert ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die erfolgreiche Überexpression wurde mittels Immunfluoreszenz und CerS2- Färbung visualisiert und quantifiziert. Zur zusätzlichen Bestätigung wurde die spezifische Überexpression von CerS2 und die Expression des Markerproteins FLAG mittels Western Blot verifiziert (Abb. 14). In der Immunfluoreszenz konnte eine $2,34 \pm 0,16$ ($p < 0,001$) erhöhte Expression von CerS2 im Vergleich zur Transfektionskontrolle ($1,0 \pm 0,20$) nachgewiesen werden (Abb. 14a). Western Blot zeigte eine $8,1 \pm 0,85$ - fache ($p = 0,04$) erhöhte Expression von FLAG und eine $5,2 \pm 0,68$ - fache ($p = 0,03$) erhöhte Expression von CerS2 für FLAG-CerS2 im Vergleich zu FLAG-TK ($1,0 \pm 0,59$ für FLAG und $1,0 \pm 0,58$ für CerS2) nachgewiesen (Abb. 14b).

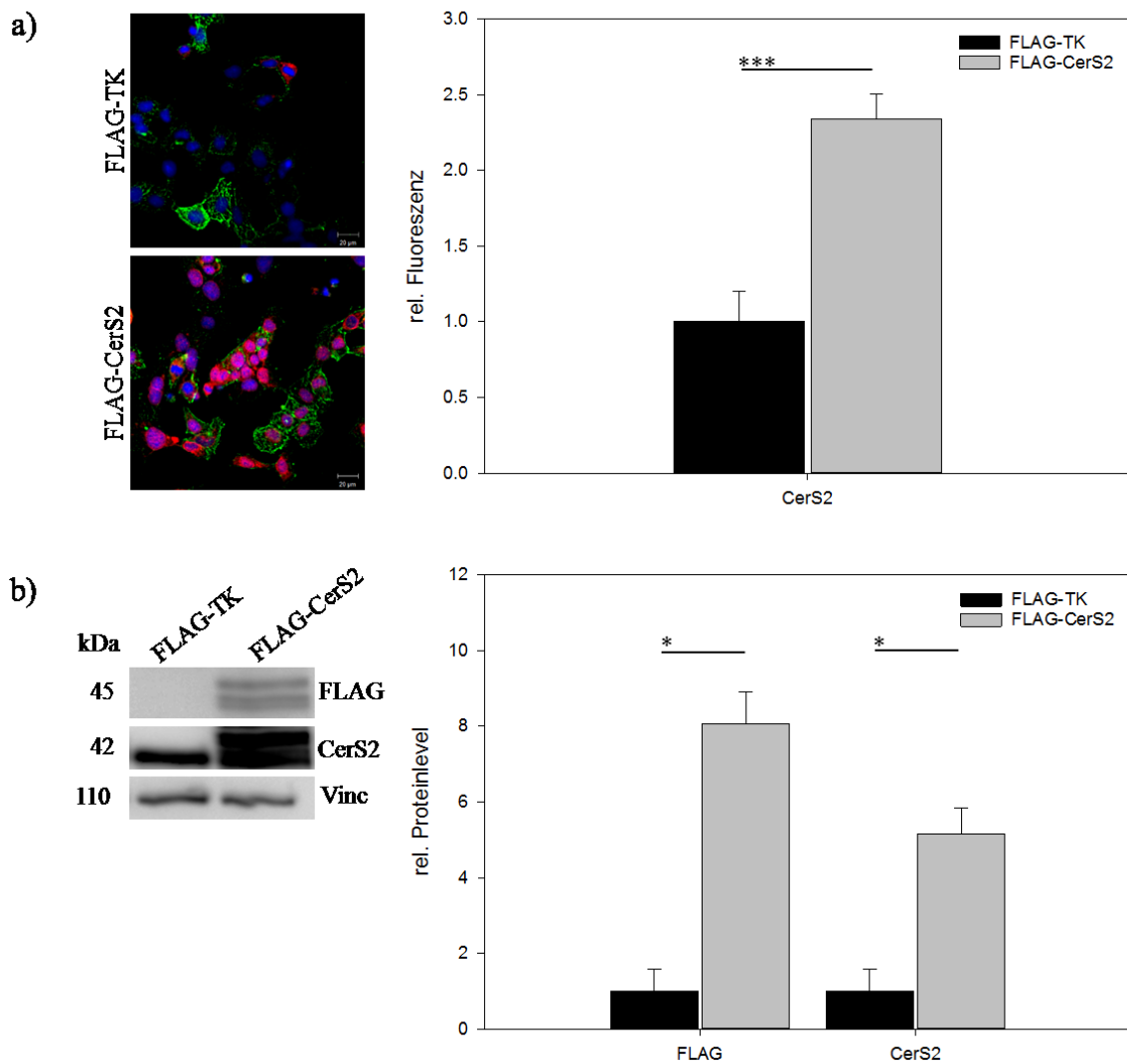


Abb. 14: Transfektionsnachweis der HL-1 Zellen mit Immunfluoreszenz und Western Blot. **a)** HL-1 Zellen wurden für 24h mit FLAG-TK bzw. FLAG-CerS2 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und CerS2 (rot), α -Actinin (grün) und der Nukleus (blau) gefärbt. Visualisierung und Quantifizierung der roten Fluoreszenz geschah mit cLSM. Dargestellt sind 2 Bilder einer repräsentativen Messung. Graphisch abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikate. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet. **b)** Mit FLAG-TK und FLAG-CerS2 transfizierte Zellen wurden mittels Western Blot auf FLAG und CerS2 Expression getestet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Graphisch abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

6.2.3 Ceramidlevel in FLAG-TK und FLAG-CerS2

Ausgehend von den Daten aus Immunfluoreszenz und Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass die Transfektion und Überexpression von CerS2 erfolgreich war. Nachfolgend wurden die Ceramidlevel erneut quantifiziert, um die biologische Aktivität des überexprimierten CerS2- Proteins nachzuweisen.

HL-1 Zellen wurden für 24h entweder mit FLAG-TK oder mit FLAG-CerS2 transfiziert. Anschließend wurden, analog wie bei den Dox behandelten HL-1 Zellen, 1 Million Zellen isoliert, lysiert und daraus die Ceramidkonzentrationen gemessen und quantifiziert (Tabelle 14). Massenspektrometrie zeigte keine Änderung der Ceramidwerte in FLAG-CerS2 im Vergleich zu FLAG-TK.

Tabelle 14: Ceramidwerte von FLAG-TK und FLAG-CerS2.

	Totale Ceramide (C ₁₄ -C ₂₄)	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{20:0}	C _{22:0}	C _{24:0}
FLAG-TK	1,0 ± 0,07	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,12	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,10	1,0 ± 0,12
FLAG-Cer2	1,03 ± 0,10 (p=0,77)	0,99 ± 0,02 (p=0,98)	0,94 ± 0,13 (p=0,65)	1,01 ± 0,04 (p=0,69)	0,96 ± 0,02 (p=0,84)	1,06 ± 0,18 (p=0,70)	1,11 ± 0,14 (p=0,47)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

6.2.4 Mitochondriale ATP- Produktion von FLAG-CerS2 (HL-1)

Western Blot und Immunfluoreszenz haben bestätigt, dass die Überexpression von CerS2 in HL-1 Zellen methodisch erfolgreich war. Jedoch zeigte die Massenspektrometrie keine Erhöhung der Ceramidlevel. Um zu verifizieren, ob die Überexpression von CerS2 dennoch Auswirkungen auf die Funktionalität der Mitochondrien hat, wurde erneut mit Seahorse Analysis die mitochondriale ATP- Produktion gemessen (Abb. 15).

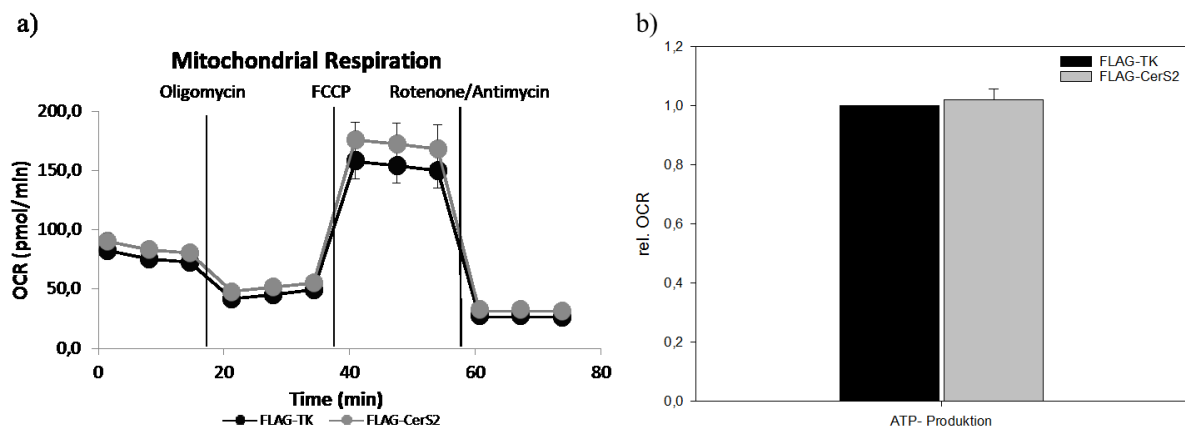


Abb. 15: Mitochondriale ATP Produktion gemessen mit Seahorse Analysis. **a)** Dargestellt ist eine von 3 repräsentativen Seahorse Messungen für FLAG-TK und FLAG-CerS2. Vertikale Linien zeigen die Zugabe des entsprechenden Inhibitors. **b)** Statistisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 biologischen Replikate. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05)

Die Messung der mitochondrialen ATP- Produktion zeigte keine signifikanten Änderungen zwischen FLAG-TK ($1,0 \pm 0$) und FLAG-CerS2 ($1,02 \pm 0,04$, $p=0,45$).

FLAG-CerS2 zeigte in keiner der getesteten Replikate eine Erhöhung der ATP- Produktion. Zusätzlich waren die einzelnen OCR-Werte zwischen den verschiedenen Passagen sehr unterschiedlich, was zu einer sehr hohen Standardabweichung führte. Deshalb wurde aus den bereits auf FLAG-TK normalisierten Werten Mittelwert und Standardabweichung berechnet und in Abb. 15b dargestellt.

Die Daten haben gezeigt, dass die CerS2 Überexpression zwar methodisch erfolgreich war, jedoch keinen biologischen Effekt auf die murinen Kardiomyozyten hatten. Weder in Bezug auf die Expression langkettiger Ceramide noch auf die mitochondriale ATP- Produktion.

Da die initial gesammelten Daten mit Dox in HL-1 Zellen jedoch einen potenziellen Zusammenhang zwischen erhöhten Ceramiden und den gezeigten Effekten vermuten ließen, wurden die Experimente angepasst.

Um die Effekte von überexprimierten CerS2 intensiv und gewissenhaft untersuchen zu können, wurde das Plasmid in humane Zellen transfiziert. Dafür wurden humane Fibroblasten ausgewählt. Diese gelten als leicht transfizierbar und ermöglichten zusätzlich die Untersuchung der Effekte von erhöhten Ceramiden auf die Fibrose, einem weiteren Problem bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Um also die vermutete Korrelation zwischen den Effekten von Dox und erhöhten Ceramiden zu verifizieren, wurden humane Fibroblasten, analog zu den murinen Kardiomyozyten, mit Dox behandelt und parallel mit FLAG-TK und FLAG-CerS2 transfiziert. Die durchgeführten Experimente und Messungen wurden unter gleichen Bedingungen wiederholt bzw. erweitert.

6.3 Humane Vorhautfibroblasten (hFSF)

Die Zellen wurden mit 4 verschiedenen Konzentrationen (0,01 μM , 0,25 μM , 0,4 μM und 0,7 μM) von Dox über einen Zeitraum von 24h inkubiert. Die Letalität wurde ebenfalls mit dem Eth-H2- Assay getestet, um die zellschädigenden Effekte von Dox auch in hFSF zu verifizieren (Abb. 16). Die Färbung mit Eth-H2 bestätigte die dosisabhängige Letalität von Dox, mit der höchsten detektierbaren Fluoreszenz bei 0,7 μM Dox.

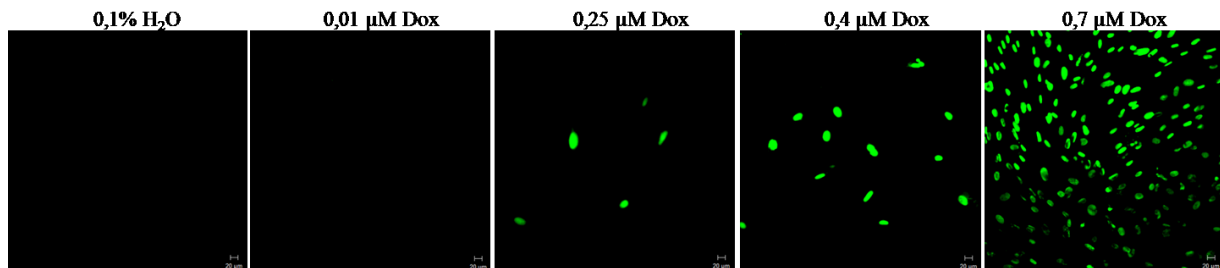


Abb. 16: Zellletalität von Dox dargestellt mit Eth- H2 und LSM. Humane Fibroblasten wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Dox inkubiert. Anschließend wurde die Letalität mit Eth-H2 und cLSM visualisiert.

6.3.1 Dox erhöht dosisabhängig CerS2- Expression und in der Konsequenz langkettige und sehr langkettige Ceramide

Immunfluoreszenz zeigte erneut den dosisabhängigen Anstieg von CerS2 nach 24-stündiger Dox- Inkubation (Abb. 17). Gemessen wurde ein $1,42 \pm 0,14$ ($p < 0,001$) facher Anstieg für 0,01 μM Dox, ein $1,39 \pm 0,12$ ($p < 0,001$) facher Anstieg für 0,25 μM Dox und ein $1,5 \pm 0,19$ ($p < 0,001$) facher Anstieg für 0,7 μM Dox verglichen mit 0,1% H_2O ($1,0 \pm 0,13$).

Die erhöhte Proteinexpression von CerS2 konnte zusätzlich mit Western Blot bestätigt werden (Abb. 18). Für 0,01 μM Dox konnte eine Erhöhung von $3,08 \pm 0,52$ ($p = 0,001$), für 0,25 μM Dox von $3,07 \pm 0,45$ ($p = 0,005$), für 0,4 μM Dox von $4,04 \pm 0,60$ ($p = 0,008$) und für 0,7 μM Dox für $1,62 \pm 0,16$ ($p = 0,02$) nachgewiesen werden.

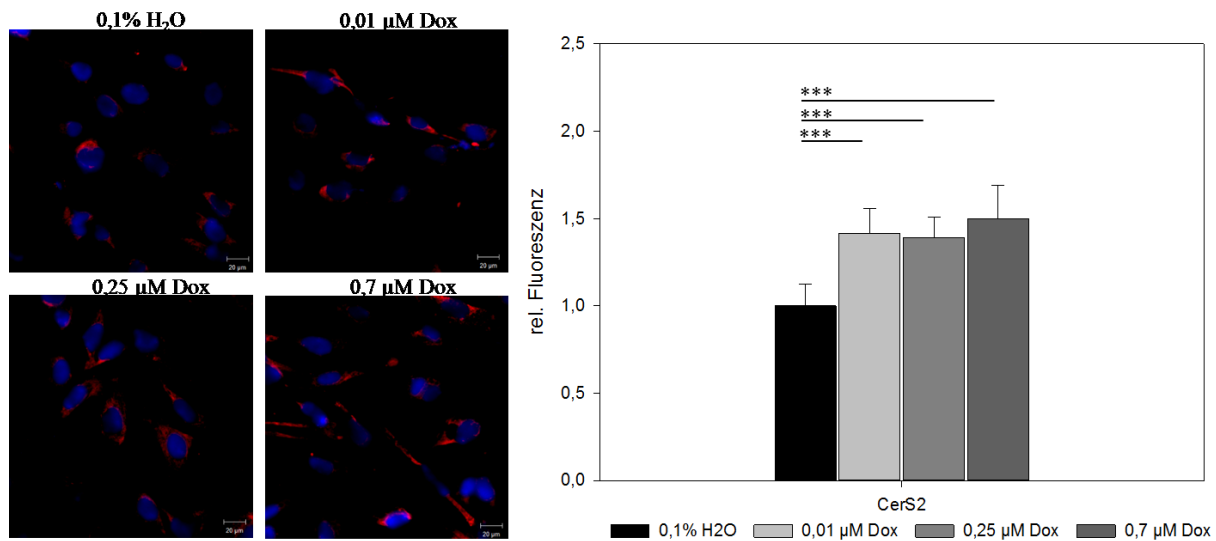


Abb. 17: CerS2- Expression dargestellt und quantifiziert mit LSM. Die Bilder repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Messungen in denen CerS2 (rot) und der Nukleus (blau) angefärbt wurden. Die Intensität der roten Fluoreszenz wurde gemessen und quantifiziert. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

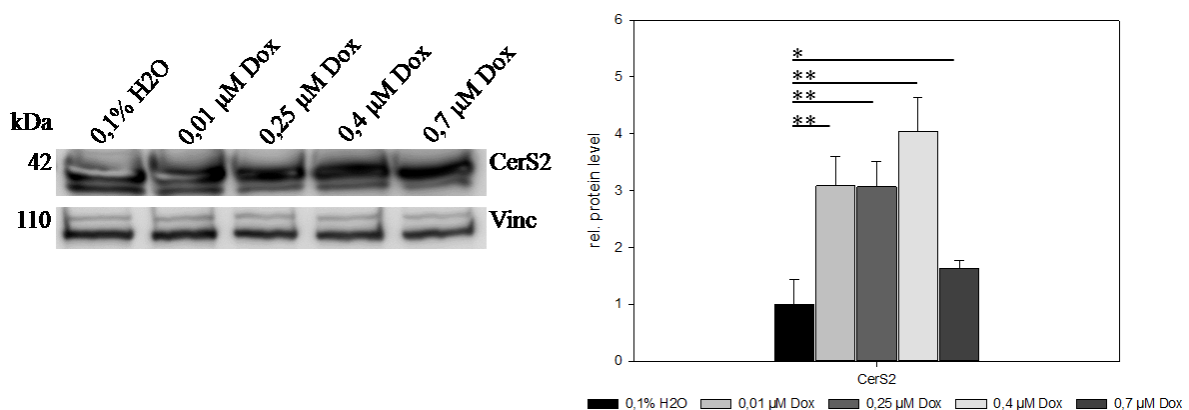


Abb. 18: CerS2- Expression von hFSF nach 24h Dox gemessen mit Western Bot. Links dargestellt ist 1 von 3 Replikaten. Graphisch dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Durch die nachfolgende Massenspektrometrie wurde überprüft, ob die langkettigen und sehr langkettigen Ceramide kohärent zur gesteigerten CerS2- Expression, erhöht waren (Tabelle 15). Die Massenspektrometrie zeigte eine dosisabhängige Erhöhung aller langkettigen ($C > 14$) und sehr langkettigen ($C > 20$) Ceramide.

Dox zeigte eine gleichmäßige dosisabhängige Erhöhung aller gemessenen Ceramide in den getesteten Zellen, jedoch waren Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen zu gravierend, als das eine Signifikanz ermittelt werden konnte. Deshalb wurde in Tabelle 15 exemplarisch eine representative Messung mit 3 methodischen Replikaten dargestellt.

Tabelle 15: Ceramidwerte nach 24h Dox in hFSF.

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7µM Dox
Totale Ceramide (C _{14-24:1})	1,0 ± 0,07	1,24 ± 0,07 (p=0,04)	1,31 ± 0,07 (p=0,02)	1,41 ± 0,03 (p=0,003)	1,39 ± 0,01 (p=0,002)
C _{14:0}	1,0 ± 0,04	1,13 ± 0,02 (p=0,01)	1,26 ± 0,05 (p=0,007)	1,31 ± 0,03 (p=0,002)	1,20 ± 0,01 (p=0,003)
C _{16:0}	1,0 ± 0,05	1,21 ± 0,05 (p=0,02)	1,28 ± 0,05 (p=0,01)	1,41 ± 0,02 (p=0,001)	1,28 ± 0,02 (p=0,02)
C _{18:0}	1,0 ± 0,07	1,17 ± 0,02 (p=0,03)	1,30 ± 0,04 (p=0,01)	1,40 ± 0,01 (p=0,001)	1,29 ± 0,02 (p=0,006)
C _{20:0}	1,0 ± 0,03	1,09 ± 0,05 (p=0,1)	1,19 ± 0,09 (p=0,08)	1,27 ± 0,01 (p=0,0005)	1,24 ± 0,02 (p=0,001)
C _{22:0}	1,0 ± 0,12	1,20 ± 0,06 (p=0,11)	1,31 ± 0,11 (p=0,08)	1,44 ± 0,06 (p=0,01)	1,54 ± 0,03 (p=0,004)
C _{22:1}	1,0 ± 0,08	1,26 ± 0,01 (p=0,01)	1,39 ± 0,09 (p=0,02)	1,53 ± 0,05 (p=0,002)	1,45 ± 0,03 (p=0,002)
C _{24:0}	1,0 ± 0,23	1,41 ± 0,05 (p=0,08)	1,43 ± 0,08 (p=0,08)	1,60 ± 0,03 (p=0,02)	1,64 ± 0,02 (p=0,02)
C _{24:1}	1,0 ± 0,03	1,21 ± 0,13 (p=0,09)	1,28 ± 0,09 (p=0,01)	1,32 ± 0,09 (p=0,008)	1,33 ± 0,03 (p=0,0004)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung einer repräsentativen Messung mit 3 methodischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

6.3.2 Dosisabhängige Erhöhung mitochondrialer ROS- Level

Um die proinflammatorischen Effekte von Dox für hFSF zu bestätigen, wurden die Zellen ebenfalls auf erhöhte mitochondrialer ROS- Level (Abb. 19) getestet. Die MitoSOX-Messung zeigte eine dosisabhängige Erhöhung mitochondrialer ROS mit dem höchsten Wert für 0,7 µM DOX. Für niedrigste Konzentration 0,01 µM (1,05 ± 0,16, p=0,35) konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. 0,25 µM Dox (2,05 ± 0,16, p<0,001) und 0,7 µM (3,41 ± 0,10, p<0,001) zeigten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu 0,1% H₂O (1,0 ± 0,19).

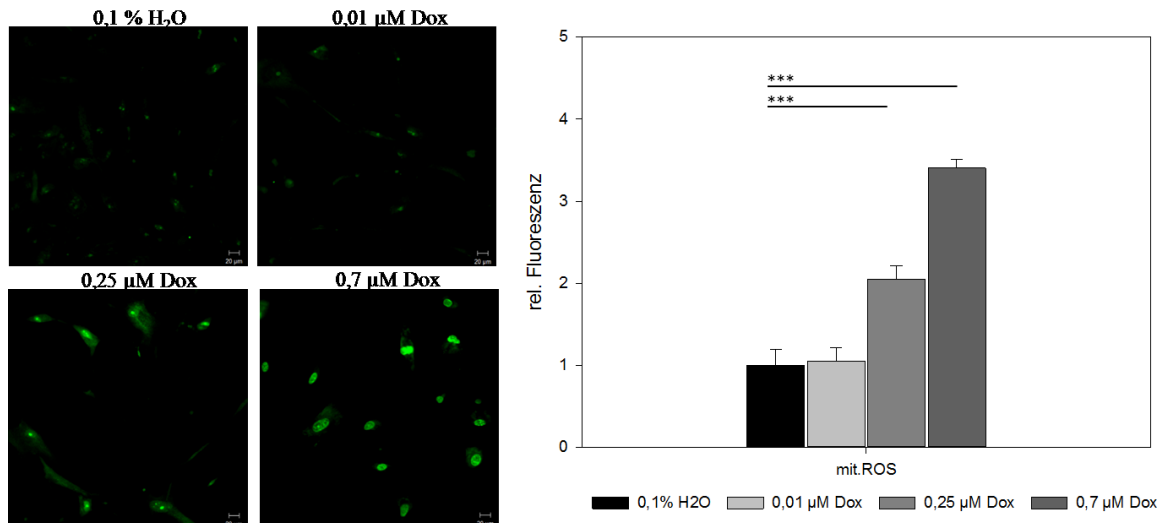


Abb. 19: Mitochondriale ROS-Level in hFSF gemessen mit MitoSOX und LSM. Dargestellt sind 4 repräsentative Bilder. Im Diagramm gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

6.3.3 Schädigung der Mitochondrienstruktur und -Funktion durch Dox

Die Akkumulation mitochondrialer ROS Level ließ eine Schädigung der Mitochondrien vermuten, wie es auch bei den HL-1 beobachtbar war. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die mitochondriale Homöostase mit LSM, Elektronenmikroskopie, qPCR und Seahorse Analysis untersucht.

Um die strukturellen Schädigungen zu visualisieren, wurden die Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker und mittels Elektronenmikroskopie analysiert (Abb. 20, 21). Die qualitative Fluoreszenzfärbung mit MitoTracker zeigte eine zunehmend beeinträchtigte und geschädigte Mitochondrienstruktur mit steigender Dox- Konzentration (Abb. 20). Während die 0,1% H₂O durch ein weitverzweigtes Mitochondriennetzwerk charakterisiert war, zeigten die steigenden Dox- Konzentration eine zunehmende Auflösung der physiologischen Struktur. Diese Strukturschäden kulminierten in der 0,7 μM Dox- Konzentration, welche durch ein beinahe vollständig aufgelöstes Netzwerk gekennzeichnet war. Die verzweigte Mitochondrienstruktur war bei 0,7 μM Dox nur noch in der Nähe des Zellkerns identifizierbar und nicht, wie bei den anderen Konzentrationen, über die ganze Zelle verteilt.

Die qualitative Elektronenmikroskopie wurde für den Nachweis eingesetzt, dass Dox die Zytotoxizität primär durch geschädigte Mitochondrien vermittelt und dass diese nicht nur ein Sekundäreffekt bzw. eine Spätfolge sind. Zu diesem Zweck sollte die Konzentration identifiziert werden, bei der sowohl intakte als auch geschädigte Mitochondrien innerhalb

einer Zelle detektierbar waren. Diese Kriterien waren bei einer Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ Dox und einer Inkubationszeit von 24h erfüllt. Die Elektronenmikroskopie zeigte eine pathologische Akkumulation multilamellarer Körper in Dox behandelten Zellen, die für gesteigerte Autophagie sprechen (Abb. 21 schwarze Pfeile). Zusätzlich konnte ein frühes Autophagosom identifiziert werden, welches ein Mitochondrium einkapselt und nachfolgend verdaut (roter Pfeil). Weiterhin wurden parallel intakte Mitochondrien innerhalb der dargestellten Zelle detektiert. Physiologisch intakte Mitochondrien sind langgestreckt und die zerklüftete und gefurchte Struktur der Cristae ist klar erkennbar. Diese Konstitution ist in der Lösungsmittelkontrolle deutlich sichtbar. Im Vergleich dazu sind die Mitochondrien in der $0,4 \mu\text{M}$ Dox behandelten Proben autophagiert und nur noch in Form der multilamellaren Körper sichtbar.

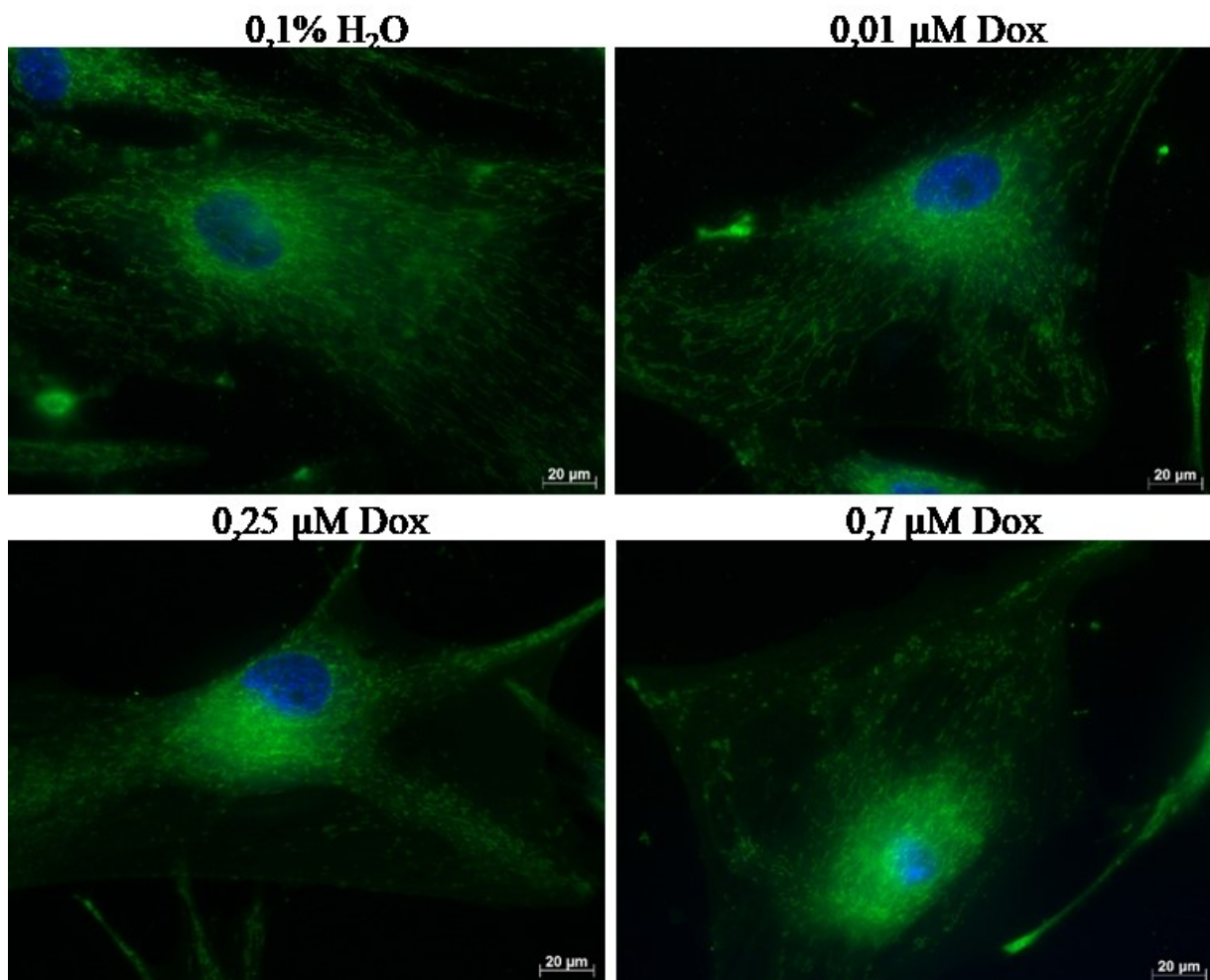


Abb. 20: Qualitative Visualisierung der Mitochondrienstruktur mit MitoTracker und Fluoreszenzmikroskopie. Die Mitochondrien sind grün (MitoTracker), während der Nukleus blau (Hoechst) gefärbt wurde.

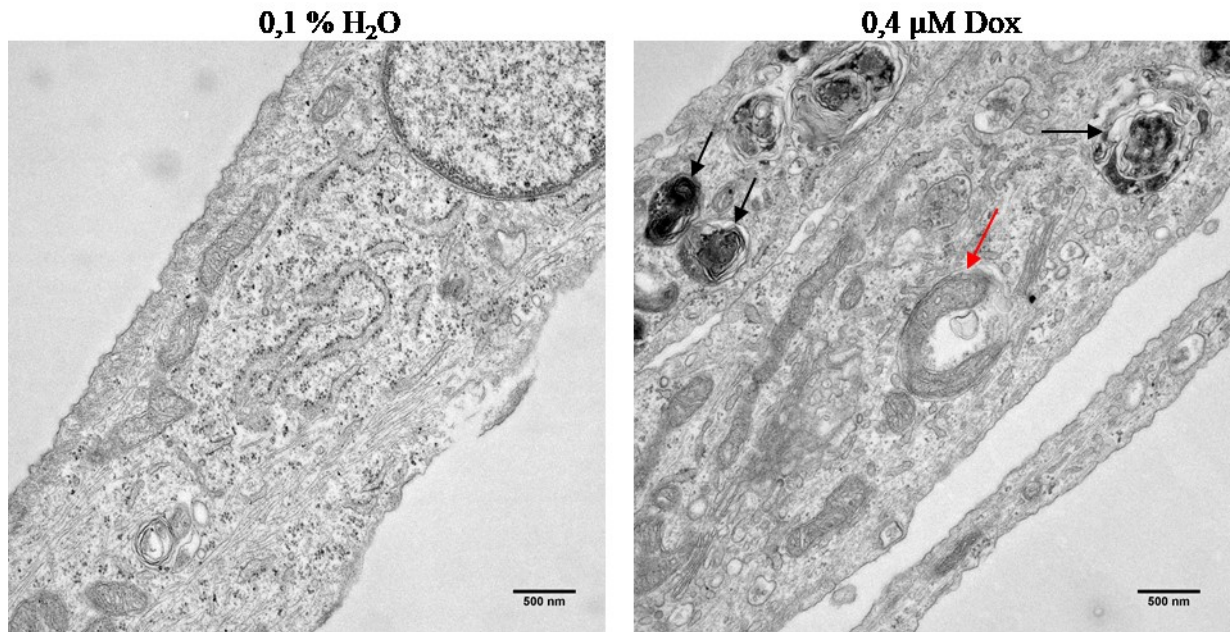


Abb. 21: Qualitative Darstellung der Zellorganellen mit Elektronenmikroskopie von hFSF nach 24h 0,4 μM Dox. Dargestellt sind die Zellorganellen bei 20000- facher Vergrößerung. Roter Pfeil: Frühes Autophagosom, welches ein Mitochondrium umschließt und abbaut. Schwarze Pfeile: Späte multilamellare Körper mit bereits verdauten und nicht mehr identifizierbaren Zellorganellen.

Die Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz bestätigten die toxischen Effekte von Dox primär auf die Mitochondrien.

Zusätzlich zu der visuellen Darstellung, wurde die Genexpression entsprechender Fusions- und Fissionsgene der Mitochondrien mit qPCR getestet (Tabelle 16). Die qPCR zeigte eine konstante Verringerung des Fusionsgenes *MFN1*, jedoch nicht von *MFN2*. *MFN2* zeigte eine dosisabhängige Expressionserhöhung mit dem höchsten Wert bei 0,7 μM Dox. Für *OPA1* wurde eine signifikante Erniedrigung bei allen Dox- Konzentrationen verzeichnet.

Das Fissionsgen *DRP1* zeigte ebenfalls eine signifikante Erniedrigung für alle eingesetzten Konzentrationen. Die Fissionsgene *Mff* und *FIS1* zeigten keine signifikanten Expressionsänderungen, unabhängig der eingesetzten Dox- Konzentration.

Tabelle 16: mRNA-Level mitochondrialer Fusion- und Fissionsgene nach 24h Dox.

	0,1% H ₂ O	0,01 µM Dox	0,25 µM Dox	0,4 µM Dox	0,7 µM Dox
MFN1	1,0 ± 0,09	0,75 ± 0,09 (p<0,001)	0,63 ± 0,12 (p<0,001)	0,65 ± 0,22 (p<0,001)	0,80 ± 0,14 (p=0,007)
MFN2	1,0 ± 0,28	0,59 ± 0,16 (p=0,02)	2,57 ± 0,34 (p<0,001)	4,18 ± 0,26 (p<0,001)	6,79 ± 0,40 (p<0,001)
OPA1	1,0 ± 0,16	0,78 ± 0,03 (p=0,03)	0,67 ± 0,12 (p=0,003)	0,64 ± 0,21 (p=0,003)	0,66 ± 0,18 (p=0,002)
DRP1	1,0 ± 0,19	0,75 ± 0,12 (p=0,04)	0,58 ± 0,12 (p=0,002)	0,54 ± 0,12 (p<0,001)	0,74 ± 0,21 (p=0,03)
Mff	1,0 ± 0,18	0,96 ± 0,16 (p=0,69)	0,92 ± 0,20 (p=0,49)	0,89 ± 0,21 (p=0,36)	0,90 ± 0,16 (p=0,26)
FIS1	1,0 ± 0,15	1,06 ± 0,09 (p=0,53)	0,93 ± 0,11 (p=0,44)	0,92 ± 0,12 (p=0,40)	0,89 ± 0,14 (p=0,19)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test (p<0,05) berechnet. MFN1= Mitofusin 1, MFN2= Mitofusin 2, OPA1= Mitochondrial Dynamin Like GTPase, DRP1= Dynamin- 1- like protein, Mff= mitochondrial fission factor, FIS1= Mitochondrial fission 1 protein.

Die strukturellen Schäden hatten einen direkten Einfluss auf die mitochondriale Funktion. Diese wurde erneut mit Seahorse Analysis und dem MitoStress Kit gemessen (Abb. 22).

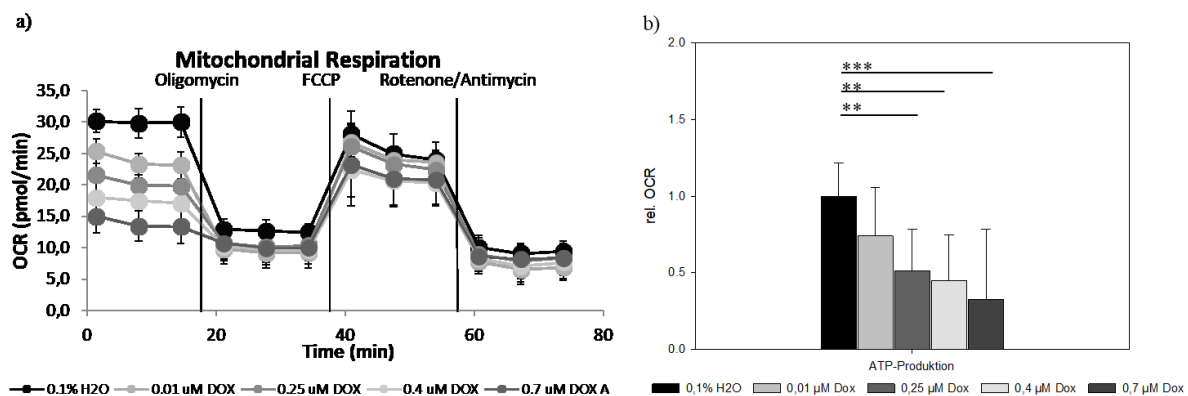


Abb. 22: Mitochondriale ATP Produktion gemessen mit Seahorse Analysis in hFSF. **a)** Gezeigt ist 1 von 3 repräsentativen Seahorse Messungen. Vertikale Linien signalisieren die Zugabe des entsprechenden Inhibitors. **b)** Graphisch abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

Die Seahorse Messung ergab eine dosisabhängige Verringerung der mitochondrialen ATP-Produktion, vergleichbar mit den Ergebnissen der HL-1 Zellen. Die geringste Dox-Konzentration zeigte keine signifikante Änderung (0,74 ± 0,31, p=0,17). Die nachfolgenden Konzentrationen waren alle durch eine verringerte OCR, also ATP Produktion, charakterisiert

($0,51 \pm 0,27$, $p=0,01$ für $0,25 \mu\text{M}$ Dox, $0,45 \pm 0,29$, $p=0,006$ für $0,4 \mu\text{M}$ Dox und $0,33 \pm 0,46$, $p<0,001$ für $0,7 \mu\text{M}$ Dox).

Weiterhin wurden die Expressionen Metabolismus- assoziierter Gene mittels qPCR gemessen. Dadurch konnten die Auswirkungen von Dox auf den zellulären Metabolismus analysiert werden. Besonderer Fokus wurde dabei auf die Gene des Fettstoffwechsels gelegt (Tabelle 17)

Tabelle 17: mRNA Expressionslevel Metabolismus assoziierter Gene nach 24h Dox.

	0,1% H ₂ O	0,01 μM Dox	0,25 μM Dox	0,4 μM Dox	0,7 μM Dox
DGAT1	$1,0 \pm 0,30$	$1,77 \pm 0,20$ ($p=0,01$)	$2,03 \pm 0,29$ ($p=0,01$)	$3,37 \pm 0,40$ ($p=0,005$)	$2,65 \pm 0,25$ ($p<0,001$)
DGAT2	$1,0 \pm 0,29$	$1,80 \pm 0,07$ ($p=0,004$)	$1,43 \pm 0,10$ ($p=0,06$)	$1,82 \pm 0,27$ ($p=0,02$)	$1,95 \pm 0,22$ ($p=0,004$)
ATGL	$1,0 \pm 0,38$	$1,52 \pm 0,13$ ($p=0,06$)	$1,75 \pm 0,09$ ($p=0,01$)	$2,56 \pm 0,13$ ($p<0,001$)	$3,02 \pm 0,18$ ($p<0,001$)
CD36	$1,0 \pm 0,58$	$0,94 \pm 0,39$ ($p=0,95$)	$2,82 \pm 0,35$ ($p=0,002$)	$3,34 \pm 0,53$ ($p=0,004$)	$4,02 \pm 0,53$ ($p<0,001$)
CPT1B	$1,0 \pm 0,40$	$2,01 \pm 0,47$ ($p=0,06$)	$0,47 \pm 0,58$ ($p=0,10$)	$0,31 \pm 0,56$ ($p=0,03$)	$0,28 \pm 0,38$ ($p=0,005$)
PDK4	$1,0 \pm 0,25$	$0,72 \pm 0,30$ ($p=0,21$)	$0,35 \pm 0,36$ ($p=0,01$)	$0,41 \pm 0,37$ ($p=0,02$)	$0,55 \pm 0,35$ ($p=0,01$)
GDH	$1,0 \pm 0,15$	$0,85 \pm 0,17$ ($p=0,19$)	$0,49 \pm 0,18$ ($p<0,001$)	$0,61 \pm 0,25$ ($p=0,007$)	$0,89 \pm 0,35$ ($p=0,52$)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanz von mindestens 3 biologischen Replikaten, normalisiert auf 0,1% H₂O. DGAT1 = Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1, DGAT2 = Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2, ATGL = Adipozyten-Triglycerid-Lipase, CD36 = Cluster of Differentiation 36, CPT1B = Carnitine Palmitoyltransferase 1B, PDK4 = Pyruvatdehydrogenase Lipoamide Kinase Isoenzym 4, GDH = Glutamatdehydrogenase

Vergleichbar mit den Daten aus den HL-1 Zellen, zeigt Dox auch hier eine dosisabhängige Erhöhung der Fettsäureoxidation- assoziierten Gene *DGAT1*, *DGAT2* und *ATGL*. Es konnte für alle drei Gene eine dosisabhängige Erhöhung mit der jeweils höchsten Expression bei $0,7 \mu\text{M}$ Dox nachgewiesen werden. *CD36* zeigt ebenfalls eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu 0,1% H₂O. Im Kontrast dazu zeigt *CPT1B*, ein in der Mitochondrienmembran lokalisiertes und für die Synthese von Acylcarnitinen verantwortliches Protein, eine dosisabhängige Erniedrigung. *PDK4*, ein wichtiges Enzym für die Erhaltung von Pyruvat, zeigt ebenfalls eine signifikante Expressionserniedrigung ab einer Konzentration von $0,25 \mu\text{M}$

Dox. Für GDH wurde eine dosisabhängige Erniedrigung bis 0,4 μM Dox detektiert. Für 0,7 μM Dox wurde keine signifikante Änderung verzeichnet.

6.3.4 Dox initiiert die Apoptose in hFSF

Die Effekte von Doxorubicin in HL-1 Zellen konnten für hFSF repliziert und bestätigt werden. Die Auswirkung auf die Apoptose wurde ebenfalls mit Immunfluoreszenz und Western Blot, in Form von gespaltenen und somit aktivierter Caspase 9 (Cleav.Casp 9) gemessen (Abb. 23). Die qualitative Immunfluoreszenz zeigte eine zunehmende Translokation von Cytochrom C ins Zytoplasma mit steigender Dox- Konzentration (Abb. 23a). Weiterhin konnte die beginnende Apoptose auch mit Western Blot durch die Messung der gespaltenen Initiatorcaspase 9 nachgewiesen werden (Abb. 23b). 0,01 μM Dox zeigte eine Erhöhung auf $1,56 \pm 0,08$ ($p=0,21$). Für 0,25 μM Dox konnte eine Erhöhung auf $1,63 \pm 0,34$ ($p=0,30$), für 0,4 μM auf $1,82 \pm 0,23$ ($p=0,15$) und für 0,7 μM auf $3,96 \pm 0,12$ ($p=0,004$) im Vergleich zu 0,1% H_2O ($1,0 \pm 0,51$) nachgewiesen werden.

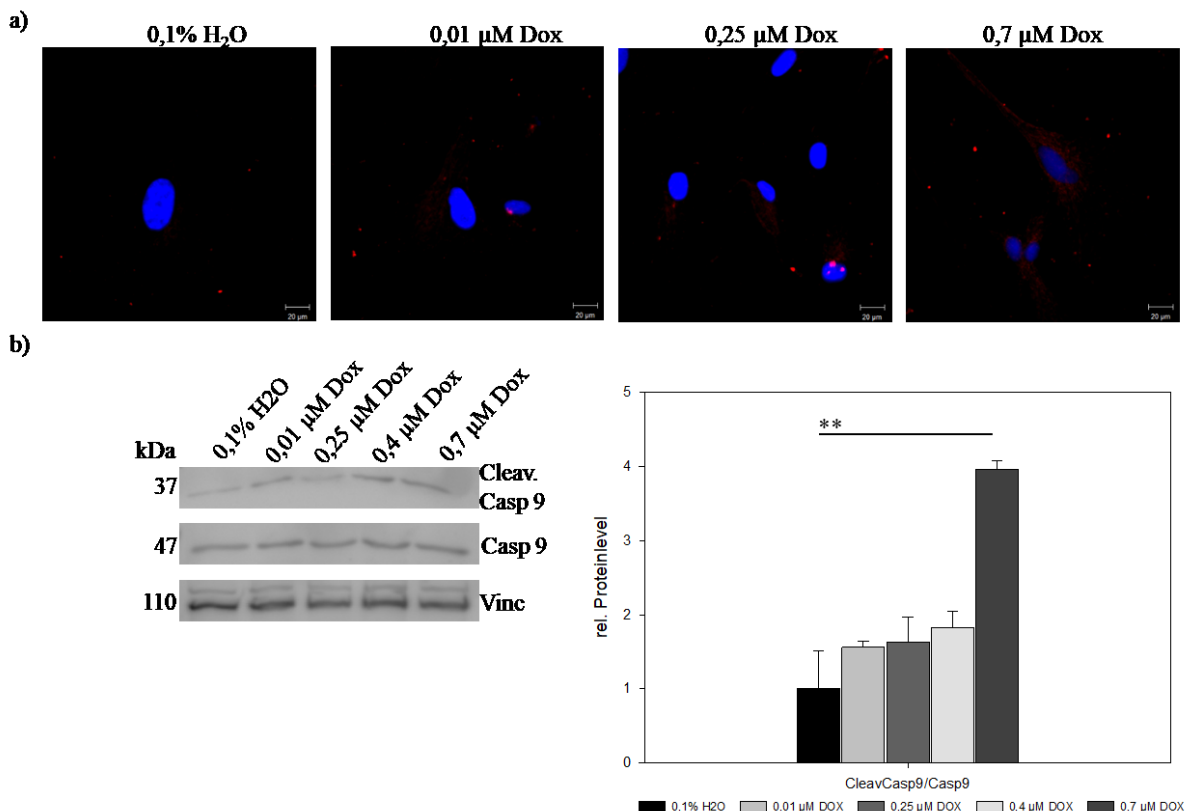


Abb. 23: Immunfluoreszenz und Western Blot der Apoptose- assoziierten Proteine. **a)** Immunfluoreszenz zeigt eine repräsentative Färbung. Cytochrom C wurde rot und der Zellkern blau gefärbt. **b)** Dargestellt ist einer von 3 repräsentativen Western Blots zur Detektion von gespaltenen (Cleav.Casp 9) und ungespaltenen Caspase 9 (Casp 9). Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten der Cleav.Casp 9/Casp 9- Ratio dargestellt. Signifikanz wurde mit t- Test ($p<0,05$) berechnet.

6.3.5 Dox fördert die Fibrose durch Erhöhung von Fibrosemarker

Fibrose ist charakterisiert durch komplizierte und verschiedene Regulationskaskaden in denen unter anderem MMPs, TIMPS und Kollagen involviert sind. Aus diesem Grund wurden die mRNA- Levels verschiedenster Fibrose- assoziierter Gene mittels qPCR gemessen (Tabelle 18, 19). Von allen getesteten MMPs zeigten nur *MMP8*, *MMP9* und *MMP14* eine dosisabhängige Expressionserhöhung (Tabelle 18).

Tabelle 18: mRNA Expressionslevel verschiedener MMPs nach 24h 0,7 μ M Dox.

	0,1% H ₂ O	0,01 μ M Dox	0,25 μ M Dox	0,4 μ M Dox	0,7 μ M Dox
MMP8	1,0 \pm 0,31	1,04 \pm 0,49	3,61 \pm 0,51 (p=0,009)	2,71 \pm 0,62 (p=0,04)	3,50 \pm 0,23 (p<0,001)
MMP9	1,0 \pm 0,23	1,50 \pm 0,60 (p=0,26)	0,98 \pm 0,64 (p=0,96)	1,70 \pm 0,38 (p=0,04)	3,22 \pm 0,52 (p=0,007)
MMP14	1,0 \pm 0,21	1,43 \pm 0,13 (p=0,007)	1,22 \pm 0,21 (p=0,13)	1,37 \pm 0,21 (p=0,03)	1,41 \pm 0,29 (p=0,03)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test (p<0,05) berechnet. MMP8= Matrixmetalloprotease 8, ..., MMP14= Matrixmetalloprotease 14.

Zusätzlich wurde die Expression weiterer Fibrose assoziierter Gene gemessen (Tabelle 19). Die qPCR zeigte einen signifikanten Anstieg von *TIMP1*, *TIMP2* und *TGF- β* ab einer Konzentration von 0,25 μ M Dox. Die für Fibroblasten charakteristischen Marker *Vim* und *DDR2* zeigten eine dosisabhängige Erniedrigung mit dem niedrigsten Wert bei 0,4 μ M Dox für *Vim* und 0,7 μ M Dox für *DDR2*. Das impliziert weiterhin eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und somit einer Induktion der Fibrose.

Tabelle 19: mRNA Expressionslevel Fibrose- assoziierter Gene nach 24h 0,7 μ M Dox

	0,1% H ₂ O	0,01 μ M Dox	0,25 μ M Dox	0,4 μ M Dox	0,7 μ M Dox
TIMP1	1,0 \pm 0,26	1,32 \pm 0,17 (p=0,13)	1,72 \pm 0,19 (p=0,008)	1,76 \pm 0,31 (p=0,02)	1,41 \pm 0,14 (p=0,03)
TIMP2	1,0 \pm 0,17	1,19 \pm 0,26 (p=0,33)	1,56 \pm 0,29 (p=0,05)	1,79 \pm 0,39 (p=0,05)	1,60 \pm 0,14 (p=0,003)
TGF- β	1,0 \pm 0,29	0,99 \pm 0,20 (p=0,96)	2,16 \pm 0,47 (p=0,04)	2,46 \pm 0,38 (p=0,01)	1,80 \pm 0,24 (p=0,02)
Vim	1,0 \pm 0,09	0,97 \pm 0,07 (p=0,70)	0,66 \pm 0,06 (p<0,001)	0,62 \pm 0,05 (p<0,001)	0,71 \pm 0,17 (p=0,003)
DDR2	1,0 \pm 0,17	0,97 \pm 0,21 (p=0,84)	0,83 \pm 0,30 (p=0,33)	0,66 \pm 0,33 (p=0,06)	0,60 \pm 0,05 (p=0,008)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet. TIMP1/2= Tissue inhibitors of Matrixmetalloproteases, TGF- β = Transforming growth factor β , Vim=Vimentin, DDR2= discoidin domain receptor 2.

Basierend auf den qPCR Daten wurde die Konzentration von MMP8 und MMP9 im Zellkulturüberstand mit ELISA gemessen, um eine potenziell erhöhte Sekretion nachzuweisen (Abb. 24).

MMP8- ELISA zeigte für 0,01 μ M Dox (1,09 \pm 0,15, $p=0,20$), 0,25 μ M Dox (0,98 \pm 0,08, $p=0,71$), 0,4 μ M Dox (1,03 \pm 0,08, $p=0,61$) und 0,7 μ M Dox (0,99 \pm 0,12, $p=0,84$) keine signifikanten Konzentrationserhöhungen im Zellüberstand im Vergleich zu 0,1% H₂O (1,0 \pm 0,11).

MMP9- ELISA zeigte ebenfalls für 0,01 μ M Dox (1,05 \pm 0,13, $p=0,38$), 0,25 μ M Dox (0,97 \pm 0,06, $p=0,36$), 0,4 μ M Dox (0,99 \pm 0,09, $p=0,71$) und 0,7 μ M Dox (1,03 \pm 0,10, $p=0,45$) keine signifikanten Konzentrationserhöhungen im Zellüberstand im Vergleich zu 0,1% H₂O (1,0 \pm 0,05).

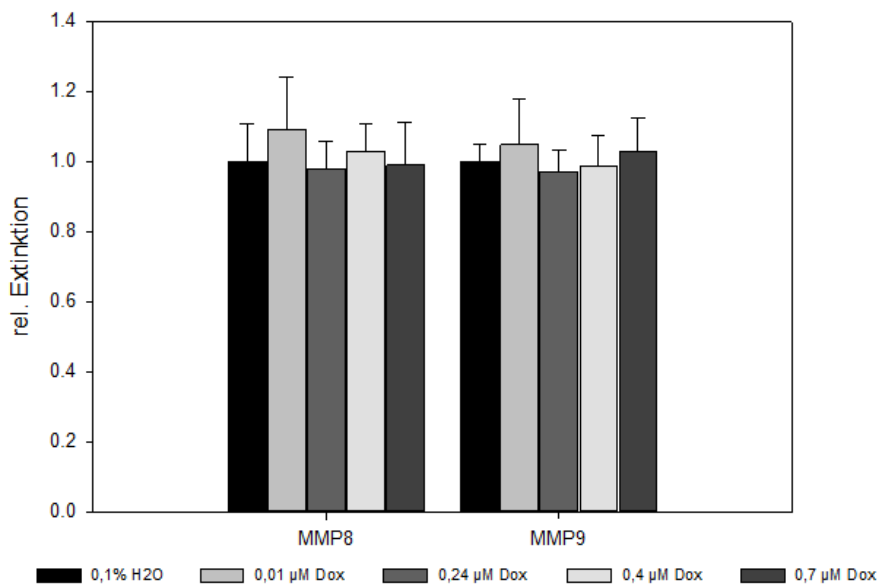


Abb. 24: MMP8 und MMP9 Bestimmung im Zellkulturüberstand mit ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

6.3.6 Verbesserung der Mitochondrienstruktur durch Reduktion proinflammatorischer Ceramide mit Fumonisin B1

Die bisher gewonnenen Daten der Fibroblastenbehandlung mit Dox waren vergleichbar mit den Daten aus den HL-1 Zellen. Um die Rolle der Ceramide bei Dox- vermittelter Kardiomyopathie weiter zu erforschen und zu verifizieren, wurden die Zellen mit Fumonisin B1 (FuB) für 4h vorinkubiert. FuB ist ein unspezifischer CerS- Inhibitor, welcher zu einer Reduktion der proinflammatorischen Ceramide führt. Durch die Reduktion der Ceramide sollte überprüft werden, inwieweit die negativen Effekte von Dox von erhöhten Ceramiden verursacht wurden und ob diese durch Reduktion der Ceramide reversibel waren.

Nach der Austestung verschiedener Konzentrationen und Inkubationsbedingungen wurde sich für eine Konzentration von 100 µM FuB und einer Präinkubationszeit von 4h mit nachfolgender Dox- Inkubation entschieden. Da die höchste bisher eingesetzte Konzentration von Dox die stärksten Effekte gezeigt hat, wurde 0,7 µM Dox ebenfalls für die FuB Experimente eingesetzt. Die Lösungsmittelkontrolle von FuB war 0,1% DMSO und die Kontrollzellen wurden erst mit 0,1% DMSO (4h) und anschließend mit 0,1% H₂O (24h) inkubiert. Die jeweiligen FuB Daten wurden auf 0,1% H₂O normalisiert, falls nicht anders angegeben.

Die Massenspektrometrie zeigte immer noch eine Erhöhung der totalen Ceramide, jedoch war diese reduziert im Vergleich zu unbehandelten 0,7 μ M Dox Zellen. Die Klassifizierung der Ceramide in ihre individuellen Spezies, demonstrierte eine Rückkehr der meisten langkettigen und sehr langkettigen Ceramidlevel auf ein nicht signifikantes Niveau. C14 und C24 waren signifikant reduziert (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ceramidwerte nach 4h FuB Vorbehandlung, gefolgt von 24h 0,7 μ M Dox.

	Totale Ceramide (C _{14-24:1})	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{20:0}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}
0,1% DMSO + 0,1% H ₂ O	1,0 \pm 0,18	1,0 \pm 0,32	1,0 \pm 0,49	1,0 \pm 0,13	1,0 \pm 0,33	1,0 \pm 0,13	1,0 \pm 0,14	1,0 \pm 0,22	1,0 \pm 0,20
100 μ M FuB + 0,7 μ M Dox	0,99 \pm 0,11 (p=0,86)	0,61 \pm 0,39 (p=0,01)	1,34 \pm 0,09 (p=0,08)	0,97 \pm 0,09 (p=0,62)	0,76 \pm 0,41 (p=0,16)	1,01 \pm 0,09 (p=0,90)	1,02 \pm 0,13 (p=0,81)	0,72 \pm 0,17 (p=0,006)	0,92 \pm 0,14 (p=0,37)

Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test (p<0,05) berechnet.

Kohärent zu der Reduktion der Ceramide verhielt sich die MitoSOX- Messung. Auch hier waren die mitochondrialen ROS- Level trotz der Vorbehandlung mit FuB (1,61 \pm 0,29, p<0,001) im Vergleich zu 0,1% H₂O (1,0 \pm 0,19) signifikant erhöht. Die gemessene Erhöhung war jedoch signifikant reduziert im Vergleich zu den nicht vorbehandelten 0,7 μ M Dox Zellen (3,41 \pm 0,10, p<0,001) (Abb. 25).

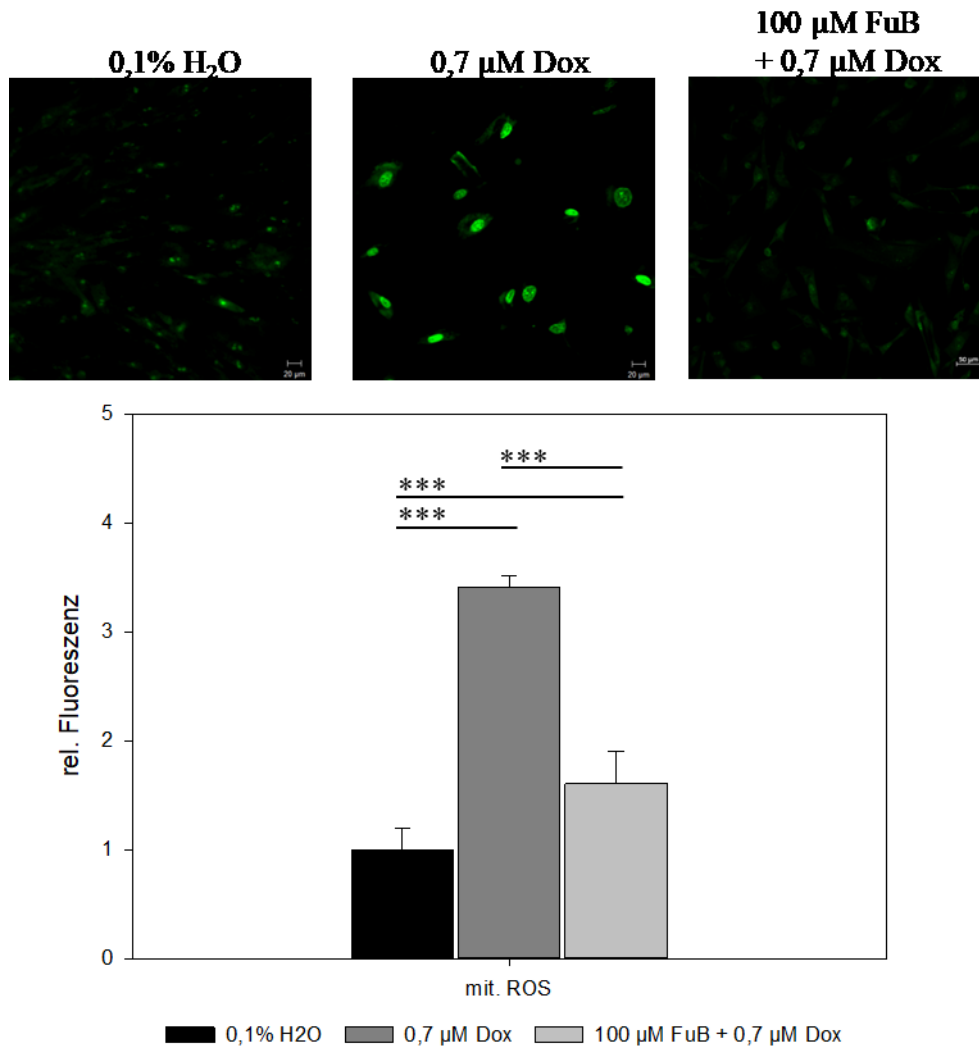


Abb.25: Mitochondriale ROS-Level in hFSF gemessen mit MitoSOX und LSM. Die Bilder zeigen eine representative Messung. Im Diagramm dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Weiterhin wurden erneut die Genexpressionen der Mitofusions- und Fissionsgene gemessen, um zu überprüfen, ob die Reduktion von Ceramiden und mitochondrialen ROS Level positive Effekte auf die Mitochondrienstruktur hat (Tabelle 21). Die qPCR zeigte keine Verbesserung der Mitofusionsgene *MFN1*, *MFN2* und *OPA1*. Auch das Fissionsgen *DRP1* blieb reduziert. Die zuvor unveränderten Expressionen der Fissionsgene *Mff* und *FIS1* waren unter der Verwendung von FuB signifikant zu 0,1% H₂O reduziert. Zusätzlich waren beide Gene auch signifikant zu 0,7 μM Dox ($p = 0,03$ für *Mff*, $p = 0,02$ für *FIS1*) reduziert.

Die erneute Messung der Metabolismus- assoziierten Gene zeigte überwiegend keine Verbesserung der getesteten Gene, mit Ausnahme von *DGAT2* (Tabelle 22). Hier führte die Vorbehandlung mit FuB zu einer Rückkehr der *DGAT2* Expression auf nicht- signifikantes Niveau.

Tabelle 21: mRNA Expressionen der Mitofusions und -fissionsgene

	0,1% H₂O	0,7 µM Dox	100 µM FuB + 0,7 µM Dox
MFN1	1,0 ± 0,09	0,80 ± 0,14 (p=0,007)	0,73 ± 0,22 (p=0,002)
MFN2	1,0 ± 0,28	6,79 ± 0,40 (p<0,001)	5,9 ± 0,23 (p<0,001)
OPA1	1,0 ± 0,16	0,66 ± 0,18 (p=0,002)	0,51 ± 0,26 (p<0,001)
DRP1	1,0 ± 0,19	0,74 ± 0,21 (p=0,03)	0,64 ± 0,12 (p=0,002)
Mff	1,0 ± 0,18	0,90 ± 0,16 (p=0,26)	0,63 ± 0,29 (p=0,03)
FIS1	1,0 ± 0,15	0,89 ± 0,14 (p=0,19)	0,68 ± 0,10 (p<0,001)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

Tabelle 22: mRNA Expressionen verschiedener Metabolismus assoziierter Gene

	0,1% H₂O	0,7 µM Dox	100 µM FuB + 0,7 µM Dox
DGAT1	1,0 ± 0,30	2,65 ± 0,25 (p<0,001)	3,24 ± 0,47 (p=0,006)
DGAT2	1,0 ± 0,29	1,95 ± 0,22 (p=0,004)	1,37 ± 0,24 (p=0,16)
ATGL	1,0 ± 0,38	3,02 ± 0,18 (p<0,001)	2,26 ± 0,33 (p=0,001)
CD36	1,0 ± 0,58	4,02 ± 0,53 (p<0,001)	3,35 ± 0,54 (p=0,002)
CPT1B	1,0 ± 0,40	0,28 ± 0,38 (p=0,005)	0,19 ± 0,82 (p=0,002)
PDK4	1,0 ± 0,25	0,55 ± 0,35 (p=0,01)	0,46 ± 0,40 (p=0,008)
GDH	1,0 ± 0,15	0,89 ± 0,35 (p=0,52)	0,84 ± 0,27 (p=0,23)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

Zusätzlich ergab die Messung der mitochondrialen ATP- Produktion keine Verbesserung der Oxygen Consumption Rate (OCR) unter der Verwendung von FuB ($0,23 \pm 0,70$) im Vergleich zu 0,1% H₂O ($1,0 \pm 0,19$, $p < 0,001$) oder 0,7 μ M Dox ($0,31 \pm 0,44$, $p < 0,001$) (Abb. 26).

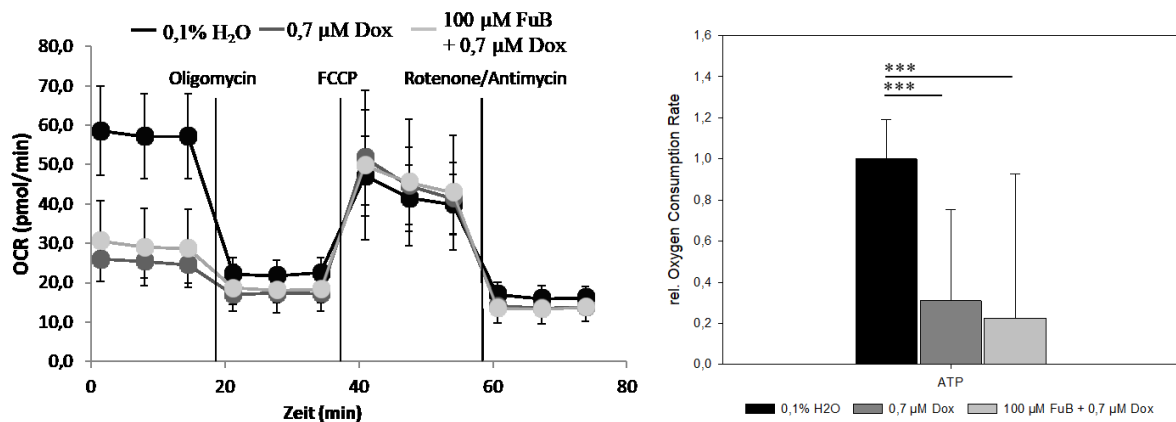


Abb. 26: Mitochondriale ATP Produktion gemessen mit Seahorse Analysis in hFSF. Links dargestellt ist eine von 3 repräsentativen Messungend der FuB- Vorinkubation und anschließender Dox- Behandlung. Vertikale Linien signalisieren den Zugabezeitpunkt des entsprechenden Inhibitors. Graphisch abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen 3 biologische Replikate. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

6.3.7 Verringerung der Apoptose durch FuB

Das Verhältnis der gespaltenen Caspase 9/Caspase 9 (Cleav.Casp 9/Casp 9) wurde ebenfalls für 100 μ M FuB + 0,7 μ M Dox bestimmt (Abb. 27). Die Vorinkubation mit FuB reduziert das Verhältnis auf ein nicht signifikantes Niveau ($2,0 \pm 0,33$, $p = 0,41$) im Vergleich zu 0,1 % H₂O ($1,0 \pm 0,51$). Zusätzlich war die Vorinkubation signifikant zu 0,7 μ M Dox erniedrigt ($p = 0,03$)

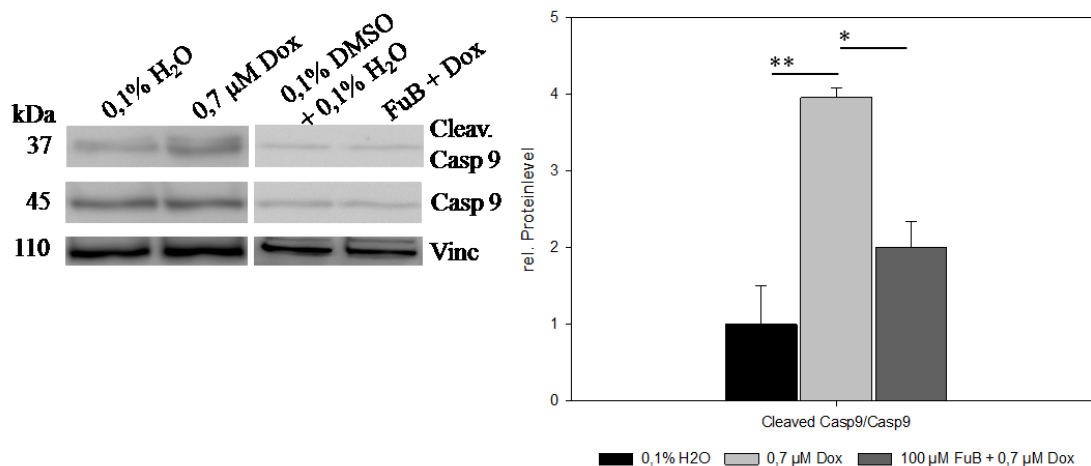


Abb. 27: Dargestellt ist einer von 3 repräsentativen Western Blots zur Detektion von gespaltener (Cleav.Casp 9) und ungespaltener Caspase 9 (Casp 9). Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten der cleav. Casp 9/Casp 9- Ratio dargestellt. Signifikanz wurde mit t- Test ($p < 0,05$) berechnet.

6.3.8 Reduktion Fibrose- assoziierter mRNA Expressionen durch FuB

Es wurden erneut die Fibrose- assoziierten Gene gemessen, um die positiven Effekte der Ceramidreduktion auf die Fibrose zu untersuchen (Tabelle 23,24).

FuB reduzierte die mRNA Expressionen auf nicht ein nicht signifikantes Niveau. Zusätzlich reduzierte FuB die Expression von MMP8 ($p = 0,002$) signifikant im Vergleich zu 0,7 µM Dox.

FuB hatte keinen Einfluss auf die *TIMP1* Expression, welche immer noch erhöht war, reduzierte aber die *TIMP2* Expression zurück auf 0,1% H₂O Level (Tabelle 24). Zusätzlich war die *TGF-β* Expression nicht länger erhöht. Die Vorbehandlung mit FuB hatte keinen Einfluss auf die *Vim* und *DDR2* Expression.

Tabelle 23: mRNA Expressionslevel verschiedener MMPs nach 4h FuB und 24h 0,7 μ M Dox.

	0,1% H₂O	0,7 μM Dox	100 μM FuB + 0,7 μM Dox
MMP8	1,0 \pm 0,31	3,50 \pm 0,23 (p<0,001)	1,47 \pm 0,32 (p=0,11)
MMP9	1,0 \pm 0,23	3,22 \pm 0,52 (p=0,007)	1,64 \pm 0,53 (p=0,13)
MMP14	1,0 \pm 0,21	1,41 \pm 0,29 (p=0,03)	1,12 \pm 0,41 (p=0,55)

Tabelle 24: mRNA Expressionslevel Fibrose- assoziierter Gene nach 4h FuB und 24h 0,7 μ M Dox.

	0,1% H₂O	0,7 μM Dox	100 μM FuB + 0,7 μM Dox
TIMP1	1,0 \pm 0,26	1,41 \pm 0,14 (p=0,03)	1,63 \pm 0,21 (p=0,009)
TIMP2	1,0 \pm 0,17	1,60 \pm 0,14 (p=0,003)	1,19 \pm 0,24 (p=0,28)
TGF- β	1,0 \pm 0,29	1,80 \pm 0,24 (p=0,02)	0,99 \pm 0,50 (p=0,96)
Vim	1,0 \pm 0,09	0,71 \pm 0,17 (p=0,003)	0,36 \pm 0,55 (p<0,001)
DDR2	1,0 \pm 0,17	0,60 \pm 0,05 (p=0,008)	0,37 \pm 0,52 (p=0,003)

6.4 CerS2 Überexpression in hFSF

Die Daten aus hFSF sind vergleichbar mit denen der HL-1 Zellen. Die Ergebnisse implizieren eine Korrelation zwischen der Erhöhung von langkettigen Ceramiden und den Effekten von Dox. Aus diesem Grund wurde das initial designte CerS2- Überexpressionsplasmid, welches auch schon bei den HL-1 Zellen verwendet wurde, in die Fibroblasten transfiziert (Abb. 13). Dadurch sollte die Rolle von CerS2 und erhöhten Ceramiden bei der Dox-vermittelten Kardiotoxizität weiter untersucht und spezifiziert werden. Die Transfektion wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt. Der Transfektionserfolg wurde mit Immunfluoreszenz und Western Blot überprüft.

6.4.1 Transfektion humaner Fibroblasten und Evaluation mittels Western Blot und Immunfluoreszenz

Humane Fibroblasten wurden mit den vorher amplifizierten und getesteten Plasmiden FLAG-TK und FLAG-CerS2 unter der Verwendung von Lipofektamin 3000 für 24h transfiziert. Die Überexpression wurde erneut mit Immunfluoreszenz (Abb. 28) und Western Blot (Abb. 29) überprüft.

Immunfluoreszenz zeigt die erfolgreiche spezifische Überexpression von CerS2 in hFSF (Abb. 28). Es konnte eine $1,58 \pm 0,10$ ($p < 0,001$) erhöhte Expression von CerS2 in FLAG-CerS2 im Vergleich zur FLAG-TK ($1,0 \pm 0,18$) nachgewiesen werden.

Diese Erhöhung konnte auch mit Western Blot bestätigt werden (Abb. 29). Der Western Blot zeigte eine $10,9 \pm 0,13$ ($p < 0,001$) fach erhöhte Expression von FLAG und eine $4,15 \pm 0,44$ ($p = 0,04$) fach erhöhte Expression von CerS2 für FLAG-CerS2 im Vergleich zu FLAG-TK ($1,0 \pm 0,31$ für FLAG, $1,0 \pm 0,23$ für CerS2).

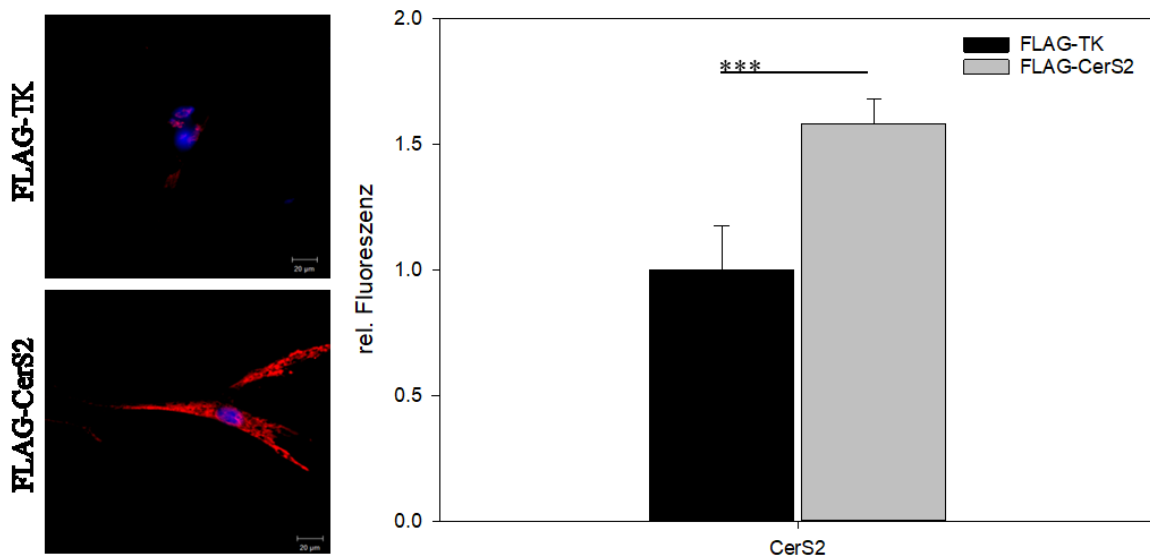


Abb. 28: Überexpression von CerS2 nachgewiesen mit Immunfluoreszenz. Humane Fibroblasten wurden für 24h mit FLAG-TK bzw. FLAG-CerS2 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und CerS2 (rot) und der Nukleus (blau) gefärbt. Visualisierung und Quantifizierung der roten Fluoreszenz geschah mit LSM. Dargestellt sind 2 repräsentative Bilder. Graphisch abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

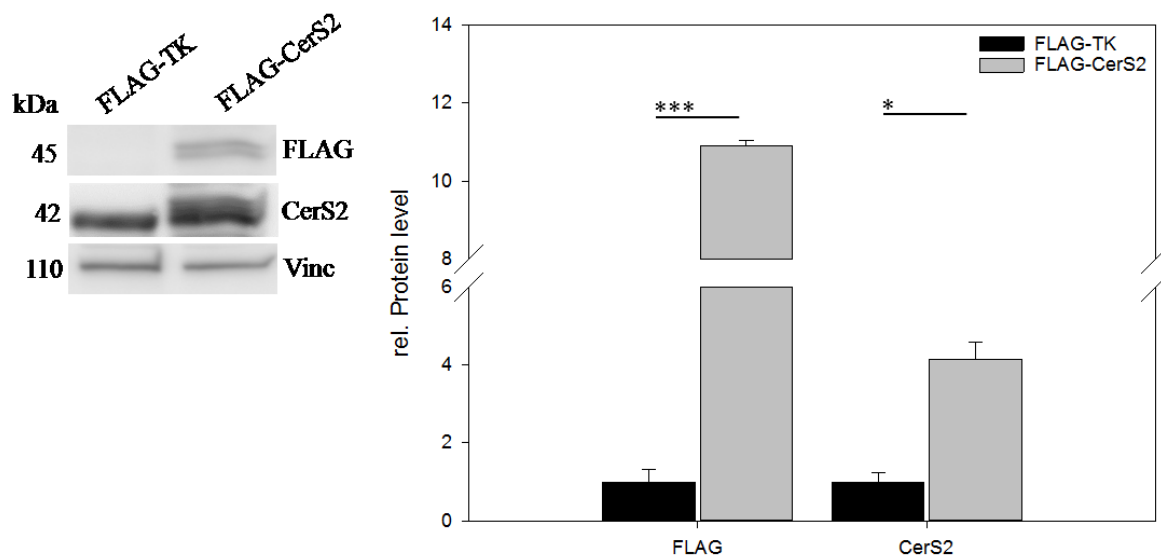


Abb. 29: Überexpression von CerS2 nachgewiesen mit Western Blot. hFSF wurden für 24h mit FLAG-TK bzw. FLAG-CerS2 transfiziert. Proteinexpression des Markerproteins FLAG und CerS2 wurde mit Western Blot gemessen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Graphisch abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

6.4.2 Ceramidkonzentrationen in FLAG-CerS2

Analog zu den Dox- behandelten Fibroblasten, wurden auch in den transfizierten Zellen die Ceramide mittels Massenspektrometrie gemessen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ceramidkonzentrationen in FLAG-CerS2.

	Ceramide (C ₁₄ -C _{24:1})	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{20:0}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}
FLAG-TK	1,0 ± 0,29	1,0 ± 0,36	1,0 ± 0,82	1,0 ± 0,16	1,0 ± 0,11	1,0 ± 0,19	1,0 ± 0,18	1,0 ± 0,29	1,0 ± 0,24
FLAG-CerS2	2,12 ± 0,08 (p=0,009)	1,32 ± 0,09 (p=0,30)	2,83 ± 0,09 (p=0,04)	2,27 ± 0,11 (p=0,004)	1,28 ± 0,12 (p=0,10)	2,90 ± 0,11 (p=0,002)	0,92 ± 0,06 (p=0,56)	2,89 ± 0,15 (p=0,006)	1,51 ± 0,02 (p=0,04)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

Vergleichbar mit der Dox- Behandlung führte die spezifische Überexpression von CerS2 ebenfalls zu einer Erhöhung aller langkettigen und sehr langkettigen Ceramide (Tabelle 23). Die totalen Ceramide waren höher in FLAG-CerS2 als in 0,7 µM Dox. Diese Erhöhung war auch bei den einzelnen Ceramidspezies nachweisbar. Die Überexpression führte nicht wie bei Dox zu einer Erhöhung aller gemessenen Ceramide. Es wurde keine Erhöhung der C14:0, C20:0 und C22:1 Ceramidspezies detektiert. Jedoch waren die Expressionen der jeweiligen Ceramide in FLAG-CerS2 immer höher als im direkten Vergleich mit 0,7 µM Dox. (Tabelle 15)

6.4.3 FuB reduziert durch FLAG-CerS2 erhöhte Ceramidkonzentrationen

FuB zeigte reduzierende Effekte bei der Dox- Behandlung in Bezug auf Ceramidwerte und Zellvitalität. Aufgrund dessen wurden die transfizierten Zellen ebenfalls mit 100 µM FuB für 4h vorinkubiert. Dies sollte weiter bestätigen, dass die beobachteten Effekte von Dox durch erhöhte CerS2- Level und Ceramide vermittelt werden. (Tabelle 24).

Die Massenspektrometrie zeigte eine Reduktion aller Ceramidspezies als auch totaler Ceramide auf ein nicht signifikantes Niveau. Vergleichbar mit den Werten aus Tabelle 20, war auch hier C14:0 signifikant erniedrigt.

Tabelle 24: Ceramidlevel transfizierter Fibroblasten nach 4h FuB und 24h FLAG-CerS2.

	Totale Ceramide (C _{14-24:1})	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{20:0}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}
0,1% DMSO + FLAG-TK	1,0 ± 0,34	1,0 ± 0,20	1,0 ± 0,32	1,0 ± 0,18	1,0 ± 0,13	1,0 ± 0,31	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,47	1,0 ± 0,40
100 µM FuB + FLAG-CerS2	0,85 ± 0,23 (p=0,42)	0,56 ± 0,25 (p=0,002)	0,90 ± 0,25 (p=0,59)	0,97 ± 0,16 (p=0,77)	1,10 ± 0,35 (p=0,57)	0,90 ± 0,23 (p=0,55)	1,03 ± 0,14 (p=0,66)	0,64 ± 0,35 (p=0,16)	0,92 ± 0,22 (p=0,56)

Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzen von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

6.4.4 CerS2- Überexpression führt zur mitochondrialen ROS- Erhöhung sowie zu strukturellen und funktionellen Mitochondrienschädigungen

Die Inkubation mit Dox zeigte eine Erhöhung mitochondrialer ROS- Produktion, welche zur Beeinträchtigung des weitverzweigten mitochondrialen Netzwerkes führte. Um zu überprüfen, ob diese Effekte aufgrund erhöhter langkettiger und sehr langkettiger Ceramide verursacht wurden, wurden die transfizierten Fibroblasten den gleichen Experimenten unterzogen. Zusätzlich wurden die FLAG-CerS2 Zellen mit FuB vorbehandelt, um eine Verbesserung der mitochondrialen Homöostase aufgrund reduzierter Ceramide zu analysieren.

Die Überexpression von CerS2 führte zur einer erhöhten mitochondrialen ROS- Produktion und war durch die Vorinkubation mit FuB reversibel (Abb. 30). Die MitoSox Messung zeigte eine Erhöhung der Fluoreszenz für FLAG- CerS2 ($1,6 \pm 0,12$, p<0,001) im Vergleich zu FLAG-TK ($1,0 \pm 0,15$). FuB reduzierte die mitochondrialen ROS-Level im Vergleich zu FLAG-TK ($0,87 \pm 0,18$, p<0,001) und FLAG-CerS2 (p<0,001)

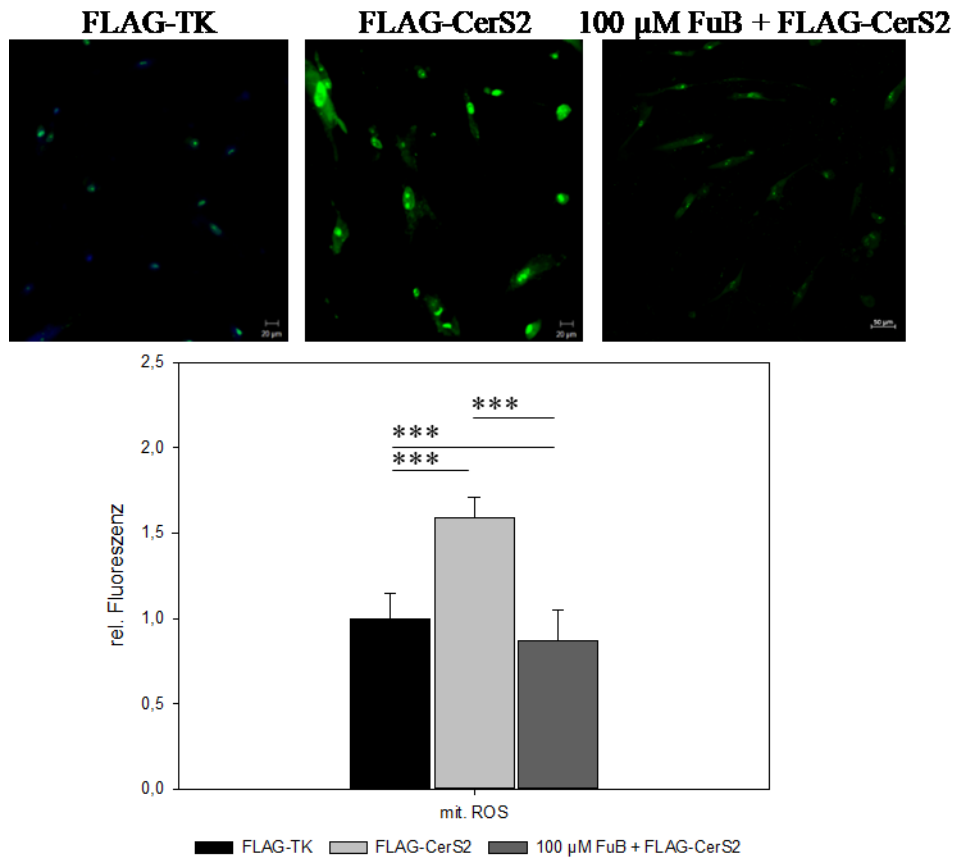


Abb. 30: Mitochondriale ROS- Produktion von FLAG-TK und FLAG-CerS ohne und mit FuB-Vorinkubation. Dargestellt ist eine von 3 repräsentativen ROS- Messungen. Graphisch abgebildet sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test ($p < 0,05$) berechnet.

Die Färbung mit MitoTracker zeigte ebenfalls erhebliche Rupturen der mitochondrialen Struktur im Vergleich zu FLAG-TK (Abb. 31 oben). Die Elektronenmikroskopie war ebenfalls durch eine pathologische Akkumulation multilamellarer Körper (rote Pfeile) charakterisiert (Abb. 31 unten). Diese Anhäufung spricht für eine gesteigerte Mitophagie.

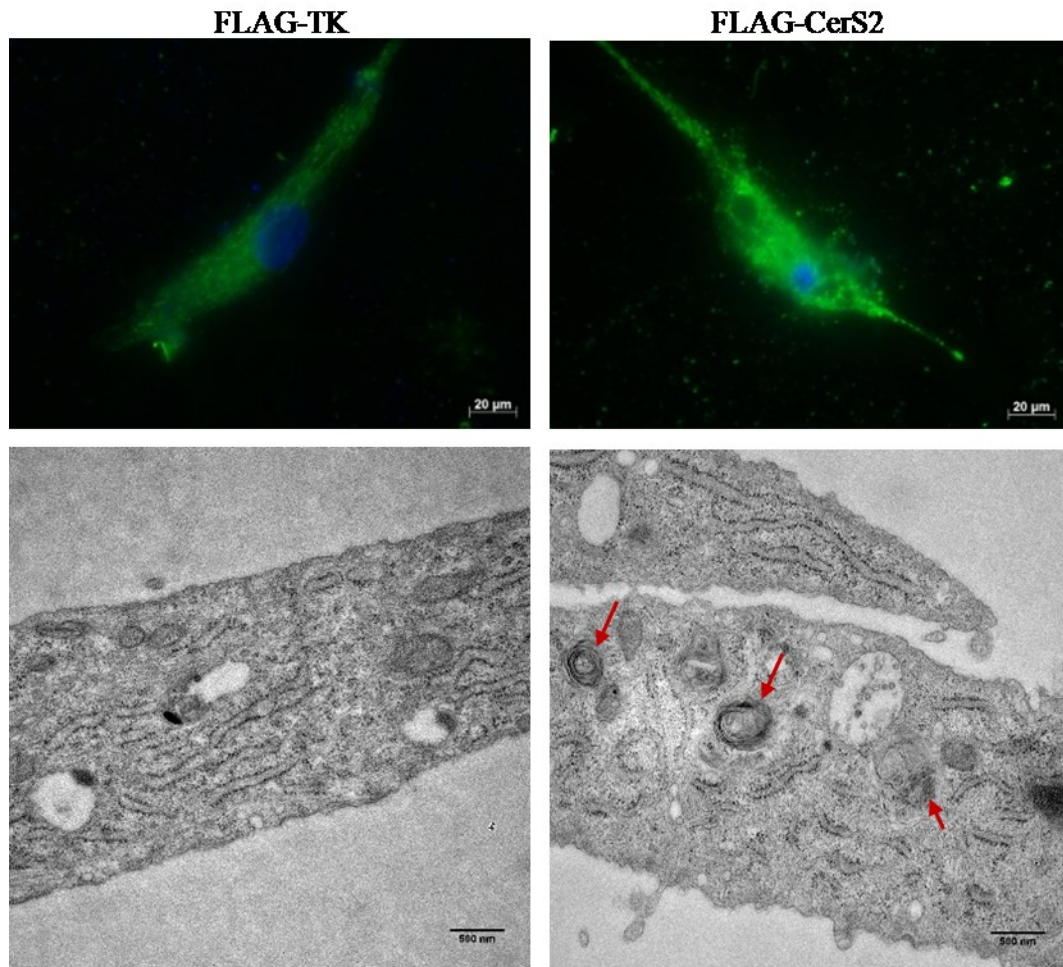


Abb. 31: Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie transfizierter Fibroblasten. Oben: Färbung der Mitochondrienstruktur mit MitoTracker (grün) und dem Zellkern (blau). Unten: Elektronenmikroskopie transfizierter Fibroblasten mit 20000- facher Vergrößerung. Rote Pfeile markieren multilamellare Körper.

Auf mRNA- Ebene konnte mittels qPCR eine signifikante Expressionserniedrigung der Fusionsgene *MFN1* und *MFN2* nachgewiesen werden. *OPA1* zeigte keine Änderung. Die Vorinkubation mit FuB führte zu einer signifikanten Erniedrigung von *MFN1* und *OPA1*. Die *MFN2* Expression kehrte auf ein nicht signifikantes Level zurück.

Die Fissionsgene *DRP1* und *FIS1* zeigten ebenfalls keine Veränderung in FLAG-CerS2. *Mff* war signifikant reduziert. Auch hier zeigte die Vorinkubation mit FuB eine Reduktion aller 3 gemessenen Mitofissionsgene (Tabelle 25).

Tabelle 25: mRNA Level der Mitofusions- und -fissionsgene mit und ohne FuB.

	MFN1	MFN2	OPA1	DRP1	Mff	FIS1
FLAG-TK	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,11	1,0 ± 0,08	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,06	1,0 ± 0,07
FLAG-Cers2	0,86 ± 0,07 (p=0,04)	0,68 ± 0,10 (p=0,02)	0,82 ± 0,13 (p=0,13)	0,89 ± 0,05 (p=0,06)	0,80 ± 0,06 (p=0,02)	0,88 ± 0,10 (p=0,21)
100 µM FuB + FLAG-CerS2	0,30 ± 0,21 (p<0,001)	1,13 ± 0,31 (p=0,63)	0,51 ± 0,15 (p=0,003)	0,44 ± 0,22 (p=0,002)	0,72 ± 0,07 (p=0,006)	0,63 ± 0,06 (p=0,003)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Mittels Seahorse Analysis konnte eine Verringerung der mitochondrialen ATP-Produktion auf $0,82 \pm 0,10$ ($p=0,003$) in FLAG-CerS2 im Vergleich zu FLAG-TK ($1,0 \pm 0,15$) nachgewiesen werden (Abb. 32a). Die mitochondriale ATP-Produktion kehrte durch Vorinkubation mit FuB auf ein nicht signifikantes Niveau zurück ($1,0 \pm 0,20$ für 0,1% DMSO + FLAG-TK, $0,97 \pm 0,36$, $p=0,89$ für 100 µM FuB + FLAG-CerS2). (Abb. 32b)

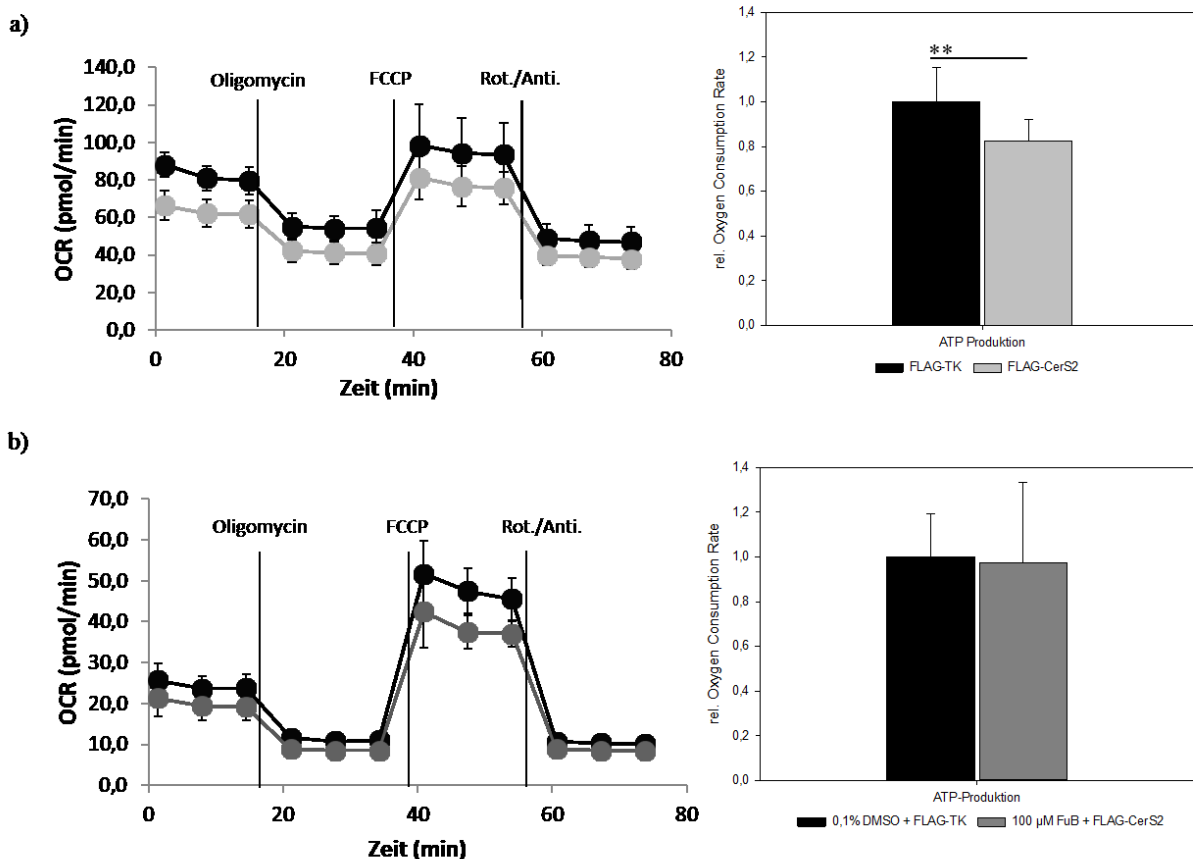


Abb. 32. Messung mitochondrialer ATP-Produktion mit Seahorse Analysis. **a)** Dargestellt ist eine repräsentative Seahorse Messung. Graphisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung 3 biologischer Replikate. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$). **b)** Dargestellt ist eine repräsentative Seahorse Messung von FLAG-TK und FLAG-CerS2 mit FuB Vorbehandlung. Graphisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung 3 biologischer Replikate. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet ($p < 0,05$).

Zusätzlich wurde auch die Expression der bereits vorher aufgelisteten Metabolismus-assoziierten Gene mittels qPCR bestimmt (Tabelle 26). Die qPCR zeigte eine signifikante Erhöhung von *CD36* in FLAG-CerS2, welche reversibel durch die Vorinkubation mit FuB war. Zusätzlich war die Expression von *CD36* in 100 µM FuB + FLAG-CerS2 signifikant erniedrigt im Vergleich zu FLAG-CerS2 (p=0,01). Die mRNA Expression von *DGAT2* war reduziert in FLAG-CerS2 und reversibel durch die FuB Vorinkubation. Weder die CerS2-Überexpression noch die Vorbehandlung mit FuB hatten Einfluss auf die *DGAT1*, *ATGL*, *PDK4* und *GDH* Expressionen. *CPT1B* Expression war erniedrigt in FLAG-CerS2 und blieb erniedrigt unter FuB- Vorbehandlung. *GDH* zeigte keine Expressionsänderungen.

Tabelle 26: mRNA- Level Metabolismus assoziierter Gene in FLAG-CerS2 mit und ohne FuB.

	DGAT1	DGAT2	ATGL	CD36	CPT1B	PDK4	GDH
FLAG-TK	1,0 ± 0,21	1,0 ± 0,21	1,0 ± 0,24	1,0 ± 0,84	1,0 ± 0,38	1,0 ± 0,38	1,0 ± 0,24
FLAG-Cers2	1,03 ± 0,19 (p=0,83)	0,66 ± 0,31 (p=0,04)	1,20 ± 0,37 (p=0,26)	3,61 ± 0,26 (p<0,001)	0,42 ± 0,65 (p=0,02)	0,86 ± 0,23 (p=0,47)	0,92 ± 0,23 (p=0,58)
100 µM FuB + FLAG-CerS2	0,67 ± 0,03 (p=0,06)	0,40 ± 0,44 (p=0,007)	0,79 ± 0,05 (p=0,20)	1,24 ± 0,53 (p=0,69)	0,24 ± 0,67 (p=0,03)	0,85 ± 0,56 (p=0,67)	0,71 ± 0,16 (p=0,22)

Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test (p<0,05) berechnet.

6.4.5 CerS2- Überexpression initiiert die Mitochondrien- vermittelte Apoptose

Um die Auswirkungen der Mitochondrienschädigung auf die Zellvitalität zu charakterisieren, wurde die Induktion der Apoptose in Form von Cytochrom C- Delokalisation ins Cytoplasma mit LSM und das Verhältnis von Cleav.Casp 9/Casp 9 mit Western Blot gemessen (Abb. 33). Immunfluoreszenz zeigte erhöhte Cytochrom C- Level im Zytoplasma in FLAG-CerS2 im Vergleich zu FLAG-TK (Abb. 33a). Weiterhin konnte mittels WB ein erhöhtes Cleav.Casp9/Casp9 Verhältnis (1,34 ± 0,10, p=0,01) detektiert werden. Die Vorinkubation mit FuB reduzierte das Verhältnis in 100 µM FuB + FLAG- CerS2 auf ein nicht signifikantes Level (0,88 ± 0,49, p=0,14). (Abb. 33b)

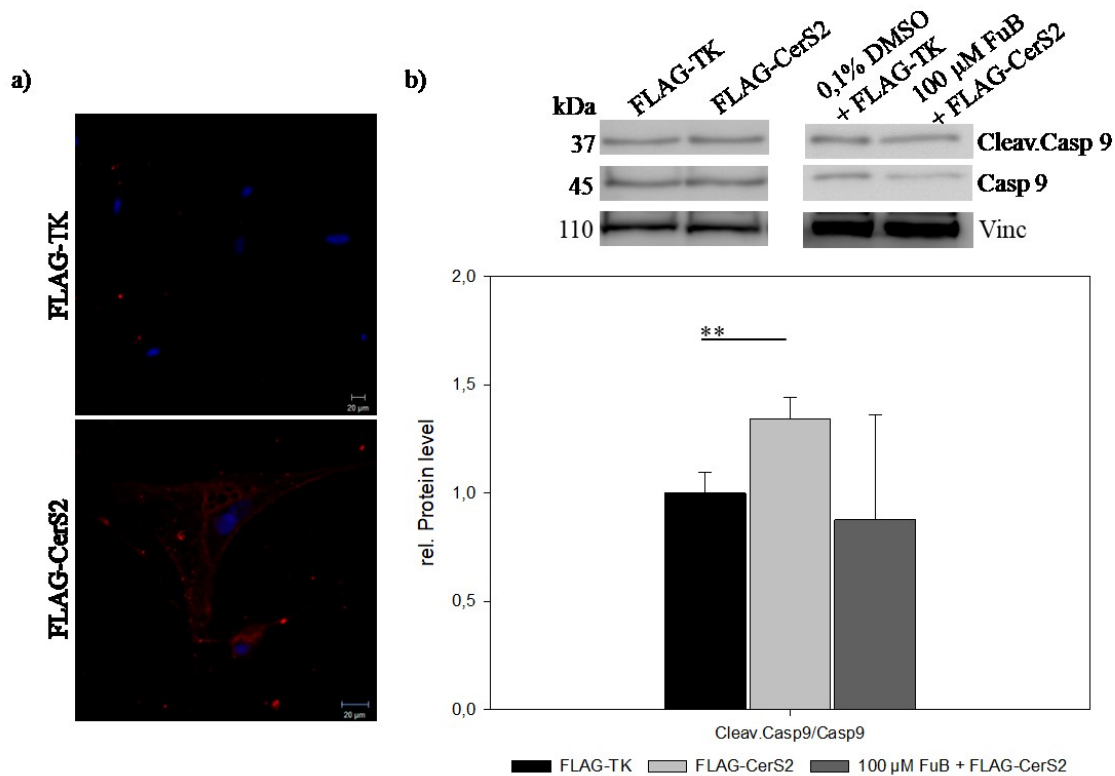


Abb. 33: Immunfluoreszenz und Western Blot Apoptose- assoziierter Proteine. **a)** Dargestellt ist eine repräsentative Cytochrom C- Färbungen (rot) und des Zellkerns (blau) **b)** Abgebildet sind repräsentative Western Blots zur Detektion von gespaltener (Cleav.Casp 9) und ungespaltener Caspase 9 (Casp 9). Graphisch dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t- Test ($p < 0,05$) berechnet.

6.4.6 Erhöhte Ceramide erhöhen mRNA-Level von MMP9 aber nicht die Konzentration im Zellüberstand

Die Dox- Behandlung zeigte einen begünstigenden Effekt auf die Fibrose in Form von Expressionserhöhungen der entsprechenden Gene (Tabelle 18, 19). Um zu bestimmen, ob diese Effekte durch erhöhte Ceramide verursacht wurden, wurden CerS2 transfizierte Fibroblasten mit den gleichen Methoden getestet (Tabelle 27,28). Die qPCR zeigte eine signifikante Erhöhung von *MMP8* in FLAG-CerS2 und eine erhöhte Tendenz für *MMP9*. Durch die Vorbehandlung mit FuB konnte keine *MMP8* und *MMP9* Expression mehr detektiert werden.

Alle anderen getesteten Gene zeigten keine Expressionsänderungen. *TGF-β* zeigte eine erhöhte Tendenz in FLAG-CerS2.

Die Vorbehandlung mit FuB zeigte eine signifikante Erhöhung von *TGF-β* und eine signifikante Erniedrigung von *DDR2*, welche vorher nicht nachweisbar waren.

Tabelle 27: mRNA-Expressionslevel von MMPs in FLAG-CerS2 mit und ohne FuB.

	MMP8	MMP9	MMP14
FLAG-TK	1,0 ± 0,17	1,0 ± 0,36	1,0 ± 0,33
FLAG-CerS2	2,55 ± 0,53 (p=0,03)	1,45 ± 0,69 (p=0,36)	0,91 ± 0,20 (p=0,66)
100 µM FuB + FLAG-CerS2	n.d.	n.d.	7,2*10 ⁻⁵ ± 0,16 (p=0,004)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05). n.d.= nicht detektierbar

Tabelle 28: mRNA Expressionslevel Fibrose- assoziierter Gene in FLAG-CerS2 mit und ohne FuB

	TIMP1	TIMP2	TGF-β	Vim	DDR2
FLAG-TK	1,0 ± 0,40	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,18	1,0 ± 0,37	1,0 ± 0,15
FLAG-CerS2	1,09 ± 0,52 (p=0,84)	0,93 ± 0,19 (p=0,55)	1,23 ± 0,36 (p=0,46)	0,90 ± 0,49 (p=0,66)	0,95 ± 0,22 (p=0,71)
100 µM FuB + FLAG-CerS2	1,29 ± 0,07 (p=0,36)	0,96 ± 0,14 (p=0,71)	1,72 ± 0,19 (p=0,03)	0,63 ± 0,11 (p=0,16)	0,61 ± 0,23 (p=0,02)

Tabellarisch dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test berechnet (p<0,05).

Ebenfalls wurde der Zellkulturüberstand von FLAG-Cers2 hFSF auf veränderte Konzentrationen von MMP8 und MMP9 mit ELISA untersucht (Abb. 34). ELISA zeigte eine signifikante Erniedrigung von MMP8 ($0,93 \pm 0,08$, $p=0,04$) im Vergleich zu FLAG-TK ($1,0 \pm 0,09$). Für MMP9 ($1,02 \pm 0,11$) war keine veränderte Konzentration nachweisbar ($1,0 \pm 0,10$ für FLAG-TK).

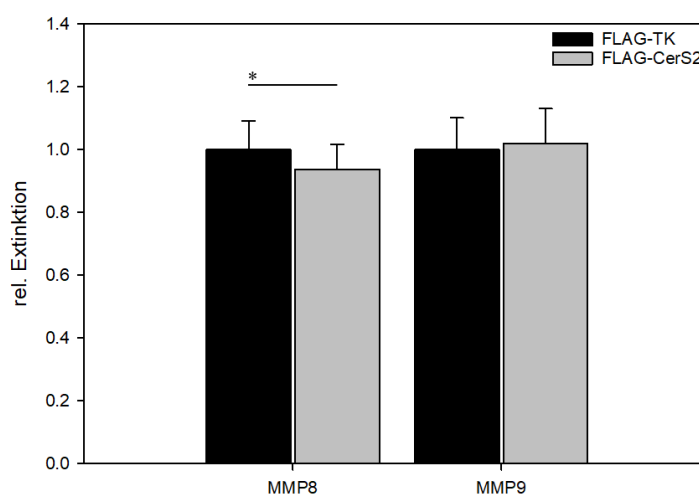


Abb. 34: Extinktionslevel von MMP8 und MMP9 im Zellüberstand transfizierter Fibroblasten gemessen mit ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte, Standardabweichungen von jeweils 3 biologischen Replikaten. Signifikanz wurde mit t-Test (p<0,05) berechnet.

7 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von erhöhten Ceramiden in Dox vermittelter Kardiotoxizität und Fibrose. Die vollständigen Ursachen dieser Kardiotoxizität sind bis heute noch nicht ausreichend geklärt. Obwohl bereits sehr viel über die Wirkungsweise dieses Chemotherapeutikums bekannt ist, werden erhöhte Ceramide überwiegend als weitere Nebenwirkung betrachtet, jedoch nicht als Beiträge der negativen Effekte von Dox. Deshalb wurde hier versucht, eine mögliche Korrelation und Kausalität zwischen den von Dox erhöhten Ceramiden und den v.a. metabolischen Veränderungen herzustellen.

Aus diesem Grund wurden sowohl murine Kardiomyozyten, da keine humanen Analoga zur Verfügung standen, als auch humane Fibroblasten mit aufsteigenden Konzentrationen von Dox behandelt. Das hatte den Vorteil, nicht nur die Auswirkungen auf die Kardiotoxizität, sondern auch auf die Fibrose zu untersuchen. Parallel dazu, wurden die humanen Fibroblasten mit einem Ceramidsynthase 2- überexprimierenden Plasmid transfiziert um eine Kausalität zwischen spezifisch erhöhten langkettigen und sehr langkettigen Ceramiden und den Effekten von Dox herzustellen.

Zusätzlich wurden der unspezifische Ceramidsynthase Inhibitor Fumonisin B1 bei den Fibroblasten eingesetzt, um die erhöhten Ceramidwerte wieder zu reduzieren. Das ermöglichte es zu untersuchen, ob die beobachteten negativen Effekte reversibel waren, welches die vermutete Kausalität weiter bestätigte.

7.1 Effekte von Dox auf Ceramidsynthese

Initial wurden alle Daten in murinen Kardiomyozyten akquiriert. Aufgrund des Verlaufs der Experimente und bestimmten Entwicklungen, wurden die Experimente und Daten in humanen Fibroblasten wiederholt und erweitert. In beiden verwendeten Zelllinien wurde sich primär auf die Ceramidsynthese und den sich daraus ergebenden Folgen für Metabolismus und Zellvitalität fokussiert.

Dox führt sowohl in HL-1 als auch hFSF zu einer Erhöhung der CerS2 in dosisabhängiger Art und Weise.

Kohärent zu der Erhöhung von CerS2, waren auch die entsprechenden langkettigen und sehr langkettigen Ceramide dosisabhängig erhöht. Dabei konnten signifikante Erhöhungen bei jeder der getesteten Ceramidspezies ab einer Konzentration von 0,25 µM Dox nachgewiesen

werden, welche bei 0,01 μM Dox nur teilweise auftrat. Interessanterweise gab es bei 0,4 μM Dox teilweise höhere Werte als bei 0,7 μM Dox. Das kann mit der jeweiligen Ceramidspezies und deren Funktion bzw. direkter Synthese zusammenhängen. Auch sind altersbedingte Effekte der Zellen nicht auszuschließen. So konnten Variationen der Ceramidexpression mit zunehmender Passage beobachtet werden, die ebenfalls Einfluss haben könnten. Außerdem könnten gewisse „Plateau- Phasen“ und Gegenregulationen der Ceramidsynthese eine Rolle spielen, sodass, nachdem ein bestimmtes Limit erreicht ist, diese Ceramidwerte nicht weiter ansteigen bzw. auch wieder rückläufig sind. Die möglichen Ursachen für die Variationen zwischen 0,4 μM Dox und 0,7 μM Dox sind vielseitig und zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig identifizierbar, dennoch ist der fördernde ceramidproduzierende Effekt von Dox klar ersichtlich und eindeutig.

Der verwendete Inhibitor FuB reduzierte die gemessenen totalen Ceramide in humanen Fibroblasten (Tabelle 20). Die einzelnen Ceramidspezies kehrten auf ein nicht signifikantes Level zurück oder waren reduziert (C14, C24). Die Massenspektrometrie bestätigte somit die positiven Effekte von FuB auf die zuvor gemessene Erhöhung proinflammatorischer Ceramide durch Dox.

7.2 Mitochondrienschädigung in Struktur und Funktion durch erhöhte mitochondriale ROS-Level verursacht durch Ceramide

Von primärem Interesse waren die Auswirkungen erhöhter Ceramide auf die Mitochondrienfunktion. Ein guter Indikator, um eine durch Ceramidakkumulation verursachte Inflammation nachzuweisen, sind mitochondriale ROS- Level. Dafür wurde zur Visualisierung mitochondrialer ROS- Level MitoSOX eingesetzt, dessen grüne Fluoreszenzintensität direkt proportional zu den vorhandenen mitochondrialen ROS ist. Durch die Färbung mit MitoSOX, konnte eine dosisabhängige Erhöhung mitochondrialer ROS- Level in beiden verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden, mit der jeweils höchsten Expression bei 0,7 μM Dox. Bei der geringsten Konzentration von 0,01 μM Dox war bei hFSF noch keine signifikant erhöhten ROS-Level detektierbar, wie es unter gleichen Bedingungen bei den HL-1 Zellen der Fall war. Das lässt vermuten, dass humane Fibroblasten resistenter auf geringere Konzentrationen von Dox reagieren als murine Kardiomyozyten. Dennoch ist der ansteigende Inflammationscharakter von Dox klar erkenn- und nachweisbar. Die Effekte von Dox sind hier eindeutig und unabhängig von Zelllinie, Passage oder methodischen Variationen. Die Reduktion der Ceramide durch FuB hatte einen positiven

Effekt auf die zuvor erhöhten ROS- Level in hFSF. So waren die mitochondrialen ROS- Level zwar immer noch erhöht, jedoch im Vergleich zu nur mit Dox behandelten Fibroblasten erniedrigt. Weiterhin konnten mitochondriale ROS- Level auch mit dem mitochondrialen ROS- Scavenger MitoTempo in HL-1 erniedrigt werden.

ROS, sowohl zellulären als auch mitochondrialen Ursprungs, sind wichtige und essenzielle *second messenger* und werden auf verschiedenen Wegen synthetisiert. Jedoch sind erhöhte Konzentrationen zellschädigend (Murphy 2009, Jezek et al. 2018). Aufgrund der diversen Synthetisierungswege ist es schwer eine eindeutige Quelle der ROS- Level unter pathologischen Bedingungen zu identifizieren. Aufgrund dessen, ist es momentan nicht möglich präzise zu sagen, wie Dox die mitochondrialen ROS- Produktion fördert und ROS- Level erhöht. Eine Möglichkeit wäre ein durch Dox verursachter und gesteigerter Calciumefflux vom endoplasmatischen Retikulum in die Mitochondrien, welcher zur erhöhten ROS- Produktion führt (Gorski et al. 2015).

Eine weitere Möglichkeit, ist die Verringerung von mitochondrialen ROS- Scavengern, wie NAD^+ . Während der ATP- Synthese in der Atmungskette entstehen viele Sauerstoffradikale, welche unter physiologischen Bedingungen durch, unter anderem, NAD^+ gebunden und abgefangen (*engl. to scavenge*) werden. Durch die Schädigung der Mitochondrien und der dadurch verursachten Beeinträchtigung der Scavenger- Funktion kommt es zur Akkumulation mitochondrialer ROS- Level. Es muss weiter untersucht werden, ob die Akkumulation mitochondrialer ROS die Mitochondrien primär schädigt, oder ob die Schädigung der Mitochondrien die gesteigerte ROS- Produktion zur Folge hat.

7.3 Beeinträchtigung der mitochondrialen Homöostase durch Dox erhöhte Ceramide

Die Akkumulation von mitochondrialen ROS, vermittelt durch Dox, schädigt die mitochondriale Struktur (Abb. 10, 20, 21, Tabelle 16). Physiologisch ist die mitochondriale Struktur charakterisiert durch ein weit verzweigtes Netzwerk miteinander fusionierter einzelner Mitochondrien, welches sich über die ganze Zelle erstreckt. Unter der Einwirkung von Dox wird diese Struktur zunehmend beeinträchtigt. Bei der am höchsten verwendeten Konzentration, war die komplette Struktur eruptiert und nur noch punktuell identifizierbar (Abb. 10, 20). Zusätzlich wurde dieser Effekt auch mit Elektronenmikroskopie exemplarisch bei 0,4 μM Dox in den Fibroblasten bestätigt (Abb. 21). In den mit Dox behandelten Zellen ist eine pathologische Akkumulation multilamellarer Körper (schwarze Pfeile) identifizierbar, welche nicht bzw. nur vereinzelt in 0,1% H_2O sichtbar waren. Besonders ist hier ein frühes

Autophagosom oder auch frühe Lysosom hervorzuheben (Abb. 21, roter Pfeil). Dieses hat gerade ein Mitochondrium eingekapselt und wird es im weiteren Lauf der Signalkaskade verdauen. Am Ende entsteht ein weiterer multilamellarer Körper, welcher auch als spätes Lysosom bezeichnet wird. Das vermehrte pathologische Auftreten von frühen und späten Lysosomen ist ein klarer Indikator für die Mikroautophagie und ein weiterer Nachweis für die zytotoxischen Effekte von Dox. Die mit verschiedenen Arten der Mikroskopie nachgewiesenen mitochondrialen Schäden konnten weiterhin auch durch Genexpressionsanalyse mittels qPCR für hFSF nachgewiesen werden (Tabelle 16).

Mitofusin 1 (*MFN1*) und Mitofusin 2 (*MFN2*) sind verantwortlich für die Fusion der äußeren Membran (Chen et al. 2003, Ishihara et al. 2004), während Dynamin-like 120 kDa protein (*OPA1*) für die innere Mitochondrienmembranfusion verantwortlich ist (Guan et al. 2019). Alle 3 Gene sind somit maßgeblich an der Membranhomöostase beteiligt.

Die Inkubation mit Doxo demonstrierte eine dosisabhängige Verminderung der *MFN1* und *OPA1* Expression in hFSF, welche kohärent mit der Fluoreszenzfärbung ist. Interessanterweise, zeigte *MFN2* einen gegenteiligen Effekt. Hier kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg der *MFN2* Expression, mit dem höchsten Anstieg bei 0,7 μ M Dox. Tang et al. konnten zeigen, dass *MFN2* in neonatalen Rattenkardiomyozyten erniedrigt ist, wenn diese mit Dox behandelt werden (Tang et al. 2017), was im Kontrast zu den hier gezeigten Ergebnissen steht. Die widersprechende Expressionserhöhung könnte ein Kontermechanismus der hier verwendeten Zellen sein, um die strukturelle Mitochondrienintegrität aufrecht zu erhalten und als Folge dessen, deren Funktionalität weiterhin zu ermöglichen. Warum das nur die Expression von *MFN2* betrifft, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend erklärt werden und Bedarf weiterer Forschung.

Ebenso entgegen der Erwartung, war auch *DRP1* dosisabhängig erniedrigt. *DRP1* katalysiert die Mitochondrienfission und wird durch Rezeptoren in der äußeren Membran rekrutiert und aktiviert, wie beispielsweise *Mff* (Liu und Chan 2015). Der synergistische Effekt beider Proteine führt zur Progression der Mitochondrienfission und eine Erhöhung beider Gene wäre kohärent mit den bisherigen Ergebnissen. Die weiteren getesteten Fissionsgene mitochondria fission 1 protein (*FIS1*) (Stojanovski et al. 2004) und mitochondria fission factor (*Mff*) (Otera et al. 2010) zeigten jedoch keine signifikante Expressionserhöhung.

Beide Gene bzw. Proteine rekrutieren jeweils *DRP1* aus dem Zellplasma in die äußere Mitochondrienmembran und initiieren und fördern dadurch die Mitochondrienfission, wobei *Mff* die Hauptrolle spielt (Loson et al. 2013, Osellame et al. 2016). Darum wäre auch hier eine erhöhte Expression zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war. Eine mögliche

Erklärung sowohl für die Erniedrigung von *DRP1* als auch die nicht vorhandene Expressionsänderung von *Mff* bzw. *FIS1*, könnte die Inkubationszeit sein. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24h inkubiert und anschließend getestet. Innerhalb dieser 24h, während die Mitochondrenruptur passierte, wurden keine Messungen durchgeführt, in der die Expression der Fissionsgene vielleicht erhöht hätte sein können. Nach 24h ist die Ruptur abgeschlossen und die Genexpressionen sind wieder gesunken, weshalb keine Änderung im Falle von *Mff* und *FIS1* detektierbar war. Die Expressionserniedrigung von *DRP1* könnte, wie im Fall von *MFN2*, auch ein gegenregulatorischer Mechanismus der Zellen sein, um den negativen Effekten von Dox entgegenzuwirken.

Die Reduktion der Ceramidkonzentrationen durch FuB hatte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die mitochondrialen Fissionsgene *Mff* und *FIS1*, während die anderen gemessenen Gene keine Änderungen zeigten (Tabelle 21). *Mff* und *FIS1* waren unter der Verwendung von FuB signifikant erniedrigt. Diese Daten implizieren, dass die Verbesserung der mitochondrialen Struktur durch reduzierte Ceramide primär durch die Reduktion der Fissionsgene vermittelt wird, anstatt durch eine Erhöhung der Fusionsgene.

Die nachgewiesenen strukturellen Schädigungen hatten ebenfalls Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion. Mittels Seahorse Analysis konnte ebenfalls eine dosisabhängige Erniedrigung der ATP- Produktion sowohl für HL-1 als auch für hFSF gezeigt und nachgewiesen werden (Abb. 11, 22). Für beide getesteten Zelllinien wurde keine signifikanten Änderungen für 0,01 μM Dox verzeichnet, was zeigt, dass diese Konzentration zu niedrig war, um einen negativen Effekt auf die jeweiligen Zellen zu haben. Ab 0,25 μM Dox war die ATP- Produktion sowohl in HL-1 als auch in hFSF signifikant erniedrigt und diese Erniedrigung stieg mit der konstant größer werdenden Dox- Konzentration und kulminierte bei 0,7 μM Dox (Abb. 11, 23).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation mit MT in HL-1 Zellen zu einer leichten Verbesserung der ATP Produktion führt, welche aber dennoch erniedrigt blieben. (Abb. 11, Tabelle 12). Die Vorbehandlung mit FuB in hFSF zeigte keine signifikante Erhöhung der mitochondrialen ATP- Produktion, obwohl die Vorbehandlung eine Erniedrigung der mitochondrialen ROS- Level und zu einer Verbesserung der mitochondrialen Struktur zur Folge hatte (Abb. 26). Das impliziert, dass die Mitochondrienschädigung nicht ausschließlich von den mitochondrialen ROS- Leveln abhängig ist, sondern das Dox noch über andere Signalwege die Mitochondrien beeinträchtigt. Zusätzlich wurde die Genexpression verschiedenster Metabolismus assoziierter Gene für beide Zelllinien getestet (Tabelle 13, 17).

Die Mitochondrien sind in der Lage aus NADH mit Hilfe der Atmungskette ATP zu synthetisieren. Dabei kann das NADH aus 3 verschiedenen Stoffwechselwegen, der Glykolyse, der Fettsäureoxidation oder dem Glutaminstoffwechsel, stammen. Innerhalb jedes einzelnen Stoffwechselweges sind spezifische Gene involviert und reguliert. Um zu verstehen, wie die Stoffwechselwege sich bei Doxorubicinverabreichung verhalten, wurden verschiedene Gene der einzelnen Stoffwechselwege in den Mitochondrien analysiert. Fokussiert wurde sich dabei primär auf Gene, die vor allem mit dem Fettstoffwechsel assoziiert sind, aufgrund der Ceramid- erhöhenden Effekte von Dox.

Getestet wurde die Genexpression von Diacylglycerol O- acyltransferase 1 (*DGAT1*), Diacylglycerol O- acyltransferase 2 (*DGAT2*), Adipozyten- Triglycerid- Lipase (*ATGL*), *CD36* und Carnitine palmitoyltransferase 1 beta (*CPT1B*). *DGAT1* und *DGAT2* katalysieren die Bindungsreaktion von Diacylglycerol und langkettigen Acyl- CoAs zu Triacylglycerol. Erhöhte Expressionen stehen im Zusammenhang mit Übergewicht und anderen metabolischen Erkrankungen (Yen et al. 2008). *ATGL* ist eine Lipase und hydrolysiert Triacylglyceride zu Diacylglyceriden und Acyl- CoAs und ist damit ein potenzieller Gegenregulator zur *DGAT1* und *DGAT2* gesteuerten Triacylglyceridsynthese (Chitraju et al. 2017). *CD36* hat viele verschiedene Funktionen in verschiedenen Zellen (Okamoto et al. 1998). Die hierfür wesentliche Funktion ist die Aufnahme von Fettsäuren und der damit zusammenstehenden Akkumulation und als Folge dessen die Auswirkungen auf den Fettsäuremetabolismus. *CPT1B* ist ein in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiertes Enzym und verantwortlich für die Synthese von Acylcarnitinen (Bonfont et al. 2004, Betry et al. 2019). Es ist maßgeblich an der Beta- Oxidation langkettiger Fettsäuren beteiligt und somit essenziell für die Mitochondrienfunktion.

Die mit dem Fettsäuremetabolismus assoziierten Gene *DGAT1*, *DGAT2* zeigten eine steigende Erhöhung mit zunehmender Dox- Inkubation für die murinen Kardiomyozyten (Tabelle 13). Eine deutliche Dosisabhängigkeit ist bei *DGAT1* für HL-1 erkennbar, welche jedoch erst bei 0,7 µM Dox signifikant war. Für *DGAT2* und *ATGL* konnten Schwankungen innerhalb der verwendeten Konzentrationen festgestellt werden, die womöglich mit den unterschiedlichen verwendeten Passagen in Zusammenhang stehen könnten. Dennoch konnte eine signifikante Expressionserhöhung mit der höchsten Dox- Konzentration nachgewiesen werden. Die Erhöhung dieser 3 Gene lässt darauf deuten, dass es zu einer Ansammlung von Fettsäuren, unter anderem Ceramiden, und somit zu einer Lipotoxizität kommt. *DGAT1*, *DGAT2* und *ATGL* waren in vergleichbarer Weise auch in den Fibroblasten erhöht (Tabelle 17).

CD36 zeigte zu keinem Zeitpunkt der Dox- Inkubation eine veränderte Expression in HL-1 Zellen. *CD36* ist ein essenzieller Fettsäuretransporter, welcher in Zusammenhang mit Lipotoxizität und nachfolgender Insulinresistenz gebracht wird. Aufgrund dessen, wird die Inhibierung bzw. Expressionsregulation von *CD36* als potentielle Behandlungsmöglichkeit für myocardiale Lipotoxizität betrachtet (Glatz et al. 2013). Die dosisabhängige Erhöhung von *CD36* in hFSF impliziert, dass die Inkubation mit Dox zu einer Lipotoxizität führt, welche durch die Erhöhung von proinflammatorischen Ceramiden und einer erhöhten Fettsäureaufnahme, durch *CD36*, vermittelt wird (Tabelle 17). Dementsprechend wäre eine Expressionsänderung auch bei den murinen Kardiomyozyten zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war (Tabelle 13).

CD36 spielt unterschiedliche Rollen bei den verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz. Bei der diabetischen Kardiomyopathie kommt es zu einer *CD36*- beteiligten Lipotoxizität, wodurch eine Inhibition bzw. Expressionsregulation von *CD36* vorteilhaft für den Patienten sein könnte (Zhang et al. 2021).

Interessanterweise konnten Umbarawan *et al* zeigen, dass *CD36* ko Mäuse, bei denen eine linksventrikuläre Hypertrophie durch transaortic constriction (TAC) ausgelöst wurde, eine geringere Überlebensrate haben (Umbarawan et al. 2018). *CD36* scheint also eine protektive Rolle im Zusammenhang mit einer Kardiomyopathie zu haben, welche durch eine Drucküberlastung hervorgerufen wurde.

Die Gründe, warum die *CD36* mRNA Expression nach Dox- Behandlung in Kardiomyozyten unterschiedlich ist als in Fibroblasten, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig erklärt werden und Bedarf weiterer Forschung.

CPT1B zeigt für 0,01 μM Dox und 0,4 μM Dox eine signifikante Expressionerniedrigung in HL-1 Zellen. Für hFSF konnte eine dosisabhängige Erniedrigung nachgewiesen werden (Tabelle 17). Aufgrund der Bedeutung von *CPT1B* für die β - Fettsäureoxidation, ist die Erniedrigung ein Indikator und eine mögliche Erklärung für die zuvor detektierte verringerte mitochondriale ATP- Produktion. Die Akkumulation der Fettsäuren kann durch die Expressionserniedrigung von *CPT1B* nicht kompensiert werden, wodurch es zur Lipotoxizität kommt. Die Vorbehandlung mit FuB hatte keinen reversiblen Effekt auf die *CPT1B* Expression, was vermuten lässt, dass Ceramide nicht an diesem Prozess beteiligt sind (Tabelle 22).

Betreffend der Glykolyse, wurde Pyruvatdehydrogenase Kinase Isoenzym 4 (*PDK4*) getestet. *PDK4* ist ebenfalls ein in der Mitochondrienmembran befindliches Enzym und reduziert den Abbau von Pyruvat, wodurch mehr in den Zitronensäurezyklus integriert werden kann.

Für *PDK4* konnte für 0,7 μM Dox eine signifikante Erhöhung in HL-1 Zellen nachgewiesen werden. Durch eine Schädigung der Kardiomyozyten kommt es zu einem metabolischen Shift in Richtung Glykolyse und Glutamat, was die Erhöhung von *PDK4* erklärt. Jedoch ist *PDK4* auch mit einer Fettsäure- abhängigen Insulinresistenz assoziiert (Kim et al. 2006). Dies könnte ebenfalls erklären, warum die Erhöhung von *PDK4* dennoch nicht zu einer erhöhten ATP- Produktion führt.

Konträr zu den HL-1 Zellen, ist die signifikante Expressionerniedrigung von *PDK4*. Die verringerte Expression kann unter anderem mit der unterschiedlichen Zell- und Herkunftsspezies zusammenhängen und das Fibroblasten primär Glukose zur Energiegewinnung nutzen und nicht Fettsäuren, wie die HL-1 Zellen.

Zusätzlich wurde in den Fibroblasten die Glutamatdehydrogenase (*GDH*) gemessen. *GDH* ist verantwortlich für die Umwandlung von Glutamat in α - Ketoglutarat, welches wieder in den Krebszyklus eingeschleust werden kann und ist ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert. Dadurch stellt *GDH* eine alternative Möglichkeit der ATP- Produktion dar (Durante 2019). Für 0,25 μM Dox und 0.4 μM Dox konnte eine signifikante Erniedrigung nachgewiesen werden, was wieder die negativen Effekte von Dox auf die Mitochondrien weiter verdeutlicht. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch nicht erklärt werden, warum 0,7 μM Dox zu keiner signifikanten Verringerung führt.

Die Vorbehandlung mit FuB in den Fibroblasten zeigte nur für *DGAT2* eine Expressionsreduktion. Die anderen gemessenen Gene zeigten leichte Verminderungen (*ATGL*, *CD36*), welche dennoch signifikant erniedrigt blieben. Die eingesetzte Konzentration von Dox war also zu hoch, um vollständig reduzierende Effekte zu zeigen. Erneute Messungen mit der gleichen FuB- Konzentration jedoch verringerter Dox- Konzentration (z.B. 0,4 μM Dox) könnten die Expressionen auf ein nicht- signifikantes Niveau verändern.

7.4 Initiierung der Apoptose durch Dox

Um zu überprüfen zu können, ob die von Dox verursachten strukturellen und funktionellen Schädigungen ausreichen die Apoptose auslösen, wurden 2 entsprechende Apoptosemarker mit Immunfluoreszenz und Western Blot getestet (Abb. 12, 23).

Bei der mitochondrien- vermittelten Apoptose, welche auch als intrinsischer Weg bezeichnet wird, kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, welches unter physiologischen Bedingungen nicht im Zytoplasma identifizierbar ist. Mit zunehmender Schädigung kommt es zur Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Als Folge

dessen kommt es zur Bindung von Cytochrom C and Apaf-1. Dieser Komplex ist nachfolgend in der Lage die inaktive Caspase 9 oder auch Procaspase 9 in die aktive Form zu spalten. Dieser Komplex wird als Apoptom bezeichnet und notwendig für die Aktivierung der Effektorcaspasen, welche wiederum die charakteristischen Effekte der Apoptose wie z.B. *Membrane blebbing*, katalysieren. Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7 und werden ebenfalls durch Spaltung aktiviert. Mit diesem Wissen über die Signalkaskade der Apoptose wurde sowohl in HL-1 Zellen als auch in hFSF die Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma mit Immunfluoreszenz überprüft. (Abb. 12a, 23 a). Bei beiden durchgeführten Färbungen war ein zunehmend positives rotes Fluoreszenzsignal mit steigender Dox- Konzentration detektierbar.

Dieses Ergebnis bestätigt die initiale Vermutung, dass die durch Dox verursachte Mitochondrienschädigung die Apoptose initiiert. Dieser Effekt konnte unabhängig von den verwendeten Zelllinien in beiden nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde auch die Proteinexpression der gespaltenen Initiatorcaspase 9 in Fibroblasten und die der gespaltenen Effektorcaspase 3 in den Kardiomyozyten mit Western Blot bestimmt (Abb. 12b, 24b). Für die HL-1 Zellen konnte ein dosisabhängiger Anstieg der gespaltenen Caspase 3 im Verhältnis zur ungespaltenen detektiert werden, was für dessen Aktivierung spricht.

Ebenso konnte eine dosisabhängige Erhöhung der gespaltenen Caspase 9 im Verhältnis zur ungespaltenen Caspase 9 in den Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Proteinexpression von Caspase 3 in Fibroblasten bzw. Caspase 9 in den Kardiomyozyten, konnte aufgrund der Spezieslimitierung der verwendeten Antikörper nicht durchgeführt werden. Dennoch bestätigen beide Expressionserhöhungen der jeweiligen Caspasen in den entsprechenden Zellen, dass die Signalkaskade der Apoptose initiiert wird. Zusätzlich konnte erneut gezeigt werden, dass durch die Reduktion der Ceramide die Zellviatliät verbessert wird, was durch eine Verringerung der Caspase 9- Aktivierung nachweisbar war (Abb. 27).

7.5 Dox fördert die Fibrose

In den HL-1 Zellen konnte gezeigt werden, dass Dox über die Erhöhung mitochondrialer ROS strukturell und funktionell irreversibel schädigt und als Folge dessen die Apoptose ausgelöst wird. Diese Effekte führen in den murinen Kardiomyozyten zur Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz. Zusätzlich wurden auch humane Fibroblasten mit Dox behandelt, um auch eine Aussage über die Auswirkungen auf die Fibrose treffen zu können. Bei diesem Prozess kommt es zur kardialen Umstrukturierung durch erhöhte Segregation von

Matrixmetalloproteasen, welche die extrazelluläre Matrix abbauen und so die Ablagerung von fibrotischem Material, wie beispielsweise Kollagen, ermöglichen und fördern. Die Regulation dieser Signalkaskade und somit die Aufrechterhaltung der sensiblen Balance zwischen physiologischer Wundheilung und maladaptiver Fibrose ist genauso wichtig für das Wohlergehen des Patienten, wie die Behandlung der zu Grunde liegenden Ursache für die Kardiomyopathie.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Fibrose- regulierende Gene auf ihre jeweilige mRNA- Expression mittels qPCR getestet (Tabelle 18,19). Auf der Seite der extrazellulären Matrix (EZM)- abbauenden Gene wurden die Expressionen von *MMP8*, *MMP9* und *MMP14* detektiert, aufgrund ihrer Assoziation mit myokardialer Fibrose (Fan et al. 2012) (Tabelle 18). Von besagten Genen zeigten nur *MMP8*, *MMP9* und *MMP14* eine dosisabhängige Expressionserhöhung. *MMP8* (Fang et al. 2013) und *MMP9* (Appleby et al. 2017) sind mit dem myokardialen remodeling bei dilativer Kardiomyopathie assoziiert und Erhöhungen konnten bei besagten Patienten histologisch nachgewiesen werden (Mitrut et al. 2019), während erhöhte *MMP14* Level bei Patienten mit linksventrikulärer Drucküberlastung identifizierbar waren (Spinale et al. 2013, Polyakova et al. 2004).

Die Erhöhung dieser 3 MMPs bei den hFSF ist kohärent mit vorherigen Ergebnissen und impliziert somit deren Beteiligung bei der Progression der Fibrose. Weiterhin zeigt die Dosisabhängigkeit, dass die Erhöhung eindeutig von Dox verursacht wurde.

Da vor allem *MMP8* und *MMP9* mit dem myokardialen remodeling assoziiert sind (Fan et al. 2012), wurde neben der mRNA- Expression auch die Konzentration im Zellüberstand der mit Dox behandelten Fibroblasten mittels ELISA gemessen (Abb. 24). Im Überstand besagter Dox behandelter Fibroblasten konnte für jegliche der 4 Konzentrationen keine erhöhte Expression, weder von *MMP8* noch *MMP9*, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren widersprüchlich zu den zuvor gezeigten erhöhten mRNA- Werten beider MMPs. Eine mögliche Erklärung könnte mit der Inkubationszeit im Zusammenhang stehen. Alle hier verwendeten Zellen, egal ob murin oder human, wurden für 24h mit Dox behandelt und anschließend in den aufgezeigten Experimenten verwendet. Diese Inkubationszeit könnte zu kurz für die gesteigerte Produktion und Sekretion von *MMP8* und *MMP9* sein, obwohl diese auf mRNA- Ebene erhöht waren. Eine längere Inkubationszeit könnte also die erwartete Erhöhung von *MMP8* und *MMP9* im Zellkulturüberstand liefern. Aufgrund des Zeitmangels konnte die erwähnte Theorie noch nicht überprüft werden, sollte aber zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden.

Fibrose ist nicht exklusiv durch die Steigerung von MMPs, sondern auch durch die Expressionsänderung anderer Gene charakterisiert. Zu den hier getesteten gehörten *TIMP1*, *TIMP2*, *Vim*, *DDR2* und *TGF- β* (Tabelle 19). *TIMP1* und *TIMP2* sind Gegenregulatoren zu den MMPs und verhindern, dass die komplette EZM abgebaut wird. Sie sind deshalb kohärent zu den MMPs erhöht und implizieren ebenfalls eine fortschreitende Fibrose. Beide Gene zeigten dosisabhängige Erhöhungen unter der Behandlung von Dox. Zusätzlich waren die für die Fibroblasten als charakteristisch bezeichnete Markergene *Vim* und *DDR2* (Camelliti et al. 2005, Schlessinger 1997) signifikant erniedrigt, während *TGF- β* (Butt et al. 1995) erhöht war. Diese Expressionsänderungen dieser 3 Gene impliziert eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten (Petrov et al. 2002), welche maßgeblich an der Initiation und Progression der Fibrose involviert sind. Die Expressionsänderungen aller hier getesteten und aufgezeigten Gene (Tabelle 18, 19) zeigen, dass Dox dosisabhängig die Fibrose fördert. Dies konnte auch durch vorangegangene Arbeiten gezeigt werden (Chan et al. 2020, Tanaka et al. 2020, Levick et al. 2019).

Auch hier zeigte die Vorbehandlung mit FuB positive Effekte (Tabelle 23,24). FuB reduzierte die Expressionen von *MMP8*, *MMP9* und *MMP14* auf ein nicht signifikantes Niveau. Weiterhin waren auch *TIMP2* und *TGF- β* nicht länger signifikant erhöht. Die Reduktion der Ceramide hatte jedoch keinen bzw. keinen ausreichend starken Einfluss auf die *TIMP1*, *Vim* und *DDR2* Expression, was wiederum zeigt, dass Ceramide nicht an der Regulation dieser Gene beteiligt ist.

7.6 Spezifisch induzierte CerS2 Überexpression

Die Überexpression von CerS2 wurde mit dem p3xFLAG-CMV7 Vektor durchgeführt, in dem das humane CerS2-Gen inseriert wurde. Die Präsenz des Inserts wurde mit Restriktionsverdau überprüft und verifiziert. Die Transfektion wurde mit Lipofektamin 3000 vollzogen und der Transfektionserfolg mit Immunofluoreszenz und Western Blot bestätigt (Abb. 14, 28, 29). Die Transfektion war sowohl in den murinen Kardiomyozyten als auch in den humanen Fibroblasten methodisch erfolgreich, wie die entsprechenden Abbildungen zeigen. Jedoch zeigten nur die Fibroblasten einen biologischen Effekt in Form der zu erwartenden Erhöhung sehr langkettiger Ceramide (C>20) (Tabelle 23).

Für die HL-1 Zellen konnte keinerlei Erhöhung besagter Ceramide gemessen werden, obwohl die Überexpression ebenso erfolgreich war (Tabelle 14). Diese Paradoxität könnte durch den humanen Ursprung von CerS2 und dessen Transfektion in murine Zellen erklärbar sein. Über

CerS2 ist bekannt, dass es phosphoryliert und dadurch aktiviert wird, was wahrscheinlich durch Casein kinase 2 geschieht (Sassa et al. 2016). Es ist also möglich, dass die murine Casein kinase 2 nicht in der Lage ist, die humane CerS2 zu phosphorylieren und nachfolgend zu aktivieren, was zur Produktion und Erhöhung langkettiger Ceramide führt. Das würde erklären, warum die nachweislich erfolgreiche CerS2- Erhöhung nicht zu der erwarteten Ceramiderhöhung führte. Besagte Paradoxität war bei den humanen Fibroblasten nicht gegeben, was eine Bestätigung dieser Hypothese impliziert.

Für die Fibroblasten konnte eine universelle Erhöhung aller langkettigen und somit proinflammatorischen Ceramide mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Tabelle 23). Die Vorinkubation mit FuB reduzierte die zuvor erhöhten Ceramidkonzentrationen auf ein nicht signifikantes Level. Ebenso waren C14 Ceramide, genau wie bei der entsprechenden Dox- Inkubation, signifikant erniedrigt. Zum jetzigen Zeitpunkt kann noch nicht geklärt werden, warum FuB speziell C14 Ceramide erniedrigt. Weiterhin ist auch noch nicht klar warum bei Dox C18 erhöht bleibt. Das kann mit der Unspezifität von FuB im Zusammenhang stehen oder mit eventuellen Expressionsänderungen von anderen Ceramid- synthetisierenden Proteinen.

Dennoch erlaubte die erfolgreiche Überexpression von CerS2 und den nachfolgenden Effekten einen direkten Vergleich zu den zytotoxischen Effekten von Dox.

7.7 Ceramide schädigen Mitochondrien in Struktur und Funktion

Genau wie bei der Dox- Behandlung, zeigte auch die CerS2- Überexpression eine Steigerung mitochondrialer ROS- Level (Abb. 30), welche mit FuB reduziert werden konnte. Bei der höchsten Konzentration von Dox konnte ein 3,4- facher Anstieg von mitochondrialem ROS verzeichnet werden, während bei FLAG-CerS2 ein 1,6- facher Anstieg nachgewiesen wurde. Das ist ein Trend, der sich über die gesamten Experimente und Ergebnisse beobachten lässt. Obwohl die CerS2- Überexpression höhere Ceramidwerte zeigte, als die 0,7 μ M Dox Konzentration, war das Ausmaß der nachfolgend beobachteten Effekte immer höher in den Dox behandelten Fibroblasten. Zusammen mit den jeweiligen FuB Daten zeigt das, dass Ceramide nur einen beitragenden Charakter zu den Nebenwirkungen von Dox haben und somit nicht ausschließlich für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind.

Die Dox- Behandlung zeigte eine Schädigung der mitochondrialen Struktur, nachweisbar mit Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie. Diese Effekte sind durch erhöhte mitochondriale ROS- Level, welche ein Indikator für die Inflammation sind, vermittelt. Um

zu sehen, ob diese Effekte auf für CerS2- Überexpression galten, wurden die Mitochondrienstruktur ebenfalls mit MitoTracker angefärbt und zusätzlich die Zellorganellen mit Elektronenmikroskopie dargestellt (Abb. 31). Die MitoTracker- Färbung zeigte erhebliche Rupturen und Schäden der FLAG-CerS2 Zellen im Vergleich zur physiologischen und netzartigen Struktur der Mitochondrien in FLAG-TK. Dieser Effekt konnte auch mit der Elektronenmikroskopie bestätigt werden (Abb. 31). Die Cer2 überexprimierenden Zellen zeigen eine deutliche pathologische Akkumulation multilamellarer Körper, vergleichbar zu 0,7 μ M Dox. Zusätzlich waren auch andere Zellorganellen, wie das endoplasmatische Retikulum von der Überexpression betroffen. Beide Methoden bestätigen die schädigenden Einflüsse von Ceramiden auf die Mitochondrien und ermöglichen eine direkte Vergleichbarkeit zu Dox.

Außerdem wurden auch hier die Expressionen der bereits gezeigten Fusions- und Fissionsgene auf mRNA-Ebene getestet (Tabelle 25). Die Fusionsgene *MFN1*, *MFN2* und *OPA1* zeigten eine signifikante Erniedrigung welche, mit Ausnahme von *MFN2*, auch bei Dox beobachtbar war. Hier war die *MFN2* signifikant erniedrigt, während die Dox-Inkubation eine paradoxe und bisher nicht geklärte dosisabhängige Expressionserhöhung von *MFN2* zeigte. Diese Ergebnisse schließen eventuelle methodische Fehler aus, da das exakt gleiche Primerpaar verwendet wurde. Da die Expression von *MFN2* reversibel mit FuB war, zeigt, dass Ceramide negative Effekte auf die Mitochondrienfusion haben. Die entsprechenden Dox- Werte implizieren aber, dass die *MFN2* erhöhenden Effekte von Dox die reduzierenden Effekte der Ceramide überlagern. Das wird auch weiterhin dadurch deutlich, dass die FuB- Vorbehandlung in den Dox behandelten Zellen zu einer leichten Erniedrigung von *MFN2* führt. Die Effekte waren jedoch nicht stark genug, um die *MFN2* Expression auf ein nicht signifikantes Level zu senken.

Weiterhin zeigte *MFN1* eine Erniedrigung in FLAG-CerS2, welche auch nicht reversibel durch die Vorinkubation mit FuB war. Das zeigt, dass die *MFN1* Expression nicht in direktem Zusammenhang mit Ceramiden, sondern mit CerS2 stehen könnte.

Die mRNA- Expression der Fissionsgene zeigte wie bei der Dox- Behandlung keine Änderungen und im Fall von *Mff* sogar eine signifikante Erniedrigung. Auch hier kann die Theorie der Inkubations- bzw in diesem Fall Transfektionszeit angewendet werden. Die Zellen wurden für einen 24 Stunden transfiziert, um eine einheitliche und vergleichbare Aussage zu der Dox- Inkubation treffen zu können. Genau wie in diesem Fall könnten die Fissionsgene innerhalb der ersten 24h erhöht sein, um anschließend wieder auf Normallevel herunterreguliert zu werden.

Auch hier verringert die Vorbehandlung mit FuB die Expression von *Mff* und *FIS1*. Das zeigt einmal mehr das Ceramide die Mitochondrien vor allem durch eine Förderung der Mitochondrienfission, anstatt einer Reduktion der Mitochondrienfusion schädigen.

Die Auswirkungen der erhöhten Ceramidlevel, gefolgt von strukturellen Schäden wurden auch auf der Ebene der Mitochondrienfunktion überprüft (Abb. 32). Die Seahorse Analyse zeigte eine Erniedrigung der mitochondrialen ATP- Produktion, welche kohärent mit den vorher gezeigten Daten ist (Abb. 32a). Auch diese Daten sind vergleichbar mit den jeweiligen Dox- Werten und zeigen, dass erhöhte Ceramide an den zytotoxischen Effekten von Dox beteiligt. Denn obwohl die ATP- Produktion signifikant erniedrigt war, war das Ausmaß der Erniedrigung vergleichsweise geringer als mit der höchsten Konzentration von Dox. Die mitochondriale ATP- Produktion kehrte nach der Vorinkubation mit FuB auf nicht-signifikante Level zurück (Abb. 32b).

Ebenfalls wurde erneut die Expression metabolisch assoziierter Gene gemessen ohne und mit der Vorinkubation von FuB (Tabelle 26). *CD36* zeigte eine signifikante Erhöhung, welche durch FuB reversibel war. Die *PK4* und *GDH* Expression war nicht verändert. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei der Dox- Inkubation nachgewiesen werden. Unterschiedlich zur besagten Behandlung waren, die nicht vorhandenen Expressionserhöhungen von *DGAT1*, *DGAT2* und *ATGL*, sowie die Erniedrigung von *CPT1B* in FLAG-CerS2 hFSF. Ceramide haben nur einen gewissen Anteil an der Dox verursachten Lipotoxizität, weshalb hier die Expressionsänderungen schwächer ausfallen. Die Vorbehandlung mit FuB zeigte dennoch eine Beteiligung der Ceramide an der *DGAT1* Expression, da dieses signifikant erniedrigt war. Keinen Einfluss hatte FuB jedoch auf die *DGAT2* Expression. Die unveränderte *DGAT2*- Erniedrigung impliziert, dass diese nicht abhängig von Ceramiden, sondern direkt von CerS2 ist. Es konnte keine Literatur gefunden werden, welche das Expressionsverhalten von *DGAT2* in direkter Verbindung mit CerS2 setzt. Weitere Forschungen sind nötig, um diese vermutete Verbindung zu verifizieren.

Die zuvor beobachtete erhöhte Tendenz von *ATGL* war reversibel mit FuB, was den positiven Effekt der Reduktion von proinflammatorischen Ceramiden auf den Metabolismus zeigt. Die Reduktion der *CPT1B* Expression wurde ebenfalls nicht von FuB positiv beeinflusst, so wie es auch bei der entsprechenden Dox- Konzentration der Fall war. Das lässt erneut auf einen direkten Zusammenhang von CerS2 und der jeweiligen Expression vermuten. Auch hier war zum jetzigen Zeitpunkt keine Literatur bekannt, die einen direkten Zusammenhang zwischen CerS2 und *CPT1B* thematisiert. Auch hier sind weitere Forschungen nötig.

Dennoch signalisiert die Rückkehr der Fettstoffwechsel- assoziierten Gene auf Normallevel eine Verringerung der Lipotoxizität, welche durch Ceramide teilweise vermittelt wird. Diese Effekte sind kohärent mit der verbesserten Mitochondrienstruktur und einer verbesserten mitochondrialen ATP- Produktion.

7.8 Ceramide fördern die Apoptose

Verursacht durch die strukturellen Schäden der Mitochondrien, wurden als Folge dessen die Apoptose untersucht. Dazu wurde die Translokation von Cytochrom C mit Immunfluoreszenz und die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 mit Western Blot bestimmt (Abb. 33). Die Immunfluoreszenz zeigte eine deutlich gesteigerte Cytochrom C- Expression (rot) in FLAG-CerS2 als in FLAG-TK, was für eine Mitochondrien- vermittelte Initiation der Apoptose spricht (Abb. 33a). Die Progression der Apoptose konnte durch ein gesteigertes Verhältnis der Cleav.Casp 9/Casp 9- Ratio bestätigt werden (Abb. 33b). Auch hier reduzierte die Vorbehandlung mit FuB das Cleav.Casp9/Casp9- Verhältnis auf Normallevel. Auch diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen aus der Dox- Inkubation und zeigen eine Kausalität zwischen spezifisch erhöhten Ceramiden und den zytotoxischen Effekten von Dox.

7.9 Einfluss erhöhter Ceramide auf die Fibrose

Die Dox- Behandlung zeigte eine klare Promotion der Fibrose auf mRNA- Level. Um zu verstehen, ob Ceramide auch auf diesen negativ assoziierten Prozess Einfluss nehmen, wurden die gleichen mit Fibrose in Verbindung gebrachten Gene auf mRNA- Ebene und zusätzlich MMP8 und MMP9 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt (Tabelle 27, Abb. 34). Die qPCR zeigte erneut eine Erhöhung von *MMP8* und *MMP9*. *MMP14* war von der Überexpression nicht betroffen. Die FuB- Vorinkubation reduzierte hier die *MMP8* und *MMP9* Expression sogar so weit, dass diese nicht länger detektierbar waren und *MMP14* war nur noch marginal nachweisbar. Das zeigt erneut die positiven Effekte der Ceramidreduktion auch auf die Fibrose. Zum anderen war die Expression von *MMP8* und *MMP9* nur grenzwertig nachweisbar (cycle threshold ca. 35), weshalb schon eine geringe Reduktion die Detektierbarkeit erschwert.

Ceramide hatten keinen Einfluss auf die *TIMP1* und *TIMP2* Expressionen, zeigte jedoch eine erhöhte Tendenz für *TGF-β*, welche unter FuB signifikant war (Tabelle 28). Dies könnte mit schwankenden Transfektionseffizienzen zusammenhängen, die die fehlende Signifikanz in

FLAG-CerS2, trotz erhöhter Tendenz, erklären könnten. *Vim* war nicht von der Überexpression betroffen und *DDR2* zeigte, vergleichbar zu *TGF-β*, eine Erniedrigung unter FuB. Auch hier ist die bereits beschriebene Erklärung möglich.

Für MMP8 wurde mittels ELISA eine signifikante Erniedrigung im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Auch MMP9 zeigte keine signifikante Erhöhung (Abb. 34). Wie zuvor bei Dox könnte auch hier der Faktor Zeit eine wichtige Rolle spielen, da es einige Zeit dauern kann, bis erhöhte Genexpressionen auch im Zellkulturüberstand nachweisbar sind. Eine Verlängerung der Inkubationszeit könnte auch hier die erwarteten Ergebnisse liefern.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass Ceramide im gewissen Maße an der Fibrose beteiligt sind und auch somit eine Rolle bei der Dox vermittelten Fibrose spielen.

7.10 Limitierungen und Ausblick

Die Doxorubicindaten sind überwiegend kohärent und durch die verwendete Dosisabhängigkeit nachvollziehbar und in sich schlüssig. Kleinere Schwankungen, wie bei bestimmten Genexpressionen, lassen sich durch die unterschiedlich verwendeten Passagen erklären. Um sicher zu gehen, dass die beobachteten Effekte biologischer Natur sind, wurden immer mindestens 3 verschiedene Passagen verwendet. Diese notwendige und essenzielle Gewissheit kann aber auch Schwankungen zur Folge haben, welche teilweise beobachtbar waren.

Der Effekt der verschieden verwendeten Passagen hat auch Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Niedrigere Passagen lassen sich unter Umständen besser transfizieren, da die Zellen vitaler sind. Obwohl einheitlich niedrige Passagen für die Transfektionen verwendet wurden, schwanken Transfektionserfolge und beeinflussen somit möglicherweise die Ergebnisse. Die Transfektionsbedingungen und das –protokoll wurden vor der Datengewinnung exzessiv getestet und so gut es ging optimiert, um einheitliche Ergebnisse zu ermöglichen. Dennoch gibt es unkontrollierbare Faktoren, die die Transfektion beeinflussen und so zu den beobachteten Effekten beitragen.

Trotz der Limitierungen sind die Daten kohärent und zeigen einen kausalen Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Ceramiden und den zytotoxischen Eigenschaften von Dox. In den nächsten Schritten sollte die Vorbehandlung mit FuB auch auf die Kardiomyozyten angewendet werden, um zu bestätigen das die in hFSF positiven beobachteten Effekte auf die HL-1 Zellen übertragbar sind. So kann eine ubiquitäre und positive Wirkungsweise der

Ceramidreduktion bei Dox- vermittelter Zytotoxizität nachgewiesen werden was die hier gewonnen und präsentierten Daten aussagekräftiger macht.

Weiterhin könnte eine Herunterregulation der CerS2- Expression mit bspw. siRNA oder sogar ein kompletter knock-out mittels CrisprCas9 gefolgt von einer Dox- Inkubation, die spezifische und explizite Rolle von CerS2 in Dox- vermittelter Zelltoxizität aufklären und herausstellen.

Ebenso könnte sowohl ein im Herzen spezifischer *in vivo* knock-out als auch eine induzierbare Überexpression von CerS2 (z.B. durch Doxycyclin gesteuert) einen detaillierteren Einblick in die Rolle von Ceramiden bei der Entwicklung einer Kardiomyopathie geben. Ein knock-out von CerS2 gefolgt von der Applikation von Dox könnte zu einer verbesserten Überlebensrate der Mäuse führen.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob Ceramide allein in der Lage sind eine Kardiomyopathie auszulösen oder ob eine Grunderkrankung dafür notwendig ist. Die hier in angegebenen Möglichkeiten einer *in vivo* Untersuchung könnten diese Frage beantworten und einen tieferen Einblick in die Wirkungsmechanismen der Doxorubicin vermittelten Kardiomyopathie und der Rolle von Ceramiden bei der Entstehung dieser Kardiomyopathie gewähren.

8 Schlussfolgerung

Ziel der Arbeit war es, die bisher nicht vollständig geklärten zytotoxischen Nebenwirkungen von Dox, die zu einer Kardiomyopathie führen, zu untersuchen und diese mit erhöhten proinflammatorischen Ceramiden in Verbindung zu bringen. Die sich daraus ergebende Kausalität kann helfen, die Wirkungsweise von Dox besser zu verstehen. Dadurch ergeben sich potenziell neue Möglichkeiten die Effekte von Dox abzumildern und so Patienten, die mit diesem Chemotherapeutikum behandelt werden, eine verbesserte Lebensqualität zu ermöglichen.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Effekte einer dosisabhängigen Dox-Inkubation universell und unabhängig sind. Sowohl in murinen Kardiomyozyten als auch humanen Fibroblasten führt Dox zur Mitochondrien- vermittelten Apoptose, was im Falle der Kardiomyozyten zur Progression der Kardiomyopathie führt. Die Ergebnisse aus der CerS2-Überexpression zeigen eindeutig, dass erhöhte Ceramide an den zytotoxischen Effekten von Dox beteiligt, aber nicht exklusiv dafür verantwortlich sind. In beiden Fällen werden die zytotoxischen Effekte von mitochondrialen ROS vermittelt und ebenso in beiden Fällen führt eine Reduktion besagter ROS- Level zur Verbesserung der mitochondrialen Struktur und Funktion. Reaktive Sauerstoffspezies scheinen deshalb eine entscheidende Rolle bei der Ceramid- vermittelten Inflammation und somit bei der Kardiomyopathie zu spielen. Weiterhin zeigt die CerS2-Überexpression einen progressiven Einfluss auf die Fibrose, was auch bei der Dox Behandlung der Fall ist und demonstriert somit die diversen negativen Effekte dieses Anthracyclins.

In dieser Arbeit ist es gelungen einen korrelativen und kausalen Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Ceramiden und den zytotoxischen Nebenwirkungen von Dox nachzuweisen. Durch die Identifikation von CerS2 als eine der verantwortlichen Proteine dieser Kausalität, könnten sich zukünftig neue Medikations- und Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit Dox- verursachter Kardiomyopathie ergeben.

9 Quellenverzeichnis

1. Aalaei-Andabili SH, Bavry AA. 2019. Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Transcatheter Aortic Valve Replacement Outcomes: A Review. *Cardiol Ther*, 8 (1):21-28.
2. Abercrombie M. 1978. Fibroblasts. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 12:1-6.
3. Andrieu-Abadie N, Levade T. 2002. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585 (2-3):126-134.
4. Appleby TC, Greenstein AE, Hung M, Liclican A, Velasquez M, Villasenor AG, Wang R, Wong MH, Liu X, Papalia GA, Schultz BE, Sakowicz R, Smith V, Kwon HJ. 2017. Biochemical characterization and structure determination of a potent, selective antibody inhibitor of human MMP9. *J Biol Chem*, 292 (16):6810-6820.
5. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. 2000. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res*, 60 (7):1789-1792.
6. Barbar T, Mahmood SS, Liu JE. 2019. Cardiomyopathy Prevention in Cancer Patients. *Cardiol Clin*, 37 (4):441-447.
7. Barenholz Y, Thompson TE. 1999. Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chem Phys Lipids*, 102 (1-2):29-34.
8. Baum J, Duffy HS. 2011. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*, 57 (4):376-379.
9. Betry C, Meugnier E, Pflieger M, Grenet G, Hercberg S, Galan P, Kesse-Guyot E, Vidal H, Laville M. 2019. High expression of CPT1b in skeletal muscle in metabolically healthy older subjects. *Diabetes Metab*, 45 (2):152-159.
10. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. 2004. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 25 (5-6):495-520.
11. Bossone E, Savarese G, Ferrara F, Citro R, Mosca S, Musella F, Limongelli G, Manfredini R, Cittadini A, Perrone Filardi P. 2013. Takotsubo cardiomyopathy: overview. *Heart Fail Clin*, 9 (2):249-266, x.
12. Brozinick JT, Hawkins E, Hoang Bui H, Kuo MS, Tan B, Kievit P, Grove K. 2013. Plasma sphingolipids are biomarkers of metabolic syndrome in non-human primates maintained on a Western-style diet. *Int J Obes (Lond)*, 37 (8):1064-1070.
13. Bujak M, Frangogiannis NG. 2007. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*, 74 (2):184-195.
14. Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. 1995. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur J Cell Biol*, 68 (3):330-335.
15. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65 (1):40-51.
16. Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. 2004. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res*, 94 (6):828-835.
17. Chan BYH, Roczковский A, Cho WJ, Poirier M, Sergi C, Keschrumrus V, Churko JM, Granzier H, Schulz R. 2020. MMP inhibitors attenuate doxorubicin cardiotoxicity by preventing intracellular and extracellular matrix remodeling. *Cardiovasc Res*.
18. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. 2010. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115 (2):155-162.

19. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160 (2):189-200.
20. Chitraju C, Mejhert N, Haas JT, Diaz-Ramirez LG, Grueter CA, Imbriglio JE, Pinto S, Koliwad SK, Walther TC, Farese RV, Jr. 2017. Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. *Cell Metab*, 26 (2):407-418 e403.
21. Cui N, Hu M, Khalil RA. 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147:1-73.
22. Disertori M, Mase M, Ravelli F. 2017. Myocardial fibrosis predicts ventricular tachyarrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*, 27 (5):363-372.
23. Durante W. 2019. The Emerging Role of l-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrients*, 11 (9).
24. Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, Shiota M, Young JD. 2014. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Mol Metab*, 3 (5):544-553.
25. El-Agamy DS, El-Harbi KM, Khoshhal S, Ahmed N, Elkablawy MA, Shaaban AA, Abo-Haded HM. 2019. Pristimerin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity and fibrosis through modulation of Nrf2 and MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Cancer Manag Res*, 11:47-61.
26. Ertl G, Frantz S. 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 66 (1):22-32.
27. Espeland T, Lunde IG, B HA, Gullestad L, Aakhus S. 2018. Myocardial fibrosis. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 138 (16).
28. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5 (1):15.
29. Fang C, Wen G, Zhang L, Lin L, Moore A, Wu S, Ye S, Xiao Q. 2013. An important role of matrix metalloproteinase-8 in angiogenesis in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*, 99 (1):146-155.
30. Fekry B, Jeffries KA, Esmailniakooshkghazi A, Ogretmen B, Krupenko SA, Krupenko NI. 2016. CerS6 Is a Novel Transcriptional Target of p53 Protein Activated by Non-genotoxic Stress. *J Biol Chem*, 291 (32):16586-16596.
31. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. 1994. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*, 72 (3):283-292.
32. G. Aumüller GA, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch. 2017. *Duale Reihe Anatomie*. Thieme.
33. Ginkel C, Hartmann D, vom Dorp K, Zlomuzica A, Farwanah H, Eckhardt M, Sandhoff R, Degen J, Rabionet M, Dere E, Dormann P, Sandhoff K, Willecke K. 2012. Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes. *J Biol Chem*, 287 (50):41888-41902.
34. Glatz JF, Angin Y, Steinbusch LK, Schwenk RW, Luiken JJ. 2013. CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 88 (1):71-77.
35. Gomez LA, Heath SH, Hagen TM. 2012. Acetyl-L-carnitine supplementation reverses the age-related decline in carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) activity in interfibrillar mitochondria without changing the L-carnitine content in the rat heart. *Mech Ageing Dev*, 133 (2-3):99-106.

36. Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ. 2015. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment. *Cell Metab*, 21 (2):183-194.
37. Guan L, Che Z, Meng X, Yu Y, Li M, Yu Z, Shi H, Yang D, Yu M. 2019. MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition. *J Cell Mol Med*.
38. Haaf P, Garg P, Messroghli DR, Broadbent DA, Greenwood JP, Plein S. 2016. Cardiac T1 Mapping and Extracellular Volume (ECV) in clinical practice: a comprehensive review. *J Cardiovasc Magn Reson*, 18 (1):89.
39. Hershberger RE, Morales A. 1993. Dilated Cardiomyopathy Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, Hrsg. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA).
40. Hinderer S, Schenke-Layland K. 2019. Cardiac fibrosis - A short review of causes and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*.
41. Hinderer S, Brauchle E, Schenke-Layland K. 2015. Generation and Assessment of Functional Biomaterial Scaffolds for Applications in Cardiovascular Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Healthc Mater*, 4 (16):2326-2341.
42. Huwiler A, Pfeilschifter J. 2006. Altering the sphingosine-1-phosphate/ceramide balance: a promising approach for tumor therapy. *Curr Pharm Des*, 12 (35):4625-4635.
43. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, 117 (Pt 26):6535-6546.
44. Jezek J, Cooper KF, Strich R. 2018. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants (Basel)*, 7 (1).
45. Jin J, Mullen TD, Hou Q, Bielawski J, Bielawska A, Zhang X, Obeid LM, Hannun YA, Hsu YT. 2009. AMPK inhibitor Compound C stimulates ceramide production and promotes Bax redistribution and apoptosis in MCF7 breast carcinoma cells. *J Lipid Res*, 50 (12):2389-2397.
46. Jin J, Hou Q, Mullen TD, Zeidan YH, Bielawski J, Kravcka JM, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA, Hsu YT. 2008. Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondria in NT-2 cells. *J Biol Chem*, 283 (39):26509-26517.
47. Jones DR, Chew DP, Horsfall MJ, Chuang AM, Sinhal AR, Joseph MX, Baker RA, Bennetts JS, Selvanayagam JB, Lehman SJ. 2019. Multidisciplinary transcatheter aortic valve replacement heart team programme improves mortality in aortic stenosis. *Open Heart*, 6 (2):e000983.
48. Kageyama-Yahara N, Riezman H. 2006. Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast. *Biochem J*, 398 (3):585-593.
49. Kamboj M, Kazory A. 2019. Left Ventricular Assist Device and the Kidney: Getting to the Heart of the Matter. *Blood Purif*:1-10.
50. Kardiologie DGf. 2017. Deutscher Herzbericht 2016. Deutsche Herzstiftung.
51. Kardiologie DGf. 2019. Deutscher Herzbericht 2018.
52. Kiema TR, Harijan RK, Strozyk M, Fukao T, Alexson SE, Wierenga RK. 2014. The crystal structure of human mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase (T1): insight into the reaction mechanism of its thiolase and thioesterase activities. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70 (Pt 12):3212-3225.
53. Kim YI, Lee FN, Choi WS, Lee S, Youn JH. 2006. Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin-resistant states. *Diabetes*, 55 (8):2311-2317.

54. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal*, 20 (6):1010-1018.
55. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*, 225 (3):631-637.
56. Kretzschmar T, Wu JMF, Schulze PC. 2021. Mitochondrial Homeostasis Mediates Lipotoxicity in the Failing Myocardium. *Int J Mol Sci*, 22 (3).
57. Kurano M, Yatomi Y. 2018. Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 25 (1):16-26.
58. Lahiri S, Park H, Laviad EL, Lu X, Bittman R, Futerman AH. 2009. Ceramide synthesis is modulated by the sphingosine analog FTY720 via a mixture of uncompetitive and noncompetitive inhibition in an Acyl-CoA chain length-dependent manner. *J Biol Chem*, 284 (24):16090-16098.
59. Lahiri S, Lee H, Mesicek J, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, Futerman AH. 2007. Kinetic characterization of mammalian ceramide synthases: determination of $K(m)$ values towards sphinganine. *FEBS Lett*, 581 (27):5289-5294.
60. Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH, Jr., Futerman AH. 2008. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, 283 (9):5677-5684.
61. Law BA, Liao X, Moore KS, Southard A, Roddy P, Ji R, Szulc Z, Bielawska A, Schulze PC, Cowart LA. 2018. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J*, 32 (3):1403-1416.
62. Lee SJ. 1991. Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (10):4250-4254.
63. Lemarie A, Grimm S. 2011. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene*, 30 (38):3985-4003.
64. Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, Hundley WG, Widiapradja A, Manteufel EJ, Bradshaw TW, Melendez GC. 2019. Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts. *Heart Lung Circ*, 28 (10):1598-1605.
65. Levy M, Futerman AH. 2010. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*, 62 (5):347-356.
66. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgozoglu L, Lewis EF. 2019. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 5 (1):56.
67. Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan SD, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE. 2004. The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 351 (2):145-153.
68. Liu R, Chan DC. 2015. The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1. *Mol Biol Cell*, 26 (24):4466-4477.
69. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 24 (5):659-667.
70. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB, American Heart A, Council on Clinical Cardiology HF, Transplantation C, Quality of C, Outcomes R, Functional G, Translational Biology Interdisciplinary Working G, Council on E, Prevention. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional

- Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113 (14):1807-1816.
71. McKavanagh P, Zawadowski G, Ahmed N, Kutryk M. 2018. The evolution of coronary stents. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 16 (3):219-228.
 72. McNally EM, Mestroni L. 2017. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res*, 121 (7):731-748.
 73. Meckfessel MH, Brandt S. 2014. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *J Am Acad Dermatol*, 71 (1):177-184.
 74. Merrill AH, Jr. 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, 277 (29):25843-25846.
 75. Mesika A, Ben-Dor S, Laviad EL, Futerman AH. 2007. A new functional motif in Hox domain-containing ceramide synthases: identification of a novel region flanking the Hox and TLC domains essential for activity. *J Biol Chem*, 282 (37):27366-27373.
 76. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JA. 2011. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*, 57 (8):891-903.
 77. Mitrut R, Stepan AE, Margaritescu C, Andreiana BC, Kesse AM, Simionescu CE, Militaru C. 2019. Immunoexpression of MMP-8, MMP-9 and TIMP-2 in dilated cardiomyopathy. *Rom J Morphol Embryol*, 60 (1):119-124.
 78. Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y. 2005. Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J*, 390 (Pt 1):263-271.
 79. Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y. 2006. LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem J*, 398 (3):531-538.
 80. Mizutani Y, Kihara A, Chiba H, Tojo H, Igarashi Y. 2008. 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J Lipid Res*, 49 (11):2356-2364.
 81. Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V, Kassiri Z. 2012. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev*, 17 (4-5):693-706.
 82. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. 2012. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*, 441 (3):789-802.
 83. Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417 (1):1-13.
 84. Naegeli B. 2004. Myokarditis: Diagnostik und Verlauf. In: TF L, Hrsg. *Cardiovascular Medicine 2004/06*. Cardiovascular Medicine 248-257.
 85. Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han XX, Wilson MH, Jain SS, Snook LA, Glatz JF, Chabowski A, Luiken JJ, Bonen A. 2009. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, 284 (24):16522-16530.
 86. Novgorodov SA, Riley CL, Keffler JA, Yu J, Kindy MS, Macklin WB, Lombard DB, Gudz TI. 2016. SIRT3 Deacetylates Ceramide Synthases: IMPLICATIONS FOR MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND BRAIN INJURY. *J Biol Chem*, 291 (4):1957-1973.
 87. Okamoto F, Tanaka T, Sohmiya K, Kawamura K. 1998. CD36 abnormality and impaired myocardial long-chain fatty acid uptake in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Circ J*, 62 (7):499-504.

88. Osellame LD, Singh AP, Stroud DA, Palmer CS, Stojanovski D, Ramachandran R, Ryan MT. 2016. Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J Cell Sci*, 129 (11):2170-2181.
89. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191 (6):1141-1158.
90. Overbeek MJ, Mouchaers KT, Niessen HM, Hadi AM, Kupreishvili K, Boonstra A, Voskuyl AE, Belien JA, Smit EF, Dijkmans BC, Vonk-Noordegraaf A, Grunberg K. 2010. Characteristics of interstitial fibrosis and inflammatory cell infiltration in right ventricles of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Int J Rheumatol*, 2010.
91. Passaroni AC, Silva MA, Yoshida WB. 2015. Cardiopulmonary bypass: development of John Gibbon's heart-lung machine. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 30 (2):235-245.
92. Pei XM, Yung BY, Yip SP, Ying M, Benzie IF, Siu PM. 2014. Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via the GHSR-independent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306 (3):E311-323.
93. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. 2002. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*, 39 (2):258-263.
94. Picard M, White K, Turnbull DM. 2013. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol* (1985), 114 (2):161-171.
95. Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. 2004. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*, 44 (8):1609-1618.
96. Renu K, V GA, P BT, Arunachalam S. 2018. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol*, 818:241-253.
97. Riebeling C, Allegood JC, Wang E, Merrill AH, Jr., Futerman AH. 2003. Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J Biol Chem*, 278 (44):43452-43459.
98. Ring ME. 2001. How a dentist's name became a synonym for a life-saving device: the story of Dr. Charles Stent. *J Hist Dent*, 49 (2):77-80.
99. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F, Alvis-Guzman N, Amrock S, Ansari H, Arnlov J, Asayesh H, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Banerjee A, Barac A, Barnighausen T, Barregard L, Bedi N, Belay Ketema E, Bennett D, Berhe G, Bhutta Z, Bitew S, Carapetis J, Carrero JJ, Malta DC, Castaneda-Orjuela CA, Castillo-Rivas J, Catala-Lopez F, Choi JY, Christensen H, Cirillo M, Cooper L, Jr., Criqui M, Cundiff D, Damasceno A, Dandona L, Dandona R, Davletov K, Dharmaratne S, Dorairaj P, Dubey M, Ehrenkranz R, El Sayed Zaki M, Faraon EJA, Esteghamati A, Farid T, Farvid M, Feigin V, Ding EL, Fowkes G, Gebrehiwot T, Gillum R, Gold A, Gona P, Gupta R, Habtewold TD, Hafezi-Nejad N, Hailu T, Hailu GB, Hankey G, Hassen HY, Abate KH, Havmoeller R, Hay SI, Horino M, Hotez PJ, Jacobsen K, James S, Javanbakht M, Jeemon P, John D, Jonas J, Kalkonde Y, Karimkhani C, Kasaeian A, Khader Y, Khan A, Khang YH, Khara S, Khoja AT, Khubchandani J, Kim D, Kolte D, Kosen S, Krohn KJ, Kumar GA, Kwan GF, Lal DK, Larsson A, Linn S, Lopez A, Lotufo PA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Mazidi M, Meier T, Meles KG, Mensah G, Meretoja A, Mezgebe H, Miller T, Mirrakhimov E, Mohammed S, Moran AE, Musa KI, Narula J, Neal B, Ngalesoni F, Nguyen G, Obermeyer CM, Owolabi M, Patton G, Pedro J, Qato D, Qorbani M, Rahimi K, Rai RK, Rawaf S,

- Ribeiro A, Safiri S, Salomon JA, Santos I, Santric Milicevic M, Sartorius B, Schutte A, Sepanlou S, Shaikh MA, Shin MJ, Shishehbor M, Shore H, Silva DAS, Sobngwi E, Stranges S, Swaminathan S, Tabares-Seisdedos R, Tadele Atnafu N, Tesfay F, Thakur JS, Thrift A, Topor-Madry R, Truelsen T, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Vlassov V, Vollset SE, Wakayo T, Watkins D, Weintraub R, Werdecker A, Westerman R, Wiysonge CS, Wolfe C, Workicho A, Xu G, Yano Y, Yip P, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Vos T, Naghavi M, Murray C. 2017. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*, 70 (1):1-25.
100. Sachin Khambadkone PB. 2009. Interventional Techniques. In: Robert H. Anderson EJB, Daniel J. Penny, Andrew N. Redington, Michael L. Riby, Gil Wernovsky, Hrsg. *Paediatric Cardiology*. Elsevier, 291-312.
 101. Samadashvili Z, Sundt TM, 3rd, Wechsler A, Chikwe J, Adams DH, Smith CR, Jordan D, Girardi L, Lahey SJ, Gold JP, Ashraf MH, Hannan EL. 2019. Multiple Versus Single Arterial Coronary Bypass Graft Surgery for Multivessel Disease. *J Am Coll Cardiol*, 74 (10):1275-1285.
 102. Santiago JJ, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, Bedosky KM, Freed DH, Kardami E, Dixon IM. 2010. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn*, 239 (6):1573-1584.
 103. Sassa T, Hirayama T, Kihara A. 2016. Enzyme Activities of the Ceramide Synthases CERS2-6 Are Regulated by Phosphorylation in the C-terminal Region. *J Biol Chem*, 291 (14):7477-7487.
 104. Sattler K, Levkau B. 2009. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res*, 82 (2):201-211.
 105. Schiffmann S, Sandner J, Birod K, Wobst I, Angioni C, Ruckhaberle E, Kaufmann M, Ackermann H, Lotsch J, Schmidt H, Geisslinger G, Grosch S. 2009. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis*, 30 (5):745-752.
 106. Schlessinger J. 1997. Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell*, 91 (7):869-872.
 107. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. 2010. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage*, 18 Suppl 3:S113-116.
 108. Schultheiss HP, Kuhl U. 2006. Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop*, (55):3-18.
 109. Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, Liu PP, Matsumori A, Mazzanti A, McMurray J, Priori SG. 2019. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers*, 5 (1):32.
 110. Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, Colombo A, Holmes DR, Mack MJ, Stahle E, Feldman TE, van den Brand M, Bass EJ, Van Dyck N, Leadley K, Dawkins KD, Mohr FW, Investigators S. 2009. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med*, 360 (10):961-972.
 111. Siskind LJ. 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*, 37 (3):143-153.
 112. Smith KM, Squiers J. 2013. Hypertrophic cardiomyopathy: an overview. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 25 (2):263-272.
 113. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, 105 (12):1164-1176.

114. Spassieva S, Seo JG, Jiang JC, Bielawski J, Alvarez-Vasquez F, Jazwinski SM, Hannun YA, Obeid LM. 2006. Necessary role for the Lag1p motif in (dihydro)ceramide synthase activity. *J Biol Chem*, 281 (45):33931-33938.
115. Spinale FG, Janicki JS, Zile MR. 2013. Membrane-associated matrix proteolysis and heart failure. *Circ Res*, 112 (1):195-208.
116. Sridevi P, Alexander H, Laviad EL, Pewzner-Jung Y, Hannink M, Futerman AH, Alexander S. 2009. Ceramide synthase 1 is regulated by proteasomal mediated turnover. *Biochim Biophys Acta*, 1793 (7):1218-1227.
117. Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT. 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*, 117 (Pt 7):1201-1210.
118. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 65 (2):157-170.
119. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. 2008. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*, 60 (2):181-195.
120. Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T. 2005. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol*, 167 (1):71-80.
121. Tanaka R, Umemura M, Narikawa M, Hikichi M, Osaw K, Fujita T, Yokoyama U, Ishigami T, Tamura K, Ishikawa Y. 2020. Reactive fibrosis precedes doxorubicin-induced heart failure through sterile inflammation. *ESC Heart Fail*.
122. Tang H, Tao A, Song J, Liu Q, Wang H, Rui T. 2017. Doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis: Role of mitofusin 2. *Int J Biochem Cell Biol*, 88:55-59.
123. Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. 2006. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis*, 1:27.
124. Tepper AD, Ruurs P, Wiedmer T, Sims PJ, Borst J, van Blitterswijk WJ. 2000. Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J Cell Biol*, 150 (1):155-164.
125. Tian J, An X, Niu L. 2017. Myocardial fibrosis in congenital and pediatric heart disease. *Exp Ther Med*, 13 (5):1660-1664.
126. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P, Group ESCSD. 2018. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J*, 39 (7):508-579.
127. Umbarawan Y, Syamsunarno M, Koitabashi N, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Hayakawa N, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T. 2018. Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure. *Sci Rep*, 8 (1):12035.
128. Van Brocklyn JR, Williams JB. 2012. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 163 (1):26-36.
129. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH. 2000. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol*, 20 (15):5454-5468.
130. Venkataraman K, Riebeling C, Bodennec J, Riezman H, Allegood JC, Sullards MC, Merrill AH, Jr., Futerman AH. 2002. Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1),

- regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem*, 277 (38):35642-35649.
131. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. 2004. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res*, 95 (3):253-260.
 132. Wanikawa M, Nakamura H, Emori S, Hashimoto N, Murayama T. 2019. Accumulation of sphingomyelin in Niemann-Pick disease type C cells disrupts Rab9-dependent vesicular trafficking of cholesterol. *J Cell Physiol*.
 133. Wattenberg BW. 2018. The long and the short of ceramides. *J Biol Chem*, 293 (25):9922-9923.
 134. Weinmann A, Galle PR, Teufel A. 2005. LASS6, an additional member of the longevity assurance gene family. *Int J Mol Med*, 16 (5):905-910.
 135. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. 2017. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 390 (10092):400-414.
 136. Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. 2009. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician*, 79 (9):778-784.
 137. Williams IR. 1998. Fibroblasts. In: Delves PJ, Hrsg. *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, 905-909.
 138. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jimenez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. 2016. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133 (4):e38-360.
 139. Wynn TA. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214 (2):199-210.
 140. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL. 2013. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*, 128 (16):1810-1852.
 141. Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV, Jr. 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*, 49 (11):2283-2301.
 142. Zamilpa R, Lindsey ML. 2010. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. *J Mol Cell Cardiol*, 48 (3):558-563.
 143. Zhang X, Fan J, Li H, Chen C, Wang Y. 2021. CD36 Signaling in Diabetic Cardiomyopathy. *Aging Dis*, 12 (3):826-840.

10 Anhang

10.1 Publikationsliste (Stand 10/2021)

1. Hilse MS, **Kretzschmar T**, Pistulli R, Franz M, Bekfani T, Haase D, Neugebauer S, Kiehntopf M, Gummert JF, Milting H, Schulze PC. 2021. Analysis of Metabolic Markers in Patients with Chronic Heart Failure before and after LVAD Implantation. *Metabolites*, 11 (9):615. (Geteilte Erstautorenschaft)
2. **Kretzschmar T**, Wu JMF, Schulze PC. 2021. Mitochondrial Homeostasis Mediates Lipotoxicity in the Failing Myocardium. *Int J Mol Sci*, 22 (3).
3. Bekhite M, Gonzalez-Delgado A, Hubner S, Haxhikadrija P, **Kretzschmar T**, Muller T, Wu JMF, Bekfani T, Franz M, Wartenberg M, Graler M, Greber B, Schulze PC. 2021. The role of ceramide accumulation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on mitochondrial oxidative stress and mitophagy. *Free Radic Biol Med*, 167:66-80.
4. Bekfani T, Bekhite Elsaied M, Derlien S, Nisser J, Westermann M, Nietzsche S, Hamadanchi A, Frob E, Westphal J, Haase D, **Kretzschmar T**, Schlattmann P, Smolenski UC, Lichtenauer M, Wernly B, Jirak P, Lehmann G, Mobius-Winkler S, Schulze PC. 2020. Skeletal Muscle Function, Structure, and Metabolism in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail*, 13 (12):e007198.
5. Bekhite MM, Gonzalez Delgado A, Menz F, **Kretzschmar T**, Wu JMF, Bekfani T, Nietzsche S, Wartenberg M, Westermann M, Greber B, Schulze PC. 2020. Longitudinal metabolic profiling of cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. *Basic Res Cardiol*, 115 (4):37.

10.2 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. P. Christian Schulze für die Bereitstellung des Themas, der herausragenden Betreuung und der immerwährenden Motivation und Unterstützung mein Bestes zu geben. Weiterhin bedanke ich mich für die Möglichkeit meinen Anteil in den verschiedensten und interessantesten Projekten beizutragen und so mein Wissen und Verständnis kontinuierlich zu erweitern.

Mein weiterer Dank gebührt Beate Schulze und Martina Voigt, die mich in ihrer Funktion als TAs immer unterstützt haben.

Weiterhin bedanke ich bei meiner Mutter und meinen Großeltern, die mich in jeder Phase meines Lebens so gut es ging, unterstützt haben und mich immer meinen eigenen Weg gehen haben lassen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Freunden und all dem, was sie für mich getan haben und wie viel sie mir bedeuten. Ohne sie, und dass sage ich aus voller Überzeugung, wäre ich nie so weit gekommen und heute nicht hier.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. P. Christian Schulze, Dr. Mohamed Bekhite,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder ander wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Disseration eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers