

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

DISSERTATION

**Verbesserung des Katecholamin-induzierten Herzschadens durch  
pharmakologische Inhibition der Adipozyten-Triglycerid-Lipase  
(ATGL) im Fettgewebe mittels Atglistatin**

**Improvement of catecholamine-induced myocardial damage by  
pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase (ATGL) in  
adipose tissue using Atglistatin**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Medical Doctor - Doctor of Philosophy (MD/PhD)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arne Thiele

aus Hildesheim

Datum der Promotion: 25.06.2023

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Zusammenfassung .....	VII
Abstract .....	IX
1 Einleitung .....	11
1.1 Herzinsuffizienz und neurohumorale Aktivierung .....	11
1.2 Zytoplasmatische Lipolyse und ihre Regulation .....	12
1.3 Herzinsuffizienz und Lipolyse im Fettgewebe .....	13
1.4 Nicht-kardiale ATGL in der Entwicklung der Herzinsuffizienz .....	15
1.5 Hypothese .....	16
2 Methodik .....	17
2.1 Tierversuche .....	17
2.2 <i>Ex vivo</i> Lipolyse in isolierten Fettgewebsexplantaten .....	19
2.3 <i>In vitro</i> TAG-Hydrolaseaktivität .....	19
2.4 TAG-Quantifizierung .....	20
2.5 Lipidomanalyse .....	20
2.6 Echokardiographie .....	20
2.7 Histologie .....	21
2.8 Genexpressionsanalyse .....	21
2.9 Microarray-Genexpressionsanalyse .....	23
2.10 Proteinexpressionsanalyse .....	23
2.11 Experimente in 3T3-L1 Adipozyten .....	24
2.12 Experimente in HL-1 Kardiomyozyten .....	25
2.13 LDH Zytotoxizitäts-Assay .....	26
2.14 Biostatistische Analyse der Fettsäure- und Lipidomdaten .....	26
2.15 Statistik .....	27
3 Ergebnisse .....	28
3.1 Einfluss von Atglistatin auf die Fettgewebs- und Herzlipolyse .....	28
3.2 Langfristige Wirkung von Atglistatin .....	28
3.3 Akute präventive Effekte von Atglistatin auf das kardiale Remodeling .....	33
3.4 Akute präventive Effekte von Atglistatin auf die kardiale Inflammation .....	34

---

3.5	Akuter präventiver Einfluss von Atglistatin auf die kardiale Apoptose .....	34
3.6	<i>In vitro</i> Effekte der adipozytären ATGL auf Kardiomyozyten .....	36
3.7	Akute präventive Wirkung von Atglistatin auf Lipide im Serum und kardiale Ceramide .....	38
4	Diskussion .....	41
4.1	ATGL-Inhibition im Katecholamin-vermittelten Schädigungsmodell .....	41
4.2	Adipozytäre ATGL-Inhibition und kardiale Inflammation .....	42
4.3	Adipozytäre ATGL-Inhibition und Lipid-vermittelte Apoptose im Herz .....	43
4.4	Limitationen .....	44
4.5	Klinische Perspektive .....	44
5	Literaturverzeichnis .....	46
	Eidesstattliche Versicherung .....	LVII
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation .....	LVIII
	Auszug aus der Journal Summary List .....	LIX
	Druckexemplar der Publikation: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. Published online June 21, 2021:cvab182 .....	LX
	Lebenslauf .....	LXXVIII
	Publikationsliste .....	LXXX
	Danksagung .....	LXXXIII

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Primersequenzen für die RT-qPCR. ....	22
Tabelle 2. Primäre und sekundäre Antikörper für das Western-Blotting. ....	24

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Intrazelluläre Lipolyse. ....	13
Abbildung 2. Regulation der Lipolyse in Adipozyten. ....	14
Abbildung 3. Einfluss von Atglistatin auf die Fettgewebs- und Herzlipolyse. ....	29
Abbildung 4. Langfristige präventive Wirkung von Atglistatin. ....	30
Abbildung 5. Langfristiger Einfluss eines fettgewebsspezifischen ATGL-Knockouts. ...	31
Abbildung 6. Langfristige therapeutische Wirkung von Atglistatin. ....	32
Abbildung 7. Akute präventive Effekte von Atglistatin auf das kardiale Remodeling. ....	33
Abbildung 8. Akute präventive Effekte von Atglistatin auf die kardiale Inflammation. ...	35
Abbildung 9. Akuter präventiver Einfluss von Atglistatin auf kardiale Apoptosemarker. ...	36
Abbildung 10. In vitro Einfluss der adipozytären ATGL auf Kardiomyozyten. ....	37
Abbildung 11. Akute präventive Wirkung von Atglistatin auf die Serumlipide. ....	39
Abbildung 12. Akute präventive Wirkung von Atglistatin auf die kardialen Ceramide. ..	40
Abbildung 13. Graphische Zusammenfassung. ....	41

---

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of Variance</i> )
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
atATGL-KO	Adipozyten-spezifischer ATGL-Knockout
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATGLi	Atglistatin
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CGI-58	<i>Coactivator comparative gene identification-58</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CTRL	Kontrolle
DAG	Diacylglyceride
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EF	Ejektionsfraktion
ETO	Etomoxir
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FS	Verkürzungsfraction (engl. <i>fractional shortening</i> )
G0S2	<i>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> switch protein 2</i>
GCS	Globaler zirkumferentielle systolischer Spitzenstrain (engl. <i>global circumferential peak strain</i> )
GLS	Globaler longitudinaler systolischer Spitzenstrain (engl. <i>global longitudinal peak strain</i> )
GRS	Globaler radialer systolischer Spitzenstrain (engl. <i>global radial peak strain</i> )
HFD	Hochfettdiät
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (engl. <i>heart failure preserved reduced ejection fraction</i> )
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (engl. <i>heart failure with reduced ejection fraction</i> )

HPLC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HSL	Hormonsensitive-Lipase
ISO	Isoproterenol
MGL	Monoglycerid-Lipase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NEFA	Freie Fettsäure (engl. <i>non-esterified fatty acids</i> )
NP	Natriuretisches Peptid
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung (engl. <i>phosphat buffered saline</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i> )
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-qPCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
SSO	Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat
TAC	Konstriktion der transversen Aorta (engl. <i>transverse aortic constriction</i> )
TAG	Triacylglyceride
VEH	Vehikel
WAT	Weißes Fettgewebe (engl. <i>white adipose tissue</i> )
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Im Kontext der Herzinsuffizienz werden verschiedene neurohumorale Systeme aktiviert, unter anderem der Sympathikus mit einer kontinuierlichen Katecholaminenfreisetzung. Während dies zunächst die verringerte Herzleistung kompensiert, trägt eine chronische Überstimulation durch strukturelle und funktionelle Veränderungen zur Progression der Herzinsuffizienz bei, insbesondere bei reduzierter Ejektionsfraktion. Ferner führt die Sympathikusaktivierung zur Lipolyseinduktion im Fettgewebe, was weiter zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen kann. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Verringerung der Fettgewebslipolyse durch eine adipozytenspezifische Deletion des Schlüsselenzyms Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) vor der Entwicklung einer druckinduzierten Herzinsuffizienz bei Mäusen schützt. In der vorliegenden Studie wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die pharmakologische Inhibition der Fettgewebslipolyse durch Atglistatin, einem adipozytenspezifischen ATGL-Inhibitor, einen Katecholamin-induzierten Herzschaden positiv beeinflusst.

**Methoden:** Der Katecholamin-vermittelte Herzschaden wurde in 129/Sv-Mäusen durch viertägige subkutane Injektionen von Isoproterenol (ISO) induziert. Die orale Behandlung mit Atglistatin oder Kontrollfutter wurde fünf Tage zuvor begonnen und bis zum Ende des Versuchs fortgesetzt. Zwei und zwölf Tage nach der letzten ISO-Applikation wurde der Herzschaden mittels Echokardiographie einschließlich Speckle-Tracking-Technik, (Immun-)Histologie, Western Blot und RT-qPCR analysiert. Mechanistische Untersuchungen umfassten die massenspektrometrische Lipidomanalysen von Serum und Herzgewebe sowie Experimente in einem *in vitro* Modell zum kardialen Einfluss von Adipozyten.

**Ergebnisse:** Langfristige Analysen zwölf Tage nach ISO zeigten eine ausgeprägte subendokardiale Fibrose, einen beeinträchtigten globalen longitudinalen Strain sowie eine pro-fibrotische Geninduktion, die durch Atglistatinbehandlung deutlich verbessert wurde. Mechanistische Analysen zwei Tage nach ISO ergaben eine pro-apoptotische Reaktion auf Gen- und Proteinebene, die durch die Atglistatintherapie nahezu vollständig blockiert wurde. Weiterhin verringerte Atglistatin den ISO-vermittelten Anstieg der lipotoxischen Diacylglyceride und Ceramide im Blut. Mehrere Ceramid-Spezies waren zudem auch in Herzen von Atglistatin behandelten ISO-Mäusen reduziert. *In vitro* reduzierte Atglistatin die ISO-vermittelte Freisetzung spezifischer Fettsäuren -

Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure - aus Adipozyten, die pro-apoptotische Effekte in Kardiomyozyten auslösten.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Arbeit deutet auf eine wichtige Rolle der Fettgewebslipolyse in der Entwicklung des Katecholamin-induzierten Herzschadens hin. Die Modifikation durch pharmakologische ATGL-Inhibition in Adipozyten stellt dabei eine neue Strategie zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen dar, die mit neurohumoraler Aktivierung und erhöhten Katecholaminspiegeln einhergehen.

## Abstract

**Background:** Several neurohormonal systems are activated during heart failure, including the sympathetic nervous system with a sustained release of catecholamines. This response compensates for reduced cardiac output at first. However, chronic overactivation becomes detrimental by direct impairment of myocardial structure and function, particularly in heart failure with reduced ejection fraction. Moreover, exaggerated sympathetic activity results in a strong induction of adipose tissue lipolysis which may be another mechanism underlying the progression of heart failure. Recently, reduction of adipose tissue lipolysis by adipocyte-specific deletion of rate-limiting enzyme adipose triglyceride lipase (ATGL) has been shown to prevent pressure-mediated heart failure in mice. In this study, we hypothesized that pharmacological inhibition of adipose tissue lipolysis using Atglistatin, an adipocyte-specific ATGL inhibitor, attenuates catecholamine-induced cardiac damage.

**Methods:** Catecholamine-mediated cardiac injury was induced in 129/Sv mice by subcutaneous injections of isoproterenol (ISO) for four days. Oral treatment with Atglistatin or control was started five days prior to ISO and continued throughout the experiment. Two and twelve days after final ISO application, cardiac damage was analyzed by echocardiography including speckle-tracking technique, (immuno-)histology, western blot and RT-qPCR. Mechanistic studies included mass spectrometry-based lipidome analyses of serum and cardiac tissue as well as investigations in an *in vitro* model of adipose tissue – heart crosstalk.

**Results:** Long-term investigations twelve days after ISO revealed profound subendocardial fibrosis, an impaired global longitudinal strain and pro-fibrotic gene induction which was significantly ameliorated by treatment with Atglistatin. Mechanistic analyses two days after ISO showed strong pro-apoptotic gene and protein expression. Application of Atglistatin significantly blocked this pro-apoptotic response in the heart. Moreover, Atglistatin treatment significantly blocked the ISO-mediated increase of lipotoxic diacylglycerol and ceramide blood levels. Several ceramide species were also reduced in cardiac tissue of mice treated with ISO and Atglistatin. *In vitro*, Atglistatin attenuated the release of specific fatty acids - palmitic acid, palmitoleic acid, and oleic acid - by adipocytes in response to ISO stimulation, which exhibited pro-apoptotic signals in cardiomyocytes.

**Conclusion:** This study highlights the importance of adipose tissue lipolysis in the development of catecholamine-induced cardiac injury. In this regard, modification of adipose tissue lipolysis by pharmacological adipocyte-specific ATGL inhibition may represent a novel strategy for the treatment of cardiovascular diseases associated with neurohormonal activation and elevated catecholamine levels.

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz und neurohumorale Aktivierung

Die chronische Herzinsuffizienz stellt weltweit eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität dar<sup>1-3</sup>. Jeder fünfte Mensch erkrankt im Laufe seines Lebens an einer Herzinsuffizienz, die mit einer erheblich eingeschränkten Lebensqualität sowie Mortalitätsrate vergleichbar zu denen von verschiedenen Krebsarten assoziiert ist<sup>1-3</sup>. Nach den aktuellen Leitlinien wird die Herzinsuffizienz als ein klinisches Syndrom mit typischen Symptomen (z. B. Dyspnoe oder Fatigue) und/oder bestimmten Zeichen (z. B. erhöhter Jugularvenendruck, pulmonale Rasselgeräusche oder periphere Ödeme) definiert, das durch kardiale Strukturdefekte und/oder Funktionsstörungen verursacht und durch erhöhte natriuretische Peptide und/oder objektivierbaren Hinweise auf eine pulmonale oder systemische Stauung bestätigt wird<sup>4,5</sup>. Eine Klassifizierung der Herzinsuffizienz erfolgt auf Basis der Ejektionsfraktion (EF) in Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer EF (EF<40%; engl. *heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) und Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer EF (EF>50% engl. *heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF)<sup>4,5</sup>. Zwei weitere Formen, die Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter sowie verbesserter EF, sind klinisch von untergeordneter Relevanz<sup>4,5</sup>. Die zwei Hauptformen HFrEF und HFpEF unterscheiden sich in ihrer Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie deutlich. HFrEF basiert insbesondere auf einer direkten kardialen Schädigung, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt, einer chronischen Ischämie, hämodynamischen Überlastung oder genetischen Variation<sup>6</sup>. Diese führt zu einem irreversiblen Verlust von Kardiomyozyten mit folgendem kardialen Remodeling und Abnahme der kardialen Kontraktilität<sup>6</sup>. HFpEF wiederum ist Teil eines Multiorgansyndroms, das aus extrakardialen Komorbiditäten wie Adipositas, Diabetes oder arterieller Hypertonie resultiert und neben dem Herz auch den Skelettmuskel, die Lungengefäße oder die Niere betrifft<sup>7,8</sup>. Die Erkrankung ist durch eine niedriggradige systemische Inflammation charakterisiert, die zu einer erhöhten Steifigkeit der Kardiomyozyten, vermehrten kardialen Fibrosebildung sowie Beeinträchtigung der diastolischen Füllung des linken Ventrikels führt<sup>7,8</sup>.

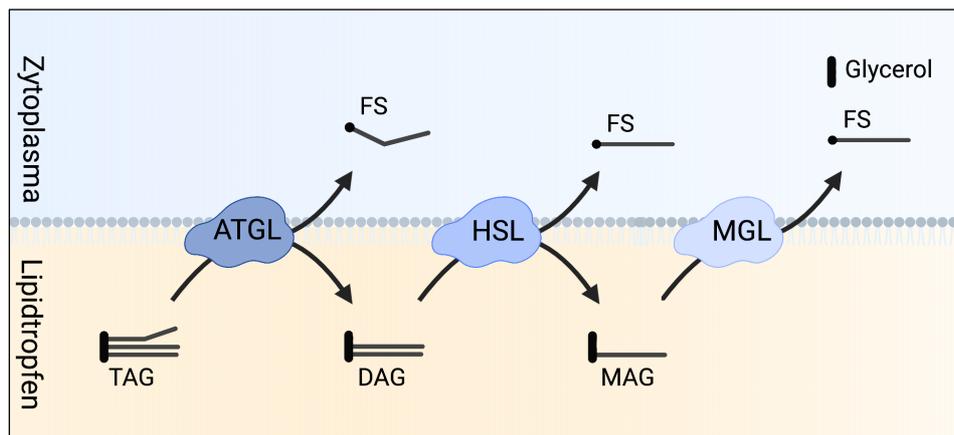
Die Pathophysiologie beider Formen der Herzinsuffizienz ist durch eine chronische Aktivierung des sympathischen Nervensystems gekennzeichnet, insbesondere im

Kontext der reduzierten EF<sup>9-13</sup>. Erhöht zirkulierende Konzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin steigern dabei über Bindung an  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren auf Kardiomyozten kompensatorisch die Herzfrequenz und Kontraktilität und erhöhen über Bindung an  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen den vaskulären Widerstand und folgend die kardiale Vorlast<sup>14,15</sup>. So kann in der Frühphase der Herzinsuffizienz das reduzierte Herzzeitvolumen zunächst kompensiert werden<sup>14,15</sup>. Langfristig wirkt die dauerhafte adrenerge Überstimulation jedoch schädlich und trägt durch Erhöhung der Vor- und Nachlast, Induktion apoptotischer sowie pro-inflammatorischer Prozesse sowie Deposition extrazellulärer Matrix (EZM) zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz bei<sup>15</sup>. Insbesondere in Patient\*innen mit HFrEF korreliert daher die Sympathikusaktivierung mit der Mortalität<sup>9,10</sup>. Die pharmakologische Inhibierung der neurohumoralen Aktivität mittels Betablocker verbessert die Prognose der HFrEF in verschiedenen Studien deutlich (MERIT-HF-Studie<sup>16</sup>, COPERNICUS-Studie<sup>17</sup>, CIBIS-II-Studie<sup>18</sup>) und gehört nach der aktuellen Leitlinie zu den effektivsten Therapieoptionen<sup>4</sup>. Trotz Fortschritten in der medikamentösen und nicht-medikamentösen Herzinsuffizienztherapie sind Morbidität und Mortalität jedoch weiterhin hoch, weshalb neue Therapieansätze dringend erforderlich sind<sup>19</sup>.

## 1.2 Zytoplasmatische Lipolyse und ihre Regulation

Die enzymatische Hydrolyse von in Lipidtropfen gespeicherten Triacylglyceriden (TAGs) zu Fettsäuren und Glycerol wird als intrazelluläre Lipolyse bezeichnet, wobei zwischen einem zytoplasmatischen/neutralen sowie lysosomalen Typ unterschieden wird<sup>20,21</sup>. Aufgrund ihrer Relevanz für Adipozyten und Kardiomyozyten liegt der Fokus der vorliegenden Studie auf der zytoplasmatischen/neutralen Lipolyse (im Folgenden nur als Lipolyse bezeichnet). Die höchste Aktivität findet sich dabei im weißen und braunen Fettgewebe, gefolgt vom Herz- und Skelettmuskel sowie der Leber<sup>22</sup>. In Säugetieren katalysieren drei Enzyme die Lipolyse: Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), Hormonsensitive-Lipase (HSL) und Monoglycerid-Lipase (MGL)<sup>23-25</sup>. Diese Hydrolasen spalten nacheinander TAGs, Diacylglyceride (DAGs) und Monoacylglyceride und setzen letztlich ein Glycerinmolekül und drei freie Fettsäuren (engl. *non-esterified fatty acids*, NEFAs) frei (**Abbildung 1**)<sup>23-25</sup>.

ATGL stellt das initiale und geschwindigkeitsbestimmende Enzym der TAG-Hydrolyse dar<sup>26</sup>. Das Enzym besteht aus einer katalytischen und regulierenden Domäne am N-



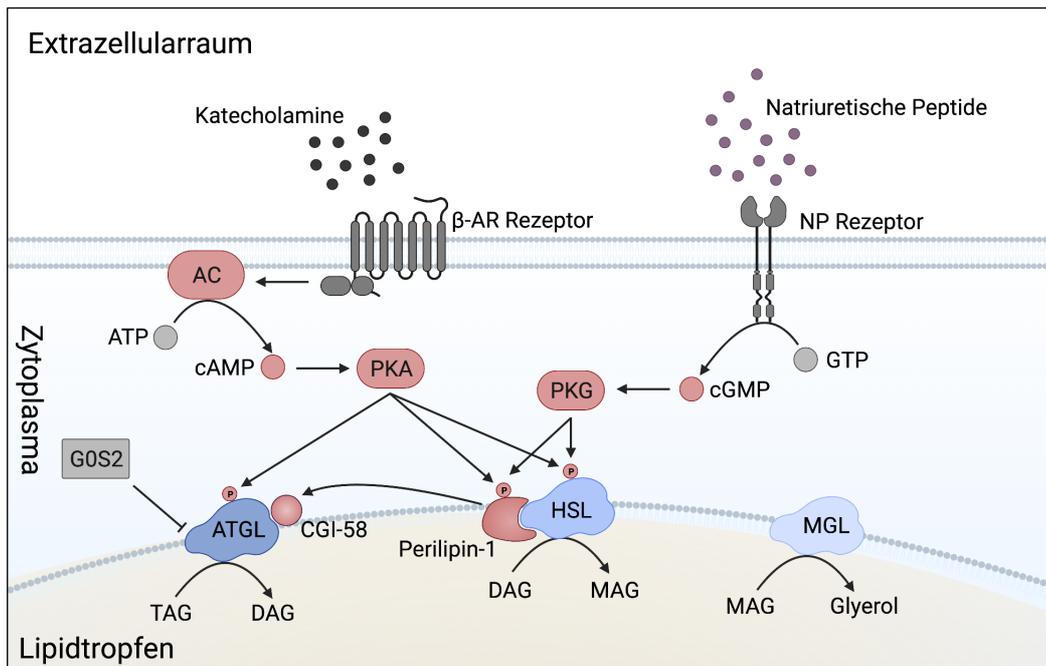
**Abbildung 1. Intrazelluläre Lipolyse.**

Triacylglyceride (TAG) werden in Lipidtropfen gespeichert und schrittweise abgebaut. Zunächst katalysiert das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) die Spaltung zu einem Diacylglycerid (DAG) und einer freien Fettsäure (FS). Die Hormonsensitive-Lipase (HSL) katalysiert dann den Abbau zu einem Monoacylglycerid (MAG) und einer FS. Abschließend setzt die Monoglycerid-Lipase (MGL) ein Glycerin und eine FS frei. Illustration modifiziert nach Zechner *et al.*<sup>21</sup> mit Biorender.com erstellt.

Terminus (Patatin Domäne) sowie einer hydrophoben Region am C-Terminus zur Bindung am Lipidtropfen<sup>27,28</sup>. Die Aktivität wird auf transkriptioneller, insbesondere jedoch auf post-translationaler Ebene über Cofaktoren und Phosphorylierungen reguliert (**Abbildung 2**)<sup>20</sup>. Zu den wichtigsten Cofaktoren zählen der Corepressor G0S2 (*G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> switch protein 2*)<sup>29,30</sup>, verschiedene Isoformen des Corepressors Perilipin<sup>31–34</sup> sowie der Coaktivator CGI-58 (*coactivator comparative gene identification-58*)<sup>35</sup>. Im Fettgewebe wird CGI-58 im basalen Zustand durch Bindung an das Lipidtropfenprotein Perilipin-1 inaktiviert<sup>36</sup>. Durch Proteinkinase A(PKA)-abhängige Phosphorylierung von Perilipin-1 wird die Bindung von CGI-58 jedoch gelöst, wodurch CGI-58 die ATGL-Aktivität stimuliert<sup>36</sup>. Im zweiten Schritt der Lipolyse katalysiert HSL die Freisetzung von Monoacylglyceriden und einem NEFA aus DAGs<sup>37</sup>. Die hydrolytische Aktivität wird über PKA- sowie Proteinkinase G(PKG)-vermittelte Phosphorylierung in Adipozyten gesteigert<sup>38,39</sup>. Zudem vermittelt PKA- und PKG-phosphoryliertes Perilipin-1 im Fettgewebe die HSL-Translokation vom Zytosol zum Lipidtropfen, wodurch die enzymatische Reaktion ermöglicht wird<sup>40</sup>. Im letzten Schritt der Lipolyse hydrolysiert MGL Monoacylglyceride zu Glycerin und einem NEFA<sup>25</sup>. Im Gegensatz zu ATGL und HSL sind die Mechanismen der Regulierung von MGL weniger komplex<sup>20</sup>.

### 1.3 Herzinsuffizienz und Lipolyse im Fettgewebe

Die im Rahmen der neurohumoralen Aktivierung erhöhten Katecholamine Adrenalin sowie Noradrenalin stellen über Aktivierung verschiedener  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren den wichtigsten Aktivator der Lipolyse im Fettgewebe dar (**Abbildung 2**)<sup>41</sup>. Die  $\beta$ -adrenerge



**Abbildung 2. Regulation der Lipolyse in Adipozyten.**

Katecholamine und natriuretische Peptide aktivieren die Lipolyse über Proteinkinase A und G. Phosphoryliertes Perilipin-1 aktiviert über den Coaktivator CGI-58 ATGL sowie über eine Translokation HSL. G0S2 stellt ein Corepressor dar.

ATP, Adenosintriphosphat; AC, Adenylatcyclase; ATGL, Adipozyten-Triglycerid-Lipase; AR, adrenerg; CGI-58, *Coactivator comparative gene identification-58*; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; cGMP, cyclisches Guanosinmonophosphat; DAG, Diacylglyceride; G0S2, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> switch protein 2; GTP, Guanosintriphosphat; HSL, Hormonsensitive-Lipase; MAG, Monoacylglyceride; MGL, Monoglycerid-Lipase; NP, natriuretische Peptide; P, Phosphorylierung; PKA, Proteinkinase A; PKG, Proteinkinase G; TAG, Triacylglyceride. Illustration modifiziert nach Grabner *et al.*<sup>36</sup> mit Biorender.com erstellt.

Stimulation führt über Aktivierung der Adenylatzyklase und Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Aktivierung der PKA<sup>21</sup>. PKA phosphoryliert anschließend Perilipin-1 und induziert damit die Lipolyse<sup>21</sup>. Weiterhin wird die lipolytische Aktivität über PKA-abhängige Phosphorylierung verschiedener Serinstellen von ATGL und HSL verstärkt<sup>38,42</sup>. Neben Katecholaminen regulieren die natriuretischen Peptide (NP) atriales natriuretisches Peptid (ANP) und B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) die Fettgewebslipolyse<sup>43</sup>. Die NP werden bei kardialer Überlastung oder Überdehnung von Kardiomyozyten sezerniert und sind im Rahmen der meisten Herzinsuffizienzformen erhöht<sup>44</sup>. Neben ihrer Wirkung auf den Volumen- und Elektrolythaushalt aktivieren sie über Bindung an Typ-A und -B NP-Rezeptoren die Lipolyse im Fettgewebe (**Abbildung 2**)<sup>43,44</sup>. Die Guanylatzyklase-gekoppelten Rezeptoren synthetisieren bei Aktivierung durch NP zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), das anschließend die cGMP-abhängige PKG aktiviert<sup>39</sup>. Die aktivierte PKG induziert dann durch Phosphorylierung von HSL sowie Perilipin-1 die Lipolyse in Adipozyten<sup>39</sup>.

Patient\*innen mit Herzinsuffizienz zeigen speziell im Kontext der reduzierten EF aufgrund der kardialen Funktionsschwäche und der damit assoziierten Sympathikusaktivierung erhöhte Serumkonzentrationen der pro-lipolytischen Katecholamine und NP<sup>9,45-47</sup>. Entsprechend konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass Patient\*innen insbesondere mit HFrEF eine verstärkte Fettgewebslipolyse mit erhöhten Serumkonzentrationen an NEFAs aufweisen<sup>48-50</sup>. Zwar ist das Herz unter physiologischen Bedingungen aufgrund der überwiegenden Adenosintriphosphat(ATP)-Gewinnung über die Fettsäureoxidation auf eine Fettsäureversorgung aus extrakardialen Speicherorganen wie dem Fettgewebe angewiesen<sup>51</sup>. Stark erhöhte Serumkonzentrationen an NEFAs verschlechtern jedoch über lipotoxische Effekte die kardiale Funktion und induzieren myokardiale Fibrose und Apoptose sowie kontraktile und mitochondriale Dysfunktion<sup>51</sup>. Unter Beachtung der chronischen Aktivierung der Fettgewebslipolyse und erhöhten NEFA-Konzentrationen stellt die Modulation dieser Prozesse einen möglichen neuen Ansatz zur Therapie der Herzinsuffizienz dar, insbesondere bei reduzierter EF.

#### **1.4 Nicht-kardiale ATGL in der Entwicklung der Herzinsuffizienz**

Verschiedene Arbeiten haben den Einfluss der nicht-kardialen ATGL auf die kardiale Funktion in unterschiedlichen Tiermodellen der kardialen Schädigung untersucht, insbesondere mit Fokus auf der ATGL im Fettgewebe. Ein im Jahr 2018 von unserer Arbeitsgruppe publizierter Ansatz war die Untersuchung des Einflusses der fettgewebsspezifischen ATGL auf die kardiale Funktion in einem druckinduzierten, murinen HFrEF-Modell mit Konstriktion der transversen Aorta (engl. *transverse aortic constriction*, TAC)<sup>52</sup>. Parallel zu Patient\*innen mit HFrEF zeigt das TAC-Modell eine neurohumorale Aktivierung mit erhöhten Katecholaminkonzentrationen sowie erhöhten NEFA-Konzentrationen im Serum als Surrogat für eine verstärkte Lipolyse im Fettgewebe<sup>53</sup>. Wir konnten zeigen, dass Mäuse mit einem adipozytenspezifischen ATGL-Knockout (atATGL-KO) verminderte NEFA-Serumkonzentrationen haben und vor der Entwicklung einer druckinduzierten Herzinsuffizienz geschützt sind<sup>52</sup>. Die verbesserte myokardiale Funktion ging mit einer Verringerung von TAC-induzierten Lipidveränderungen im Herzen sowie einer Abschwächung von apoptotischen Prozessen durch den atATGL-KO einher<sup>52</sup>. Eine weitere Studie konnte diese Ergebnisse bestätigen<sup>54</sup>.

2013 wurde ein pharmakologischer ATGL-Inhibitor mit dem Namen Atglistatin (ATGLi) entwickelt<sup>55</sup>. Diese niedermolekulare Verbindung (engl. *small molecule*) inhibiert ATGL

spezifisch und kompetitiv ohne andere Lipasen der Lipolyse zu beeinflussen<sup>55</sup>. Ferner akkumuliert Atglistatin nur im weißen und braunen Fettgewebe sowie in der Leber und nicht im Herz- oder Skelettmuskel<sup>55,56</sup>. Eine kardiale ATGL-Inhibition würde dabei mit einer schweren kardialen Steatose sowie ausgeprägten kardialen Dysfunktion einhergehen<sup>57</sup>. Die orale Behandlung mit Atglistatin inhibierte in einem murinen Adipositasmodell spezifisch die Fettgewebslipolyse, wodurch das Körpergewicht und die zirkulierenden NEFAs reduziert sowie die Entwicklung einer Insulinresistenz und die Entstehung einer nicht-alkoholischen Fettleber verhindert wurden<sup>56</sup>. Weiterhin zeigten Parajuli *et al.*, dass Atglistatin im TAC-vermittelten HFrEF-Modell die echokardiographische Verschlechterung der kardialen Funktion sowie die pulmonalen Stauung abschwächt<sup>54</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen der kardioprotektiven Wirkung sowie der Einfluss von Atglistatin auf die Interaktion zwischen Fettgewebe und Herz blieben jedoch unerforscht<sup>54</sup>.

## 1.5 Hypothese

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass die pharmakologische Inhibition von ATGL im Fettgewebe durch Atglistatin einen protektiven Einfluss auf einen Katecholamin-induzierten kardialen Schaden hat<sup>58</sup>. Zur Testung der Hypothese wurden die kardiale Funktion und das myokardiale Remodeling sowie die kardiale Inflammation und Apoptose zu unterschiedlichen Zeitpunkten in einem *in vivo* Modell des Katecholamin-vermittelten Herzschadens, induziert durch die Applikation des nicht-selektiven  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol (ISO), analysiert. Ein mechanistischer Fokus lag zudem auf der *in vivo* und *in vitro* Bedeutung von verschiedenen Lipiden und Fettsäuren in der Interaktion zwischen Fettgewebe und Herz.

## 2 Methodik

### 2.1 Tierversuche

Die Experimente wurden gemäß den deutschen und europäischen Richtlinien zum Tierschutz durchgeführt. Alle Tierversuche wurden durch die zuständige Behörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin; Genehmigungsnummern G 0322/09 vom 21.01.2010 und G 0136/16 vom 01.09.2016). Die Mäuse wurden bei 21°C Raumtemperatur und einem 12/12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser in Käfigen zu je zwei bis drei Tieren gehalten. Die unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden nach Stratifizierung für das Körpergewicht randomisiert.

Ein Teil der Versuche wurde in männlichen 6-9 Wochen alten 129/Sv Mäusen durchgeführt. Diese wurden von Janvier Labs (Frankreich) zur Verfügung gestellt und waren genetisch nicht verändert. Der Katecholamin-vermittelte Herzschaden wurde durch die repetitive, subkutane Injektion mit dem nicht-selektiven  $\beta$ -Agonisten ISO (25mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, Deutschland), gelöst in Natriumchlorid, an vier aufeinanderfolgenden Tagen induziert<sup>59,60</sup>. Die Kontrolltiere erhielten Natriumchlorid als Vehikel (VEH). Zur Untersuchung der Effekte einer pharmakologischen adipozytenspezifischen ATGL-Inhibition wurde Atglistatin (bereitgestellt durch R. Breinbauer, Technische Universität Graz, Österreich) in das Futter (Maus-Zucht-Extrudat, V1126; Ssniff Spezialdiäten, Deutschland) gemischt (2mmol kg<sup>-1</sup>). Da Atglistatin das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme beeinflusst<sup>56</sup>, wurde die Futteraufnahme der Kontrolltiere an die Aufnahme der mit Atglistatin-behandelten Tiere angepasst (sog. Paarfütterung). Zur Evaluation langfristiger präventiver Effekte der ATGL-Inhibition wurde die orale Behandlung mit Atglistatin fünf Tage vor der ersten ISO-Applikation begonnen und die Mäuse zwölf Tage nach der finalen ISO-Injektion getötet (**Abbildung 4A**; Gruppengröße: n=10 (CTRL/VEH), n=11 (CTRL/ISO), n=8 (ATGLi/VEH), n=9 (ATGLi/ISO)). Zur Analyse langfristiger therapeutischer Effekte wurde die Behandlung mit Atglistatin in einer Subgruppe an Mäusen einen Tag nach der letzten ISO-Gabe, nach etabliertem kardialen Schaden, begonnen (**Abbildung 6A**; Gruppengröße: n=10 (ATGLi/VEH), n=12 (ATGLi/ISO)). Zur mechanistischen Untersuchung akuter präventiver Effekte wurden in einem weiteren Experiment Mäuse bereits zwei Tage nach der letzten ISO-Injektion getötet (**Abbildung 7A**; Gruppengröße: n=7 (CTRL/VEH), n=12 (CTRL/ISO), n=13 (ATGLi/VEH), n=10 (ATGLi/ISO)). In den beschriebenen Experimenten wurde die kardiale *in vivo* Funktion der Mäuse einen Tag vor Euthanasie

mittels Echokardiographie beurteilt.

Ein weiterer Teil der Versuche wurde in männlichen 6-9 Wochen alten, kongenen C57BL/6N Mäusen mit atATGL-KO oder Geschwistermäusen ohne adipozytenspezifischen ATGL-Knockout (Wildtyp; WT) als Kontrolle durchgeführt. Mäuse mit einem LoxP-flankiertem ATGL-Gen (ATGL<sup>lox/lox</sup>) wurden mit Mäusen mit Expression einer aP2-Cre-Rekombinase gekreuzt, um atATGL-KO Mäuse (ATGL<sup>lox/lox</sup> Cre/+) und WT Mäuse (atATGL<sup>lox/lox</sup> +/+) zu generieren. Der kardiale Schaden wurde durch die subkutane Injektion von ISO hervorgerufen. Da in einem Vorversuch die viertägige Injektion von ISO (25mg kgKG<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) in männliche C57BL/6N keinen myokardialen Schaden auslöste (Daten nicht ausgewiesen), wurde das Protokoll modifiziert<sup>61</sup>. WT- und atATGL-KO Mäuse erhielten an 14 aufeinanderfolgenden Tagen subkutan ISO (5mg kgKG<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) oder Natriumchloridlösung (VEH) und wurden nach 22 Tagen getötet, zeitlich abgestimmt zu den Experimenten in 129/Sv Mäusen (**Abbildung 5A**; Gruppengröße: n=9 (WT/VEH), n=12 (WT/ISO), n=11 (atATGL-KO/VEH), n=15 (atATGL-KO/ISO)). Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung. Die *in vivo* Funktion des Herzens wurde einen Tag vor Tötung mittels Echokardiographie analysiert.

In einem weiteren Experiment wurde einer kleinen Gruppe (n=3) von männlichen, 4-6 Wochen alten C57BL/6J Mäusen eine Hochfettdiät (HFD, 60% kcal aus Fett; Altromin Spezialfutter, Deutschland) für 15 Wochen *ad libitum* gefüttert. Aufgrund der Resistenz von 129/Sv Mäusen gegenüber der Entwicklung einer HFD-induzierten Adipositas<sup>62</sup>, wurden für diese Versuche C57BL/6J Mäuse genutzt. Einer zusätzlichen Kontrollkohorte von männlichen, 6-9 Wochen alten C57BL/6J Mäusen (n=6) wurde eine Kontrolldiät *ad libitum* gefüttert.

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch zervikaler Disklokation unter inhalativer Narkose mit Isofluran. Gewebe sowie Blut aller Tiere wurden für weitere Analysen asserviert. Die Herzspitze wurde für Genexpressions- und Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff gefroren. Ein Gewebering wurde auf Papillarmuskelebene für (immun-)histologische Analysen in 4% Formalin fixiert. Das verbleibende Herzgewebe wurde zur Bestimmung der TAG-Hydrolase-Aktivität, TAG-Quantifizierung und Lipidomanalyse in flüssigem Stickstoff asserviert. Gonadales Fettgewebe wurde für die Lipolyseexperimente in PBS überführt sowie für Genexpressions- und Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff gelagert. Aus dem Blut wurde Serum gewonnen, das bei -80°C für spätere Analysen gelagert wurde.

## 2.2 *Ex vivo* Lipolyse in isolierten Fettgewebsexplantaten

Gonadales weißes Fettgewebe (engl. *white adipose tissue*, WAT) wurde aus behandlungsnaiven 129/Sv Mäusen (n=6; Janvier Labs) isoliert und in kleine Explantate geschnitten (~20mg). Das Gewebe wurde in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; GIBCO, USA) mit 10% fetalem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS, Sigma-Aldrich) und 100U/ml Penicillin-Streptomycin (P/S; PAN-Biotech, Deutschland) in Anwesenheit von 40µM Atglistatin bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) für 8h preinkubiert und anschließend in mit 40µM Atglistatin bzw. DMSO sowie 100µM ISO bzw. phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl. *phosphat buffered saline*; GIBCO) in Anwesenheit von 2% fettsäurefreiem Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Carl Roth, Deutschland) für 2h stimuliert.

Zur Bestimmung der Fettgewebslipolyse in behandelten 129/Sv Mäusen wurde gonadales Fettgewebe von ISO-injizierten, Atglistatin behandelten und unbehandelten 129/Sv Mäusen (n=6 pro Gruppe) zwölf Tage nach der finalen ISO-Injektion entnommen. Die zerkleinerten Explantate wurden in 2% fettsäurefreiem BSA für 1h preinkubiert und anschließend in 10µM Forskolin (Sigma-Aldrich) bzw. DMSO in Anwesenheit von 2% fettsäurefreiem BSA für 1h stimuliert.

Die Freisetzung von Glycerol und NEFAs wurde mit dem Free Glycerol Reagent Assay (Sigma-Aldrich) und NEFA-HR(2) Assay (FUJIFILM Wako Chemicals, Deutschland) nach Protokollen des Herstellers im Überstand gemessen. Zur Proteinbestimmung wurden die Lipide durch Inkubation der Fettgewebsexplantaten in Chloroform/Methanol(2/1)-Lösung extrahiert. Das restliche Gewebe wurde in NaOH/SDS (0,3N/0,1%) lysiert und die Proteinkonzentration anschließend mittels BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) bestimmt. Die NEFA- und Glycerolkonzentration wurde anschließend zur Proteinkonzentration normalisiert und pro Tier gemittelt (Experimentaleinheit).

## 2.3 *In vitro* TAG-Hydrolaseaktivität

Um den Einfluss der Atglistatinbehandlung auf die kardiale ATGL-Aktivität zu analysieren, erfolgte die *in vitro* Bestimmung der TAG-Hydrolase-Aktivität im kardialen Gewebe aus ISO-injizierten, Atglistatin behandelten und unbehandelten 129/Sv Mäusen zwölf Tage nach der finalen ISO-Injektion. Die Messung erfolgte unter Verwendung eines Radioaktivitätsassays in An- und Abwesenheit von rekombinant gereinigten CGI-58 durch G. F. Grabner (Universität Graz, Österreich) wie bereits beschrieben<sup>63</sup>.

## 2.4 TAG-Quantifizierung

Zur Beurteilung des Einflusses der Behandlung mit Atglistatin auf die kardiale TAG-Akkumulation wurden die TAGs im Herzgewebe von 129/Sv Mäusen zwölf Tage nach der finalen ISO-Injektion bestimmt. Als Positivkontrollen dienten C57BL/6J Mäuse, denen 15 Wochen eine HFD gefüttert wurde. Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus C57BL/6J Mäusen, gleichaltrig zu den 129/Sv Mäusen. Die Analyse wurde mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) durch M. Rothe (Lipidomix GmbH, Deutschland) durchgeführt wie bereits beschrieben<sup>58</sup>.

## 2.5 Lipidomanalyse

Um den Effekt der pharmakologischen, nicht-kardialen ATGL-Inhibition auf die Gesamtheit aller Lipide (Lipidom) in Blut und Herz zu untersuchen, erfolgte eine Massenspektrometrie-basierte Analyse in Serum von CTRL/VEH-, CTRL/ISO-, ATGLi/VEH- und ATGLi/ISO-behandelten Mäusen (n=5 pro Gruppe) sowie in kardialem Gewebe von CTRL/ISO- und ATGLi/ISO-behandelten Mäusen zwei Tage nach der finalen ISO-Injektion (n=5 pro Gruppe). Die Untersuchung wurde durch die Firma Lipotype GmbH (Deutschland) durchgeführt.

## 2.6 Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte mit einem Vevo 3100 Ultraschall-System und einem linearen 30 MHz-Schallkopf (MX400; beide FUJIFILM VisualSonics, Kanada) zu den angegebenen Zeitpunkten nach einem standardisierten Protokoll<sup>60</sup>. Die Mäuse wurden mit Isofluran (3% in 80% Sauerstoff) narkotisiert, in Rückenlage auf einem gewärmten Untersuchungstisch (37°C) positioniert und über eine integrierte EKG-Messung überwacht. Für vergleichbare Herzfrequenzen während der Untersuchung wurde die Isoflurankonzentration anschließend auf 0,5-1,5% angepasst. Die echokardiographischen Bilder wurden in der parasternalen langen und kurzen Achse sowie im apikalen 4-Kammer-Blick akquiriert und anschließend offline unter Verwendung einer Software (VevoLAB und VevoStrain, beide FUJIFILM VisualSonics) ausgewertet. Die linksventrikuläre EF wurde aus B-Mode Bildern der parasternalen langen Achse durch Markierung der endsystolischen und enddiastolischen Fläche kalkuliert. Die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (engl. *fractional shortening*, FS) wurde in M-Mode Bildern der parasternalen kurzen Achse auf Papillarmuskelebene anhand der Endokardbegrenzung erhoben. Die Mitralanulusgeschwindigkeit wurde unter Verwendung des Gewebedopplers (engl. *tissue doppler*) im apikalen 4-Kammer-Blick am

septalen Mitralanulus gemessen. Die gepulste Doppleruntersuchung (engl. *pulsed wave doppler*) im apikalen 4-Kammer-Blick ermöglichte unter Orientierung im farbkodierten Doppler die Analyse des Flussprofils über der Mitralklappe. Die myokardiale Deformation wurde mittels Speckle-Tracking Echokardiografie halbautomatisch analysiert. Die longitudinale Deformation wurden in der parasternalen langen Achse, die radiale und zirkumferentielle Deformation in der parasternalen kurzen Achse durch Markierung des Endo- und Epikards akquiriert. Der globale longitudinale (engl. *global longitudinal peak strain*, GLS), radiale (engl. *global radial peak strain*, GRS) sowie zirkumferentielle (engl. *global circumferential peak strain*, GCS) systolische Spitzenstrain sowie die Veränderung des Strain-Wertes pro Zeiteinheit (Strain Rate) wurden durch Bildung der Mittelwerte der einzelnen Segmente berechnet. Zur Minimierung von Verzerrungen wurden alle Parameter über mindestens drei kardiale Zyklen analysiert und anschließend gemittelt.

## 2.7 Histologie

Die (immun-)histologischen Färbungen wurden in Kooperation mit R. Klopfleisch (R.K., Freie Universität Berlin) durchgeführt. Der Formalin-fixierte Herzring wurden in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Präparate wurden anschließend mit Pikro-Siriusrot (Morphisto, Deutschland) zur Detektion der Kollagene 1 und 3 gefärbt und mithilfe eines Bildaufnahmegegerätes (Aperio CS2, Leica Biosystems, Deutschland) digitalisiert. Subendokard und Subepikard wurden in einer Ansichtssoftware (Aperio ImageScope, Leica Biosystems) manuell markiert, in denen ein trainierter Bildanalysealgorithmus (Aperio GENIE, Leica Biosystems) die gefärbten Kollagenfasern automatisch detektierte. Zur Untersuchung der kardialen Immunzellinfiltration wurden Paraffin-eingebettete Querschnitte mit einem polyklonalen Ratte-anti-Maus-MAC-3-Antikörper (Verdünnung 1:500, BD Pharmingen, USA) oder einem Kaninchen-anti-Maus-CD3-Antikörper (Verdünnung 1:800, Agilent Dako, USA) gefärbt. Zur Detektion wurde das Histofine-Simple-Stain-MAX-PO-Anti-Rat-Kit bzw. Histofine-Simple-Stain-MAX-PO-Anti-Rabbit-Kit (beide Nichirei Biosciences, Japan) mit 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen genutzt. Die Quantifizierung erfolgte semi-quantitativ durch R.K. wie folgt: 0 = keine oder geringe perivaskuläre Immunzellinfiltration, 1 = milde, multifokale Immunzellinfiltration, 2 = moderate, multifokale Immunzellinfiltration, 3 = schwere, multifokale Immunzellinfiltration.

## 2.8 Genexpressionsanalyse

Die Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) aus Fettgewebe, Herzgewebe bzw. HL-1 Zellen wurde mithilfe des *Qiazol Lysis Reagent* und *RNeasy Mini*

*Kit* (beide Qiagen, Deutschland), des *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) bzw. des *NucleoSpin RNA II Kit* (Machery-Nagel, Deutschland) nach Protokollen der Hersteller isoliert. Die Menge sowie Qualität der isolierten mRNA wurden mit dem NanoDrop1000 Spektrophotometer (Peqlab, Deutschland) bestimmt. Die reverse Transkription in komplementäre Desoxyribonukleinsäure erfolgte mit dem *Reverse Transcription System* (Promega, USA) nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Quantifikation der Expression erfolgte durch quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) mit *SYBR Green* Technologie auf einem CFX96 und CFX384 Real-Time PCR System (BioRad, USA). Die Auswertung erfolgte als relative Genexpression normalisiert auf ein stabil exprimiertes Gen (*reference gene*), *HSP90ab1* bzw. *β-Actin*, mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode<sup>64</sup>. Die Primersequenzen sind in **Tabelle 1** aufgelistet.

*Tabelle 1 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopfleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

## 2.9 Microarray-Genexpressionsanalyse

Um den Einfluss von Atglistatin auf nekrotische und apoptotische Prozesse zu analysieren, erfolgte die Expressionsanalyse von 84 mit dem Zelltod zusammenhängenden Genen in kardialem Gewebe von 129/Sv Mäusen (n=3 pro Gruppe) zwei Tage nach der finalen ISO-Injektion mittels eines Signalweg fokussierten und auf RT-qPCR basierenden Microarrays (*RT<sup>2</sup> Profiler Mouse Necrosis Array*, Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Der Array wurde auf einem CFX96 Real-Time PCR System (BioRad) mit gleichem Schwellenwert für jedes Gen quantifiziert. Zur Auswertung wurde die *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis* Software (Qiagen) genutzt, die die relative Genexpression normalisiert auf *HSP90ab1* (*reference gene*) mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode berechnete. Clustergram, Heatmap und Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) wurden unter Verwendung der webbasierten Software ClustVis<sup>65</sup> erstellt.

## 2.10 Proteinexpressionsanalyse

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde das Western-Blotting-Verfahren genutzt. Zur Proteinisolierung wurden Herz- und Fettgewebe sowie HL-1 Zellen durch einen mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (cOmplete bzw. PhosSTOP, Roche Diagnostics, Deutschland) supplementierten Lysis-Puffer (RIPA-Puffer) homogenisiert und anschließend sonifiziert. Der Proteingehalt wurden mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Die Proteine wurden unter Erhitzung denaturiert, durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung eines 10%igen, 12%igen oder 15%igen Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Nach Inkubation der PVDF-Membran mit dem Primärantikörper und Peroxidase-konjugierten-Sekundärantikörper (**Tabelle 2**) erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch Chemolumineszenz mittels ECL Western Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific) auf einem ChemiDoc-System (BioRad). Die Signalstärke der Proteinbanden wurde densitometrisch unter Verwendung der *Image Lab* Software (BioRad) ausgewertet.

*Tabelle 2 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

## **2.11 Experimente in 3T3-L1 Adipozyten**

Um den Einfluss des Fettgewebes auf den kardialen Schaden *in vitro* zu analysieren, wurde die 3T3-L1 Zelllinie als etabliertes Adipozytenmodell genutzt<sup>66</sup>. 3T3-L1 Präadipozyten (ATCC, UK) wurden in DMEM mit 10% FBS Sigma-Aldrich und 100U/ml P/S standardmäßig kultiviert. Zur Differenzierung der Präadipozyten in adulte Adipozyten wurde die Zellen zwei Tage nach Erreichen einer Konfluenz von 100% in einem Induktionsmix bestehend aus 0,5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin, 1µM Dexamethason, 10µg ml<sup>-1</sup> Insulin (alle Sigma-Aldrich) und 5µM Pioglitazon (Abcam) für drei Tage inkubiert. Dieser wurde anschließend durch einen Differenzierungsmix bestehend aus 10µg ml<sup>-1</sup> Insulin und 5µM Pioglitazon für zwei weitere Tage ersetzt. Es wurden ausschließlich Zellkulturen verwendet, bei denen mehr als 80% der Zellen zu 3T3-L1 Adipozyten differenziert waren.

Eine Oil-Red-O Färbung wurde durchgeführt, um intrazelluläre TAGs in undifferenzierten 3T3-L1 Präadipozyten und differenzierten 3T3-L1 Adipozyten zu detektieren. Hierfür

wurden Zellen in PBS gewaschen, in einer gefilterten Oil-Red-O Färbelösung (0,3% Oil-Red-O (SERVA, Deutschland) in 60% Isopropanol) inkubiert und durch ein Mikroskop (BZ-9000E, Keyence, Deutschland) visualisiert.

Die Lipolyseexperimente wurden nach nächtlichem Serumentzug (0,5% FBS) in DMEM mit 0,5% FBS und 100U/ml P/S durchgeführt. 3T3-L1 Adipozyten wurden mit 40µM Atglistatin bzw. DMSO für 2h preinkubiert und anschließend mit 100µM ISO bzw. PBS sowie 40µM Atglistatin bzw. DMSO in Anwesenheit von 2% fettsäurefreiem BSA für 1h stimuliert. Die Analyse der Glycerol- und NEFA-Freisetzung im Überstand erfolgte wie unter 2.2 beschrieben. Die Proteine wurden im Anschluss an eine Lipidextraktion mit Hexane/Isopropanol(3/2)-Lösung und einer Lyse in NaOH/SDS (0,3N/0,1%) mittels BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fischer Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Die NEFA- und Glycerolkonzentration wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. Die Ergebnisse wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen erhoben.

Die qualitative Analyse der NEFAs im Überstand erfolgte mittels HPLC-MS durch M. Rothe wie bereits beschrieben<sup>58</sup>.

## 2.12 Experimente in HL-1 Kardiomyozyten

Zur mechanistischen *in vitro* Charakterisierung des kardialen Schadens wurde die aus einem atrialen Maustumor stammende HL-1 Kardiomyozyten-Zelllinie genutzt (bereitgestellt durch W.C. Claycomb, Louisiana State University, USA)<sup>67</sup>. Die Zellen wurden in Claycomb-Medium supplementiert mit 10% HL-1-Zell-geprüftem FBS, 2mM L-Glutamin (alle Sigma-Aldrich) und 100U/ml P/S standardmäßig kultiviert. Die Experimente wurden in Zellkulturen mit einer Konfluenz von 80% nach nächtlichem Serumentzug (0,5% FBS) durchgeführt.

Um die Auswirkung der von 3T3-L1 Adipozyten sezernierten NEFAs zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem Mix aus drei Fettsäuren (FA-Mix, gelöst in 10% fettsäurefreiem BSA), bestehend aus C16:0 (Palmitinsäure; Sigma-Aldrich), C16:1n-7 (Palmitoleinsäure; Sigma-Aldrich) und C18:1n-9c (Ölsäure; Cayman Chemical, USA), bzw. BSA für 6h stimuliert. Die Fettsäuren des FA-Mix waren äquimolar zu denen in der qualitativen Analyse unter 2.11 gemessenen Mengen konzentriert. Zur Untersuchung des Einflusses der Fettsäuren-Translokase CD36 wurden die HL-1 Kardiomyozyten nach 4h Preinkubation mit 50µM Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat (SSO; Sigma-Aldrich), einem pharmakologischen CD36-Inhibitor<sup>68</sup>, bzw. DMSO mit FA-Mix bzw. BSA für 3h stimuliert.

Um die Auswirkung der Carnitin-Acyltransferase 1 zu analysieren, wurden die Zellen mit 100µM Etomoxir (ETO; Sigma-Aldrich), einem pharmakologischen Inhibitor der Carnitin-Palmityltransferase <sup>169</sup>, bzw. PBS für 0,5h preinkubiert und anschließend mit der Kombination aus FA-Mix bzw. BSA und 100µM ETO bzw. PBS für 6h stimuliert. Die Zellen wurden für Genexpressions- und Proteinanalysen bei -80°C bzw. -20°C gelagert. Alle Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### 2.13 LDH Zytotoxizitäts-Assay

Die *in vitro* Quantifizierung der LDH-Level erfolgte im Überstand durch den CyQUANT LDH Zytotoxizitäts-Assay (Thermo Fisher Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers photometrisch.

### 2.14 Biostatistische Analyse der Fettsäure- und Lipidomdaten

Es wurden 26 individuelle Fettsäuren in der qualitativen NEFA-Analyse unter 2.11 identifiziert, die auf die Gesamtmenge an Fettsäuren normalisiert und log<sub>2</sub> transformiert wurden. Zwei Fettsäuren wurden aufgrund fehlender Messwerte von der Analyse ausgeschlossen. Die Daten wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test überprüft. Anschließend wurde der Einfluss von ISO, Atglistatin oder der Kombination beider mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (engl. *analysis of Variance*, ANOVA) bei Normalverteilung oder mit Kruskal-Wallis Test bei fehlender Normalverteilung untersucht. Zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung wurden die p-Werte nach dem Benjamini-Hochberg-Verfahren korrigiert. Signifikant regulierte Fettsäuren wurden mit Bonferroni Post-Hoc-Test bzw. Dunn Post-Hoc-Test verglichen. Zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung wurden die p-Werte wieder nach dem Benjamini-Hochberg-Verfahren korrigiert. Statistische Signifikanz wurde bei einem FDR-korrigierten Signifikanzniveau (P) von < 0,05 angenommen. Zur Visualisierung der Daten erfolgte die Kalkulation des gemittelten log<sub>2</sub>-Wertes einer Gruppe und die Berechnung der relativen Änderung zwischen zwei Gruppen (log<sub>2</sub>-Verhältnis). Es wurde zudem der gemittelte molare Prozentanteil zweier Gruppen bestimmt.

Zur Auswertung der unter 2.5 analysierten Lipidomdaten wurden die Lipide zur Gesamtmenge jeder Probe normalisiert und log<sub>2</sub> transformiert. Lipidspezies mit drei oder mehr fehlenden Messwerten in einer Gruppe wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Serumdaten wurden zunächst auf Ebene der Lipidklassen miteinander verglichen. Fehlende Lipidspezieswerte wurden mit dem Gruppenmedian imputiert. Anschließend wurden die Spezieskonzentrationen jeder Klasse und jeder

Probe zu einem molare Prozentanteil summiert und Mittelwert und Standardfehler für jeder Gruppe gebildet. Abschließend wurden die Lipidklassen sowie die Ceramid- und DAG-Spezies mit einer zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Bonferroni Post-Hoc-Test für den Unterschied zwischen CTRL/VEH vs. CTRL/ISO und CTRL/ISO vs. ATGLi/ISO verglichen. Die kardialen Lipidomdaten wurden für Ceramide auf Ebene der Lipidklassen durch Berechnung des molaren Prozentanteils an der Gesamtmenge an Lipiden analysiert. Ceramide sowie Ceramidspezies wurden anschließend mittels zweiseitigen, ungepaarten *t*-Tests miteinander verglichen.

Alle Analysen und Abbildungen wurden in R (R Foundation, Österreich) unter Verwendung folgender Pakete durchgeführt: rstatix (version 0.4.0), RVAideMemoire (version 0.9-75), ggplot2 (version 3.2.1), pheatmap (1.0.12).

## 2.15 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA) durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Eine Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk Test festgestellt. Zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung mit einem zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test verglichen. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine ein- bzw. zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Bonferroni Post-Hoc-Test bei Normalverteilung, oder ein Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunn Post-Hoc-Test bei nicht normalverteilten Daten genutzt. Statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau (P) von  $< 0,05$  angenommen. Statistische Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach Grubbs identifiziert. Die Fallzahlberechnung der *in vivo* Experimente basierte auf der bisherigen Erfahrung mit dem ISO-Modell<sup>59,60</sup>.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von Atglistatin auf die Fettgewebs- und Herzlipolyse

Zunächst wurde der Einfluss von Atglistatin auf den Fettsäuremetabolismus im Fett- und Herzgewebe untersucht (**Abbildung 3**). Die *ex vivo* Behandlung von behandlungsnaiven WAT-Explantaten mit Atglistatin inhibierte vollständig die Katecholamin-induzierte Lipolyse, gemessen an der Freisetzung von NEFAs und Glycerol (**Abbildung 3A und B**). In ISO-injizierten Mäusen reduzierte die Atglistatinapplikation zudem die induzierbare NEFA-Freisetzung (**Abbildung 3A, Einsatz**). Weiterhin wurde die basale Gen- und Proteinexpression von ATGL, HSL und MGL im WAT von *in vivo* behandelten Mäusen analysiert (**Abbildung 3C-I**). Es waren keine Unterschiede durch ISO oder Atglistatin zu erkennen.

Die kardiale ATGL-Inhibition resultiert in einer kardialen Steatose mit letaler Kardiomyopathie<sup>57</sup>. Um vermeintliche Veränderungen der kardialen ATGL-Funktion durch Atglistatin auszuschließen, wurde die Expression sowie die enzymatische Aktivität von ATGL in Herzen von *in vivo* behandelten Mäusen untersucht (**Abbildung 3J-O**). Die Behandlung mit Atglistatin hatte dabei keinen Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression von ATGL (**Abbildung 3J-L**). Zudem wurde kein Feedback-Effekt auf HSL beobachtet, gemessen an der Proteinexpression sowie Phosphorylierung (Ser563 und Ser660) von HSL (**Abbildung 3K und M**). Weiterhin war die basale sowie mit dem spezifischen ATGL-Coaktivator CGI-58-stimulierte Hydrolaseaktivität von TAGs im kardialen Gewebe von ISO-injizierten Tieren vergleichbar (**Abbildung 3N**). Darüber hinaus konnte keine kardiale Lipidakkumulation durch Atglistatin beobachtet werden (**Abbildung 3O**). Letztlich deuten diese Daten auf eine spezifische ATGL-Inhibition durch Atglistatin im Fettgewebe hin ohne Beeinflussung der kardialen ATGL.

### 3.2 Langfristige Wirkung von Atglistatin

Zur Untersuchung langfristiger, präventiver Effekte der adipozytären ATGL-Inhibition durch Atglistatin unter  $\beta$ -adrenerger Überstimulation erhielten 129/Sv Mäuse an vier aufeinanderfolgenden Tagen Injektionen mit dem nicht-selektiven  $\beta$ -Agonisten ISO. Die Behandlung mit Atglistatin wurde fünf Tage vor der ersten ISO-Applikation gestartet (**Abbildung 4A**). Zwölf Tage nach der finalen ISO-Applikation zeigten sich histologisch fibrotische Läsionen, die insbesondere im Bereich des Subendokards ausgeprägt und unter Atglistatinbehandlung deutlich geringer ausgebildet waren (**Abbildung 4B-D**). Zur Bestätigung des anti-fibrotischen Effekts von Atglistatin wurde die Genexpression

*Abbildung 3 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

*Abbildung 4 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

von Fibrosegenen auf mRNA-Ebene analysiert. Sowohl *Kollagen 1a1* als auch *Kollagen 3a1* belegten den anti-fibrotischen Effekte von Atglistatin (**Abbildung 4E und F**). Es erfolgte zudem eine Analyse der kardialen *in vivo* Funktion durch Echokardiographie, wobei keine Veränderung in systolischen Parameter wie der EF oder FS beobachtet wurden (**Abbildung 4G-I**). Zudem erfolgte eine Untersuchung der myokardialen Deformation mittels Speckle-Tracking Technik. Durch die myokardiale Faserstruktur repräsentiert der GLS überwiegend den subendokardialen Status, während der GCS sowie GRS die meso- und subepikardiale Funktion darstellen (**Abbildung 4J**)<sup>59</sup>. Der GLS war in ISO-injizierten Mäusen signifikant eingeschränkt und wurde durch die Atglistatinbehandlung deutlich verbessert (**Abbildung 4K**). Andere Strainparameter blieben dabei unverändert (**Abbildung 4L-N**). In der Evaluation der diastolischen Funktion (**Abbildung 4O**) war eine Verbesserung der ISO-vermittelten Erhöhung im E/e'-Verhältnis als Surrogat für den linksventrikulären Füllungsdruck bei unverändertem E/A-

*Abbildung 5 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

Verhältnis durch Atglistatin zu erkennen (**Abbildung 4P und Q**). Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass die pharmakologische ATGL-Inhibition in Adipozyten durch Atglistatin vor der Entwicklung eines Katecholamin-induzierten Herzschadens schützt.

Wie einleitend erwähnt akkumuliert Atglistatin auch in der Leber<sup>55</sup>. Um den adipozytenspezifischen Effekt von Atglistatin zu überprüfen und einen indirekten hepatischen Effekt auf den ISO-induzierten Herzschaden auszuschließen, wurde Mäusen mit adipozytenspezifischen ATGL-Knockout (atATGL-KO) oder Geschwistermäusen ISO appliziert (**Abbildung 5A**). Entsprechend den Atglistatin-behandelten Tieren waren die atATGL-KO Mäuse vor der Ausbildung eines ISO-induzierten Herzschaden geschützt, gemessen an einer geringeren Fibroseausbildung und einem verbesserten GLS sowie einem geringeren E/e'-Verhältnis (**Abbildung 5B, E, I**). EF, FS, GRS und GCS waren nicht verändert durch die ISO-Injektion (**Abbildung 5C, D, F-H**). Die vorliegenden Daten deuten somit auf eine adipozytenspezifische ATGL-Wirkung von Atglistatin im Kontext des kardialen Katecholaminschadens hin.

Um herauszufinden, ob Atglistatin auch langfristig therapeutisch wirkt, wurde das Studienprotokoll modifiziert und die Behandlung mit Atglistatin erst nach Abschluss der  $\beta$ -adrenergen Überstimulation begonnen (**Abbildung 6A**). Interessanterweise konnte

*Abbildung 6 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

Atglistatin das subendokardiale Fibroseremodelling auch in diesem Versuch verbessern (**Abbildung 6B und C**). Auch der GLS konnte unter dieser therapeutischen Behandlung verbessert werden, allerdings zeigte dieser Trend keine statistische Signifikanz (**Abbildung 6F**). EF, FS, GRS und GCS blieben unverändert durch die ISO-Applikation (**Abbildung 6D, E, G, H**). Diese Ergebnisse implizieren ein mögliches, jedoch mildes therapeutisches Potential der adipozytären ATGL-Inhibition durch Atglistatin nach Etablierung des kardialen Schadens.

### **3.3 Akute präventive Effekte von Atglistatin auf das kardiale Remodeling**

Um Mechanismen zu identifizieren, die den langfristigen protektiven Effekten von Atglistatin zugrunde liegen, wurden Mäuse in einer frühen Phase des kardialen Remodelings, zwei Tage nach ISO, phänotypisiert (**Abbildung 7A**). Die Histologie identifizierte signifikant ausgeprägte Fibroseläsionen durch ISO, allerdings keine

*Abbildung 7 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (**Abbildung 7B-D**). Auch der durch ISO eingeschränkte GLS konnte nur bedingt durch die Atglistatinbehandlung verbessert werden (**Abbildung 7E**). Vergleichbar zum späten Zeitpunkt blieben andere echokardiographische Parameter unverändert (**Abbildung 7F-I**). Allerdings stieg die kardiale Genexpression von *Kollagen 1a1* und *Kollagen 3a1* deutlich in den ISO-behandelten Tieren an (**Abbildung 7J und K**). Dieser Anstieg wurde durch die Atglistatingabe stark reduziert. Zusammengefasst deutet dies auf eine protektive akute Wirkung der pharmakologischen adipozytären ATGL-Inhibition hin. Die Reduktion der frühen Expression pro-fibrotischer Gene führt mutmaßlich zu einem verringerten makroskopischen Fibrosegehalt, der zwei Wochen später beobachtet wurde.

### 3.4 Akute präventive Effekte von Atglistatin auf die kardiale Inflammation

$\beta$ -adrenerge Überstimulation kann inflammatorische Prozesse im Herzen initiieren und hierüber die kardiale Funktion verschlechtern<sup>15</sup>. Um eine mögliche Modulation dieser Prozesse durch Atglistatin zu untersuchen, wurden kardial infiltrierende Immunzellen zwei Tage nach ISO mittels Immunhistologie untersucht. ISO führte zu einer Akkumulation von MAC-3<sup>+</sup> Makrophagen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen (**Abbildung 8A und B**). Die Atglistatinbehandlung hatte jedoch keinen Einfluss auf diese Immunzellinfiltration. Die weiterführende Analyse von inflammatorischen Genen zeigte einen Anstieg in der mRNA von *CD68*, *ST2*, *TNF- $\alpha$* , *MCP-1*, *Galectin-3* und *TLR2* unter ISO, wobei Atglistatin nur die Expression von *CD68* und *ST2* reduzierte (**Abbildung 8C-H**). Die Expression von *IL-1 $\beta$*  und *NOS2* blieb unverändert in den verschiedenen Gruppen (**Abbildung 8I und J**). Zusammengefasst hat Atglistatin allenfalls moderate Effekte auf inflammatorische Prozesse, die für den anti-fibrotischen Effekt weniger relevant zu sein scheinen.

### 3.5 Akuter präventiver Einfluss von Atglistatin auf die kardiale Apoptose

Die neurohumorale Aktivierung sowie myokardiale Fibrose sind eng mit kardialer Apoptose assoziiert<sup>15</sup>. Um herauszufinden, ob die Verbesserung der kardialen Schädigung durch die pharmakologische adipozytäre ATGL-Inhibition über apoptotische Prozesse moduliert wird, erfolgte eine Microarray-basierte Genexpressionsanalyse in kardialem Gewebe zwei Tage nach ISO. Die PCA trennte die CTRL/ISO-behandelten Mäuse deutlich sowohl von CTRL/VEH- als auch von den ATGLi/ISO-behandelten Mäusen (**Abbildung 9A**). Das hierarchische Clustergram zeigte zudem eine Zunahme der Expression mehrerer apoptotischen Gene durch ISO, unter anderem *Calpain 6*, *BAX*, *BID*, *PIDD1* und *NOX4* (**Abbildung 9B**). Interessanterweise veränderte Atglistatin das

Expressionsprofil und reduzierte die Expression dieser Gene. Die Ergebnisse konnten in zusätzlichen RT-qPCR-Analysen mit größerer Probenanzahl bestätigt werden (**Abbildung 9C-G**). Weiterhin war im Western-Blotting-Verfahren eine vermehrte Expression der pro-apoptischen Proteine BAX und BAK durch ISO zu erkennen (**Abbildung 9H**). Die Behandlung mit Atglistatin sorgte dabei für eine Normalisierung auf das Niveau der Vehikel-Gruppe. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ISO eine kardiale Apoptose begünstigt, die durch Atglistatin bedeutend reduziert wird.

*Abbildung 8 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

*Abbildung 9 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopfleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

### **3.6 *In vitro* Effekte der adipozytären ATGL auf Kardiomyozyten**

Hohe Fettsäurekonzentrationen wirken auf zellulärer Ebene über apoptotische Prozesse lipotoxisch<sup>70</sup>. Um zu untersuchen, ob die anti-apoptotische Wirkung von Atglistatin auf endokrinem Weg über die Modulation der adipozytären Fettsäuresekretion vermittelt wird, wurden differenzierte 3T3-L1 Adipozyten mit ISO und Atglistatin behandelt (**Abbildung 10A und B**). Ähnlich zu den Experimenten in isolierten WAT-Explantaten erhöhte ISO die lipolytische Aktivität in Adipozyten, gemessen an der erhöhten Sekretion von NEFAs und Glycerin in das konditionierte Medium (**Abbildung 10C und D**).

*Abbildung 10 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

Atglistatin blockierte diese lipolytische Aktivität, was zu einer verringerten Freisetzung von NEFAs und Glycerin führte. Die HPLC-MS basierte qualitative Analyse der NEFAs im konditionierten Medium ergab eine Abtrennung der CTRL/ISO-Gruppe in der PCA sowohl von der CTRL/VEH- als auch von der ATGLi/ISO-Gruppe (**Abbildung 10E**). Des Weiteren wurden Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1) und Ölsäure (C18:1) als die Fettsäuren mit der höchsten Konzentration sowie stärksten Regulation unter ISO identifiziert (**Abbildung 10F und G**). Die ISO-vermittelte Freisetzung dieser Fettsäuren wurde durch Atglistatin vollständig aufgehoben.

Anschließend wurden HL-1 Kardiomyozyten mit einer äquimolaren Mischung aus Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure (FA-Mix) stimuliert, was in einer erhöhten LDH-Freisetzung als Surrogat für den Zelltod resultierte (**Abbildung 10H**). Spezifischer induzierte der FA-Mix Apoptoseprozesse, gemessen an der Expression des pro-apoptotischen Proteins Cleaved Caspase 3 sowie der pro-apoptotischen Gene *BID* und *BAX* (**Abbildung 10I-K**). Weiterführende Experimente zeigten, dass die FA-Mix-vermittelte Genexpression von *BID* und *BAX* durch Inhibition des integralen Membranproteins und Fettsäuretransporters CD36 mittels SSO<sup>68</sup> reduziert wurde (**Abbildung 10J**). Die Inhibition der Carnitin-Palmityltransferase 1, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der mitochondrialen Fettsäureoxidation<sup>69</sup>, führte hingegen zu einer vermehrten Expression von *BID* und *BAX* (**Abbildung 10K**).

Zusammenfassend implizieren diese Ergebnisse, dass Atglistatin *in vitro* die adipozytäre, Katecholamin-vermittelte Freisetzung von Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure inhibiert. Diese Fettsäuren lösen in Kardiomyozyten apoptotische Signale aus, die über die CD36-abhängige Fettsäureaufnahme vermittelt und über die Fettsäureoxidation gedämpft werden.

### **3.7 Akute präventive Wirkung von Atglistatin auf Lipide im Serum und kardiale Ceramide**

Um den Wirkmechanismus von Atglistatin auf den durch ISO-vermittelten Herzschaden über eine Freisetzung von Lipiden *in vivo* zu untersuchen, wurde das Serumlipidom in Mäusen zwei Tage nach ISO analysiert (**Abbildung 11**). Cholesterolester, Cholesterole, Lysophosphatidylcholine, Phosphatidylcholine und TAGs wurden als Lipidklassen mit der höchsten Serumkonzentration identifiziert (**Abbildung 11A**). Ceramide, DAG, Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylethanolamin waren signifikant reguliert

*Abbildung 11 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

zwischen mindestens zwei Gruppen (**Abbildung 11A-C**). Die weitergehende Analyse fokussierten wir dann auf Ceramide und DAGs aufgrund ihrer beschriebenen Kardiotoxizität<sup>70</sup>. Ceramide und DAG waren in den ISO-behandelten Tieren beide höher konzentriert, allerdings erreichte dieser Trend bei DAG keine statistische Signifikanz

**(Abbildung 11B und C)**. Interessanterweise führte die Behandlung mit Atglistatin zu einer deutlichen Reduktion beider Lipidklassen im Serum. Anschließend erfolgte eine Analyse der individuellen Ceramid- und DAG-Lipidspezies **(Abbildung 11D)**. Unter dem Einfluss von ISO nahmen drei Ceramid-Spezies (40:1;2, 42:1;2 und 42:2;2) zu, jedoch erreichte nur Ceramid 42:1;2 statistische Signifikanz **(Abbildung 11E)**. Die Behandlung mit Atglistatin sorgte dabei für einer signifikante Reduktion der drei Ceramid-Spezies. Die tiefergehende Analyse der DAG-Spezies zeigte eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reduktion durch Behandlung mit Atglistatin, insbesondere bei Spezies mit Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure sowie C18:2 (Linolsäure, **Abbildung 11F**). Aufgrund ihrer starken Regulation im Serum wurden im nächsten Schritt die Ceramide in Herzen von Mäusen zwei Tage nach ISO untersucht **(Abbildung 12)**. Herzen von ATGLi/ISO-behandelten Mäusen akkumulierten tendenziell weniger Ceramide als von VEH/ISO-behandelten Mäusen **(Abbildung 12A)**. Die Behandlung mit Atglistatin sorgte zudem für eine signifikante Reduktion von drei Ceramid-Spezies: 38:2;2, 40:2;2 und 42:2;2 **(Abbildung 12B)**.

*Abbildung 12 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die präventive pharmakologische Inhibition des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Lipolyse - ATGL - im Fettgewebe durch Atglistatin vor der Entwicklung einer Katecholamin-vermittelten Herzschiädigung schützt (**Abbildung 13**)<sup>58</sup>. Atglistatin reduzierte die kardiale Fibrose und verbesserte die myokardiale Deformation sowie Kontraktilität. Die Wirkung wurde dabei insbesondere über eine Regulation verschiedener Lipid- und Fettsäurespezies und einer Verminderung apoptotischer Prozesse vermittelt. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit legen daher eine Nutzung der pharmakologischen ATGL-Inhibition bei kardialen Erkrankungen nah, die mit einer neurohumoralen Aktivierung assoziiert sind.

*Abbildung 13 einschließlich Legende wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Die Informationen sind in der Originalpublikation zu finden: Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc Res. 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>*

### 4.1 ATGL-Inhibition im Katecholamin-vermittelten Schädigungsmodell

Das therapeutische Potential einer inhibierten ATGL-Aktivität im Fettgewebe muss grundsätzlich strikt von einer Inhibition im Herzen getrennt werden<sup>36</sup>. Die globale sowie isoliert kardiale Inhibition von ATGL durch genetische Deletion führt in Mäusen zu einer

myokardialen Steatose mit Akkumulation von TAGs sowie einer ausgeprägten kardialen Dysfunktion, die bei globaler ATGL-Deletion mit einer deutlich erhöhten Mortalität assoziiert ist<sup>57,71</sup>. Ebenfalls erkrankten Patient\*innen mit einer Loss-of-Function-Mutation im ATGL kodierenden Gen *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2* an der Neutralfett-Speicherkrankheit (engl. *neutral lipid storage disease*) mit ektope Fetteinlagerung in verschiedenen Geweben und Ausbildung einer progressiven skelettalen und kardialen Myopathie<sup>72,73</sup>. Ein bedeutender Aspekt der vorliegenden Arbeit war daher die Überprüfung der Wirkung von Atglistatin auf die Lipolyse im Fettgewebe und Herz im Mausmodell der Katecholamin-vermittelten Herzschiädigung<sup>58</sup>. Die inhibierte lipolytische Aktivität im Fettgewebe durch Atglistatin ohne direkte Modifikation der kardialen Lipolyse ermöglichte dabei, die Rolle der adipozytären ATGL isoliert im Kontext der Sympathikusaktivierung zu analysieren.

#### **4.2 Adipozytäre ATGL-Inhibition und kardiale Inflammation**

Im Herzen sorgt die EZM für eine geordnete Anordnung zellulärer Strukturen sowie für eine physiologische Übertragung der Kontraktion<sup>74</sup>. Die neurohumorale Aktivierung im Rahmen der Herzinsuffizienz, besonders bei reduzierter EF, führt zu einem fibrotischen Remodelling mit vermehrter Deposition von Kollagenfibrillen in die EZM sowie strukturellen Veränderungen, die schließlich zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen<sup>15</sup>. Die präventive adipozytäre ATGL-Inhibition durch Atglistatin führte in dieser Arbeit zu einer Verminderung dieses Katecholamin-vermittelten fibrotischen Remodelings - in der Frühphase auf Ebene der Genexpression sichtbar, im späten Stadium im makroskopischen Kollagengehalt sowie funktionellen Parametern verdeutlicht. Kürzlich konnten auch Takahara *et al.* einen protektiven Effekt einer präventiven Behandlung mit Atglistatin auf das Katecholamin-vermittelte kardiale Remodelling zeigen<sup>75</sup>. Als Wirkungsmechanismus wurde auf der Grundlage einer verminderten Sekretion des pro-inflammatorischen Proteins Galektin-3 von WAT-Makrophagen sowie einer reduzierten kardialen Infiltration von aktivierten Makrophagen eine anti-inflammatorische Wirkung vorgeschlagen<sup>75</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Reduktion von kardial infiltrierenden MAC-3<sup>+</sup> Makrophagen oder abgeschwächte kardiale Expression von Galektin-3 durch Atglistatin beobachtet werden<sup>58</sup>. Auch CD3<sup>+</sup> T-Zellen und die Expression anderer inflammatorischer Gene waren nicht entscheidend beeinflusst. Es bleibt daher die Frage offen, welche Rolle

inflammatorische Prozesse in der Vermittlung der protektiven Wirkung der adipozytären ATGL-Inhibition auf das fibrotische Remodelling einnehmen.

### 4.3 Adipozytäre ATGL-Inhibition und Lipid-vermittelte Apoptose im Herz

Der programmierte Zelltod - Apoptose - von Kardiomyozyten stellt ein Merkmal in der Entwicklung der Herzinsuffizienz dar, besonders bei reduzierter EF, und ist mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung assoziiert<sup>76-78</sup>. *In vitro* wurden Mechanismen für den kausalen Zusammenhang zwischen neurohumoraler Aktivierung und Kardiomyozyten-Apoptose gezeigt<sup>79-82</sup>. Für Katecholamine wurde dabei eine Induktion über  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren beschrieben<sup>79,80</sup>. Daneben stellen Angiotensin II sowie TNF- $\alpha$  pro-apoptotische Neurohormone dar<sup>81,82</sup>. Die *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten zudem darauf hin, dass im Kontext der Sympathikusaktivierung auch die adipozytäre Lipolyse eine wichtige Rolle in der Entstehung kardialer Apoptose spielt und eine erhöhte Lipolyse im Fettgewebe zur Apoptose im Herzen beiträgt<sup>58</sup>. Im Kontext der Herzinsuffizienz werden abgestorbenen Kardiomyozyten pathophysiologisch über eine Aktivierung von Myofibroblasten durch fibrotisches Gewebe ersetzt<sup>83</sup>. Der anti-fibrotische Effekt der präventiven Atglistatinbehandlung resultiert dann sekundär aus einer verminderten kardialen Apoptose, die über eine reduzierte Fettgewebslipolyse vermittelt wird. Die positive Wirkung von Atglistatin fällt daher milder aus, wenn die Behandlung erst nach Katecholamin-induzierter Schädigung auf therapeutischer Weise erfolgt und die kardiale Apoptose bereits über eine induzierte Fettgewebslipolyse verstärkt wurde.

Verschiedene Studien haben den Substratmetabolismus zur kardialen ATP-Produktion im Kontext der Herzinsuffizienz untersucht, insbesondere bei reduzierter EF, wobei die kardiale Funktionsstörung mit einer reduzierten Kapazität zur Fettsäureoxidation assoziiert ist<sup>84,85</sup>. Simultan ist das kardiale Angebot an Fettsäuren durch die neurohumorale Aktivierung und der damit assoziierten erhöhten Serumkonzentration an NEFAs erhöht<sup>48-50</sup>. Dieses erhöhte Fettsäureangebot verbunden mit der reduzierten Oxidationskapazität führt zu einer intrazellulären Akkumulation von Fettsäuren, die als TAGs gespeichert<sup>86</sup>, jedoch auch zu toxischen Lipiden umgebaut werden können<sup>87</sup>. Die Ergebnisse der vorgelegten Studie stützen diese Hypothese eines Lipid-vermittelten kardialen Schadens, bei der die Katecholamin-vermittelte Freisetzung von Lipiden aus dem Fettgewebe in einer kardialen Lipotoxizität mit verschiedenen Schädigungsmustern einschließlich zellulärer Apoptose und mitochondrialer Dysfunktion resultiert<sup>88,89</sup>. Die NEFA-Kombination aus Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure wurde *in vitro* als

potenzieller lipotoxischer und pro-apoptotischer Mediator von ISO identifiziert, dessen Freisetzung durch die adipozytäre ATGL-Inhibition aufgehoben wurde. Dabei stellt insbesondere Palmitinsäure eine stark lipotoxische gesättigte Fettsäure dar<sup>90,91</sup>. Zusätzlich zur Apoptoseinduktion über reaktive Sauerstoffspezies führt sie als Syntheseprekursor zur Akkumulation von Ceramiden<sup>91-93</sup>. Ceramide gelten zusammen mit DAGs als wichtigste Ursache für kardiale Lipotoxizität<sup>94</sup> und waren in Herzen von Atglistatin-behandelten ISO-Mäusen tendenziell vermindert. *In vivo* zeigten sich zudem Veränderungen in zirkulierenden Serumlipiden, vor allem bei den lipotoxischen DAGs und Ceramiden. Insbesondere DAGs mit Palmitinsäure, Palmitoleinsäure und Ölsäure sowie zwei Linolsäureresten waren reguliert. *In vivo* scheinen daher DAGs und Ceramide direkt als Reaktion auf ISO aus dem Fettgewebe freigesetzt zu werden, was durch Atglistatin inhibiert wird. Während die DAGs dabei auf exzessive, ISO-stimulierte ATGL-Aktivität mit limitierter Modifikation von HSL und MGL zurückzuführen sein könnten, muss für die Ceramide der zugrundeliegende Regulationsmechanismus im Fettgewebe noch aufgeklärt werden.

#### 4.4 Limitationen

Die vorliegende Arbeit weist bestimmte Limitationen auf. Das ISO-Modell mit einer viertägigen Katecholamin-Applikation ist nur bedingt mit der humanen Entstehung der Katecholamin-vermittelten Herzschiädigung vergleichbar und kann mit einer eingeschränkten Übertragbarkeit der Erkenntnisse der Studie auf den Menschen verbunden sein. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, dass die *in vitro* Analyse mit 3T3-L1 Adipozyten und HL-1 Kardiomyozyten die *in vivo* Interaktion zwischen Fettgewebe und Herz vollständig widerspiegelt.

Die vorliegende Arbeit wird zudem durch die Selektivität von Atglistatin limitiert. Trotz hoher struktureller Ähnlichkeit zwischen der murinen und humanen ATGL hemmt Atglistatin nicht die humane Enzymaktivität<sup>55,56</sup>. Eine Translation der Studie ist daher nur begrenzt möglich und die Ergebnisse müssen durch einen potenten humanen Inhibitor validiert werden.

#### 4.5 Klinische Perspektive

Die vorliegende Studie deutet auf eine entscheidende Rolle der Fettgewebslipolyse in der Entwicklung von Herzschiädigungen hin, die mit einer neurohormonalen Aktivierung und erhöhten Katecholaminspiegeln assoziiert sind. Die Reduktion dieser Fettgewebslipolyse durch pharmakologische ATGL-Inhibition stellt dabei eine neue Behandlungsstrategie

dar, die sich durch ein primäres Wirkungsziel außerhalb des Herzens auszeichnet. Das Konzept eines extrakardialen Ansatzpunktes erscheint vielversprechend angesichts des Scheiterns klinischer HFrEF-Studien mit Medikamenten zur direkten pharmakologischen Beeinflussung des kardialen Stoffwechsels, beispielsweise mit Etomoxir (ERGO-Studie<sup>95</sup>) oder Elamipretide (PROGRESS-HF-Studie<sup>96</sup>). Zudem wird es durch die kürzlich publizierten positiven Effekte der SGLT2-Inhibitoren Empagliflozin und Dapagliflozin bei Patient\*innen mit HFrEF (EMPEROR-Reduced-Studie<sup>97</sup>, DAPA-HF-Studie<sup>98</sup>) und HFpEF (EMPEROR-Preserved-Studie<sup>99</sup>) unterstützt, die auf eine erfolgreiche Modifikation des kardialen Stoffwechsels über die Ansteuerung von extrakardialen Zielstrukturen hinweisen. Aufgrund der stark kardioprotektiven Wirkung von Atglistatin bei präventiver Behandlung und nur milden Effekten bei therapeutischer Gabe sollte das Konzept der adipozytären ATGL-Inhibition insbesondere im Kontext der kardiovaskulären Prävention weiter untersucht werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259.
2. Shah KS, Xu H, Matsouaka RA, Bhatt DL, Heidenreich PA, Hernandez AF, Devore AD, Yancy CW, Fonarow GC. Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(20):2476-2486.
3. Mamas MA, Sperrin M, Watson MC, Coutts A, Wilde K, Burton C, Kadam UT, Kwok CS, Clark AB, Murchie P, Buchan I, Hannaford PC, Myint PK. Do patients have worse outcomes in heart failure than in cancer? A primary care-based cohort study with 10-year follow-up in Scotland. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(9):1095-1104.
4. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-3726.
5. Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, Anker SD, Atherton J, Böhm M, Butler J, Drazner MH, Felker GM, Filippatos G, Fiuzat M, Fonarow GC, Gomez-Mesa JE, Heidenreich P, Imamura T, Jankowska EA, Januzzi J, Khazanie P, Kinugawa K, Lam CSP, Matsue Y, Metra M, Ohtani T, Piepoli MF, Ponikowski P, Rosano GMC, Sakata Y, Seferović P, Starling RC, Teerlink JR, Vardeny O, Yamamoto K, Yancy C, Zhang J, Zieroth S. Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. 2021;23(3):352-380.
6. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(6):368-378.
7. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-271.

8. Paulus WJ, Zile MR. From Systemic Inflammation to Myocardial Fibrosis: The Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Paradigm Revisited. *Circ Res.* 2021;128(10):1451-1467.
9. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma Norepinephrine as a Guide to Prognosis in Patients with Chronic Congestive Heart Failure. *N Engl J Med.* 1984;311(13):819-823.
10. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, Glazer RD, Tognoni G, Cohn JN. Changes in Brain Natriuretic Peptide and Norepinephrine Over Time and Mortality and Morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation.* 2003;107(9):1278-1283.
11. Leimbach WN, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlöf G, Mark AL. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation.* 1986;73(5):913-919.
12. de Souza SBC, Rocha JA, Cuoco MAR, Guerra GM, Ferreira-Filho JC, Borile S, Krieger EM, Bortolotto LA, Consolim-Colombo FM. High Muscle Sympathetic Nerve Activity Is Associated With Left Ventricular Dysfunction in Treated Hypertensive Patients. *Am J Hypertens.* 2013;26(7):912-917.
13. Sugiura M, Yamamoto K, Takeda Y, Takeda Y, Dohmori T, Ogata M, Kondo H, Suzuki S, Fukutomi T. The relationship between variables of 123-I-metaiodobenzylguanidine cardiac imaging and clinical status of the patients with diastolic heart failure. *Int J Cardiol.* 2006;113(2):223-228.
14. Florea VG, Cohn JN. The Autonomic Nervous System and Heart Failure. *Circ Res.* 2014;114(11):1815-1826.
15. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(1):30-38.
16. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet Lond Engl.* 1999;353(9169):2001-2007.
17. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334(21):1349-1355.
18. CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 1999;353(9146):9-13.

19. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *The Lancet*. 2011;378(9792):704-712.
20. Zechner R, Madeo F, Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):671-684.
21. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, Madeo F. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metab*. 2012;15(3):279-291.
22. Schreiber R, Xie H, Schweiger M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(6):880-899.
23. Zimmermann R. Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science*. 2004;306(5700):1383-1386.
24. Vaughan M, Berger JE, Steinberg D. Hormone-sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. *J Biol Chem*. 1964;239(2):401-409.
25. Douglass JD, Zhou YX, Wu A, Zadrogro JA, Gajda AM, Lackey AI, Lang W, Chevalier KM, Sutton SW, Zhang SP, Flores CM, Connelly MA, Storch J. Global deletion of MGL in mice delays lipid absorption and alters energy homeostasis and diet-induced obesity. *J Lipid Res*. 2015;56(6):1153-1171.
26. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R. Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism. *J Biol Chem*. 2006;281(52):40236-40241.
27. Duncan RE, Wang Y, Ahmadian M, Lu J, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Characterization of desnutrin functional domains: critical residues for triacylglycerol hydrolysis in cultured cells. *J Lipid Res*. 2010;51(2):309-317.
28. Schweiger M, Schoiswohl G, Lass A, Radner FPW, Haemmerle G, Malli R, Graier W, Cornaciu I, Oberer M, Salvayre R, Fischer J, Zechner R, Zimmermann R. The C-terminal Region of Human Adipose Triglyceride Lipase Affects Enzyme Activity and Lipid Droplet Binding. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17211-17220.
29. Yang X, Lu X, Lombès M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, Smart EJ, Liu J. The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell Metab*. 2010;11(3):194-205.
30. Schweiger M, Paar M, Eder C, Brandis J, Moser E, Gorkiewicz G, Grond S, Radner FPW, Cerk I, Cornaciu I, Oberer M, Kersten S, Zechner R, Zimmermann R, Lass A.

- G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *J Lipid Res.* 2012;53(11):2307-2317.
31. Miyoshi H, Perfield JW, Souza SC, Shen WJ, Zhang HH, Stancheva ZS, Kraemer FB, Obin MS, Greenberg AS. Control of Adipose Triglyceride Lipase Action by Serine 517 of Perilipin A Globally Regulates Protein Kinase A-stimulated Lipolysis in Adipocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(2):996-1002.
32. Granneman JG, Moore HPH, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of Perilipin-5 (Plin5) with Adipose Triglyceride Lipase. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5126-5135.
33. Granneman JG, Moore HPH, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride Lipase (Atgl). *J Biol Chem.* 2009;284(50):34538-34544.
34. Wang H, Sreenivasan U, Gong DW, O'Connell KA, Dabkowski ER, Hecker PA, Ionica N, Konig M, Mahurkar A, Sun Y, Stanley WC, Sztalryd C. Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *J Lipid Res.* 2013;54(4):953-965.
35. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 2006;3(5):309-319.
36. Grabner GF, Xie H, Schweiger M, Zechner R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab.* 2021;3(11):1445-1465.
37. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. Hormone-sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Diglyceride Accumulation in Adipose Tissue, Muscle, and Testis. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4806-4815.
38. Strålfors P, Belfrage P. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1983;258(24):15146-15152.
39. Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(49):48617-48626.
40. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1093-1103.

41. Carpéné C, Bousquet-Mélou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;839:186-189.
42. Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RCR, Macaulay SL, Brown W, O'Brien PE, Tiganis T, Watt MJ. Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology.* 2012;153(9):4278-4289.
43. Sengenès C, Berlan M, Glisezinski I de, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 2000;14(10):1345-1351.
44. Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(11):698-717.
45. Vinch CS, Aurigemma GP, Hill JC, Gaasch WH, Volturo G, Tighe DA, Meyer TE. Usefulness of clinical variables, echocardiography, and levels of brain natriuretic peptide and norepinephrine to distinguish systolic and diastolic causes of acute heart failure. *Am J Cardiol.* 2003;91(9):1140-1143.
46. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(2):379-385.
47. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS. Utility of B-Natriuretic Peptide in Detecting Diastolic Dysfunction: Comparison With Doppler Velocity Recordings. *Circulation.* 2002;105(5):595-601.
48. Lommi J, Kupari M, Yki-Järvinen H. Free Fatty Acid Kinetics and Oxidation in Congestive Heart Failure. *Am J Cardiol.* 1998;81(1):45-50.
49. Polak J, Kotrc M, Wedellova Z, Jabor A, Malek I, Kautzner J, Kazdova L, Melenovsky V. Lipolytic effects of B-type natriuretic peptide 1-32 in adipose tissue of heart failure patients compared with healthy controls. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(11):1119-1125.
50. Szabó T, Postrach E, Mähler A, Kung T, Turhan G, Haehling S von, Anker SD, Boschmann M, Doehner W. Increased catabolic activity in adipose tissue of patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(10):1131-1137.
51. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid Use and Misuse by the Heart. *Circ Res.* 2016;118(11):1736-1751.
52. Salatzki J, Foryst-Ludwig A, Bentele K, Blumrich A, Smeir E, Ban Z, Brix S, Grune

- J, Beyhoff N, Klopffleisch R, Dunst S, Surma MA, Klose C, Rothe M, Heinzel FR, Krannich A, Kershaw EE, Beule D, Schulze PC, Marx N, Kintscher U. Adipose tissue ATGL modifies the cardiac lipidome in pressure-overload-induced left ventricular failure. Barsh GS, ed. *PLOS Genet.* 2018;14(1):e1007171.
53. Shimizu I, Yoshida Y, Katsuno T, Tateno K, Okada S, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Ito T, Zechner R, Komuro I, Kobayashi Y, Minamino T. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.* 2012;15(1):51-64.
54. Parajuli N, Takahara S, Matsumura N, Kim TT, Ferdaoussi M, Migglautsch AK, Zechner R, Breinbauer R, Kershaw EE, Dyck JRB. Atglistatin ameliorates functional decline in heart failure via adipocyte-specific inhibition of adipose triglyceride lipase. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2018;315(4):H879-H884.
55. Mayer N, Schweiger M, Romauch M, Grabner GF, Eichmann TO, Fuchs E, Ivkovic J, Heier C, Mrak I, Lass A, Höfler G, Fledelius C, Zechner R, Zimmermann R, Breinbauer R. Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. *Nat Chem Biol.* 2013;9(12):785-787.
56. Schweiger M, Romauch M, Schreiber R, Grabner GF, Hütter S, Kotzbeck P, Benedikt P, Eichmann TO, Yamada S, Knittelfelder O, Diwocky C, Doler C, Mayer N, De Cecco W, Breinbauer R, Zimmermann R, Zechner R. Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Nat Commun.* 2017;8(1):14859.
57. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science.* 2006;312(5774):734-737.
58. Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. *Cardiovasc Res.* Published online June 21, 2021:cvab182.
59. Beyhoff N, Brix S, Betz IR, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Krannich A, Stawowy P, Knebel F, Grune J, Kintscher U. Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *J Am Soc Echocardiogr.*

2017;30(12):1239-1250.e2.

60. Beyhoff N, Lohr D, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Brix S, Grune J, Thiele A, Erfinanda L, Tabuchi A, Kuebler WM, Pieske B, Schreiber LM, Kintscher U. Characterization of Myocardial Microstructure and Function in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *Hypertension*. 2019;74(2):295-304.
61. Liu HL, Chen CH, Sun YJ. Overexpression of lncRNA GAS5 attenuates cardiac fibrosis through regulating PTEN/MMP-2 signal pathway in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(10):4414-4418.
62. Fink BD, Herlein JA, Almind K, Cinti S, Kahn CR, Sivitz WI. Mitochondrial proton leak in obesity-resistant and obesity-prone mice. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(5):R1773-R1780.
63. Schweiger M, Eichmann TO, Taschler U, Zimmermann R, Zechner R, Lass A. Measurement of lipolysis. *Methods Enzymol*. 2014;538:171-193.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25(4):402-408.
65. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W566-W570.
66. Muenzner M, Tuvia N, Deutschmann C, Witte N, Tolkachov A, Valai A, Henze A, Sander LE, Raila J, Schupp M. Retinol-Binding Protein 4 and Its Membrane Receptor STRA6 Control Adipogenesis by Regulating Cellular Retinoid Homeostasis and Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  Activity. *Mol Cell Biol*. 2013;33(20):4068-4082.
67. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(6):2979-2984.
68. Brinkmann JFF, Abumrad NA, Ibrahim A, vanderVUSSE GJ, Glatz JFC. New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem J*. 2002;367(3):561-570.
69. He L, Kim T, Long Q, Liu J, Wang P, Zhou Y, Ding Y, Prasain J, Wood PA, Yang Q. Carnitine Palmitoyltransferase-1b Deficiency Aggravates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy Caused by Lipotoxicity. *Circulation*. 2012;126(14):1705-1716.
70. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid Use and Misuse by the Heart. *Circ Res*. 2016;118(11):1736-1751.

71. Kienesberger PC, Pulini T, Nagendran J, Young ME, Bogner-Strauss JG, Hackl H, Khadour R, Heydari E, Haemmerle G, Zechner R, Kershaw EE, Dyck JRB. Early structural and metabolic cardiac remodeling in response to inducible adipose triglyceride lipase ablation. *Cardiovasc Res.* 2013;99(3):442-451.
72. Fischer J, Lefèvre C, Morava E, Mussini JM, Laforêt P, Negre-Salvayre A, Lathrop M, Salvayre R. The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet.* 2007;39(1):28-30.
73. Natali A, Gastaldelli A, Camastra S, Baldi S, Quagliarini F, Minicocci I, Bruno C, Pennisi E, Arca M. Metabolic Consequences of Adipose Triglyceride Lipase Deficiency in Humans: An In Vivo Study in Patients With Neutral Lipid Storage Disease With Myopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):E1540-E1548.
74. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):549-574.
75. Takahara S, Ferdaoussi M, Sronic N, Maayah ZH, Soni S, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Dyck JRB. Inhibition of ATGL in adipose tissue ameliorates isoproterenol-induced cardiac remodeling by reducing adipose tissue inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(1):H432-H446.
76. Olivetti G, Nitahara JA, Krajewski S. Apoptosis in the Failing Human Heart. *N Engl J Med.* Published online 1997:11.
77. Saraste, Pulkki, Kallajoki, Heikkilä, Laine, Mattila, Nieminen, Parvinen, Voipio-Pulkki. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation: Cardiomyocyte apoptosis in heart failure. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(5):380-386.
78. Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res.* 1999;85(9):856-866.
79. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine Stimulates Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes by Activation of the  $\beta$ -Adrenergic Pathway. *Circulation.* 1998;98(13):1329-1334.
80. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 1999;100(22):2210-2212.
81. Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways.
82. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P.

- Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(3):859-870.
83. Sabbah H. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):704-712.
84. Bedi KC, Snyder NW, Brandimarto J, Aziz M, Mesaros C, Worth AJ, Wang LL, Javaheri A, Blair IA, Margulies KB, Rame JE. Evidence for Intramyocardial Disruption of Lipid Metabolism and Increased Myocardial Ketone Utilization in Advanced Human Heart Failure. *Circulation.* 2016;133(8):706-716.
85. Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, Gropler RJ. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(2):271-277.
86. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, Taegtmeyer H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2004;18(14):1692-1700.
87. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):457-470.
88. Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid Metabolism and Toxicity in the Heart. *Cell Metab.* 2012;15(6):805-812.
89. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):311-319.
90. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3077-3082.
91. He Y, Zhou L, Fan Z, Liu S, Fang W. Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N-acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):568.
92. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2498-2502.
93. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32487-32490.

94. Chokshi A, Drosatos K, Cheema FH, Ji R, Khawaja T, Yu S, Kato T, Khan R, Takayama H, Knöll R, Milting H, Chung CS, Jorde U, Naka Y, Mancini DM, Goldberg IJ, Schulze PC. Ventricular assist device implantation corrects myocardial lipotoxicity, reverses insulin resistance, and normalizes cardiac metabolism in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2012;125(23):2844-2853.
95. Holubarsch CJF, Rohrbach M, Karrasch M, Boehm E, Polonski L, Ponikowski P, Rhein S. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. *Clin Sci*. 2007;113(4):205-212.
96. Butler J, Khan MS, Anker SD, Fonarow GC, Kim RJ, Nodari S, O'Connor CM, Pieske B, Pieske-Kraigher E, Sabbah HN, Senni M, Voors AA, Udelson JE, Carr J, Gheorghiade M, Filippatos G. Effects of Elamipretide on Left Ventricular Function in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: The PROGRESS-HF Phase 2 Trial. *J Card Fail*. 2020;26(5):429-437.
97. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, Jamal W, Kimura K, Schnee J, Zeller C, Cotton D, Bocchi E, Böhm M, Choi DJ, Chopra V, Chuquiure E, Giannetti N, Janssens S, Zhang J, Gonzalez Juanatey JR, Kaul S, Brunner-La Rocca HP, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S, Pina I, Ponikowski P, Sattar N, Senni M, Seronde MF, Spinar J, Squire I, Taddei S, Wanner C, Zannad F. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2020;383(15):1413-1424.
98. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, Ponikowski P, Sabatine MS, Anand IS, Bělohávek J, Böhm M, Chiang CE, Chopra VK, de Boer RA, Desai AS, Diez M, Drozd J, Dukát A, Ge J, Howlett JG, Katova T, Kitakaze M, Ljungman CEA, Merkely B, Nicolau JC, O'Meara E, Petrie MC, Vinh PN, Schou M, Tereshchenko S, Verma S, Held C, DeMets DL, Docherty KF, Jhund PS, Bengtsson O, Sjöstrand M, Langkilde AM. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(21):1995-2008.
99. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, Brunner-La Rocca HP, Choi DJ, Chopra V, Chuquiure-Valenzuela E, Giannetti N, Gomez-Mesa JE, Janssens S, Januzzi JL, Gonzalez-Juanatey JR, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone SV, Piña IL, Ponikowski P, Senni M, Sim D, Spinar J, Squire I, Taddei S, Tsutsui H, Verma S, Vinereanu D, Zhang J, Carson P, Lam CSP, Marx N, Zeller C, Sattar N, Jamal W,

Schnaidt S, Schnee JM, Brueckmann M, Pocock SJ, Zannad F, Packer M. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1451-1461.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Arne Thiele, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Verbesserung des Katecholamin-induzierten Herzschadens durch pharmakologische Inhibition der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) im Fettgewebe mittels Atglistatin" bzw. "Improvement of catecholamine-induced myocardial damage by pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase (ATGL) in adipose tissue using Atglistatin" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

### **Publikation 1**

Thiele A, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A, "Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage.", *Cardiovascular Research*, 2021

**Beitrag im Einzelnen:** Gemeinsam mit PD Dr. A. Foryst-Ludwig und Prof. Dr. U. Kintscher habe ich alle *in vivo* und *in vitro* Experimente geplant und organisiert (Fig. 1-6, S1-S5). Ich führte alle Tierversuche einschließlich Überwachung, Fütterung, Substanzapplikation (Fig. 2-5, S1-3, S4A, S5) sowie echokardiographischer Untersuchung (Fig. 3G-Q, 4G-K, S1C-I) mit Ausnahme von Fig. S2D-H durch. Zusammen mit PD Dr. A. Foryst-Ludwig, B. Höft, Dr. D. Ritter, K. Lüttges, Dr. A. Blumrich, Dr. N. Beyhoff und Dr. E. Smeir präparierte, wog und fixierte ich die Organe (Fig. 2-5, S1-S3, S4A, S5). Ich quantifizierte die Histologie (Fig. 3B-D, 4B-D, S1B, S2B-C) und wertete das echokardiographische Bildmaterial (Fig. 3G-Q, 4G-K, S1C-I) mit Ausnahme von Fig. S2D-H aus. Ich führte die Experimente in 3T3-L1 und HL-1 Zellen durch (Fig. 1, S4B-C). In Zusammenarbeit mit B. Höft führte ich außerdem die Lipolysemessungen (Fig. 1C-D, 2A-B), Proteinexpressionsanalysen (Fig. 1I, 2F-I, 2K-M, 5H, S4), Genexpressionsanalysen (Fig. 1J-K, 2C-E, 2J, 3E-F, 4E-F, 4L, 5C-G, S3B-H), die Microarray-basierte Genexpressionsanalyse (Fig. 5A-B) sowie den LDH Zytotoxizitäts-Assay (Fig. 1H) durch (Eigenanteil: 80%) und wertete die Daten eigenständig aus. Weiterhin übernahm ich die statistische Analyse aller Daten einschließlich biostatistischer Auswertung der Fettsäure- und Lipidomdaten sowie die Anfertigung aller graphischen Abbildungen. Gemeinsam mit PD Dr. A. Foryst-Ludwig und Prof. Dr. U. Kintscher verfasste ich das Manuskript und bearbeite die Revision.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin (PD Dr. Anna Foryst-Ludwig)

---

Unterschrift des Doktoranden (Arne Thiele)

## Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"CARDIAC and CARDIOVASCULAR SYSTEMS"** Selected  
 Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 136 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	EUROPEAN HEART JOURNAL	57,358	23.239	0.125920
2	CIRCULATION	166,484	23.054	0.211290
3	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY	100,986	18.639	0.193290
4	Nature Reviews Cardiology	6,301	17.420	0.018820
5	CIRCULATION RESEARCH	52,988	15.862	0.072290
6	EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE	13,107	13.965	0.027620
7	JAMA Cardiology	3,280	11.866	0.019320
8	JACC-Cardiovascular Imaging	8,801	10.975	0.026160
9	JACC-Cardiovascular Interventions	11,555	9.544	0.033640
10	JACC-Heart Failure	3,537	8.910	0.016830
11	JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION	12,436	8.578	0.027310
12	CARDIOVASCULAR RESEARCH	21,828	7.014	0.021500
13	European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy	442	6.723	0.001430
14	Circulation-Heart Failure	6,900	6.526	0.022830
15	BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY	4,137	6.470	0.005590
16	PROGRESS IN CARDIOVASCULAR DISEASES	4,055	6.162	0.008860
17	JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF ECHOCARDIOGRAPHY	10,478	6.111	0.016060
18	EUROPACE	10,908	6.100	0.025320
19	Circulation-Cardiovascular Interventions	5,289	6.060	0.016640

## **Druckexemplar der Publikation**

Thiele A, Luettgies K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. *Cardiovasc Res.* 2022;118(11):2488-2505. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182>



































## **Lebenslauf**

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

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

---

## Publikationsliste

### Publikationen

Luettges K, Bode M, Diemer JN, Schwanbeck J, Wirth EK, Klopffleisch R, Kappert K, **Thiele A**, Ritter D, Foryst-Ludwig A, Kolkhof P, Wenzel UO, Kintscher U. Finerenone Reduces Renal ROR $\gamma$ t  $\gamma$  $\delta$  T Cells and Protects against Cardiorenal Damage. *Am J Nephrol.* 2022;1-13. doi: 10.1159/000524940. IF: 4.6 (2021).

Lohr D<sup>†</sup>, **Thiele A**<sup>†</sup>, Stahnke M, Braun V, Smeir E, Spranger J, Brachs S, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Schreiber LM, Kintscher U, Beyhoff N. *Assessment of Myocardial Microstructure in a Murine Model of Obesity-Related Cardiac Dysfunction by Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging at 7T.* *Front Cardiovasc Med.* 9:839714. doi: 10.3389/fcvm.2022.839714. IF: 5.8 (2021).

Betz IR, Qaiyumi SJ, Goeritzer M, **Thiele A**, Brix S, Beyhoff N, Grune J, Klopffleisch R, Greulich F, Uhlenhaut, NH, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Cardioprotective Effects of Palmitoleic Acid (C16:1n7) in a Mouse Model of Catecholamine-Induced Cardiac Damage Are Mediated by PPAR Activation.* *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:12695. doi: 10.3390/ijms222312695. IF: 6.2.

Ritter D, Goeritzer M, **Thiele A**, Blumrich A, Beyhoff N, Luettges K, Smeir E, Kasch J, Grune J, Müller OJ, Klopffleisch R, Jaeger C, Foryst-Ludwig A, Kintscher U. *Liver X Receptor Agonist AZ876 Induces Beneficial Endogenous Cardiac Lipid Reprogramming and Protects Against Isoproterenol-Induced Cardiac Damage.* *J Am Heart Assoc.* 2021;10(14):e019473. doi: 10.1161/JAHA.120.019473. IF: 6.1.

**Thiele A**, Luettges K, Ritter D, Beyhoff N, Smeir E, Grune J, Steinhoff JS, Schupp M, Klopffleisch R, Rothe M, Wilck N, Bartolomaeus H, Migglautsch AK, Breinbauer R, Kershaw EE, Grabner GF, Zechner R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage.* *Cardiovasc Res.* Published online June 21, 2021:cvab182. doi: 10.1093/cvr/cvab182. IF: 13.1.

Beyhoff N, Lohr D, **Thiele A**, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Schreiber LM, Kintscher U. *Myocardial Infarction After High-Dose Catecholamine Application-A Case Report From an Experimental Imaging Study.* *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:580296. doi: 10.3389/fcvm.2020.580296. IF: 6.1.

Beyhoff N, Lohr D, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Brix S, Grune J, **Thiele A**, Erfinanda L, Tabuchi A, Kuebler WM, Pieske B, Schreiber LM, Kintscher U. *Characterization of Myocardial Microstructure and Function in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage.* *Hypertension.* 2019;74(2):295-304. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12956. IF: 7.7.

† geteilte Erstautorenschaft

**Kongressbeiträge**

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Klopffleisch R, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk – pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by atglistatin improves myocardial stiffness in a murine model of cardiac fibrosis*. (2020, März). Vortrag, 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Leipzig, Deutschland.

Jasaityte R, **Thiele A**, Ernst LP, Baldenhofer G, Spethmann S, Laule M, Dreger H, Stangl K, Knebel F. *Myocardial work in patients with aortic stenosis before and short term after transcatheter aortic valve replacement*. (2019, Dezember). Posterpräsentation, EuroEcho, European Society of Cardiology (ESC), Wien, Österreich.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin diminishes myocardial fibrosis in an experimental mouse model*. (2019, November). Posterpräsentation, DZHK Partner Site Retreat Berlin, Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK), Berlin, Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin diminishes myocardial fibrosis in an experimental mouse model*. (2019, November). Posterpräsentation, 43. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. (DHL), Berlin, Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Klopffleisch R, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin diminishes myocardial fibrosis in an experimental mouse model*. (2019, Oktober). Posterpräsentation, 43. Herztage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie e.V. (DGK), Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin improves myocardial stiffness in a murine model of cardiac fibrosis*. (2019, September). Vortrag, DZHK Retreat, Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK), Potsdam, Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin improves deformation in a murine model of cardiac fibrosis*. (2019, Mai). Vortrag, Heart Failure 2019 - 6th World Congress on Acute Heart Failure, European Society of Cardiology (ESC), Athen, Griechenland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Die pharmakologische Inhibition von ATGL durch Atglistatin verbessert die kardiale Funktion in einem Isoproterenol-vermittelten Fibrosemodell*. (2019, April). Vortrag, 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie e.V. (DGK), Mannheim, Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Klopffleisch R, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Adipose tissue – heart crosstalk: Pharmacological inhibition of non-cardiac ATGL by Atglistatin improves myocardial function in a murine model of cardiac fibrosis*. (2019, April). Posterpräsentation, EMBO workshop: Organ crosstalk in energy balance and metabolic disease, EMBO, Chiclana de la Frontera, Spanien.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Klopffleisch R, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Höft B, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Die pharmakologische Inhibition von ATGL durch Atglistatin verbessert die kardiale Funktion in einem Isoproterenol-vermittelten Fibrosemodell*. (2018, November), „Best of...“-Vortrag, 42. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. (DHL), Berlin, Deutschland.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Klopffleisch R, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Höft B, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Posterpräsentation Pharmacological Inhibition of Adipose Triglyceride Lipase by Atglistatin Improves Cardiac Function in Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy*. (2018, November). Posterpräsentation, Scientific Sessions, American Heart Association (AHA), Chicago, USA.

**Thiele A**, Beyhoff N, Blumrich A, Ritter D, Klopffleisch R, Grune J, Smeir E, Lüttges K, Höft B, Zechner R, Breinbauer R, Kintscher U, Foryst-Ludwig A. *Pharmacological inhibition of ATGL by Atglistatin improves cardiac function in a preclinical model of cardiac fibrosis*. (2018, Oktober). Vortrag, DZHK Partner Site Retreat Berlin, Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK), Berlin, Deutschland.

## Danksagung

Verschiedenen Personen möchte ich besonderen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit entgegenbringen.

Tiefster Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Anna Foryst-Ludwig für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Unterstützung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen. Vielen Dank für die umsorgende Betreuung und die bereichernde Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Kintscher für die Ermöglichung der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, die exzellente Unterstützung sowie die akademische und persönliche Förderung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Ulf Landmesser für die klinischen Anregungen sowie Stärkung der translationalen Perspektive der Arbeit.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Niklas Beyhoff für die fortwährende persönliche und wissenschaftliche Begleitung, kritischen Einwände sowie wertvollen Ratschlägen. Großer Dank geht auch an Frau Beata Höft für die methodische Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit. Hervorheben möchte ich außerdem die aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Kintscher: Dr. Annelie Blumrich, Katja Lüttges, Dr. Daniel Ritter, Max Stahnke, Dr. Elia Smeir, Dr. Jana Grune, Sarah Leberer und Dr. Juliane Kasch. Vielen Dank für die Unterstützung, den anregenden wissenschaftlichen Austausch sowie die großartigen Momente im Doktorandenraum, bei Kongressen und anderen gemeinsamen Veranstaltungen.

Danken möchte ich auch allen Kooperationspartnern für die Ermöglichung der Publikation: Julia Steinhoff, Prof. Dr. Michael Schupp, Prof. Dr. Robert Klopffleisch, Dr. Michael Rothe, Dr. Nicola Wilck, Dr. Hendrik Bartolomaeus, Dr. Anna Migglautsch, Prof. Dr. Rolf Breinbauer, Prof. Dr. Erin Kershaw, Dr. Gernot Grabner und Prof. Dr. Rudolf Zechner.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meinen Freundinnen und Freunden. Danke für eure Unterstützung, Motivation und euren Rückhalt.