

Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf adaptive Titin Modifikationen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Małgorzata Isić
aus Rypin, Polen

Düsseldorf, Oktober 2018

aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Martina Krüger
2. Prof. Dr. Ulrich Rüther

Tag der mündlichen Prüfung:
14. November 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	XII
Summary	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Myokardinfarkt	1
1.1.1. Myokardinfarkt als Folge einer koronaren Herzerkrankung	1
1.1.2. Phasen des Myokardinfarktes	3
1.1.3. Remodellierung im <i>remote</i> Myokard.....	5
1.1.4. Maladaptive Remodellierung des Herzens	6
1.2. <i>Diabetes mellitus</i> – pathologische Ursachen und kardiovaskuläre Folgen . 9	9
1.2.1. Klassifizierung und Pathophysiologie von Diabetes.....	9
1.2.2. Diabetische Kardiomyopathie.....	10
1.2.3. <i>Diabetes Mellitus</i> und akuter Myokardinfarkt	11
1.3. Titin	13
1.3.1. Titinstruktur	14
1.3.2. Titin-abhängige passive Steifigkeit der Muskeln	16
1.3.3. Veränderungen des Isoformenverhältnisses im gesunden und insuffizienten Herzen	18
1.3.4. Posttranslationale Modifikationen von Titin.....	20
1.3.5. Das Zusammenspiel von Titin und Kollagen.....	27
1.3.6. Titin und sarkomerische Proteinqualitätskontrolle.....	28
1.3.7. Modulation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit nach einem Myokardinfarkt	30
1.3.8. Diabetes-induzierte Modifikationen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit	31
1.4. Interleukin-6.....	32
1.5. Neuregulin-1	33
1.6. Zielsetzung	35
2. Material und Methoden	36
2.1. Materialien	36
2.1.1. Laborausstattung	36
2.1.2. Puffer und Lösungen.....	37
2.1.3. Reagenzien.....	40
2.1.4. Antikörper	42
2.1.5. Kits	44

2.1.6. qPCR Primers	45
2.1.7. Zellkulturmedien.....	46
2.1.8. Gewebe- und Blutentnahme	47
2.2. Methoden	47
2.2.1. Tierversuche	47
2.2.2. Isolation der adulten Ratten- und Mauskardiomyozyten	51
2.2.3. Biochemische Methoden.....	53
2.2.4. Biophysikalische Methoden.....	55
2.2.5. Molekularbiologische Methoden.....	57
2.2.6. Assays	57
2.3. Analyse der Daten	57
2.4. Software	58
3. Ergebnisse	59
3.1. Verwendete Tiermodelle	59
3.2. Ischämische Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion.....	59
3.2.1. Titin-abhängige passive Steifigkeit im ischämischen Bereich des Herzens 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt	59
3.2.2. Titinisoformenverhältnis im ischämischen Gebiet der db/+ und db/db Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt	59
3.2.3. Akute Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen im ischämischen Myokard in Folge eines Herzinfarktes... 60	60
3.2.4. Basale Modifikationen der Titineigenschaften in db/db Herzen führen zur modifizierten Antwort auf Myokardischämie im infarzierten Myokard..... 62	62
3.2.5. Modulation der mRNA Expression der ECM-Proteine im ischämischen Gebiet der db/+ und db/db Herzen akut nach I/R	63
3.3. Remote Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion.....	65
3.3.1. Titinisoformenverhältnis im <i>remote</i> Gebiet der db/+ und db/db Herzen akut nach einem Myokardinfarkt	65
3.3.2. Erhöhte Titin-abhängige passive Steifigkeit im nicht-ischämischen Bereich des Herzens nach I/R und Beeinträchtigung dieser Antwort bei db/db Mäusen.....	66
3.3.3. Akute Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen im <i>remote</i> Myokard in Folge eines Herzinfarktes	66
3.3.4. Unterschiedliche Modifikationen der Titineigenschaften im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Antwort auf I/R.....	66
3.3.5. I/R-bedingte Modifikationen der ECM-Proteine im <i>remote</i> Gebiet des Herzens der db/+ und db/db Mäuse	69
3.3.6. Interleukin-6 vermittelt <i>in vitro</i> Veränderungen der Titineigenschaften.... 70	70
3.3.7. IL-6-Ausschüttung und mRNA Expression im <i>remote</i> Myokard wird bei db/db Mäusen nach I/R beeinträchtigt.....	71
3.3.8. Autophagie und proteasomaler Abbau im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Mäuse akut nach I/R	73

3.4. Remote Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/3 Wochen	
Reperfusion	75
3.4.1. Titin-abhängige Steifigkeit und Titinisoformenverhältnis im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt.....	75
3.4.2. Modifikationen der Titinphosphorylierung im <i>remote</i> Myokard nach Ischämie und 3 Wochen Reperfusion.....	76
3.4.3. mRNA Expression der ECM-Proteine im <i>remote</i> Gebiet des Herzens 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt.....	79
3.4.4. Myokardiale mRNA Expression von IL-6 3 Wochen nach einem Herzinfarkt.....	80
3.4.5. Autophagie und proteasomaler Abbau im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt.....	80
3.5. Neuregulin-1-vermittelte Veränderungen der Titineigenschaften	81
4. Diskussion	84
4.1. Akute Modulation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im ischämischen Gebiet des Myokards	84
4.2. Diabetische Stoffwechsellage beeinflusst die Veränderungen der Titinphosphorylierung im ischämischen Myokard	85
4.3. Titin-abhängige Steifigkeit wird akut auch im nicht-ischämischen Gebiet des Herzens moduliert	87
4.4. I/R-bedingte Anpassungsmechanismen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit werden im diabetischen Herzen beeinträchtigt	89
4.5. IL-6 könnte die beobachteten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit vermitteln	91
4.6. Die Erhöhung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im <i>remote</i> Myokard ist transient	92
4.7. Proteinqualitätskontrolle nach Myokardinfarkt und bei Typ-2-Diabetes	94
4.8. Mögliche Behandlung der Diabetes-induzierten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit	97
4.9. Zusammenfassung	99
Originalarbeiten	VII
Literaturverzeichnis	VIII
Danksagung	XIX
Eidesstattliche Erklärung	XIXI
Lebenslauf	XXII

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1. Übersicht über die Schäden, die im Herzen durch Myokardinfarkt verursacht werden können.....	1
Abb.1.2. Schätzungen der Mortalität in Deutschland.	2
Abb.1.3. Phasen der Myokardinfarktheilung (bei einer Maus)	3
Abb.1.4. Ventrikuläre Remodellierung: Grobe und mikroskopische Architektur.	7
Abb.1.5. Mechanismen der kardialen Remodellierung nach einem Myokardinfarkt.	8
Abb.1.6. Diabetische Herzinsuffizienz: Interaktionen von systemischen, myokardialen und zellulären Manifestationen.....	11
Abb.1.7. Kaplan-Meier-Schätzungen des Überlebens nach akutem Myokardinfarkt in der Abwesenheit und Anwesenheit von Diabetes	12
Abb.1.8. Organisation des quergestreiften Muskels.....	14
Abb.1.9. Die schematische Darstellung der Titinstruktur im Herzen	15
Abb.1.10. Exemplarische Ruhedehnungskurve eines Muskels.....	16
Abb.1.11. Titin funktioniert im kardialen Sarkomer wie eine entropische Feder	17
Abb.1.12. Veränderung der passiven Steifigkeit auf Grund des Isoformenswitches ...	18
Abb.1.13. Regulation der Titinisoformen Expression im Herzen	20
Abb.1.14. Phosphorylierung von Titin innerhalb der N2B-(us)- und PEVK-Sequenzen und Beteiligung der relevanten Kinase-Signalwege	21
Abb.1.15. Die posttranslationalen Modifikationen von Titin und ihr Einfluss auf die passive Steifigkeit der Myofilamente.....	23
Abb.1.16. Der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Titin-abhängige Steifigkeit	26
Abb.1.17. Kollagen und Titin als wichtige Quellen der diastolischen passiven Steifigkeit im Myokard.....	28
Abb.1.18. Beteiligung von Titin an verschiedenen Signalwegen der Proteinqualitätskontrolle.	29
Abb.1.19. Schematische Darstellung der Remodellierungsphasen nach dem akuten Myokardinfarkt.....	30
Abb.1.20. Klassische und Trans-Signaltransduktion von IL-6.....	32
Abb.2.1. Schematische Darstellung der in Versuchen verwendeten Mausmodelle	48
Abb.2.2. Ablauf einer <i>closed-chest</i> Ischämie/Reperfusion	49
Abb.2.3. Isolierte Bereiche des Herzens.....	51
Abb.2.4. Isolierung und Stimulierung der adulten Rattenkardiomyozyten	52
Abb.2.5. Mikroskopbild eines einzelnen Kardiomyozytes	56
Abb.2.6. Exemplarische Kraftmessung eines einzelnen Kardiomyozytes	56

Abb.3.1. Modifikationen der Titineigenschaften im ischämischen Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Min./24Stunden)	61
Abb.3.2. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Tiere in Folge eines akuten Myokardinfarktes.....	63
Abb.3.3. Umstrukturierung der ECM im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Folge eines akuten Herzinfarktes	64
Abb.3.4. Titinisoformenverhältnis im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Mäuse nach Ischämie und Reperfusion (60 Min./24Stunden).....	65
Abb.3.5. Modifikationen der Titineigenschaften im nicht-ischämischen Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Min./24Stunden)	67
Abb.3.6. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Tiere in Folge eines akuten Myokardinfarkts.....	68
Abb.3.7. Umstrukturierung der extrazellulären Matrix im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Folge eines akuten Herzinfarktes	69
Abb.3.8. Interleukin-6-bedingte <i>in vitro</i> Modifikationen der Titin-abhängigen Steifigkeit und Titinphosphorylierung in adulten Rattenkardiomyozyten.....	70
Abb.3.9. Veränderungen der IL-6 Konzentration im Blutplasma und der mRNA Expression von IL-6 im Herzen und Skelletmuskeln der db/+ und db/db akut nach I/R.....	72
Abb.3.10. Veränderungen der AMPK-Aktivität und Expression der anderen Autophagie-Marker im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Tiere 24 Stunden nach einem Herzinfarkt.....	73
Abb.3.11. Analyse der verschiedenen Proteasomaktivitäten und PSMA Expression im <i>remote</i> Myokard der db/+ und db/db Tiere (basal und nach I/R).....	75
Abb.3.12. Modifikationen der Titineigenschaften im <i>remote</i> Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Min/3 Wochen)	77
Abb.3.13. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt.	78
Abb.3.14. mRNA Expression der ECM-Proteine im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einer Ischämie.....	79
Abb.3.15. IL-6 mRNA Expression im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einer Ischämie	80
Abb.3.16. Veränderungen der AMPK-Aktivität und Expression der anderen Autophagie-Marker sowie Expression des Proteasoms im <i>remote</i> Myokard 3 Wochen nach einem Herzinfarkt.....	81
Abb.3.17. <i>In vitro</i> Einfluss von Neuregulin-1 (NRG-1) und Metfomin (Met) auf	

Titinphosphorylierung und Aktivität der Kinasen. 82

Abb.4.1. Veränderungen der Titineigenschaften und IL-6 Konzentration im *remote*
Myokard nach Ischämie/Reperfusion bei db/+ oder WT und db/db Mäusen. 94

Tabellenverzeichnis

Tab.2.1. Laborausstattung	36
Tab.2.2. Puffer und Lösungen	37
Tab.2.3. Reagenzien	40
Tab.2.4. Primäre Antikörper.....	42
Tab.2.5. Sekundäre Antikörper	42
Tab.2.6. Kits	44
Tab.2.7. qPCR Primers.....	45
Tab.2.8. Zellkulturmedien	46
Tab.2.9. Zusammensetzung des SDS Geles	54
Tab.2.10. Zusammensetzung des Titin-Geles	54

Abkürzungsverzeichnis

Name	Bedeutung
A	Amper
A-Bande	anisotrope Bande
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACM	adulte Rattenkardiomyozyten
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
AMI	akuter Myokardinfarkt
AMPK	Adenosintriphosphat-abhängige Proteinkinase
Ang II	Angiotensin II
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-AR	β-Adrenorezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
BDM	2,3-Butanedione Monoxim
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca²⁺	Calcium
CaCl₂	Calciumchlorid
CaMKIIδ	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cdc2	Cyclin-abhängige Proteinkinase 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CM	Kardiomyozyten
Col1a1	Kollagen Typ 1
Col3a1	Kollagen Typ 3
cTnI	Kardiales Troponin I
CUT	Schneidelösung
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Zellschaden-assoziierte molekulare Muster
db/+	Leptinrezeptor-defiziente heterozygote Maus
db/db	Leptinrezeptor-defiziente homozygote Maus
DCP	Verdau-Kollagenase-Protease Puffer
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	signalverstärkte Chemolumineszenz
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	extrazelullär-regulierte Kinase

et al.	et alii (lat. und andere)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
Erb	Tyrosin-Kinase-Rezeptor
FA	Fettsäure
FBS	fetales Kälberserum
FNIII	Fibronektin III-ähnliche Domäne
g	Gramm
G	G-Protein
GLUT4	Glukosetransporter 4
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
gp130	Glykoprotein 130
GSSG	Gluthathiondisulfid
H⁺	Wasserstoff
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfsfraktion
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfsfraktion
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockproteine
H₂O	Wasser
I-Bande	isotrope Bande
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Janus-Kinase
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC3	Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1 leichte Kette 3
LV	linksventrikulär
l	Liter
LAD	absteigender Ast der linken Koronararterie
LDA	längen-abhängige Aktivierung
LOX	Lysyloxidase
Lox11	Lysyloxidase Homolog 1
Lox12	Lysyloxidase Homolog 2
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
μ	mikro
m	mili
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
M-Bande	mittlere Bande
MDa	Megadalton
MDM2	<i>Mouse double minute-2</i> Homolog
MEK	Kinase der Mitogen-aktivierten Proteinkinase
Met	Metformin
mg	Miligramm
MgCl₂·6 H₂O	Magnesiumchlorid Hexahydrat

MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier
MURFs	muskelspezifische RING-finger Proteine
Na⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	Natriumfluorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₂MgATP	Adenosin-5'-(tetrahydrogen-triphosphat), Dinatriumsalz
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
Nbr1	Nachbar der BRCA-1 Gene
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
NRG-1	Neuregulin-1
NUDC	<i>Nuclear migration protein nudC</i>
OP	Operation
O₂	Sauerstoff
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE5A	Phosphodiesterase-5
PEVK	Prolin Glutaminsäure Valin Lysin
pGC	partikuläre Guanylylzyklase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2	Proteinphosphatase 2
PSMA	Proteasom-Untereinheit alpha
PT	passive Spannung
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p62	Sequestosom 1
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
Raf	Ratte-Fibrosarkom-Protein
RAS	Renin-Angiotensin-System
Ras	Ratte-Sarkom
RBM20	RNA-bindendes Protein 20
rhNRG-1	rekombinant humanes Neuregulin-1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezien
rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	Relaxationslösung
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
s.c.	subkutan

SG	S-Glutathionylierung
sGC	lösliche Guanylylzyklase
Sham	Schein-
SHP2	SRC Homologdomäne-2, die Tyrosinphosphatase 2 enthält
sIL-6R	löslicher IL-6 Rezeptor
SITA	Sitagliptin
Smyd2	Proteine, die SET und MYND Domänen enthalten
SOCS	Suppresoren der Zytokinsignalwege
SQSTM1	Sequestosom 1
STAT3	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (mit 0,1% Tween)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor
TK	Titinkinase-Domäne
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TR	Schilddrüsenhormon-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Titin
T3	Schilddrüsenhormon
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	Unique sequence – einzigartige Sequenz
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
Zis	Titin-Z2-Domäne angrenzende Insertionen
ZSF	Hybridratte von ZDF (<i>Zucker diabetic fatty</i>) Weibchen und SHHF (<i>Spontaneously hypertensive heart failure</i>) Männchen

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt zählt weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Diabetische Patienten zeigen statistisch eine höhere Mortalität in der frühen Phase nach einem Herzinfarkt und eine höhere Morbidität in den späteren Phasen der Myokardremodellierung als Nicht-Diabetiker. Der Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit des nicht infarzierten (*remote*) Myokards nach einem Herzinfarkt scheint eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der ventrikulären Stabilität zu spielen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob die schnelle Myokardanpassung nach Ischämie/Reperfusion (I/R) transient ist und ob diese durch Diabetes-induzierte Veränderungen der Titineigenschaften beeinträchtigt wird. I/R wurde bei heterozygoten (db/+) oder WT Kontrollen und diabetischen db/db Mäusen durch eine reversible 60-minütige LAD Ligatur induziert. Das Herzgewebe wurde 24 Stunden oder 3 Wochen (WT) nach der Reperfusion entnommen. Western-Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern haben gezeigt, dass bei nicht-diabetischen db/+ Mäusen eine I/R signifikant die PKC α -Aktivität und die Phosphorylierung der S11878 in der PEVK-Region von Titin erhöht. Kraftmessungen an einzelnen Kardiomyozyten konnten den zuvor beobachteten Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit bestätigen. Ähnliche basale Veränderungen der Titineigenschaften wurden bei den db/db Mäusen ohne I/R beobachtet, die ebenso zu einer erhöhten passiven Spannung der diabetischen Kardiomyozyten führten. In Folge einer I/R wurde bei db/db Mäusen die PKC α Aktivität und die Titin S11878 Phosphorylierung nicht zusätzlich erhöht. Bei den diabetischen Tieren wurde dagegen nach einer I/R ein Trend zur Aktivierung der ERK 1/2 und Phosphorylierung von S4010 in der N2-B(us) Titinregion beobachtet, was sogar eine Abnahme der passiven Steifigkeit begünstigen könnte. In nicht-diabetischen WT Tieren war 3 Wochen nach einer I/R die passive Spannung (PT) des *remote* Myokards trotz einer noch signifikant erhöhten S11878 Phosphorylierung mit der PT der Sham-operierten WT Tieren vergleichbar. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 die Titin-abhängige passive Steifigkeit durch PKC α -abhängige Phosphorylierung der S11878 in der PEVK-Region modulieren kann und dass die IL-6-Signaltransduktion bei db/db Tieren nach einer I/R anders als bei db/+ Mäusen modifiziert wird. Zusammenfassend wird aus den Beobachtungen geschlossen, dass den diabetischen Tieren ein wichtiger Mechanismus der schnellen Myokardanpassung nach einer I/R fehlt und dass dies gegebenenfalls zu der erhöhten Mortalität der diabetischen Patienten in Folge eines Myokardinfarkts beitragen könnte.

Summary

Myocardial infarction is a leading cause of mortality worldwide. Diabetic patients experience a greater mortality during the acute phase after myocardial infarction and show a higher morbidity in the post-infarction period. It was previously suggested that the giant protein titin plays a significant role in the maintenance of ventricular stability in the acute phase after myocardial ischemia by rapidly increasing cardiac myocyte stiffness of *remote* myocardium. The present work investigated whether this acute myocardial adaptation after ischemia/reperfusion (I/R) is transient and whether it can be affected by preexisting diabetes-induced alterations of titin properties. I/R was induced in heterozygous (db/+) or WT controls and diabetic db/db mice by 60 minutes' reversible ligation of LAD. Cardiac tissue was collected 24 hours or 3 weeks after reperfusion. Western Blot analysis using the phospho-specific antibodies revealed significantly increased PKC α activity and phosphorylation of the residue S11878 in the elastic titin PEVK region in non-diabetic db/+ mice after I/R. Force measurements on single cardiomyocytes confirmed the previously observed increase in titin-dependent passive stiffness. Importantly, 3 weeks after I/R, the passive tension of the remote myocardium was comparable to that of sham-operated WT controls despite a persistently increased S11878 phosphorylation. Similar alterations of titin properties were observed in db/db mice without I/R and led to increased passive tension of cardiomyocytes from diabetic animals. In db/db mice, I/R did not further increase PKC α activity and titin S11878 phosphorylation, and cardiomyocyte passive tension remained unchanged by I/R. This could in part be explained by the finding that in diabetic mice, but not in the non-diabetic controls I/R caused a trend towards activation of ERK1/2 and phosphorylation of residue S4010 in the titin N2-B(us) region, which is expected to decrease titin stiffness. Interleukin-6 was shown to modulate titin-dependent passive stiffness by PKC α -dependent phosphorylation of S11878 in the PEVK region. It has been demonstrated that IL-6 blood plasma levels were significantly increased in response to I/R. IL-6 plasma levels were chronically elevated in db/db animals and not further increased after I/R. In summary cardiac titin properties and IL-6 signalling were differentially modified in diabetic db/db mice after myocardial I/R compared to non-diabetic controls. These changes may alter the adaptational response of the sarcomeres to myocardial injury and contribute to the worsened outcome of type 2 diabetes patients after I/R.

1. Einleitung

1.1. Myokardinfarkt

1.1.1. Myokardinfarkt als Folge einer koronaren Herzerkrankung

Koronare Herzerkrankung ist eine Krankheit, bei der eine wachsähnliche Substanz zu sogenannten Plaques in den Herzkoronararterien agglomeriert. Dieser Prozess wird als Arteriosklerose bezeichnet. Im Laufe der Zeit können solche Plaques entweder verhärten oder es kommt zu ihrer Ruptur. Die verhärteten Plaques verengen die Koronararterien und reduzieren den Fluss von sauerstoffreichem Blut zum Herzen. Im Falle einer Plaqueruptur, kann es durch Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Bildung eines Blutgerinnsels auf der Plaqueoberfläche kommen. Ein großer Thrombus kann größtenteils oder sogar vollständig den Blutfluss durch eine Koronararterie blockieren. Wenn der Transport vom sauerstoffreichen Blut zu einem Bereich des Herzmuskels komplett unterbrochen wird, kommt es zu einem Herzinfarkt (Abb.1.1.). Im Falle einer nicht rechtzeitigen Wiederherstellung des Blutflusses fängt der Herzmuskel an abzusterben. Die dauerhafte Schädigung des Myokards wird schon nach einem 15-minütigen Verlust der Sauerstoffversorgung beobachtet (Aaronson et al., 2013). Ohne rasche Behandlung, kann Herzischämie zu seriösen Gesundheitsproblemen oder sogar zum Tode führen (<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/coronary-heart-disease>).

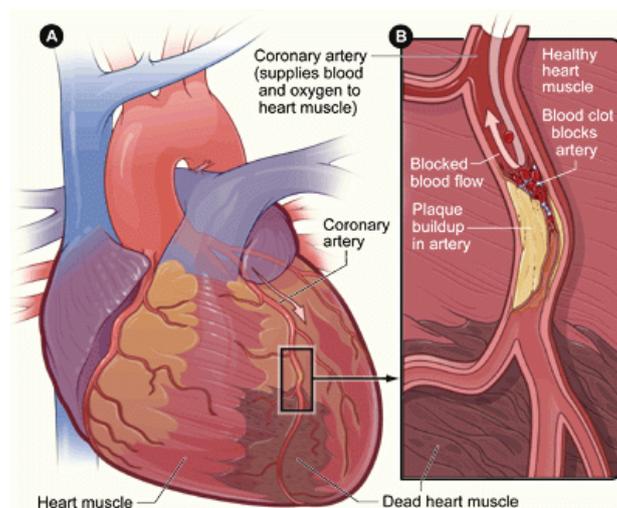


Abb.1.1. Übersicht über die Schäden, die im Herzen durch Myokardinfarkt verursacht werden können. (A) Komplette Unterbrechung des Blutflusses in Koronararterien führt zum Absterben der Kardiomyozyten in dem nicht mit Sauerstoff versorgten Gebiet des Herzens. (B) Querschnitt durch eine Koronararterie mit Plaque und Blutgerinnsel (<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/coronary-heart-disease>).

Obwohl die moderne Kardiologie erhebliche Fortschritte bei der Diagnose und Behandlung des akuten Myokardinfarkts gemacht hat, gehört die ischämische Herzkrankheit weiterhin zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Weltgesundheitsorganisation, WHO, 2015). Selbst in Deutschland sterben in Folge eines Myokardinfarkts jährlich rund 55.000 Menschen (Abb.1.2.).

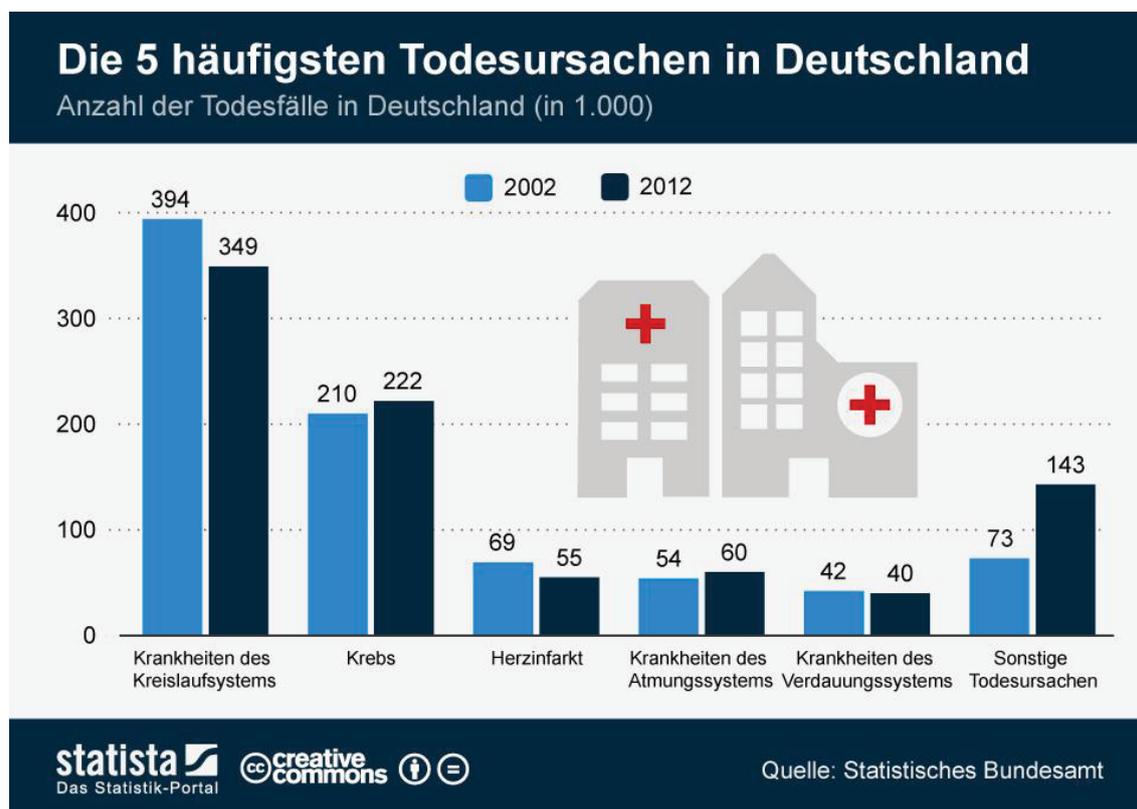


Abb.1.2. Schätzungen der Mortalität in Deutschland. Die Abbildung zeigt die 5 häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2002 und 2012 (Statistisches Bundesamt, 2013).

Zu den meisten Sterbefällen kommt es auf Grund eines Pumpversagens des Herzens und des plötzlichen Herzstillstands in der frühen Phase des Myokardinfarkts. Patienten, die die akute Phase nach dem Myokardinfarkt überlebt haben, können nichtsdestotrotz eine Herzinsuffizienz entwickeln und an den Spätfolgen der Erkrankung sterben. Es ist notwendig die komplexen zellulären und molekularen Mechanismen nach einem Myokardinfarkt zu verstehen, um die neuen Behandlungsstrategien zu entwickeln und Überlebenschancen der betroffenen Patienten zu verbessern.

Nach dem Auftreten des Myokardinfarkts erlebt das Herz eine Abfolge von Anpassungsreaktionen. Diese finden sowohl im Versorgungsgebiet der verschlossenen Herzkranzarterie, als auch im benachbarten, nicht-ischämischen *remote* Myokard statt. Falls der Heilungsprozess nach dem Myokardinfarkt nicht einwandfrei verläuft, kann

dies zur maladaptiven kardialen Remodellierung, Herzinsuffizienz und letztendlich zum Tode führen (Matsui et al., 2010). Die bisherigen Studien fokussierten sich hauptsächlich auf dem ischämischen Gebiet des Herzens und die Anpassungsmechanismen in den nicht-ischämischen Myokardarealen nach akutem Myokardinfarkt (AMI) sind bislang unzureichend bekannt. Der Erkenntnisgewinn über die Veränderungen in diesem Myokardbereich ist von wesentlicher Bedeutung, weil das *remote* Myokard für die Kompensation und die Aufrechterhaltung der kardialen Pumpleistung nach AMI verantwortlich ist.

1.1.2. Phasen des Myokardinfarktes

Die regenerative Kapazität eines adulten Herzens ist sehr begrenzt, deswegen hängt die Heilung des infarzierten Myokards von zellulären Ereignissen ab, die zur Bildung einer Kollagen-basierten Narbe führen (Frangogiannis, 2014). Die Heilung eines Myokardinfarktes kann in drei überlappende Phasen unterteilt werden: die Entzündungsphase (*inflammatory phase*), Proliferationsphase (*proliferative phase*) und Reifungsphase (*maturation phase*) (Frangogiannis, 2006b; Abb.1.3.).

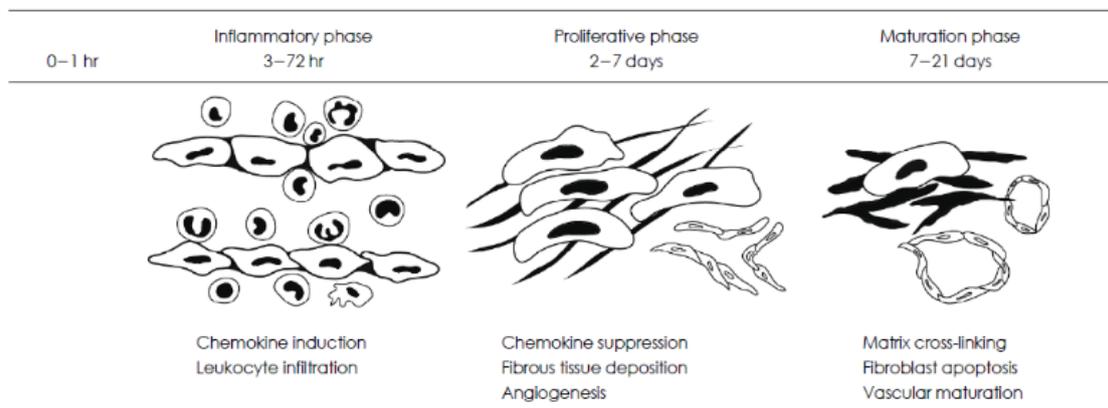


Abb.1.3. Phasen der Myokardinfarktheilung (bei einer Maus) (Nah und Rhee, 2009).

Die Entzündungsphase

Das akute, plötzliche Absterben von Kardiomyozyten aktiviert rasch die Stoffwechselwege des angeborenen Immunsystems und löst vorübergehend eine intensive Entzündungsreaktion aus (Frangogiannis, 2014). Die Entzündungsphase dient dem Verdau und der Entfernung von beschädigten Zellen und extrazellulären Matrixbestandteilen (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Das beschädigte Gewebe schüttet Mediatoren – sogenannte Zellschaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) aus, um den Körper vor einer Verletzung zu warnen (Timmers et al., 2012; Bianchi ME, 2007). Dies aktiviert zusammen mit intrazellulären Bestandteilen, die

durch nekrotische Zellen freigesetzt werden, wie Hitzeschockproteine (HSP) und Adenosintriphosphat (ATP), die Immunabwehr des infarzierten Herzens (Zou et al., 2008; Arslan et al., 2011). Für die Auslösung der Entzündungsreaktion in dem infarzierten Myokard ist die Ischämie-vermittelte Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ebenso von großer Bedeutung (Frangogiannis, 2014).

Die Entzündungsphase ist mit der schnellen Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose Faktor (TNF), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Mitglieder der Interleukin-6 (IL-6) Familie assoziiert, die die Synthese der Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen induzieren und Leukozytenintegrine aktivieren. Auf diese Weise werden starke adhäsive Wechselwirkungen vermittelt, die schließlich zur Extravasation von Neutrophilen zum Infarktbereich führen. Eindringende Leukozyten setzen proteolytische Enzyme frei, die wichtig für die Phagozytose der toten Zellen und die Entfernung der Zelltrümmer sind (Frangogiannis, 2006a).

Proliferationsphase

Sobald die nekrotischen Zellen und Schutt von extrazellulärer Matrix (ECM) entfernt wurden (etwa 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt), kommt es durch die Freisetzung des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) zu einer rapiden Inhibition der Entzündung. Die Entzündungszellen werden anschließend durch Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen ersetzt, die den Heilungsprozess einleiten. Die von abgestorbenen Kardiomyozyten und Matrixtrümmern gereinigte Herzwand könnte ohne neue stützende Strukturen dem hohen Blutdruck und den hohen mechanischen Kräften nicht standhalten (Liehn et al., 2011; Zymek et al., 2007). Um die strukturelle Integrität des infarzierten Ventrikels aufrechtzuerhalten, werden Fibroblastenvorläuferzellen aktiviert, die in Myofibroblasten differenzieren und Kollagen synthetisieren. Dieses Kollagen bildet zusammen mit Proteoglykanen und Glykoproteinen die extrazelluläre Matrix, die für die Stabilität des Herzens sorgt (Lindsey et al., 2003; Frangogiannis et al., 2000; Liehn et al., 2011).

Reifungsphase

Der proliferativen Phase der kardialen Heilung folgt die Reifung der Infarktnarbe (etwa 7 Tage nach einem Myokardinfarkt). Während dieser Phase findet eine Quervernetzung der extrazellulären Matrix durch Lysyloxidasen (LOX) statt (Talman und Ruskoaho, 2016). Die reparativen Zellen werden deaktiviert (Prabhu and Frangogiannis, 2016). In dem letzten Stadium enthält die Narbe eine dichte Kollagen-

basierte Matrix, Myofibroblasten, Stammzellen und neu gebildete Gefäße. Unbekannte Mechanismen aktivieren apoptotische Signalwege in Myofibroblasten und Gefäßzellen und bestimmen den Verlust von den meisten zellulären Komponenten (Dobaczewski et al., 2010a).

1.1.3. Remodellierung im *remote* Myokard

Die oben beschriebenen Ereignisse der einzelnen Phasen der Myokardinfarktheilung finden in dem infarzierten Bereich des linken Ventrikels statt. Immer mehr Studien weisen jedoch darauf hin, dass sich bei Patienten, die einen Herzinfarkt erleiden, die Beschädigung des Myokards nicht nur auf das ischämische Gebiet beschränkt (Dastidar et al., 2016). Meistens ist die Remodellierung der nicht infarzierten linksventrikulären Wand und nicht der Kardiomyozytenverlust selbst der Hauptgrund für die pathologische, maladaptive Remodellierung und folgende Herzinsuffizienz (Talman und Ruskoaho, 2016).

Obwohl die reparative Fibrose ursprünglich für die Verhinderung der Herzruptur von großer Bedeutung ist, ist eine übertriebene fibrotische Antwort außerhalb des infarzierten Bereiches schädlich und trägt zur progressiven Verschlechterung der Herzfunktion und einer möglichen Herzinsuffizienz bei (Talman und Ruskoaho, 2016). Der mechanische Stress im nicht infarzierten Myokard könnte einer der Faktoren sein, der die Fibrose außerhalb des Infarktbereichs fördert. Dieser Stress induziert TGF- β Expression im *remote* Gebiet des Herzens. In Folge der Aktivierung der Zytokinkaskaden kann erhebliche Ablagerung von Kollagen beobachtet werden. Zusätzlich produzieren die in der Infarktnarbe aktivierten Myofibroblasten verschiedene profibrotische Faktoren. Diese können bis zum *remote* Bereich gelangen und dort Aktivierung und Proliferation der lokalen Fibroblasten induzieren (Dean et al., 2005; Milanez et al., 1997).

Es konnte auch gezeigt werden, dass im *remote* Myokard apoptotische Prozesse gefördert werden. Der Zellverlust kann zur Verringerung der Pumpleistung dieses Gebietes und anschließender Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen (Stefanon et al., 2011; Jiang L et al., 2001). Auch die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) wird in allen Regionen des Herzens erhöht und führt lokal zu einer hohen Konzentration von Angiotensin II. Diese ist ein wichtiger Vermittler der Hypertrophie und trägt zur hämodynamischen Störungen und Entwicklung von Herzinsuffizienz bei (de Resende et al., 2006). In Randzonen des Infarktes oder im

remote Bereich des Myokards treten ebenfalls Veränderungen der Expression von Ionen Kanälen und ihrer Funktion auf. Es kommt zu einer sogenannten elektrischen Remodellierung, in Folge derer es zur Produktion des elektrischen Gradienten zwischen der ischämischen Zone und lebendem Gewebe während der Repolarisation kommt. Dieser Gradient kann zu Herzrhythmusstörungen führen (Santos et al., 1995; Antoons und Sipido, 2008). Andere Studien haben bewiesen, dass die Aktivierung der NADPH (Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) Oxidase in dem *remote* Bereich den endoplasmatischen Retikulum-bedingten Stress induziert und ventrikuläre Remodellierung begünstigt (Li et al., 2015).

Die Kenntnis, der im *remote* Gebiet stattfindenden Veränderungen in Folge eines akuten Myokardinfarkts und deren Zusammenhang mit maladaptiver Herzremodellierung, könnte zu einem besseren Verständnis der pathologischen Mechanismen in Folge einer Herzischämie beitragen. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft eine Quelle der potenziellen Targets für Therapie sein und eine wichtige Rolle bei der Behandlung der Infarktpatienten spielen.

1.1.4 Maladaptive Remodellierung des Herzens

Als Antwort auf den Gewebeverlust im infarzierten Myokard kommt es sowohl im ischämischen- als auch im *remote* Bereich des Herzens zu vielen Anpassungsreaktionen, welche adaptiv wirken und für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion sorgen. Nach einigen Wochen wird jedoch eine maladaptive Remodellierung des Herzens beobachtet, die schließlich zu einer Herzinsuffizienz und zum Tode führen kann.

Die initiale post-MI Phase der Remodellierung des linken Ventrikels ergibt sich, sowohl aus Bildung der Narbe im nekrotischen Gebiet, als auch aus Ausdehnung und Ausdünnung des Infarktgebietes (Abb.1.4.). Das Volumen des linken Ventrikels wird dadurch vergrößert. Diese Antwort wird als eine Anpassungsreaktion betrachtet, die mit Zunahme des Schlagvolumens verbunden ist und der Aufrechterhaltung des normalen Herzzeitvolumens dient (Cohen et al., 2000). Die beeinträchtigte Pumpfunktion führt über den Frank-Starling Mechanismus zur Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEDV). Dadurch wird die Dehnung der myokardialen Faser erhöht und es kommt zur Verbesserung der Kontraktionskraft. So können linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und Herzleistung trotz der verringerten Pumpfunktion in Folge des Infarkts aufrechterhalten werden (Westman et

al., 2016). Die Dilatation des linken Ventrikels erhöht laut des Laplace-Gesetzes den Wandstress und erzeugt auf diese Weise eine weitere Ausdehnung der linken Herzkammer. Es wird davon ausgegangen, dass diese Veränderung zur maladaptiven Remodellierung und Herzinsuffizienz beitragen kann (Westman et al., 2016).

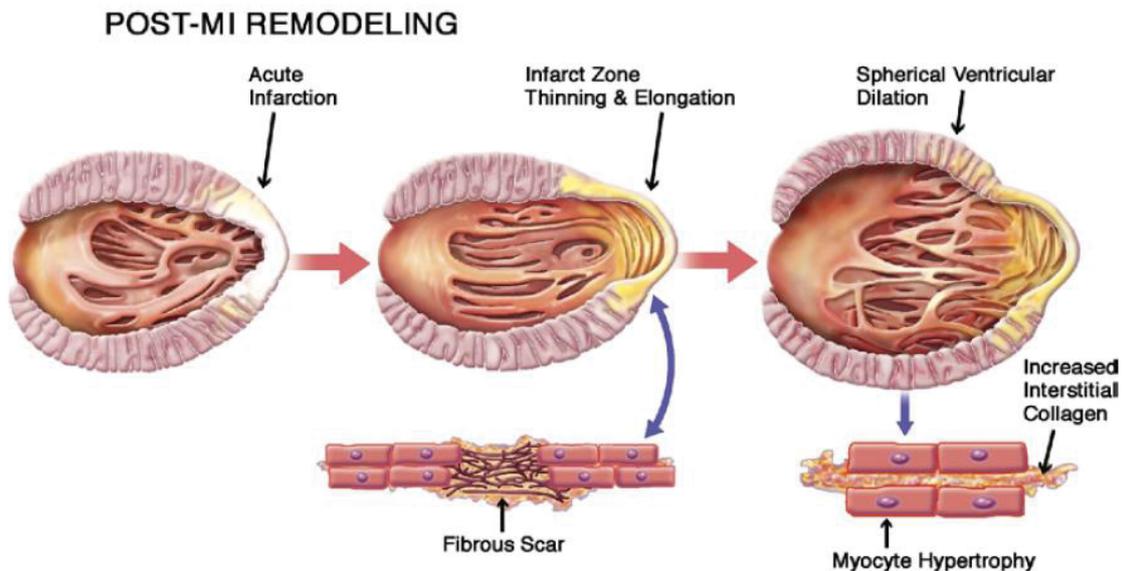


Abb.1.4. Ventrikuläre Remodellierung: Grobe und mikroskopische Architektur. Schematische Darstellung der linksventrikulären Remodellierung nach dem Myokardinfarkt. Die frühe Phase ist durch Ausdünnung und Dehnung des faserigen Narbengewebes im Bereich des Infarktes gekennzeichnet. Anschließend wird die Dilatation des linken Ventrikels, mit dem Übergang von der elliptischen zu mehr sphärischen Form grundsätzlich durch verbreitete Myozytenhypertrophie mit erhöhter Apoptose und Zunahme des interstitiellen Kollagens getrieben (Konstam et al., 2011).

In Folge der mechanischen Belastung kommt es zur adaptiven Kardiomyozytenhypertrophie. Durch Zunahme der kontraktile Einheiten und Reduktion des Wandstress wird die Pumpfunktion verbessert (Fedak et al., 2005). Epidemiologische Studien haben jedoch gezeigt, dass Hypertrophie ein signifikanter Prädiktor der kardiovaskulären Mortalität ist (Mill et al., 2011). In späteren Stadien der Remodellierung verursacht Hypertrophie eine Erhöhung der Wandmasse und Dilatation der Herzkammer. Diese Veränderungen, zusammen mit dem Leistungsabfall der pathologisch hypertrophierten Myozyten und der interstitiellen Fibrose im nicht infarzierten Myokard verursachen einen fortschreitenden Abfall der ventrikulären Pumpleistung und eine diastolische Dysfunktion (Konstam et al., 2011; Weber et al., 2013).

Das rechtzeitige Vorschreiten und die Resolution der Entzündungs- und Reparationsphase sind für die richtige Heilung nach dem Myokardinfarkt notwendig.

Falls eine der Phasen überaktiv oder unvollständig abgeschlossen wird, kommt es zur unerwünschten, maladaptiven Remodellierung (Abb.1.5.).

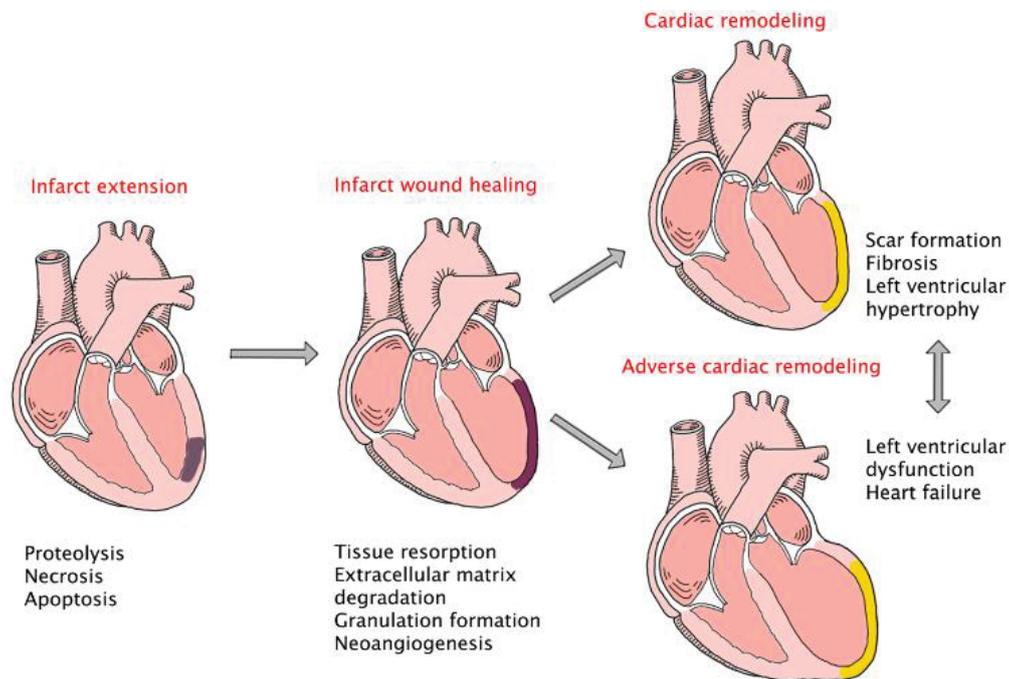


Abb.1.5. Mechanismen der kardialen Remodellierung nach einem Myokardinfarkt. In der frühen Phase nach der Beschädigung des Myokards ist die Remodellierung eine Folge der Infarktausweitung. In der späteren Phase kommt es zur Myozytenhypertrophie, interstitieller Fibrose und ventrikulärer Dilatation. Veränderungen der extrazellulären Kollagenmatrix spielen eine wichtige Rolle in der kardialen Remodellierung. Eine Suche nach einem therapeutischen Target, das in der Lage ist die maladaptive Remodellierung zu reduzieren oder zu verhindern ist eine der wichtigsten und schwierigsten Aufgaben der modernen Kardiologie (Gombozhapova, 2017).

Übermäßige Entzündung oder Fibrose stehen in direktem Zusammenhang mit erhöhtem Auftreten von Arrhythmien und anderen mit Myokardinfarkt verbundenen Pathologien (Stuart et al., 2016). Es gibt deutliche Hinweise vom Mausmodell auf Dilatation vom linken Ventrikel und maladaptive Remodellierung in Folge der beeinträchtigten Reduktion der Entzündung (Dobaczewski et al., 2010b; Cochain et al., 2012; Iyer et al., 2015). Eine ausgebreitete oder verlängerte Entzündung in dem infarzierten Bereich des Herzens kann zu solchen Konsequenzen wie Verlust der Kardiomyozyten, Unterdrückung der systolischen Funktion, erhöhter Abbau der intrazellulären Matrix (Dilatation des Ventrikels) und Fibrose außerhalb des initialen Infarktgebiet führen. Eine weitere Folge ist ein verstärkter Abbau von Herzgewebe, was den Verlust der ventrikulären Integrität und kardiale Ruptur zur Folge haben kann (Frangogiannis, 2014). Gleichzeitig ist die Entzündung für die richtige Heilung nach dem Myokardinfarkt erforderlich (van Amerongen et al., 2007). Einerseits wirkt die kurzfristige Aktivierung des angeborenen Immunsystems zytoprotektiv und erhöht die

Überlebenschancen u.a. durch Stabilisierung der Mitochondrien, andererseits führt eine anhaltende Stimulation des Immunsystems zu stärkeren Immunantworten und Leukozytenrekrutierung, was Gewebebeschädigungen induzieren kann (Prabhu und Frangogiannis, 2016).

Eine hyperaktive Reparationsphase bringt weitere Nachteile mit sich, da sie auch die Fibrose außerhalb des Infarktgebietes begünstigt, was wiederum zur diastolischen Dysfunktion beiträgt. Eine Störung der Remodellierungsphasen kann auch zur ungünstigen elektrophysiologischen Remodellierung führen, die in der Lage ist, die ventrikulären Arrhythmien und einen plötzlichen Herzstillstand zu verursachen (Stuart, 2016).

1.2. *Diabetes mellitus* – pathologische Ursachen und kardiovaskuläre Folgen

1.2.1. Klassifizierung und Pathophysiologie von Diabetes

Der weltweite, explosionsartige Anstieg der Fettleibigkeit führt zu ständig steigenden Zahlen an *Diabetes mellitus* Erkrankten. Im Jahr 2011 waren über 300 Millionen Menschen mit Diabetes diagnostiziert und es wird geschätzt, dass im Jahr 2030 etwa 450 Millionen Menschen unter Diabetes leiden werden (<http://www.diabetesatlas.org/>).

Im Jahr 1936 wurde die Klassifizierung des Diabetes in Typ 1 und Typ 2 eingeführt (Ahmed AM, 2002). Typ-1-Diabetes ist durch die Unfähigkeit des Körpers zur Insulinproduktion gekennzeichnet. Dies wird durch eine Störung des Autoimmunsystems verursacht, in Folge derer es zur Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse kommt.

Sehr viel häufiger ist die insulinresistente Form (Typ 2) von Diabetes. Insulin wird bei Menschen mit Typ-2-Diabetes produziert, jedoch wird das Zielgewebe gegen Wirkung von diesem Hormon weniger empfindlich oder sogar resistent. Aus diesem Grund kann die Glukose nicht richtig benutzt werden und demzufolge kommt es zu erhöhten Glukosewerten im zirkulierenden Blut. Typ-2-Diabetes ergibt sich aus 2 Defekten: aus gestörter Insulinwirkung und beeinträchtigter Funktion der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse und anschließend behinderter Insulinsekretion. Die gestörte Wirksamkeit von Insulin (sogenannte Insulinresistenz) tritt ein, wenn die Zielgewebe nicht in der Lage sind, auf die normale Konzentration von Insulin zu reagieren. Die Gründe hierfür können vielfältig sein: normalerweise schütten die β -Zellen in der

Bauchspeicheldrüse, als Antwort auf erhöhte Zuckerwerte, eine erhöhte Menge an Insulin aus, um den normalen Glukosegehalt aufrechtzuerhalten. Durch funktionelle Defekte in der Insulinsekretion wird diese Anpassungsreaktion im Laufe der Zeit jedoch stark beeinträchtigt. Eine Abnahme der Rezeptordichte auf Grund anhaltend gesteigerter Insulinkonzentration und genetische Defekte von Rezeptoren oder Elementen der intrazellulären Signaltransduktion können dazu führen, dass die Zielorgane weniger empfindlich gegen das Hormon werden. Auch eine Reduktion der β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse kann an der Ausprägung der Insulinresistenz beteiligt sein (Pape et al., 2014; Kahn et al., 2014).

1.2.2. Diabetische Kardiomyopathie

Kardiovaskuläre Erkrankung ist die führende Ursache für Mortalität unter Patienten mit Diabetes. Epidemiologische Erkenntnisse weisen auf eine starke Assoziierung zwischen Diabetes und Herzinsuffizienz hin. Die Framingham-Studie dokumentierte eine 2,4-fach erhöhte Inzidenz von Herzinsuffizienz bei Männern und 5-fache bei Frauen, die unter Diabetes gelitten haben (Kannel et al., 1974). Neben der Förderung von Arteriosklerose, gibt es auch Beweise, dass Diabetes eine direkte Auswirkung auf das Myokard haben kann. Dieser Zustand wird oft als diabetische Kardiomyopathie bezeichnet (Schilling und Mann, 2012). Definiert wird diabetische Kardiomyopathie als gestörte Myokardstruktur und eingeschränkte kardiale Leistung in der Abwesenheit von Risikofaktoren wie koronare Herzerkrankung, Bluthochdruck und Herzklappenerkrankungen bei Menschen mit Diabetes (Jia et al., 2018). Bei diesen Patienten werden Diabetes-assoziierte Veränderungen durch die Existenz der oben genannten Komorbiditäten verstärkt. Dieses Phänomen erhöht die Anfälligkeit des Herzens auf ischämische Gewebeschäden und erhöht die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Hayat et al., 2004).

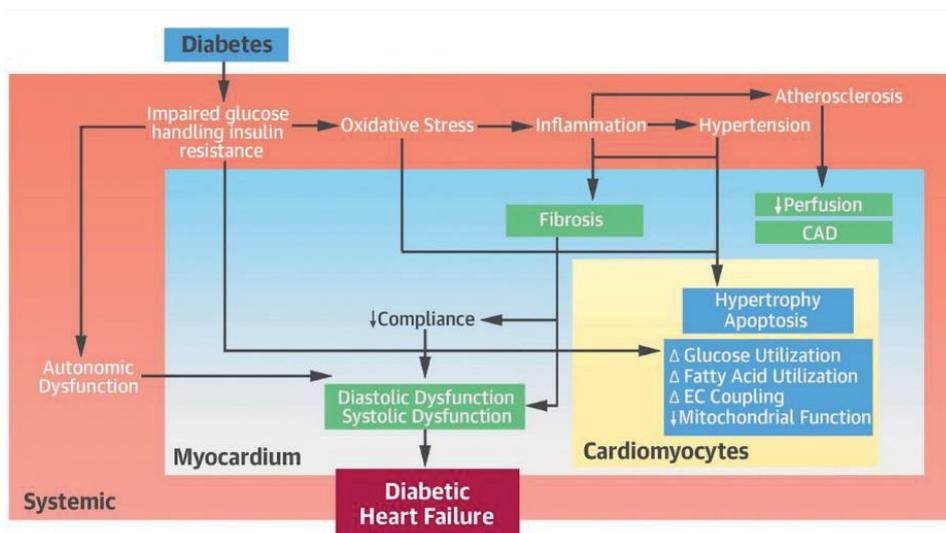


Abb.1.6. Diabetische Herzinsuffizienz: Interaktionen von systemischen, myokardialen und zellulären Manifestationen. Der gestörte Transport von Glukose und Insulinresistenz tragen zu vielfältigen Effekten bei. Diese umfassen Beeinträchtigung der Glukose- und Fettsäurenverwendung, Störungen der mitochondrialen Funktion und der Kopplung von Erregung und Kontraktion. Andere systematische Auswirkungen wie autonome Dysfunktion und oxidativer Stress führen zu Koronarerkrankung. Sich daraus ergebende Störungen der Myokardfunktion führen zu diabetischer Herzinsuffizienz (Marwick et al., 2018).

Bei der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie spielen mehrere Mechanismen eine wichtige Rolle (Abb.1.6.). Die Veränderungen in der Struktur des Myokards, sowie Beeinträchtigung des Metabolismus und der Calcium Homöostase sind frühe, Diabetes-assoziierte Defekte, die der klinisch manifestierten, kardialen Dysfunktion vorausgehen können (Boudina und Abel, 2010).

1.2.3. Diabetes Mellitus und akuter Myokardinfarkt

Durch das spezifische diabetische Milieu wird die Entwicklung einer Arteriosklerose beschleunigt. Systemische und dysregulierte Entzündungen scheinen hierbei ein wesentlicher Treiber zu sein. Insulinresistenz trägt zur Entwicklung und zum Fortschreiten der Hypertonie bei, die diesen Prozess noch stärker vorantreiben (Haas und McDonnell, 2017). Die Überlebensrate nach eventuellem Myokardinfarkt (Abb. 1.7.), sowohl akut, als auch zu späteren Zeitpunkten ist bei Patienten mit *Diabetes mellitus* dramatisch erniedrigt (Paulson, 1997).

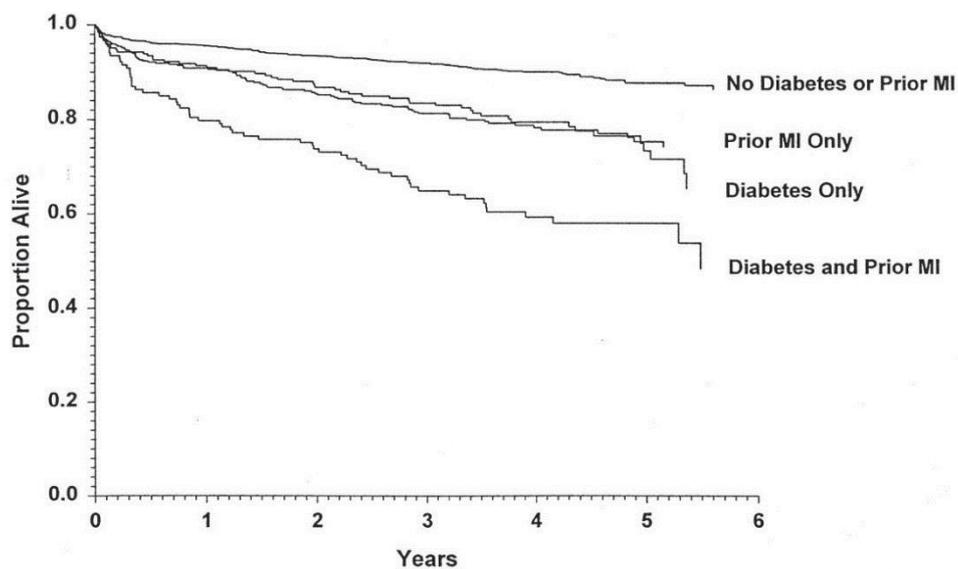


Abb.1.7. Kaplan-Meier-Schätzungen des Überlebens nach akutem Myokardinfarkt in der Abwesenheit und Anwesenheit von Diabetes. Die Schätzungen zeigen die Wahrscheinlichkeit des Todes auf Grund der Herzkoronarerkrankung. Diabetische Patienten nach dem Myokardinfarkt zeichnet die schlechteste Prognose aus, Patienten ohne Myokardinfarkt hingegen die beste. Diabetiker ohne Myokardinfarkt und gesunde Patienten nach Myokardischämie charakterisiert dazwischenliegende Überlebensrate (Kenneth et al., 2001).

Diabetiker leiden öfter unter schwerwiegenden Komplikationen nach Myokardinfarkt, neigen zur Entwicklung von Herzrhythmusstörungen und haben ein stark höheres Risiko für die Entwicklung eines kardiogenen Schocks in Folge der Myokardischämie (Kjaergaard et al., 1993; Malmberg et al., 1994; Echouffo-Tcheugui et al., 2018).

Verglichen mit gesunden Patienten zeigen Diabetiker trotz gleicher Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt eine erhöhte Anfälligkeit für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der linke Ventrikel der diabetischen Patienten den Herzinfarkt schlechter als das Myokard aus nicht-diabetischen Patienten verträgt (Granger et al., 1993; Stone et al., 1989). Viele Faktoren könnten zum vermehrten Auftreten der Herzinsuffizienz nach Myokardischämie bei Diabetikern beitragen. Ein Faktor könnte der größere Umfang der Koronarerkrankung sein, der die Herzleistung durch Begrenzung des Blutflusses zum nicht infarzierten Myokard beeinträchtigt (Mak et al., 1997; Stein et al., 1995). Eine erhöhte Inzidenz früherer Myokardinfarkte und myokardialer Dysfunktion könnte ebenso dieses Phänomen verursachen (Jaffe et al., 1984). Auch oxidativer Stress und gestörte, kardioprotektive Signalwege könnten eine wichtige Rolle in der verstärkten Beschädigung des diabetischen Myokards spielen (Ansley und Wang, 2013). Myokardischämie führt zudem zur Steigerung der Glykogenolyse und Glukoseaufnahme durch die Translokation des Glukosentransporters 4 (GLUT-4) zum

Sarkolemm. Oxidation von Glukose erfordert weniger Sauerstoff als Oxidation der FA und aus diesem Grund kann das Myokard dank Glukoseoxidation während der Ischämie mehr effizient arbeiten. Insulinopenie im diabetischen Herzen zwingt das Myokard jedoch zur Nutzung der freien Fettsäuren als Energiequelle, weil die Glukoseaufnahme der Kardiomyozyten beeinträchtigt ist. Dies kann zur metabolischen Krise führen, da hypoxisches Myokard im Rahmen der Hyperglykämie und Insulinresistenz weniger energieeffizient wird (Zarich und Nesto, 2007; Banerjee S, 2012).

Mehrere Studien unterstützen die Idee, dass die maladaptive Remodellierung des *remote* Myokards bei Diabetikern nach Myokardinfarkt zur stärkeren Beeinträchtigung der Herzfunktion beitragen kann. Iwasaka et al., (1992) haben mit Hilfe der radionuklidien Angiographie bewiesen, dass die regionale Ejektionsfraktion im *remote* Gebiet des diabetischen Herzens 3 Wochen nach Myokardinfarkt kleiner war, als es bei Patienten ohne Diabetes der Fall war. Es konnte auch gezeigt werden, dass die regionale Kontraktilität des *remote* Myokards bei Diabetikern reduziert ist. Das Verhalten des nicht infarzierten Bereiches des Herzens könnte somit ein entscheidender Faktor in dem Endergebniss der beiden Patientengruppen sein (Iwasaka et al., 1992; Aronson et al., 1997). Es sollte weiterhin untersucht werden, wie die passiven Komponenten der Kraftentwicklung im *remote* Myokard bei den Diabetikern in Folge eines Myokardinfarkts modifiziert werden.

1.3. Titin

Die filamentöse Natur der kleinsten kontraktilen Einheiten des Muskels – der Sarkomere – wurde erstmals 1953 mikroskopisch nachgewiesen. Die quergestreiften Muskeln sind durch charakteristische Anordnung von dicken (Myosin) und dünnen (Aktin) Filamenten gekennzeichnet (Abb.1.8.). Erst 1977 haben Koscak Maruyama und seine Mitarbeiter aus Muskelfasern ein elastisches Protein isoliert und dieses „Connectin“ genannt. Weitere zwei Jahre später wurde dieses Protein mit Hilfe von Gelektrophorese nachgewiesen und auf Grund seines hohen Molekulargewichts von 3 bis 4 MDa „Titin“ (nach dem griechischen Mythos Titan) bezeichnet (dos Remedios und Gilmour, 2017).

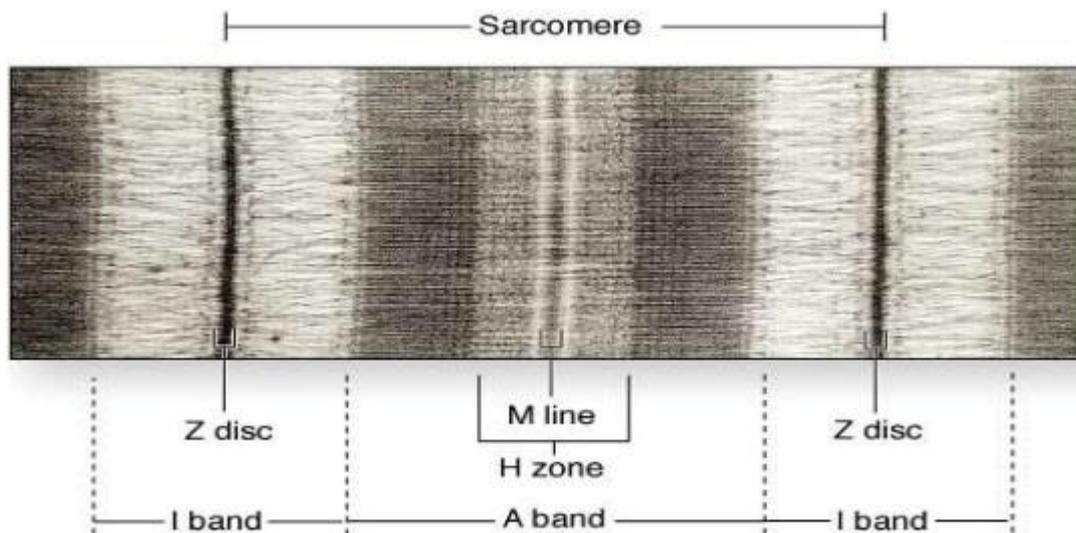


Abb.1.8. Organisation des quergestreiften Muskels. Der Ausschnitt einer Myofibrille zeigt die lichtmikroskopisch sichtbaren Elemente der Querstreifung (Mescher, 2009).

Bis heute ist Titin das größte bisher bekannte monomerische Protein. Es erstreckt sich über ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Bande und ist unter anderem für die Erzeugung der passiven Steifigkeit sowohl im Herz- als auch in Skelettmuskeln verantwortlich. Die Titin-abhängige Elastizität wird im Prozess der Herzentwicklung als auch pathologisch auf Grund von Herzerkrankungen moduliert. Diese Veränderungen haben wesentliche Auswirkungen auf die Dehnbarkeit und diastolische Funktion des Myokards. Darüber hinaus erfüllt Titin viele andere Funktionen. Unter anderem hält es das Myosin in der zentralen Position des Sarkomers, was eine optimale Entwicklung der aktiven Kräfte ermöglicht. Zusätzlich ist Titin für den Zusammenbau der Sarkomere wichtig und nimmt mit Hilfe seiner Bindungspartner an der mechano-chemischen Signalübertragung teil (Linke und Hamdani, 2014).

1.3.1. Titinstruktur

Titin wird durch ein einziges Gen kodiert (*TTN*). Alternatives Spleißen dieses Gens führt zur Bildung zahlreicher spezie- und muskelspezifischer Titinisoformen. In Skelettmuskeln wird nur die sogenannte N2A-Isoform (3,3-3-7 MDa) exprimiert, welche durch alternatives Spleißen in vielen Isoformen verschiedener Längen vorliegt (Prado et al., 2005). Der Herzmuskel dagegen exprimiert zwei Titinvarianten: N2BA (3,2-3,8 MDa) und N2B (etwa 3 MDa). Die Isoformen Novex-1 und Novex-2 sind dafür nur in geringem Ausmaße vorhanden (Bang et al., 2001). Die N2B-Isoform ist durch eine kürzere Konturlänge charakterisiert und es wird mehr Kraft benötigt, um diese

Titinvariante zu dehnen, als für die N2BA-Isoform. Die N2BA-Isoform ist länger (größer) und elastischer (Trombitas et al., 2000).

Man unterscheidet 4 Haupt-Regionen der Titinstruktur: **(1)** Das N-terminale Ende, welches in der sarkomerischen Z-Scheibe verankert ist, **(2)** die Regionen der I-Bande, die für die elastischen Eigenschaften von Titin verantwortlich sind, **(3)** Die Region der A-Bande, die eine wichtige Rolle als Myosinstabilisator spielt und **(4)** das C-terminale Ende in der sogenannten M-Linie. Dieser C-Terminus überlappt sich mit dem, des nächsten Titinmoleküls und enthält eine Serin/Threonin Kinase-Domäne (Chauveau et al., 2014).

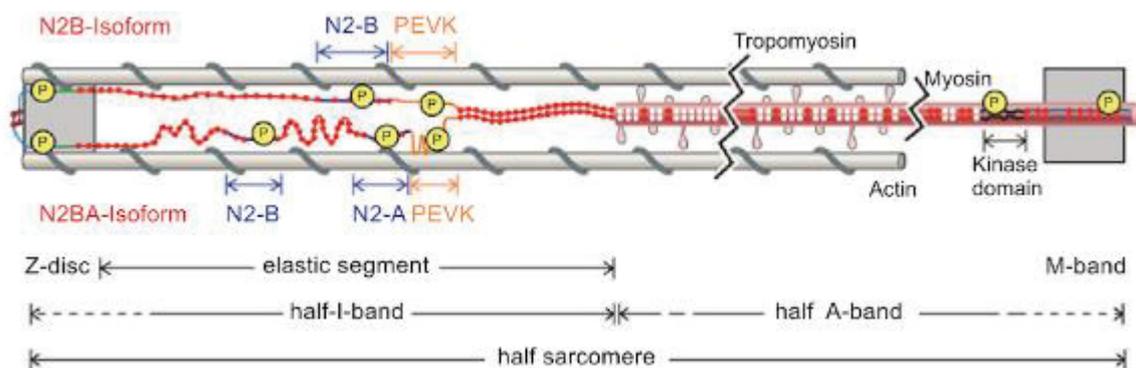


Abb.1.9. Die schematische Darstellung der Titinstruktur im Herzen. Für die Vereinfachung der Abbildung sind nur zwei Titinmoleküle pro halbes Myosinfilament dargestellt (Krüger, 2015).

Zu den meisten Veränderungen auf Grund des alternativen Spleißens kommt es im I-Banden Bereich von Titin. In geringerem Maße betreffen diese Modifizierungen auch Regionen der Z-Scheibe und der M-Bande (Bang et al., 2001; Krüger und Linke, 2011).

In der I-Bande befindet sich das elastische Segment von Titin (Abb.1.9.). Im Herzen umfasst diese Region 3 wichtige Elemente: **(1)** eine Reihe von seriell angeordneten immunglobulinähnlichen (Ig)-Domänen, **(2)** die elastische PEVK-Domäne, benannt nach dem hohen Anteil von Prolin, Glutaminsäure, Valin und Lysin und **(3)** das herzspezifische N2-B Element (LeWinter und Granzier, 2014).

Alle Titinisoformen enthalten ein proximales und distales Tandem-Ig-Segment. Die N2BA-Isoform beinhaltet außerdem ein mittleres Tandem-Ig-Element (Lahmers et al., 2004). Ein herzspezifisches N2-B-Element ist in allen kardialen Isoformen zu finden. Es besteht aus drei Ig-Domänen und der spezifischen N2-B(us) Sequenz. Die sogenannte N2A Region kommt im Herzen lediglich in der N2BA-Isoform vor. Das dritte federähnliche Element – die PEVK-Region - ist in beiden kardialen Titinisoformen enthalten. In der N2B-Isoform ist diese Region jedoch deutlich kürzer (183

Aminosäurereste), als in der N2BA-Isoform (bis zu 800 Aminosäurereste) (Greaser et al., 2002). Durch zusätzliche Ig-Domänen und die längere PEVK-Sequenz ist die N2BA-Isoform deutlich größer als die N2B-Isoform (Bang et al., 2001).

1.3.2. Titin-abhängige passive Steifigkeit der Muskeln

Die wichtigste Funktion von Titin beruht auf der Dämpfung der sarkomerischen Dehnungskräfte. Aus diesem Grund wird Titin oft als "molekulare Feder" bezeichnet. Wenn ein Muskel passiv über seine Ruhesarkomerlänge hinaus gedehnt wird, entwickelt sich eine passive Spannung (*passive tension*). Diese kann als Resistenz gegen die Dehnung definiert werden. Die Steifigkeitseigenschaften eines Muskels werden mit Hilfe einer Ruhedehnungskurve dargestellt (Abb.1.10.). Je steifer ein Muskel ist, desto höher ist die passive Kraft, die während seiner Streckung entwickelt wird und desto steiler ist somit die Ruhedehnungskurve. Passive Spannung spielt eine wichtige Rolle bei der diastolischen Funktion des Herzens, weil sie das Ausmaß der Herzfüllung und des anschließenden Herzschlagvolumens bestimmt. Neben Kollagen ist Titin für die Erzeugung der passiven Steifigkeit quergestreifter Muskeln von wesentlicher Bedeutung (Granzier und Irving, 1995).

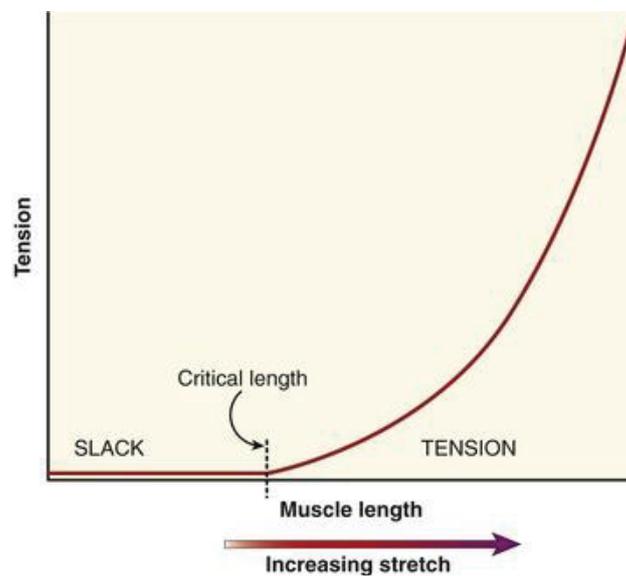


Abb.1.10. Exemplarische Ruhedehnungskurve eines Muskels. Während der Dehnung eines Muskels über seine Ruhesarkomerlänge hinaus, entwickelt sich exponentiell die passive Spannung (Neumann, 2008).

Für die Elastizität bzw. Steifigkeit von Titin sind die elastischen Segmente in ihrer I-Banden Region von wesentlicher Bedeutung. Die Aminosäuren der Ig-Domänen in dieser Region sind dafür bekannt, sekundäre Proteinstrukturen in Form eines β -Faltblattes zu bilden (Politou et al., 1995). Diese werden nur bei hohen Kräften von >50

pN entfaltet. Die restlichen Feder-ähnlichen Domänen im I-Banden Bereich (PEVK, N2-B(us)) enthalten jedoch „random coil“ Strukturen, die unter physiologischen Bedingungen reversibel entfaltet werden können (Lee et al., 2007). Auf Grund der wenig definierten Sekundärstruktur des I-Band Bereiches kann das Verhältnis zwischen Kraft und Dehnung eines Titinmoleküls durch die Modelle zur entropischen Elastizität z.B. das „wormlike-chain“ - Modell oder das Modell einer frei beweglichen Kette erklärt werden. Somit steigt die entropische Kraft von Titin, wenn die elastischen Segmente gedehnt werden (Li et al., 2002; Hsin et al., 2011).

Mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops konnte ein Modell erstellt werden, das erklärt, wie die verschiedenen Titin-Segmente im Sarkomer gedehnt werden. Vermutlich werden bei kleinen Dehnungskräften zunächst die proximalen und distalen Ig-Domänen ausgestreckt und die Entfaltung der PEVK- und N2-B(us)-Elemente folgt (Abb.1.11.) (Li et al., 2002).

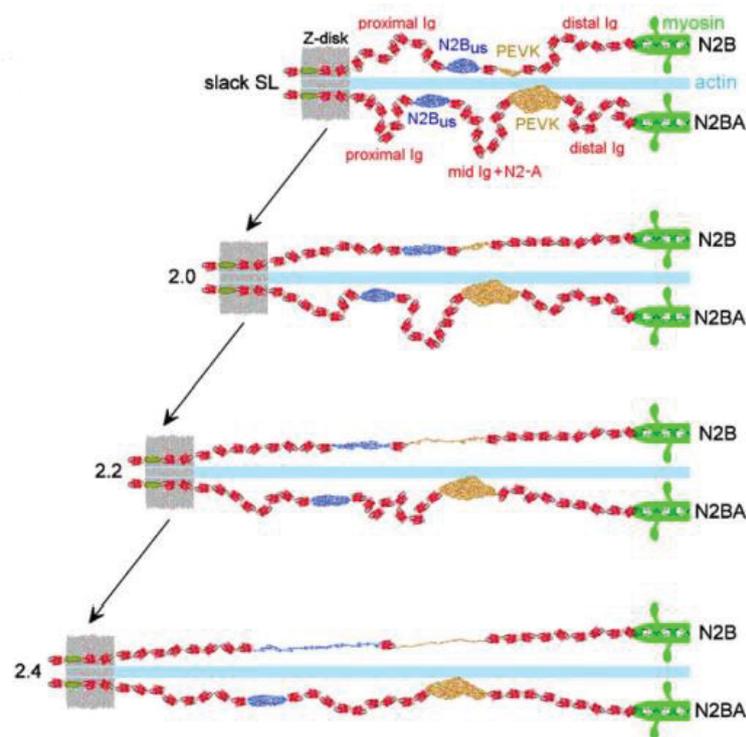


Abb.1.11. Titin funktioniert im kardialen Sarkomer wie eine entropische Feder. Das Modell zeigt eine Abfolge der Ereignisse, die zur Entfaltung der I-Banden Region der N2B- und N2BA-Isoformen führen. Die Abbildung zeigt eine Dehnung der Sarkomere von der Ruhesarkomerelänge bis zu 2,4 μm (Linke und Grützner, 2008).

1.3.3. Veränderungen des Isoformenverhältnisses im gesunden und insuffizienten Herzen

Die Anzahl der Titinmoleküle pro Myosinfilament wird in der Regel als konstant angenommen (6 Titinmoleküle pro halbes dickes Filament), aber das Expressions-Verhältnis der beiden kardialen Isoformen: N2B und N2BA kann verändert werden. Dieses Isoformen-Verhältnis hat einen wesentlichen Einfluss auf die Titin-abhängige passive Steifigkeit der Myofilamente (Abb.1.12.) (Cazorla et al., 2000). Die Unterschiede in der Expression der Titinisoformen sind auch für die Variabilität der passiven Steifigkeit zwischen verschiedenen Spezies verantwortlich. Eine höhere N2B Expression (N2B:N2BA Verhältnis etwa 80:20 bei einer Maus) wurde bei kleineren Säugetieren mit höherer Herzfrequenz beschrieben, wohingegen menschliche Herzen durch ein Expressionverhältnis von etwa 60:40 charakterisiert sind (Hidalgo und Granzier, 2013). Ferner exprimiert das rechte Herz normalerweise einen höheren Anteil der N2BA-Isoform als der linke Teil des Herzens. Auch die Herzvorhöfe (Atrien) exprimieren einen höheren Anteil von N2BA als der linke Ventrikel (Neagoe et al., 2003).

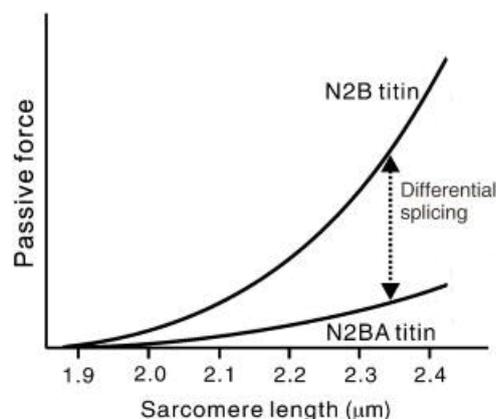


Abb.1.12. Veränderung der passiven Steifigkeit auf Grund des Isoformenswitches. Die Kardiomyozyten, die N2B-Isoform stärker exprimieren, entwickeln höhere passive Kräfte als Zellen die höhere N2BA-Isoform Expression aufweisen (Fukuda et al., 2010).

Zu einer sehr starken Veränderung der Titinisoformen-Zusammensetzung kommt es während der perinatalen Entwicklung von Rattenherzen. Fetale Rattenherzen exprimieren kurz vor der Geburt ausschließlich die lange, elastische, fetale N2BA Titinisoform, die eine Länge von etwa 3,7 MDa erreicht. Um die Geburt herum wird die fetale N2BA-Isoform durch kleinere N2BA-Isoform und steife N2B-Isoform ersetzt (Krüger et al., 2010). Man vermutet, dass die hohe Expression von N2BA im Fötus eine adaptive Antwort auf geringeren ventrikulären Fülldruck im Vergleich mit erwachsenem

Herzen ist. Die Expression der elastischeren Isoform in fötalen Kardiomyozyten könnte zusätzlich mehr Flexibilität in dem Zusammenbau der Sarkomere während der embryonalen Entwicklung der Muskeln bieten (Warren et al., 2004).

Eine veränderte Zusammensetzung der Titinisoformen kann auch bei Herzerkrankungen beobachtet werden. Menschen, die unter ischämischer Kardiomyopathie leiden, sind durch eine erhöhte Expression der N2BA-Isoform gekennzeichnet (Neagoe et al., 2002). Eine ähnliche Verschiebung der Isoformenexpression zugunsten der N2BA-Isoform konnte ebenso bei Patienten in der Spätphase einer Herzinsuffizienz festgestellt werden (Makarenko et al., 2004). Die höhere Expression der elastischeren N2BA-Isoform wurde außerdem bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfraction (eng. *heart failure with preserved ejection fraction*; HFpEF) beobachtet. Diese Patientengruppe macht etwa die Hälfte aller Herzinsuffizienzfälle aus und ist durch interstitielle Fibrose und somit erhöhte diastolische Steifigkeit charakterisiert (Borbely et al., 2005). Die erhöhte Expression der N2BA-Isoform ist vermutlich ein kompensatorischer Effekt, der der gestiegenen Steifigkeit der extrazellulären Matrix entgegenwirken kann (Nagueh et al., 2004; LeWinter und Granzier, 2014).

Die Mechanismen, die den Veränderungen der Expression von Titinisoformen zu Grunde liegen, sind bisher unzureichend bekannt. Die kürzliche Entdeckung des Spleißfaktors - RNA-bindendes Protein 20 (RBM20) könnte jedoch ein wesentlicher Durchbruch für die Aufklärung der Prozesse sein (Abb.1.13.). Die reduzierte Expression von RBM20 verursacht verstärkte Expression der elastischeren N2BA-Isoform (Guo et al., 2012). Es konnte auch gezeigt werden, dass das Titinisoformenverhältnis über den Insulin-Signalweg beeinflusst werden kann. Die Stimulation der embryonalen Rattenkardiomyozyten mit Insulin über 7 Tage förderte den Austausch der fetalen Titinisoform durch die adulte N2B-Isoform. Die Daten zeigen, dass die durch Insulin induzierte Kontrolle des Titinisoformenverhältnisses die Aktivierung des Phosphotylinosital 3 Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) Signalwegs erfordert. Eine Aktivierung dieses Signalwegs findet wahrscheinlich ebenfalls durch das Schilddrüsenhormon T3 statt. Eine veränderte Insulin-abhängige Signaltransduktion könnte somit zur veränderten diastolischen Funktion in diabetischer Kardiomyopathie beitragen (Krüger et al., 2008; Krüger et al., 2010). Die weiteren Diabetes-induzierten Veränderungen der Titin-Eigenschaften wurden im Kapitel 1.3.7. beschrieben.

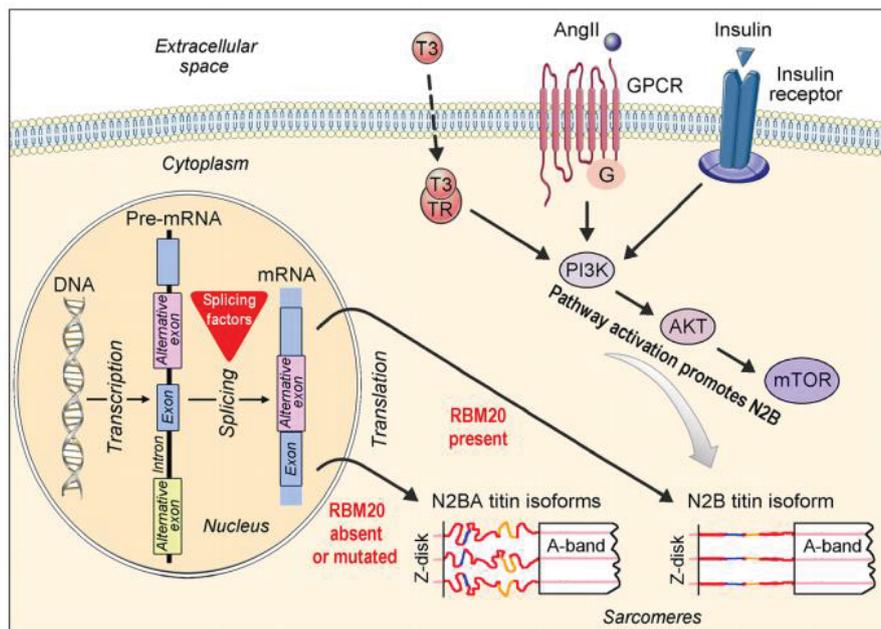


Abb.1.13. Regulation der Titinisoformen Expression im Herzen. Die Abbildung stellt die bislang bekannten Mechanismen dar, die einen Einfluss auf die Expression der Titinisoformen haben. AKT-Proteinkinase B, Angiotensin II, G – G-Protein, GPCR – G-Protein gekoppelter Rezeptor, mTOR - Ziel des Rapamycins im Säugetier, PI3K - Phosphoinositid-3-Kinase, RBM20 – RNA bindendes Protein 20, T3 – Schilddrüsenhormon, TR – Schilddrüsenhormonrezeptor (Linke und Hamdani, 2014).

Obwohl die Expression der verschiedenen Titinisoformen äußerst wirkungsvoll für die Veränderung der passiven Steifigkeit ist, ist die Umschaltung der Titinexpression in der kardialen Sarkomeren ein langsamer Prozess, der mehrere Tage oder sogar Wochen benötigt, um abgeschlossen zu werden. Eine schnellere Anpassung der Titin-basierten Myofilamentsteifigkeit erfolgt über posttranslationale Modifikationen (Hidalgo und Granzier, 2013).

1.3.4. Posttranslationale Modifikationen von Titin

Phosphorylierung und Dephosphorylierung der elastischen Titindomänen

Phosphorylierung der Sarkomerproteine stellt eine gut erforschte Modifikation zur Modulation der kardialen kontraktilen Funktion dar. Auch Titin kann posttranslational modifiziert werden. In proteomischen Datenbanken sind mehrere Hunderte an potenziellen Phosphorylierungsstellen in Titin aufgelistet. Das Verständnis über die Auswirkungen der ortsspezifischen Phosphorylierung auf die Titinfunktion und die Veränderung der Myokardleistung wird jedoch erst allmählich ergründet (Lundby A, 2012; Linke und Hamdani, 2014).

Die meisten Phosphorylierungsereignisse finden in der I-Banden-Region, vor allem in der N2-B(us) („unique sequence“ in der N2-B-Region) und im PEVK-Bereich statt. Die

Phosphorylierung der beiden Domänen moduliert dynamisch die passiven mechanischen Eigenschaften der Myofilamente (Krüger, 2015).

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) war das erste Enzym, von dem berichtet worden ist, dass es die I-Banden Region von Titin *in vitro* phosphorylieren kann und somit zur Reduktion der passiven Steifigkeit führt (Abb.1.14.).

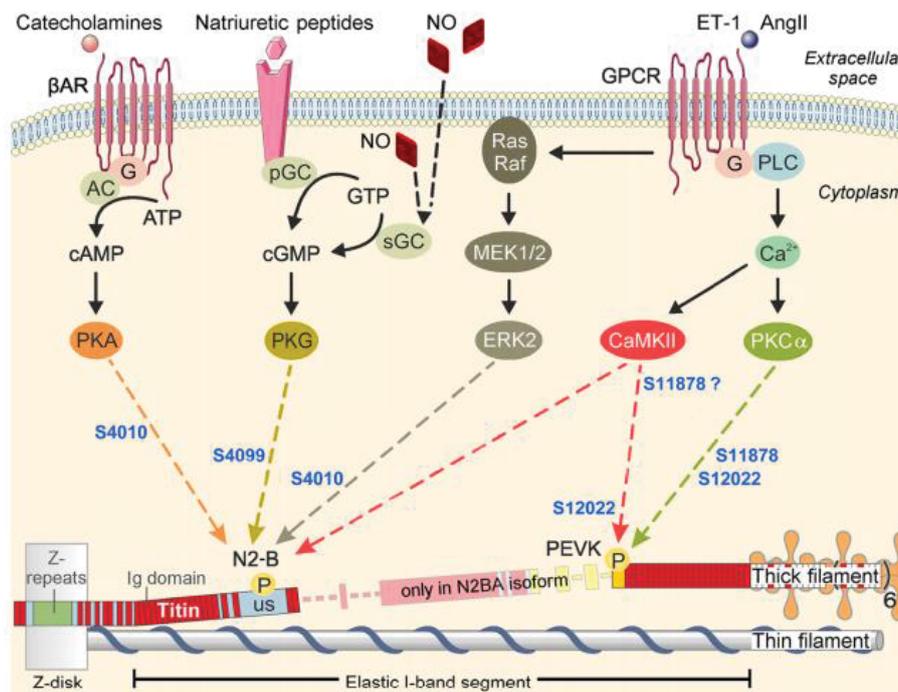


Abb.1.14. Phosphorylierung von Titin innerhalb der N2B(us)- und PEVK-Sequenzen und Beteiligung der relevanten Kinase-Signalwege. Evolutionär konservierte Phosphorylierungsstellen wurden blau markiert. Phosphorylierungsstellen in der N2B(us) und PEVK-Region wurden gemäß der humanen Titinsequenz nummeriert (UniProtKB Identifikator Q8WZ42-1). β-AR - β-Adrenorezeptor, AC – Adenylzyklase, AngII – Angiotensin II, CaMKII, Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, ERK2 - extrazellulär regulierte Kinase 2, ET-1 – Endothelin-1, G – Protein G, GPCR - G-Protein gekoppelter Rezeptor, MEK1/2 – MAPK/ERK Kinase 1 und 2, NO – Stickstoffmonoxid, PEVK – Prolin, Glutamat, Valin und Lysin-reicher Titinregion, pGC – partikuläre Guanylylcyclase, PKA – Proteinkinase A, PKCα - Proteinkinase C α, PKG – cGMP abhängige Protein Kinase G, PLC – Phospholipase C, Raf – Ratte-Fibrosarkom-Protein, Ras – Ratte-Sarkom, sGC - lösliche Guanylylcyclase, us – einzigartige Sequenz (Linke und Hamdani, 2014, modifiziert).

In vitro Phosphorylierung rekombinanter Titinfragmente und Immunelektronenmikroskopie konnten nachweisen, dass PKA die Subdomäne N2-B des elastischen Titinsegments phosphoryliert (Yamasaki et al., 2002; Fukuda et al., 2005). Mit Hilfe von Einzelmolekülexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der N2-B(us) die sogenannte Persistenzlänge (physikalisches Maß für die Steifigkeit einer Polymerkette) dieser Region erhöht und auf diese Weise die Titin-abhängige passive Spannung um bis zu 20% reduziert (Krüger et al., 2009). Massenspektrometrie hat gezeigt, dass einige Phosphorylierungsstellen in der N2-

B(us) (z.B. S4010) zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind (Kötter et al., 2013; Hamdani et al., 2013b). Es wird vermutet, dass durch Hypo- oder Hyperphosphorylierung dieser Stellen die Titinsteifigkeit rasch z.B. in Antwort auf β -adrenerge Stimulation moduliert werden kann (Abb.1.15.) (Krüger, 2015).

Ähnlich wie PKA, phosphoryliert auch die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) die N2-B(us) von Titin und reduziert dadurch die passive Steifigkeit der Myofilamente. PKG wird durch NO und natriuretische Peptide (NPs) aktiviert und phosphoryliert weitestgehend die gleichen Phosphorylierungsstellen wie PKA (Krüger et al., 2009). Die zusätzlichen PKG-abhängige Phosphorylierungsstellen an der Position S4092 (semikonserviert) und S4099 (konserviert) wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie identifiziert (Kötter et al., 2013). *In vitro* Kinase Assays weisen auf PKG-abhängige Phosphorylierung einiger Ig-Domänen und der N2A-Domäne hin. Unter physiologischen Bedingungen tragen diese Modifikationen nicht zur Titin-basierten passiven Steifigkeit bei und die Funktion dieser Phosphorylierungsstellen muss noch geklärt werden (Krüger et al., 2009). Über Bindungspartner an der N2-A Region ist Titin an Hypertrophie-Signalwege und Elemente der Proteinqualitätskontrolle gekoppelt (Miller et al., 2003; Hayashi, 2008). Phosphorylierung der N2-A Region könnte die Interaktionen zwischen Titin und seinen Bindungspartnern verändern und dadurch die genannten Signalwege modulieren (Krüger, 2015).

Die Phosphorylierungsstelle (S4010) in der Titin N2-B Region wird auch durch die extrazellulär regulierte Kinase 2 (ERK2) phosphoryliert. ERK2 phosphoryliert zusätzlich zwei nicht konservierte Phosphorylierungsstellen bei Menschen: S3918 und S3960 (Raskin et al., 2012). ERK2 wird durch mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MEK) als Antwort auf mechanischen Stress aktiviert und die induzierten Konformationsänderungen begünstigen die ERK2 Translokation zum Zellkern. Dort ist ERK2 für die Freischaltung einiger Transkriptionsfaktoren verantwortlich, die in das hypertrophe Wachstum involviert sind (Mebratu und Tesfaigzi, 2009). ERK2 vermittelte Phosphorylierung kann also ein Teil des regulatorischen Mechanismus sein, der zur Wahrnehmung des biomechanischen Stresses an der N2-B(us) in Titin beiträgt (Krüger, 2015).

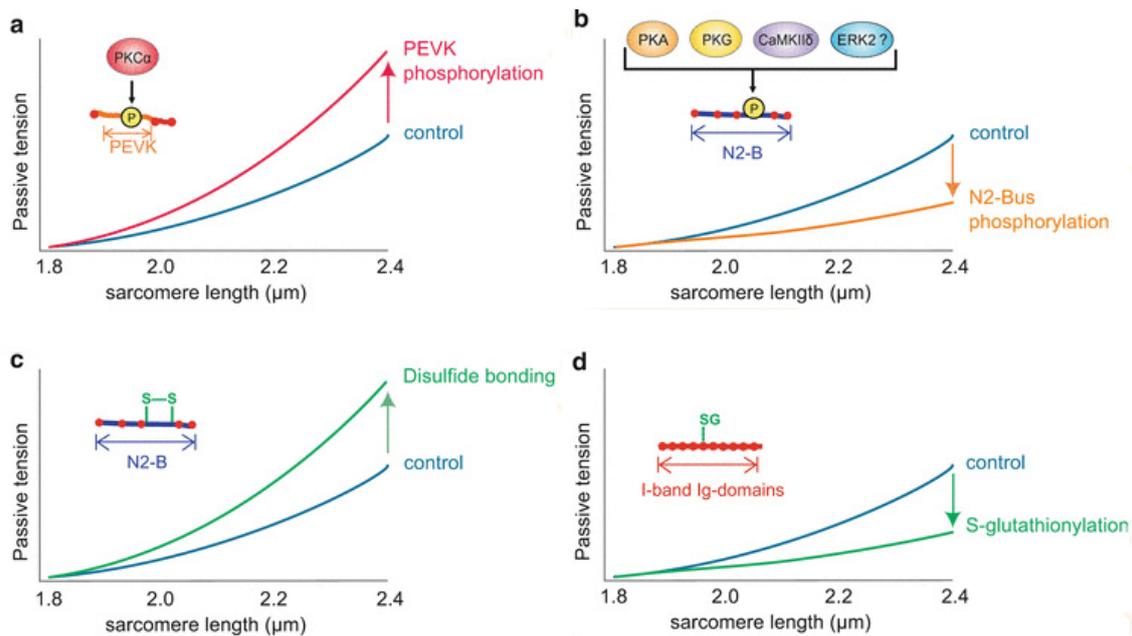


Abb.1.15. Die posttranslationalen Modifikationen von Titin und ihr Einfluss auf die passive Steifigkeit der Myofilamente. (a) Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin durch PKC α erhöht die Titin-abhängige passive Steifigkeit der Myofilamente; (b) Phosphorylierung der N2B Region des Titins durch PKA/PKG/ERK2 oder CaMKII δ vermindert die passive Steifigkeit; (c) Disulfidbindungen innerhalb der N2-B Region erhöhen die Titin-abhängige Myofilamentensteifigkeit; (d) S-Glutathionylierung (SG) der entfalteten Ig-Domänen reduziert die Titinsteifigkeit (Krüger, 2015; modifiziert)

Bisher wurden zwei Kinasen identifiziert, die Titin in der PEVK-Region phosphorylieren: Proteinkinase C α (PKC α) und Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ) (Hidalgo et al., 2009; Hamdani et al., 2013a; Hidalgo et al., 2013b). PKC α ist die im Herzen vorwiegende PKC-Isoform und spielt eine wichtige Rolle in der kontraktile Dysfunktion und bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz (Hamdani et al., 2008; Hidalgo et al., 2009). Durch Massenspektrometrie wurden 2 Stellen (S11878 und S12022) im PEVK-Bereich identifiziert, die durch diese Kinase phosphoryliert werden. Mechanische Experimente mit permeabilisierten, ventrikulären Myokardstreifen haben ergeben, dass PKC α -abhängige Phosphorylierung dieser Stellen die Titin-abhängige passive Steifigkeit signifikant erhöht (Hidalgo et al., 2009). Die Verbindung von PKC α , PEVK-Phosphorylierung und passiver Spannung wurde durch eine weitere Studie bestätigt, die gezeigt hat, dass PKC α keinen Effekt auf die passive Steifigkeit von Mäusen hat, bei denen die PEVK-Region von Titin genetisch deletiert wurde (Hudson et al., 2010).

Die CaMKII δ ist die vorherrschende CaMKII-Isoform des Herzens und wird unter anderem durch die Erhöhung des zellulären Calciumspiegels aktiviert (Couchonnal und Anderson, 2008). Hidalgo et al. haben gezeigt, dass CaMKII δ in der Lage ist, Titin in gehäuteten Fasern vom linken Ventrikel einer Maus zu phosphorylieren, und dass

diese Kinase sowohl N2-B als auch PEVK-Elemente phosphorylieren kann. Sie konnten auch nachweisen, dass sich die CaMKII δ Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region mit diesen von PKC α überlappen (z.B. S12022) (Hidalgo et al., 2012). Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung der PEVK-Region durch die CaMKII δ ebenfalls zu einem Anstieg der passiven Steifigkeit führt (Hidalgo und Granzier, 2013).

Die entgegengesetzten Effekte der N2-B(us)- und PEVK-Phosphorylierung auf die passive Steifigkeit des Titinfilaments mögen auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens basiert auf den Aminosäuresequenzen jeweiliger Titinsegmente. Die N2-B(us) enthält eine hohe Menge der sauren (negativ geladenen) Aminosäuren, was zu einem niedrigen isoelektrischen Punkt dieser Region führt. Im Gegensatz dazu besteht die PEVK-Domäne zu einem großen Teil aus basischen Aminosäureresten und ist durch einen höheren isoelektrischen Punkt charakterisiert. Die Einführung einer zusätzlichen negativen Ladung einer Phosphatgruppe zur bereits negativ geladenen Umgebung könnte zur intramolekularen elektrostatischen Abstoßung führen. Dies wiederum könnte die intrinsisch ungeordnete Struktur der N2-B(us) beeinflussen und die Dehnbarkeit dieser Domäne erhöhen, was sich in der gemessenen Erhöhung der Persistenzlänge widerspiegelt. Die Einführung der negativ geladenen Phosphatgruppen zur basischen Umgebung der PEVK-Region könnte dagegen die elektrostatische Abstoßung verhindern und zusätzliche intramolekulare ionische Interaktionen erzeugen. Das führt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einer reduzierten Dehnbarkeit der PEVK-Domäne und erklärt die beobachtete Verminderung der Persistenzlänge. Das Vorkommen zahlreicher Phosphorylierungsstellen in den elastischen Regionen ermöglicht auf diese Weise eine dynamische Regulierung und Anpassung der Titin-abhängigen Steifigkeit (Kötter et al., 2013).

Phosphorylierungsstellen wurden auch in nicht-dehnbaren Regionen des Titins entdeckt. In der N-terminalen Region von Titin befinden sich Sequenzinsertionen Zis-1 und Zis-5, die sogenannte XSPXR Motivwiederholungen enthalten. Diese Motive können *in vitro* durch ERK1/2 und Cyclin-abhängige Proteinkinase 2 (Cdc2) phosphoryliert werden (Gautel et al., 1996; Sebestyen et al., 1995). Ähnliche Phosphorylierungsmotive wurden am C-Terminus gefunden. Zur Phosphorylierung dieser Stellen kommt es in sich entwickelnden Muskeln. Deswegen spielt diese Modifikation eine potenzielle Rolle während der Myogenese (Gautel et al., 1993; Sebestyen et al., 1995). In der M-Bande Region von Titin befindet sich die

Serin/Threonin Kinasedomäne (TK) (Gautel, 2011). Für die Aktivierung dieser Kinase ist die Entfernung ihrer autoinhibitorischen C-terminalen Region erforderlich (Mayans et al., 1998). Eine Aktivierung der Titinkinase scheint auch durch mechanische Kräfte möglich zu sein (Gräter et al., 2005; Puchner et al., 2008). Die TK könnte daher ein wichtiger Sensor des biomechanischen Stresses und ein Vermittler zur Aktivierung hypertropher Signalwege sein (Gautel, 2011).

Auch Dephosphorylierung der Titindomänen kann Titin-abhängige Steifigkeit modulieren. Die ersten Studien zeigen, dass Proteinphosphatase 1 und 2 (PP1, PP2) sowie alkalische Phosphatase in der Lage sind, Titin *in vitro* zu dephosphorylieren (Hidalgo et al., 2009; Krüger und Linke 2006; Krüger et al., 2009). PKC α kann PP1 Aktivität im Herzen durch Regulation des PP1 Inhibitors direkt erhöhen (Braz et al., 2004). Dieser Effekt hat eine Hypophosphorylierung der PKA- und PKG-Phosphorylierungsstellen in der Titin N2-B(us) zur Folge und führt zur erhöhten passiven Steifigkeit der Myofilamente (Yamasaki et al., 2002). Auf diese Weise könnte eine erhöhte PKC α Aktivität durch Hypophosphorylierung der N2-B(us) und Hyperphosphorylierung des PEVK-Elements den Anstieg der myokardialen Steifigkeit im Rahmen einer Herzinsuffizienz verursachen (Hudson et al., 2010). Die neuesten Studien zeigen, dass Proteinphosphatase 5 (PP5), deren Aktivität auf Grund der Herzinsuffizienz erhöht wird, Titin in der N2-B(us) dephosphorylieren kann und zusätzlich MAPK/ERK Signaltransduktion hemmt. Somit wird die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten durch PP5 erhöht (Krysiak et al., 2018).

Oxidativer Stress und posttranslationale Titinmodifikationen

Mechanische Eigenschaften von Titin können nicht nur durch Phosphorylierung verändert werden, sondern auch durch oxidativen Stress. Dieser entsteht beispielsweise in Folge einer Ischämie/Reperfusion und kann die diastolische Funktion des Herzens beeinträchtigen. Oxidierende Bedingungen fördern nämlich die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb des N2B-(us) Elements (Abb.1.16.). Die humane N2-B(us) Sequenz enthält 6 Cysteinreste, die 3 Disulfidbrücken formen können. Durch diese kovalente Bindung verliert die N2-B(us) einen Teil ihrer Dehnbarkeit, was zur erhöhten passiven Spannung der Kardiomyozyten führt (Grützner et al., 2009).

Oxidativer Stress kann auch Ig-Domänen modifizieren, die den Großteil der elastischen Segmente in Titin ausmachen. Wenn diese Domänen z.B. in Folge einer erhöhten Belastung der Sarkomere entfaltet werden, exponieren sie kryptische Cysteine, die nun

für die Disulfidbrückenbildung und S-Gluthathionierung unter oxidierenden Bedingungen zugänglich sind. Die entfalteten Ig-Domänen formen fast immer ausschließlich gemischte Disulfide mit Gluthathion, was zur Abschwächung der mechanischen Stabilität dieser Domänen führt und Rückfaltung der β -Faltblatt-Strukturen inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese S-Gluthathionierung von Titin zu einer Reduktion der passiven Steifigkeit führt (Alegre-Cebollada et al., 2014).

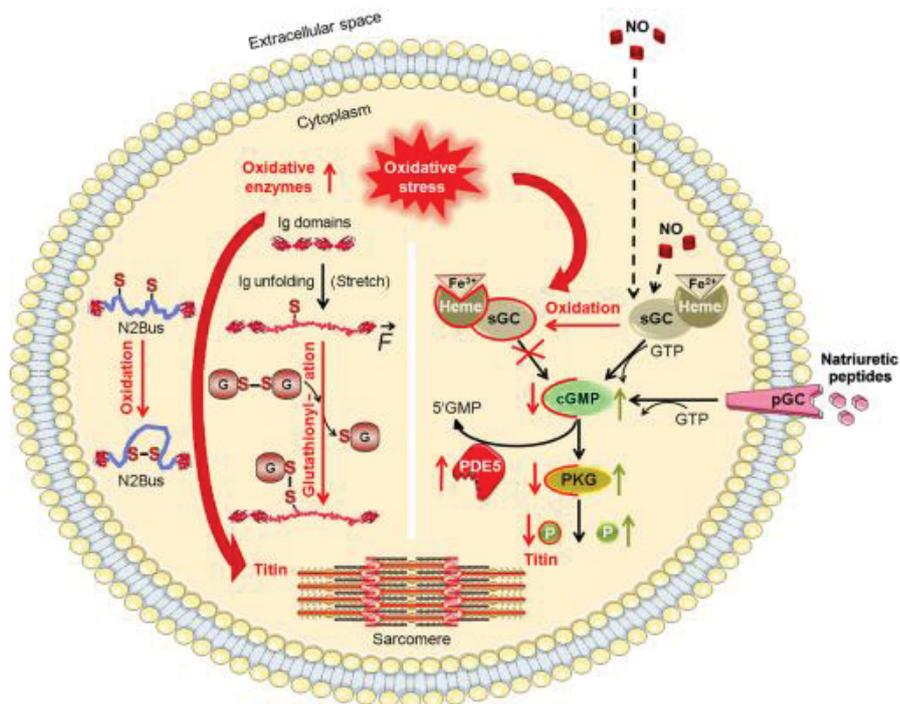


Abb.1.16. Der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Titin-abhängige Steifigkeit. Die Abbildung stellt Signalwege dar, die durch den oxidativen Stress induziert werden und die zu posttranslationalen Modifikationen von Titin führen. Links – Oxidation der Cysteinreste in der N2-B(us) Region, die Bildung der Disulfidbrücken zur Folge hat; Mitte – S-Gluthathionierung der Cysteine in entfalteten Ig-Domänen, die erneute Faltung dieser Domänen verhindert; Rechts – reduzierte Phosphorylierung des N2Bus durch PKG, die durch Oxidation des sGC und daraus resultierende Verminderung der cGMP Produktion verursacht wird. cGMP - cyclisches Guanosinmonophosphat; G – Glutathion, GSSG – Gluthathiondisulfid; NO – Stickstoffmonoxid; P – Titinphosphorylierung; PDE5 – Phosphodiesterase-5, pGC – partikuläre Guanylylcyclase, PKG – cGMP abhängige Proteinkinase G, sGC – lösliche Guanylylcyclase (Linke und Hamdani, 2014, modifiziert).

Die verstärkte Bildung von ROS verändert auch die cGMP-PKG Signalübertragung und moduliert die passive Steifigkeit. Normalerweise aktiviert NO die lösliche Guanylylcyclase (sGC), die zur Bildung von cGMP führt. Dieses moduliert die Aktivität der verschiedenen Phosphodiesterasen und aktiviert PKG (Zhang und Kass, 2011). Oxidativer Stress führt zu einer niedrigeren Bioverfügbarkeit von NO, blockiert die sGC, erhöht die Aktivität spezifischer Phosphodiesterasen und führt insgesamt zu einer Beeinträchtigung des cGMP-PKG Signalweges (Boerrigter et al., 2007). Dies resultiert

in einer reduzierten Aktivität von PKG, und führt zur Hypophosphorylierung von Titin im N2-B(us) Segment, was die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten erhöht.

Die neuesten Studien weisen darauf hin, dass auch S-Sulfonylierung der Ig-Domänen die passive Steifigkeit beeinflussen könnte. Ähnlich wie S-Glutathionylierung blockiert diese posttranslationale Modifikation unter Bedingungen des oxidativen Stresses die erneute Faltung von Titin und kann auf diese Weise die Titin-abhängige passive Steifigkeit vermindern (Beedle et al., 2016). Man vermutet, dass oxidativer Stress ebenso die S-Nitrosylierung von Titin induziert und die Sensibilität der Myofilamente für Ca^{2+} reduziert. Es muss jedoch getestet werden, ob diese Modifikation die passiven mechanischen Eigenschaften von Titin verändern kann (Figueiredo-Freitas et al., 2015). Schließlich kann oxidativer Stress, z.B. unter ischämischen Bedingungen, zu einer Aggregation der Titinfilamente im I-Band Bereich führen und somit die Titin-abhängige Steifigkeit erhöhen (Kötter et al., 2014b).

1.3.5. Das Zusammenspiel von Titin und Kollagen

Außer Titin tragen auch Kollagenfasern in extrazellulärer Matrix (ECM) zur gesamten Myokardsteifigkeit bei (Abb.1.17.). Die Titinfilamenten der Kardiomyozyten und myokardiale ECM funktionieren jedoch nicht unabhängig und ein enges Zusammenspiel der beiden Komponenten der passiven Steifigkeit wird beobachtet (Franssen und González Miqueo, 2016).

Im Bereich der physiologischen Sarkomerlängen (von 1,9 bis 2,2 μm) wird die gesamte Myokardsteifigkeit durch die Titin-abhängige Steifigkeit bestimmt. Außerhalb dieses Bereichs gewinnt die extrazelluläre Matrix-/Kollagen-abhängige Steifigkeit an der Bedeutung. Die entsprechenden Beiträge von Kollagen und Titin zur totalen diastolischen Steifigkeit unterscheiden sich vermutlich zwischen einzelnen Herzen, Spezies und Art der Herzerkrankung. Eine dynamische Adaptation der beiden Komponenten findet auch unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen statt (Linke et al., 1994; Granzier und Irving, 1995; LeWinter et al., 2007; Linke und Hamdani, 2014).

Der Beitrag von Titin und Kollagen zur totalen Myokardsteifigkeit variiert beispielweise stark im Verlauf der HFpEF. In der frühen Phase der Erkrankung bestimmt Titin die pathologisch erhöhte passive Spannung des Herzens und die ECM-Veränderungen sind in späteren Phasen der HFpEF relevant. Dieses Phänomen kann mit schnelleren Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Funktion der Kardiomyozyten erklärt

werden. Bildung der steifen Kollagenfasern nimmt dagegen viel mehr Zeit in Anspruch (Franssen und González Miqueo, 2016).

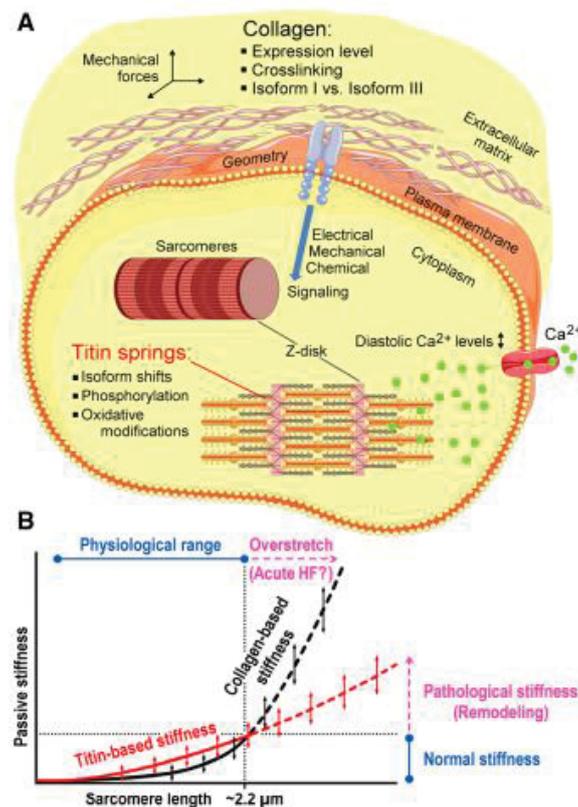


Abb.1.17. Kollagen und Titin als wichtige Quellen der diastolischen passiven Steifigkeit im Myokard. (A) Schematische Darstellung der wichtigsten Determinanten der passiven Steifigkeit im Herzen (B) Beteiligung von Titin und Kollagen an der gesamten Myokardsteifigkeit - abhängig von der Sarkomerlänge. Die Pfeile mit zwei Spitzen deuten darauf hin, dass die Steifigkeit von Titin und Kollagen variabel ist. In akuter dekompensierter Herzinsuffizienz könnte es auf Grund der Volumenüberlastung zur Überdehnung kommen (Linke und Hamdani, 2014).

1.3.6. Titin und sarkomerische Proteinqualitätskontrolle

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Titin an verschiedenen Signalwegen der Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist (Abb.1.18). Eine Verbindung des Titins zum proteasomalen System wird durch die Interaktion der Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*mouse double-minute-2 homolog*) mit Telethonin (*Titin cap protein*) ermöglicht. Die Titindomänen A168-170 der M-Banden Region interagieren mit muskelspezifischen RING-finger-Proteinen 1 und 2 (MuRF-1 und 2) – E3 Ligasen, die an der proteasomalen Degradation mehrerer Muskelproteine beteiligt sind (Übersicht in Kötter et al., 2014a).

Titin ist auch mit dem Autophagie-Signalweg verbunden. Die Titindomänen Ig141/Ig142/FNIII132 interagieren mit MURF1 und 2 (Gregorio et al., 2005; Witt et al.,

2005), die Proteine (wahrscheinlich auch Titin) durch Ubiquitinierung für den Abbau markieren (Lange et al., 2005). Die Titinkinase kann mit Nbr1 – *neighbour of BRCA1-gene-1* interagieren, was zur Bildung eines Komplexes mit Sequestosom-1 (SQSTM1) führt (Lange et al., 2005; Puchner et al., 2008). Letzteres assoziiert mit MURF2 sowie Ubiquitin und verbindet Titin mit dem Autophagie-Signalweg (Gautel, 2011).

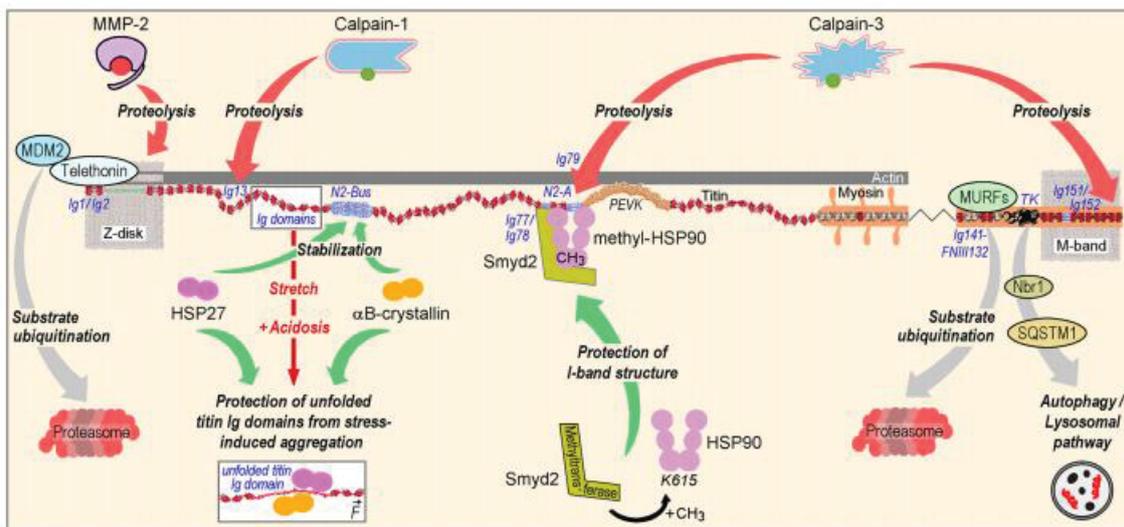


Abb.1.18. Beteiligung von Titin an verschiedenen Signalwegen der Proteinqualitätskontrolle. Es wurden sowohl die bekannten Bindungsstellen von Proteinasen in Titin (rote Pfeile) als auch Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle, die Titin involvieren angezeigt. Grüne Pfeile zeigen die protektiven Mechanismen, welche in der Lage sind, Titin zu schützen. Graue Pfeile hingegen zeigen die Signalwege, die zur Titindegradation führen. FNIII – Fibronectin III-ähnliche Domäne; HSP27 – Hitzeshockprotein-27; MDM2 – *mouse double-minute-2 homolog*; MMP-2 – Matrix-Metalloproteinase-2; MURFs – muskelspezifische RING-finger Proteine; Nbr1 – *neighbour of BRCA1-gene*; Smyd2 – Proteine, die SET und MYND Domänen enthalten. SQSTM1 – Sequestosom-1; TK – Titinkinase-Domäne (Linke und Hamdani, 2014).

Titin ist auf Grund der enormen Größe für die Fragmentierung und die Degradation anfällig und gehört zu den ersten Proteinen, die in Folge einer Ischämie degradiert werden (Hein et al., 1994). Der erhöhte hämodynamischer Stress im überlebenden Myokard könnte einen negativen Einfluss auf die Halbwertszeit der sarkomerischen Proteine (unter anderem Titin) haben, wodurch ein beschleunigter Umsatz der Sarkomerproteine in dieser Region benötigt wird (Kötter et al., 2016). Ob die proteasomale Aktivität und die Autophagie bei diabetischen Mäusen basal verändert sind und wie die eventuellen Veränderungen die Proteinqualitätskontrolle und somit den Abbau von Titin im *remote* Myokard nach I/R beeinträchtigen, muss genauer untersucht werden.

1.3.7. Modulation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit nach einem Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt führt zum funktionellen Verlust des ischämischen Gewebes. Aus diesem Grund sind Modifikationen des lebenden Myokards für die Adaptation auf erhöhten mechanischen Stress von wesentlicher Bedeutung. Eine erhöhte Expression von Kollagen I und III, sowie Kollagenquervernetzung wurden erst 3 bis 4 Tage nach dem Herzinfarkt beobachtet (Cleutjens et al., 1995). Zu diesem Zeitpunkt ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bereits signifikant reduziert und das end-systolische Volumen erhöht, was auf einen wesentlichen Verlust der Ventrikelfunktion und eine vergrößerte hämodynamische Belastung hinweist (Müller et al., 2014). Deswegen muss der mechanische Stress im *remote* Bereich des Herzens, durch die Modifikation der lebenden Kardiomyozyten kompensiert werden (Kötter et al., 2016).

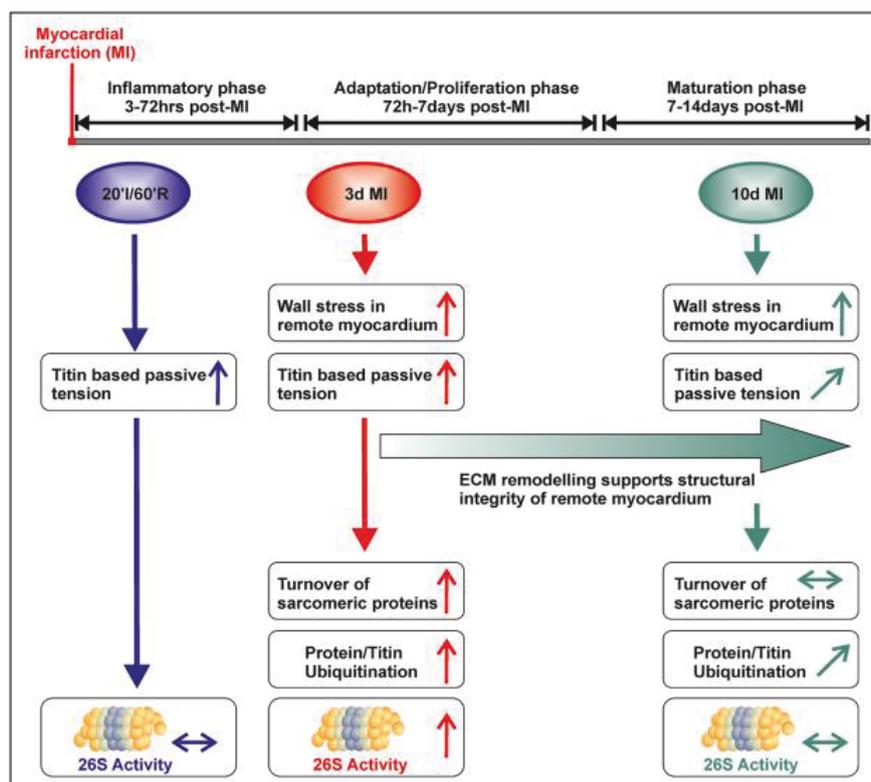


Abb.1.19. Schematische Darstellung der Remodellierungsphasen nach dem akuten Myokardinfarkt und die festgestellten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit und des Umsatzes von Titin (*Turnover*). 26S – 26S Proteasom, I/R – Ischämie/Reperfusion, MI – Myokardinfarkt ↑ zeigt einen Anstieg, ↔ keine Veränderung und ↗ leichte Erhöhung (Kötter et al., 2016).

Es ist bisher nicht viel über den Einfluss von Myokardinfarkt auf die Titin-abhängige passive Steifigkeit bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein akuter Myokardinfarkt zum schnellen Anstieg der passiven Steifigkeit im *remote* Bereich des

Myokards führt (Abb.1.19.). Diese Veränderung wird hauptsächlich durch Erhöhung der PEVK-Phosphorylierung verursacht. 10 Tage nach dem permanenten Myokardinfarkt wurde die Titinphosphorylierung der PEVK-Region wieder normalisiert und die kardiale Myozytensteifigkeit war im Vergleich mit Tieren nach 3 Tagen der permanenten LAD Ligatur signifikant vermindert (Kötter et al., 2016).

1.3.8. Diabetes-induzierte Modifikationen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit

Bei Patienten, die unter *Diabetes mellitus* leiden, trägt die übermäßige diastolische linksventrikuläre Steifigkeit wesentlich zur Herzinsuffizienz bei. Diabetes erhöht die Myokardsteifigkeit durch myokardiale Ablagerung von Kollagen und AGEs im Myokard und Erhöhung der Kardiomyozyten-abhängigen passiven Steifigkeit (van Heerebeek et al., 2008).

An mehreren Tiermodellen wurde untersucht, welche Modifikationen von Titin die diastolische Steifigkeit bei Diabetikern induzieren. ZSF1 Ratten (Hybriden von ZDF – *Zucker diabetic fatty* und SHHF – *spontaneously hypertensive heart failure* Ratten), sind ein Tiermodell für Typ-2-Diabetes und entwickeln innerhalb von 20 Wochen eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). Es konnte gezeigt werden, dass verringerte Phosphorylierung der N2B-Region und damit verbundene erhöhte passive Steifigkeit zur zugrundeliegenden myokardialen diastolischen Dysfunktion beigetragen haben (Hamdani et al., 2013b). Ein anderes Modell für Diabetes Typ 2 - db/db Mäuse (Leptin-Rezeptor defizient) zeigt bereits im Alter von 16 Wochen eine reduzierte linksventrikuläre diastolische Elastizität des linksventrikulären Myokards. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Mäuse einen niedrigen cGMP Spiegel, verminderte Aktivität der myokardialen PKG und eine reduzierte Phosphorylierung der N2B-Isoform aufweisen. Diese Veränderungen führten zur basal erhöhten passiven Steifigkeit des Herzmuskels (Hamdani et al., 2014). Auch beim Menschen wurden ähnliche Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit beobachtet. Hopf et al. konnten zeigen, dass die Kardiomyozytensteifigkeit in humanen atrialen Herzproben der diabetischen Patienten trotz einer signifikant erhöhten Expression der weniger steifen N2BA Titinisoform ansteigt. Die PKG-abhängige Phosphorylierung der S4099 Phosphorylierungsstelle war signifikant reduziert, was auf eine Beeinträchtigung des NO-cGMP-PKG-Signalwegs hinweist. Gleichzeitig war die PKC α -abhängige Phosphorylierung von S11878 in der PEVK-Region erhöht. Eine ähnliche posttranslationale Modifikation Titins wurde auch in diabetischen ApoE-/-

(Apolipoprotein E defizient) Mäusen beobachtet und es wird vermutet, dass eine erhöhte PKC α -abhängige Phosphorylierung der Titin PEVK-Region wahrscheinlich der hauptbeitragende Faktor zur Diabetes-induzierten erhöhten passiven Steifigkeit ist (Hopf et al., 2018).

Die basal hohe diastolische LV Steifigkeit bei diabetischen Patienten scheint die linksventrikulären Anpassungsprozesse nach einem Myokardinfarkt deutlich zu beeinträchtigen. Es wird vermutet, dass die diastolische Steifigkeit eine wichtige Ursache dafür ist, dass Diabetiker mit einer höheren Wahrscheinlichkeit nach einem Myokardinfarkt eine Herzinsuffizienz entwickeln (Stone et al., 1989; Solomon et al., 2002).

1.4. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, das eine wichtige Rolle im Immunsystem und in der Pathogenese der metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Die im Blutplasma zirkulierenden Konzentrationen von IL-6 betragen bei gesunden Menschen etwa 1 pg/ml und können z.B. in Folge einer Entzündung oder körperlicher Aktivität massiv erhöht werden (Qu et al., 2014).

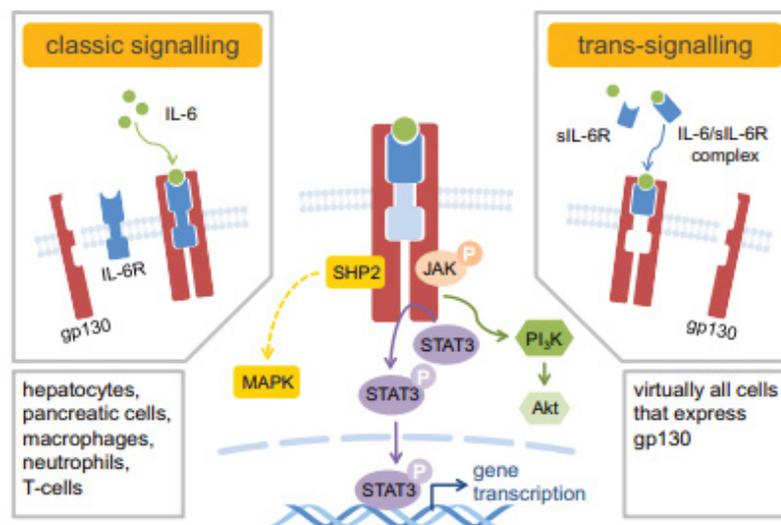


Abb.1.20. Klassische und Trans-Signaltransduktion von IL-6. Die Bindung von IL-6/IL-6R (klassische Signaltransduktion-links) oder IL-6/sIL-6R (Trans- Signaltransduktion -rechts) und das gp130 initiiert die Dimerisierung des Proteins mit anschließender Aktivierung der intrazellulären Signalübertragung. Nach der Dimerisation von gp130 kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste des Proteins und drei folgende Signalwege können aktiviert werden: JAK/STAT, SHP2/MAPK und PI3K/Akt. SHP2 – SRC homology domain 2-containing tyrosine phosphatase 2 (Qu et al., 2014).

IL-6 bindet an seinen spezifischen membrangebunden IL-6 Rezeptor (IL-6R) und bildet mit dem gp130 (Glykoprotein 130) Homodimer einen Signallisierungskomplex. Im Gegensatz zu gp130 wird IL-6R nur auf einer begrenzten Anzahl von Zelltypen exprimiert, nämlich auf Hepatozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen (Scheller und Rose-John, 2006; Rose-John et al., 2006). Die zelluläre Aktivierung von IL-6 durch die Bindung mit dem IL-6R wird als klassische Signaltransduktion bezeichnet (Abb.1.20). Alle anderen Zellen, die keinen membrangebundenen IL-6R exprimieren werden durch sogenannte IL-6 Trans-Signaltransduktion aktiviert. IL-6 bindet in diesem Fall an die lösliche Form des IL-6R (sIL-6R). Dadurch entsteht ein Komplex mit gp130, der sich auf der Zelloberfläche befindet. Die Zellen, die keinen IL-6R besitzen, sind dank sIL-6R in der Lage auf IL-6 zu antworten (Qu et al., 2014). Die nachgeschaltete Signalisierung des IL-6 erfolgt entweder über die Janus-Kinase/Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (JAK-STAT), Ras-MAPK oder PI3K Signalwege. Im Rahmen des JAK-STAT-Weges vermittelt IL-6 seine Wirkung spezifisch durch Aktivierung von STAT3, das dimerisiert und dann zum Zellkern transportiert wird. Die Regulation und Beendigung der nachgeschalteten IL-6-Signaltransduktion wird durch einen Suppressor von Zytokinsignalisierungsproteinen (SOCS) vermittelt (Fontes et al., 2015).

Es gibt erste Hinweise darauf, dass IL-6 auch einen direkten Einfluss auf Modulation der Titineigenschaften hat. Savvatis et al. haben ein Mausmodell der akuten Herzmuskelentzündung, die sich durch hohe IL-6 Konzentration auszeichnet, untersucht. Die gesamte Phosphorylierung von Titin wurde hierfür mit Hilfe einer phosphospezifischen Pro-Q Diamond-Färbung gelektrophoretisch analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Titinphosphorylierung bei den infizierten Tieren mit hohen IL-6 Plasmawerten signifikant reduziert war. Die Behandlung der Tiere mit dem IL-6 Rezeptorantikörper (MR16-1, Tocilizumab), welche die IL-6 Signaltransduktion hemmt, führte zur Normalisierung der Phosphorylierung von Titin (Savvatis et al., 2014).

1.5. Neuregulin-1

Neuregulin-1 (NRG-1) gehört zu den epidermalen Wachstumsfaktoren, die Proliferation, Differenzierung und das Überleben vielen verschiedenen Zelltypen wie Brust-Epithelzellen, Neuronen und Myozyten fördern (Lemmens et al., 2007). Die NRG-1 bedingten Effekte werden durch Tyrosin-Kinase Rezeptoren (Erb2, Erb3 und Erb4) vermittelt, die nach der Bindung eines Ligandes dimerisieren, was zur Phosphorylierung

und Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege führt (Holbro und Hynes, 2004). In den adulten Herzen wird NRG-1 hauptsächlich in endothelialen Zellen in der Nähe der Kardiomyozyten exprimiert (z.B im Endokard und in der myokardialen Mikrovaskulatur), wohingegen sich die ErbB2 und ErbB4 Rezeptoren in den Kardiomyozyten befinden (Abb.1.21.) (Cote et al., 2005; Zhao et al., 1998). Zu den Signalwegen, die durch NRG-1 aktiviert werden, gehört auch der ERK1/2 und PI3K/Akt Signalweg. Die hypertrophe Antwort auf NRG-1 beruht hauptsächlich auf der Aktivierung von ERK1/2 wogegen die anti-apoptotischen Effekte von NRG-1 Akt-abhängig zu sein scheinen (Baliga et al., 1999; Fukazawa et al., 2003). Es wird vermutet, dass NRG-1 durch das Zusammenwirken mit dem cholinergen (anti-adrenergen) System die Herzleistung und den Blutdruck vermindern kann. Die molekularen Mechanismen werden immer noch untersucht, aber erste Studien zeigen, dass die anti-adrenergen Effekte von NRG-1 durch NO und endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) vermittelt werden können (Lemmens et al., 2004).

Die NRG-1/ErbB Signaltransduktion scheint bei den diabetischen Ratten beeinträchtigt zu sein. Gui et al. konnten nämlich zeigen, dass STZ Ratten eine signifikant reduzierte ErbB2 und ErbB4 mRNA Expression und NRG-1 Proteinexpression aufweisen (Gui et al., 2011). Die ersten möglichen therapeutischen Effekte von NRG-1 wurden durch Li et al. bewiesen, die die STZ Ratten mit NRG-1 behandelt haben. Alle Symptome der eingeschränkten Myokardfunktion konnten mit NRG-1 gemildert werden (Li et al., 2011). Die genauen Mechanismen, die zur Verbesserung der Herzleistung führen, sind aber noch nicht bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Titin zu den positiven Effekten der NRG-1 vermittelten Signaltransduktion beitragen könnte. Hopf et al. haben nämlich beobachtet, dass die chronische NRG-1 Behandlung der Apolipoprotein E-defizienten Mäusen, bei denen *Diabetes mellitus* mit STZ induziert worden ist, die Diabetes-assoziierten Veränderungen in der Titin-basierten passiven Steifigkeit normalisierte. Die Titinphosphorylierung konnte nämlich über NRG-1-bedingte erhöhte PKG und ERK1/2-Aktivität und reduzierte PKC α Aktivität korrigiert werden (Hopf et al., 2018).

1.6. Zielsetzung

Die Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt ist bei Patienten mit *Diabetes mellitus* dramatisch reduziert. Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass die maladaptive Remodellierung des *remote* Myokards bei Diabetikern zur gestörten Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt beitragen kann. Um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können, ist es von großer Bedeutung, die frühen Anpassungsreaktionen des nicht-ischämischen, sogenannten *remote* Myokards zu erforschen. Im Rahmen dieser Dissertation sollen die I/R-induzierten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Kardiomyozytensteifigkeit untersucht werden. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, welche Rolle Titin während der frühen Phase der Remodellierung des *remote* Myokards spielt. Desweiteren soll diese Arbeit Auskunft darüber geben, ob die Diabetes-bedingten Modifikationen der Titin-abhängigen Eigenschaften, die Anpassungsmechanismen im *remote* Myokard nach einer I/R beeinträchtigen. Es soll geklärt werden, ob Interleukin-6, das nach einem Myokardinfarkt und bei Diabetikern verstärkt ausgeschüttet wird, die Modulation der Titineigenschaften induzieren kann. Die neuesten Studien zeigen, dass ein epidermaler Wachstumsfaktor Neuregulin-1 zur Verbesserung der Herzleistung bei diabetischen Ratten führen kann. Im Rahmen der Dissertation wird zusätzlich getestet, ob Neuregulin-1 potenzielle therapeutische Effekte bei der Behandlung der Diabetes-induzierten, pathologischen Veränderungen von Titin haben könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Alle Kits, Reagenzien und Färbungen wurden, falls nicht anders angegeben, laut der Herstellerangaben verwendet.

2.1.1. Laborausstattung

Tab.2.1. Inventar der bei Versuchen verwendeten Laborgeräten

Laborgerät	Hersteller
Blutzuckermessgerät	Bayer Contour
Brutschrank	Thermo Scientific
ECL Imager Fusion FX7	Vilber
Elektrokardiogramm Monitor	AD Instruments
Eismaschine	Ziegra
Feinwaage	Mettler
Geldokumentationsanlage	Biorad
Glomax Multi Detection System	Promega
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ti
Inverses Lichtmikroskop	Motic AE 2000
Kraftmessungstand	Aurora Scientific Instruments
Kühlschrank +4°C	Liebherr
Kühlschrank -80°C	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Heraeus Instruments
Magnetrührer	VWR
Mikrowelle	AEG
NanoDrop	Thermo Scientific
pH Meter	Mettler
Power Pack	Biometra
Real Time PCR System	Thermo Scientific
Rollmischer	CAT
Rollpumpe	Gilson
Schüttler	Edmund Bühler GmbH
SDS Gelelektrophorese System	Biorad
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	VWR
Tissue Ruptor	QIAGEN
Trans Blot Turbo System	Biorad
Transiluminator	Kaiser
Ultraschallbad	Bandelin
Ultra Turrax	VWR
Vortexer	VWR
Waage	KERN
Wasserbad	Kötterman
Werkbank	Thermo Scientific
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen

2.1.2. Puffer und Lösungen

Tab.2.2. Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Anodenpuffer	300 mM Tris 100 mM Tricine pH 8,8
CUT (Schneidelösung)	DCP Lösung 100 µM CaCl ₂ 1% BSA
DCP (Verdau-Collagenase-Protease-Lösung)	Perfusionspuffer 50 µM CaCl ₂ 6U/ml Protease 200 U/ml Kollagenase Typ II
EGTA Lösung	250 mM EGTA 50 mM KCl pH 7,0
High-Calcium Lösung	Perfusionspuffer 400 µM CaCl ₂ 1% BSA
IL-6 ELISA Extraktionspuffer	10 mM Tris 150 mM NaCl 1% Triton X-100 pH 7,4
Kathodenpuffer	300 mM Aminocapronsäure 30 mM Tris pH 8,7
10xLaufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% SDS pH-Wert sollte über 8,3 liegen
Low-Calcium Lösung	Perfusionspuffer 200 µM CaCl ₂ 1% BSA
Na₂MgATP Lösung	50 mM Na ₂ ATP 50 mM MgCl ₂ pH 7,0
Perfusionspuffer Adulte Mauskardiomyozyten	126 mM NaCl 4,4 mM KCl 1,0 mM MgCl ₂ ·6 H ₂ O 4 mM NaHCO ₃ 10 mM HEPES 30 mM BDM 11 mM Glukose pH 7,3-7,35
Perfusionspuffer Adulte Rattenkardiomyozyten	130 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,25 mM MgCl ₂ ·6 H ₂ O 0,33 mM NaH ₂ PO ₄ 25 mM HEPES

	20 mM Glucose 3 mM Puryvate 5 mM Creatine 2 mM Carnitine 5 mM Taurine pH 7,3-7,4
1xPBS Puffer	2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Phosphatase Inhibitor Cocktail	500 M NaF 10 mM Na ₃ VO ₄ 100 mM Natrium Pyrophosphat, Decahydrat 100 Mm β-Glycerophosphat
PVDF Destain	10% Essigsäure 40% Ethanol
PVDF Stain	0,075% Serva Blue Methanol
Relaxationslösung	10 mM Imidazole 3 mM EGTA 10 mM Na ₂ MgATP 47,7 Mm Na ₂ CrP 2 Mm DTT pH 7,0
4xSammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS pH 6,8
Stripping Puffer	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2% Nonident P40 0,1 M β-Mercaptoethanol frisch zugeben
10xTBST	0,2 M Tris 1,5 M NaCl 0,1% Tween-20 pH 7,4
Titinprobenpuffer	8 M Urea 2 M Thiourea 3% SDS 0,035% Serva Blue 10% Glycerol 50 mM Tris
4xTrenngelpuffer	1,5 mM Tris 0,4% SDS pH 8,8
Verdau-Lösung Adulte Mauskardiomyozyten	Perfusionspuffer 270 U/ml Kollagenase Typ I 25 μM CaCl ₂
Waschpuffer I	Perfusionspuffer 20 mg/ml BSA 100 μM CaCl ₂

Waschpuffer II	Perfusionspuffer 20 mg/ml BSA 200 μ M CaCl ₂
Waschpuffer III	Perfusionspuffer 20 mg/ml BSA 500 μ M CaCl ₂

2.1.3. Reagenzien

Tab.2.3. Liste der verwendeten Reagenzien

Name	Hersteller
199 Medium	MERCK
Aceton	Sigma Aldrich
Acrylamide/Bis (29:1)	Biorad
Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz	AppliChem
Agarose	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich
APS	AppliChem
β -Glycerophosphat	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
BDM	Sigma Aldrich
Blebbistatin	Sigma Aldrich
Blotting Papier	Macherey Nagel
Bradford	Thermo Fisher
BSA	Capricorn Scientific
Calciumchlorid	Sigma Aldrich
Carnitin	Sigma Aldrich
Collagenase Typ II	Biochrom
Collagenase Typ I	Worthington
Creatin	Sigma Aldrich
Creatine Phosphat Disodium Salz	MERCK
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
DMEM Medium	MERCK
DTT	Sigma Aldrich
ECL Westar η c Ultra	Cyanagen
EDTA	Sigma Aldrich
EGTA	Sigma Aldrich
Essigsäure	ROTH
Ethanol	VWR
FBS Superior	Biochrom
Glucose	MERCK
Glycerol	Sigma Aldrich
Glycin	ROTH
Guanidinhydrochlorid	AppliChem
Heparin	Calbiochem
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm
HEPES	Sigma Aldrich
Salzsäure	VWR
Imidazol	Sigma Aldrich
Imperial Protein Stain	Thermo Scientific
Isofluran	Piramal Healthcare
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Ladder PAGE Ruler	Thermo Scientific
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma Aldrich
Metformin	Sigma Aldrich

Methanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK
Natriumhydrogencarbonat	MERCK
Natriumhydroxid	ROTH
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Neuregulin-1	Biomol
Nonident P40	Sigma Aldrich
Penicilin/Streptomycin	MERCK
2-Propanol	MERCK
Protease	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
Puryvate	Sigma Aldrich
Roti-PVDF Blotting Membran	ROTH
SDS	AppliChem
Serva Blue	Serva-Electrophoresis
Taurine	Sigma Aldrich
TEMED	AppliChem
Thiourea	AppliChem
Tricine	Sigma Aldrich
Triton-X	AppliChem
Tween-20	Sigma Aldrich
Urea	Sigma Aldrich

2.1.4. Antikörper

Tab.2.4. Liste der verwendeten primären Antikörpern

Name	Hersteller	Verdünnung	Erzeugt in
α -Aktinin (sarkomerisch)	Sigma Aldrich	1:5000	Maus
AMPK α (phospho Thr172)	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
AMPK α	Abcam	1:2000	Kaninchen
LC3B	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
p44/42 MAPK (Erk1/2) (phospho T202/Y204)	Cell Signalling	1:5000	Kaninchen
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
PKC α (phosphoT497)	Abcam	1:10 000	Kaninchen
PKC α (Y124)	Abcam	1:10 000	Kaninchen
PSMA2 (D3A4)	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
SQSTM1/p62	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
STAT3 (phospho Y705)	Cell Signalling	1:5000	Kaninchen
STAT3	Cell Signalling	1:1000	Maus
Troponin I (phospho S23/24)	Cell Signalling	1:5000	Kaninchen
Troponin I	Cell Signalling	1:2000	Kaninchen
PEVK total	Eurogentec	1:50 000	Kaninchen
Phospho-N2B-(us) S4010	Eurogentec	1:2000	Kaninchen
Phospho-N2B-(us) S4099	Eurogentec	1:2000	Kaninchen
Phospho-PEVK S11878	Eurogentec	1:1000	Kaninchen
Phospho-PEVK S12022	Eurogentec	1:2000	Kaninchen

Tab.2.5. Liste der verwendeten sekundären Antikörpern

Name	Hersteller	Verdünnung	Erzeugt in
Anti-Kaninchen	Cell Signalling	1:5000	Ziege
Anti-Maus	Cell Signalling	1:5000	Pferd

Primäre und sekundäre Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen gesamtes Titin und phosphospezifische Antikörper wurden in den Kaninchen erzeugt. Diese wurden mit Peptiden immunisiert, die folgenden Sequenzen enthalten haben: phospho: -Ser 4010 (VRIIEEGKpSLRFPC), -Ser4099 (QANLFpSEWLRNID) in der N2-B(us) Region und phospho: -Ser11878 (CEVVLKpSVLRKR), -Ser12022 (KLRPGpSGGEKP) in der PEVK-Region und volle Sequenz der PEVK-Region des humanen Titins.

Die Nomenklatur von den Peptiden bezieht sich auf die Sequenz des humanen, kardialen Titins (UniProtKB: Q8WZ42). Alle Antikörper wurden bei Eurogentech in Belgium erzeugt und affinitätschromatographisch gereinigt. Die primären Antikörper wurden 1:1000-1:2000 in 2% BSA in 1xTBST verdünnt und über die Nacht bei 4°C inkubiert.

Sekundäre Antikörper wurden 1:5000 in 2 % BSA in 1xTBST verdünnt und 2 Stunden lang im Raumtemperatur inkubiert.

2.1.5. Kits

Tab.2.6. Liste der verwendeten Kits

Name	Hersteller
Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-GO!	Affymetrix eBioscience
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Proteasome-Glo™ 3-Substrate System	Promega
RNAeasy® Fibrous Tissue Minikit	QIAGEN
Quantitect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN
Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR	Thermo Scientific

2.1.6. qPCR Primers

Tab.2.7. Liste der verwendeten qPCR Primers

Oligo-Name	Hersteller	Sequenz (5'-3')
FM1_Col1a1	Sigma Aldrich	CGTATCACCAAACCTCAGAAG Forward Mouse Col1a1
RM1_Col1a1	Sigma Aldrich	GAAGCAAAGTTTCCTCCAAG Reverse Mouse Col1a1
FM1_1Col3a1	Sigma Aldrich	ACTCAAGAGTGGAGAATACTG Forward Mouse Col3a1
RM1_1Col3a1	Sigma Aldrich	AACATGTTTCTTCTCTGCAC Reverse Mouse Col3a1
FM1_IL6	Sigma Aldrich	AAGAAATGATGGATGCTACC Forward Mouse IL6
RM1_IL6	Sigma Aldrich	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG Reverse Mouse IL6
FM1_Lox11	Sigma Aldrich	CAAGTACATTGTTCTGGAGTC Forward Mouse 1 Lox11
RM1_Lox11	Sigma Aldrich	CTTTTCAAGGAGAGACAAGG Reverse Mouse 1 Lox11
FM1_Lox12	Sigma Aldrich	AGACTGCAAATTCAACACAG Forward Mouse 1 Lox2
RM1_Lox12	Sigma Aldrich	CATTTCTCTCTGTTAGCACC Reverse Mouse 1 Lox12
FM1_NUDC	Sigma Aldrich	AGAACTCCAAGCTATCAGAC Forward Mouse NUDC
RM1_NUDC	Sigma Aldrich	CTTCAGGATTTCTGTTTCTTC Reverse Mouse NUDC

2.1.7. Zellkulturmedien

Tab.2.8. Liste der verwendeten Zellkulturmedien

Name	Weitere Zusätze	Konzentration
Hank's 199 Medium	FBS superior	10%
	Penicilin/Streptomycin	1 %
	Creatin	5 mM
	Carnitin	2 mM
	Taurin	5 mM
	HEPES	10 mM
	Blebbistatin	12,5 nM
DMEM		

Die Zellkulturmedien wurden steril filtriert.

Blebbistatin wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

2.2.Methoden

2.2.1. Tierversuche

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzausschuss der zuständigen Behörde (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) durchgeführt, der die experimentellen Protokolle überprüft und genehmigt hat (Az.84-02.04.2013.A122; Az.84-02.04.2017.A145).

Verwendete Tiere

In den Versuchen wurden 12 bis 14-wöchige männliche db/+ und db/db Mäuse mit genetischem Hintergrund von C57BLKS/J (n=mindestens 6 Tiere pro Versuchsgruppe) verwendet. Die db/db Mäuse gehören zu den gut charakterisierten und häufig verwendeten Tiermodellen für Typ-2-Diabetes. Durch eine Punktmutation wird bei diesen Tieren die Bildung des Rezeptors für das Sättigungshormon Leptin gestört. Dies führt zur Hyperphagie, Übergewicht (im Alter von 4 Wochen), Hyperinsulinämie (im Alter von 2 Wochen) und Insulinresistenz. Ungefähr 4 bis 8 Wochen nach der Geburt entwickeln db/db Mäuse zusätzlich eine Hyperglykämie und somit ähnelt ihre Stoffwechsellage der Situation bei diabetischen Patienten (Übersicht in Chatzigeorgiou et al., 2009). Um sicherzustellen, dass die verwendeten db/db Mäuse, die für Typ-2-Diabetes typischen Störungen des Metabolismus aufwiesen, wurden die Tiere vor der Herzentnahme gewogen und die Glukosekonzentration wurde anschließend mit Hilfe des Bayer Contour-Blutzuckermessgerätes gemessen. Nur übergewichtige, über 35 g schwere db/db Mäuse, bei denen die Glukosekonzentration über 300 mg/dl (durchschnittlicher Vergleichswert der db/+ Tiere: 150 mg/dl) betrug, wurden in den weiteren Versuchen verwendet.

Trotz einer Vielzahl der Tiermodelle für Typ-2-Diabetes, existiert bislang kein Tiermodell, das den klinischen Phänotyp humaner Patienten mit Typ-2-Diabetes vollständig widerspiegelt. Die Tiermodelle für Typ-2-Diabetes gelten trotz gewisser Einschränkungen als sehr nützliches Hilfsmittel zur Untersuchung der Pathophysiologie dieser Erkrankung. In humanen Herzen von Patienten mit Typ-2-Diabetes ist die passive Titin-abhängige Myozytensteifigkeit signifikant höher als in Patienten ohne Diabetes Erkrankung (Hopf et al., 2018). Ursächlich hierfür ist ein veränderter Phosphorylierungsstatus von Titin, der in ganz ähnlicher Form auch bei den db/db Mäusen beobachtet wird. Auf Grund dessen sowie der beobachteten Diabetes-ähnlichen Veränderungen des Gewichts und der Glukosekonzentration bei den db/db

Tieren, wird in der vorliegenden Arbeit trotz der bekannten Einschränkungen oft von „diabetischen“ Mäusen gesprochen.

Bei allen Tieren wurde eine *closed chest* LAD Ligation (*left anterior descending artery* - der absteigende Ast der linken Koronararterie) oder eine Sham Ischämie 60 Minuten lang durchgeführt. Nach der Ischämie wurde das Herz in der Regel 24 Stunden reperfundiert. Für die Analyse der langfristigen Folgen der Ischämie wurden zusätzlich C57BL/6 Wildtyp Mäuse (n=6) verwendet. Bei dieser Gruppe wurde die Reperfusion 3 Wochen lang durchgeführt (Abb.2.1.)

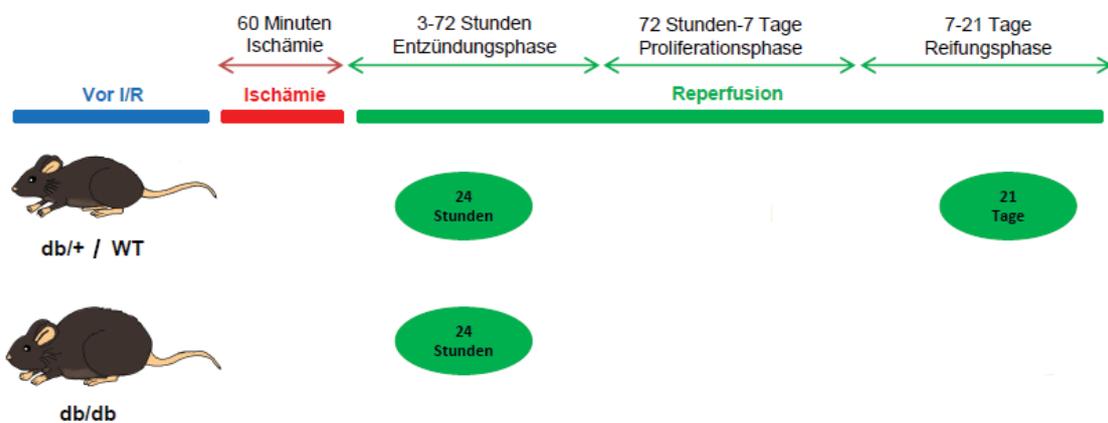


Abb.2.1. Schematische Darstellung der in Versuchen verwendeten Mausmodelle. db/+, bzw. WT und db/db Mäuse wurden einer *closed-chest* Ischämie/simulierten 'Sham' Ischämie und 24 stündigen- oder 3-wöchigen Reperfusion unterzogen.

Induktion eines Myokardinfarktes

Zuerst wurden die Mäuse einer vor-Operation (vor-OP) unterzogen, während der Ligaturhilfen angebracht worden sind.¹ Die Tiere wurden mit 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Zur zusätzlichen Analgesie wurde den Tieren 30 Minuten vor Operationsbeginn Buprenorphin (0,05 mg/kg) subkutan (s.c.) verabreicht. Nach der Prüfung der eingetretenen Narkose wurden die Mäuse mittels einer 20G Venenverweilkanüle intubiert und über einen Respirator für Kleintiere mit Sauerstoff angereicherter Raumluft (O₂ 40%), sowie 2-3% Vol.Isofluran mit der Frequenz von 150 Atemzügen/Minute und Tidalvolumen von 250 ml beatmet. Während des gesamten Eingriffs wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert, um die

¹ Die Vor-Operationen der db/+ und WT Mäuse wurden durch Dominik Semmler oder Prof. Joachim Schmitt durchgeführt. Die Vor-Operationen der db/db Mäuse wurden durch Dominik Semmler durchgeführt.

Körpertemperatur konstant zu halten. Der Thorax wurde mit Hilfe von einer Mikroschere zwischen der 3. und 4. Rippe geöffnet und das Perikard wurde anschließend entfernt. Die Retraktoren wurden benutzt, um den Brustkorb offen zu halten. Darauffolgend wurde die LAD lokalisiert, ein 7-0 Prolene Faden unter der Arterie durchgezogen und beide Enden des Fadens wurden durch einen Okkluder eingefädelt. Die Enden des Fadens wurden ca. je 15 cm lange gelassen, aus dem Thorax geführt und bis zum zweiten Eingriff in einer subkutanen Tasche am Brustkorb gelagert. Der Thorax, die Muskelschichten sowie die Haut wurden mit sterilem Nahtmaterial der Stärke 5/0 verschlossen. Nach der Extubation der Mäuse wurden diese bis zum vollständigen Erwachen auf einer Wärmeplatte gelagert und perioperativ mit Buprenorphin (0,1 mg/kg, s.c.) analgesiert. Die Applikation von Buprenorphin wurde in dieser Dosierung bis einschließlich zum 3. postoperativen Tag im Abstand von 6-8 h fortgeführt.

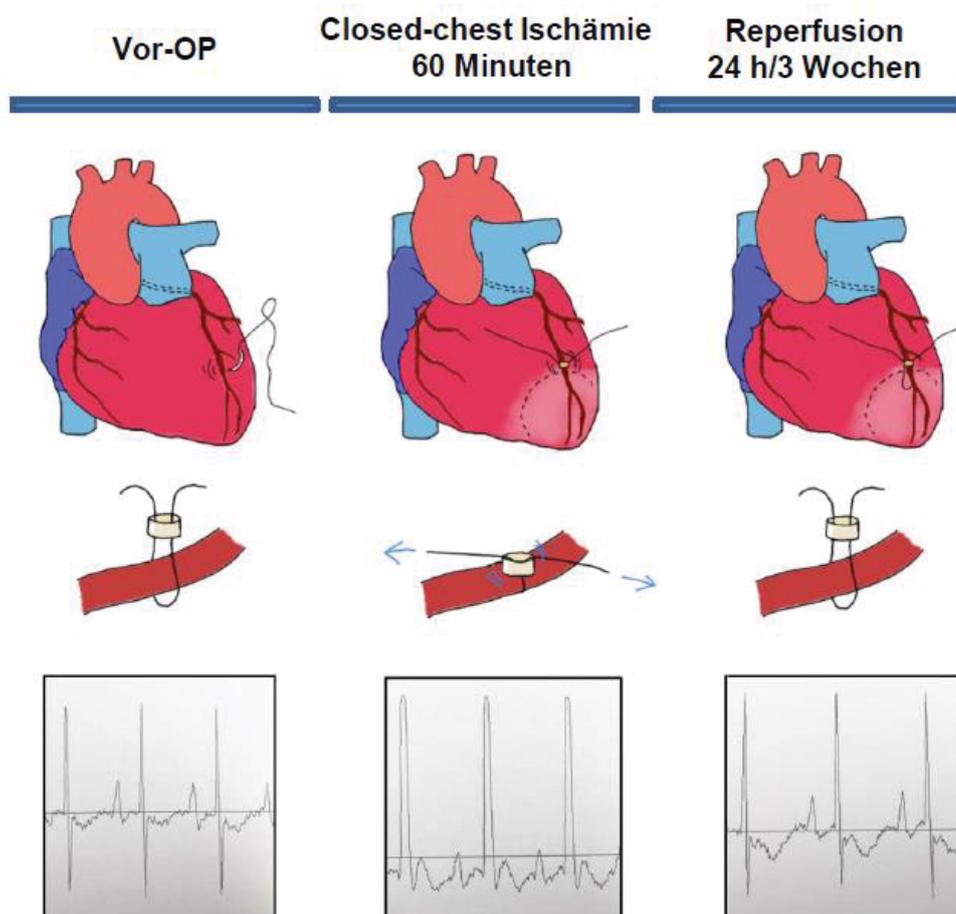


Abb.2.2. Ablauf einer closed-chest Ischämie/Reperfusion. Die Mäuse wurden einer vor-OP unterzogen, während der Ligaturhilfen angebracht worden sind. 3 Tage später wurde eine closed-chest Ischämie bzw. simulierte 'Sham' Ischämie durchgeführt. Während der Ischämie konnte eine ST-Hebung im EKG beobachtet werden. Nach dem Ablauf der 60 Minuten wurden die Fäden abgeschnitten und eine Reperusionsphase wurde im EKG protokolliert.

3 Tage nach der vor-Operation erfolgte eine Ischämie oder Sham-Ischämie (Abb.2.2.).² Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit 2% Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) an die Maus angeschlossen und eine Baseline Marke in der Software gesetzt. Die Fäden in der Haut wurden vorsichtig entfernt und an zwei Magnethaltern befestigt. Danach wurden die Fäden soweit gezogen, dass man im EKG eine ST-Hebung als Zeichen einer erfolgreichen Ischämie beobachten konnte. Während der simulierten 'Sham' OP wurde keine ST-Hebung beobachtet, da die Fäden nicht gezogen werden. Die Ischämie wurde 60 Minuten aufrechterhalten und die Temperatur der Maus wurde währenddessen kontrolliert auf 37-37,5 °C gehalten. Nach dem Ablauf der 60 Minuten wurden die Fäden vorsichtig abgeschnitten und eine Reperfusionphase wurde im EKG protokolliert. Anschließend wurde die Haut mit sterilem Nahtmaterial der Stärke 5/0 verschlossen und das Tier wurde auf einer Wärmeplatte platziert bis es sich von der Narkose erholt hatte. Zur postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin (0,1 mg/kg, s.c.) im Abstand von 6-8 h appliziert.

24 Stunden bzw. 3 Wochen nach Beginn der Reperfusion erfolgte die Tötung der Tiere zur Organ- und Blutentnahme durch den Überschuss von Isofluran und Durchtrennung des Zwerchfells. Das Blut wurde final mit einer heparinisierten Flügelkanüle vom rechten Ventrikel entnommen. Anschließend wurde das Blut 10 Minuten lang mit 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Nach der Herzentnahme wurde das Herz in Stücke geteilt und zwar in Septum, ischämischen Bereich vom linken Ventrikel (unterhalb der Ligationsstelle) und *remote* Bereich vom linken Ventrikel (oberhalb der Ligationsstelle) (Abb.2.3.). Für die Analyse der mRNA Expression von IL-6 in Skelettmuskeln wurde auch *Musculus quadriceps* isoliert. Die Proben wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

² Ischämie bzw. Sham-Ischämie wurde durch Dominik Semmler, Dr. Annette Kronenbitter oder Promovendin ausgelöst.

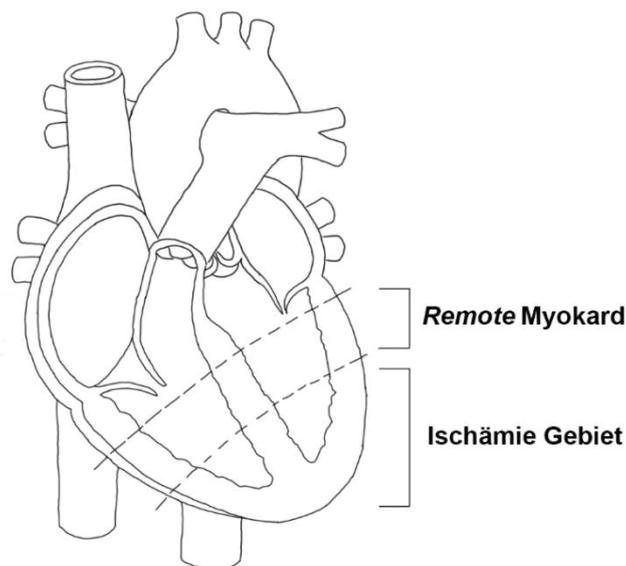


Abb.2.3. Isolierte Bereiche des Herzens. Oberhalb der Ligationstelle befindet sich der *remote* Bereich des linken Ventrikels und des Septums. Unterhalb dieser Stelle ist das ischämische Gebiet des linken Ventrikels zu finden.

2.2.2. Isolation der adulten Ratten- und Mauskardiomyozyten

Isolation und Stimulation der adulten Rattenkardiomyozyten

Die Tötung der Ratten erfolgte gemäß dem Tierschutzgesetz und Vorgaben der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Projektnummer O29/11). 8 bis 12 Wochen alte männliche Wistar Ratten wurden mit 2% Isofluran anästhetisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Nach der Thoraxöffnung wurde das Herz mit Heparin gespritzt und entnommen. Die Aorta des Herzens wurde an der Kanüle aufgehängt und mit Langendorfanlage verbunden. Das Herz wurde anschließend mit Perfusionspuffer mit Heparin gewaschen, um die Blutreste zu entfernen. Anschließend wurde das Herz mit Kollagenase Typ II (200 U/ml), Trypsin (6 U/ml) und CaCl_2 (50 μM) enthaltendem Perfusionspuffer perfundiert. Die Dauer der Perfusion wurde an das Gewicht des jeweiligen Herzens angepasst. Zusätzlich wurde der Perfusionspuffer mit Sauerstoff begast. Nach der etwa 30-minütigen Perfusion wurde das Herz in die Schneidelösung (CUT) Puffer (Kollagenase Typ II, 200 U/ml; Protease, 6 U/ml; CaCl_2 , 100 μM ; BSA, 1%) überführt, zerkleinert und anschließend 15 Min lang im 37°C im Wasserbad inkubiert.

Danach wurde die Lösung durch einen Zellsieb mit Porengröße von 200µm filtriert und 2 Minuten bei 500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde darauffolgend in eine Lösung mit niedrigerer Calcium Konzentration (200 µM) überführt und 1 Minute lang bei 500 rpm zentrifugiert. Das gleiche Vorgehen wurde im Anschluß mit einem Puffer, der eine höhere Calciumkonzentration (400 µM) enthalten hat wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 199 Medium mit 1% FBS und Blebbistatin (12,5 nM) gelöst und die Zellen wurden für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Kardiomyozyten erneut 1 Minute lang bei 500 rpm zentrifugiert und 2 Mal mit reinem, serumfreiem DMEM Medium gewaschen. Pro Herz konnten etwa 3 bis 4 Millionen Zellen isoliert werden und das Verhältnis zwischen den lebenden, stabförmigen und toten, runden Kardiomyozyten betrug etwa 70:30. Die Zellen wurden entweder mit Interleukin-6 (0,4 nM) 15 Minuten lang oder Neuregulin (100 µM), Metformin (20 mM) oder Neuregulin und Metformin gleichzeitig eine Stunde lang bei 37°C stimuliert (Abb.2.4.). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 80-120 µl modifiziertem Laemmli-Puffer (Titinprobenpuffer) resuspendiert.

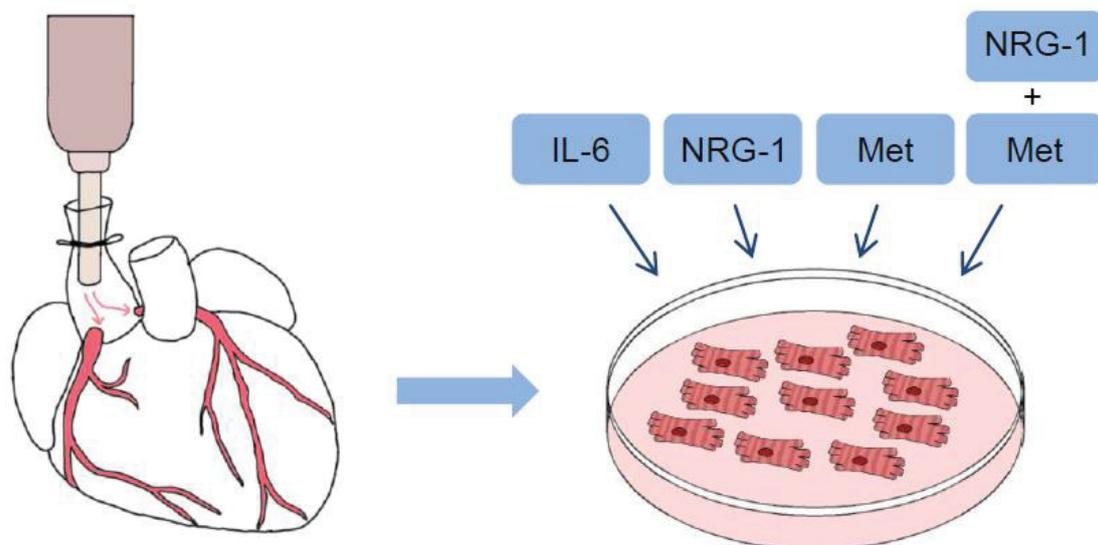


Abb.2.4. Isolation und Stimulierung der adulten Rattenkardiomyozyten. Die Zellen wurden mit Hilfe einer retrograden Perfusion isoliert. Anschließend wurden sie mit verschiedenen Substanzen stimuliert. IL-6 – Interleukin-6; NRG-1 – Neuregulin-1; Met-Metformin.

Isolation der adulten Mauskardiomyozyten für die Kraftmessung³

12 bis 14-wöchige db/+ und db/db Mäuse wurden mit 100 µl Heparin gespritzt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend wurden sie mit Hilfe von zervikaler Dislokation getötet. Das Herz wurde entnommen, mit PBS ausgespült und die Aorta

³ Die adulten Mauskardiomyozyten für die Kraftmessung wurden durch Dr. Annette Kronenbitter isoliert.

des Herzens wurde an der Kanüle aufgehängt. Nach der Verbindung mit der Perfusionsanlage wurde das Herz für ein paar Sekunden mit Perfusionspuffer ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Enzymlösung für etwa 6 Minuten. Nach diesem Schritt wurde das Herz im Waschpuffer I gelegt, der *remote* Bereich vom linken Ventrikel getrennt und weitere 10 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Herzstück mit einer feinen Schere zerkleinert und mit Pasteur-Pipette mehrmals aufgezogen und vorsichtig ausgeblasen. Die Gewebelösung wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 150 µm filtriert. Nach der 5-minütigen Sedimentation der Kardiomyozyten wurde der Überstand verworfen und Waschpuffer II auf das Zellpellet gegeben. Der Waschschrift wurde anschließend mit Waschpuffer III wiederholt. Nach der Sedimentation der Kardiomyozyten wurde der Überstand entnommen und Relaxationslösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde eine Permeabilisierung der Kardiomyozyten mit Hilfe von 2% Triton-X 3 Minuten lang durchgeführt. Die Zellen wurden 3 Mal mit Relaxationslösung gewaschen und bei den weiteren Kraftmessungsversuchen verwendet.

2.2.3. Biochemische Methoden

Herstellung der Proteinlysate

Eingefrorene Gewebestücke wurden auf Trockeneis gekühlt mit Hilfe von Skalpell mechanisch zerkleinert und in 80-150 µl Titinprobenpuffer aufgenommen. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte photometrisch mit Hilfe der Bradford-Methode. Zu diesem Zweck wurden 2 µl des 1:10 verdünnten Proteinlysats mit 800 µl Wasser und 200 µl Bradfordreagent gemischt und anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Nach der Konzentrationbestimmung wurden etwa 30 µg der Proteinmischung auf die Polyakrylamidgele aufgetragen.

Gelelektrophorese

Die Autrennung der Proteine aus einem Zell- oder Gewebelysat erfolgte nach Molekülmasse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Für die Separation der Proteine im Größenbereich von 10 kDA bis 260 kDA wurden Gele mit folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Tab.2.9. Zusammensetzung des SDS Geles

Lösung	Trenngel 15%	Sammelgel 4%
Acrylamid/Bis	7,5 ml	0,667 ml
H ₂ O	3,75 ml	3,025 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
TEMED	7,5 µl	15 µl
APS	75 µl	50 µl

Aufgrund der außerordentlichen Größe des Titinmoleküls (3-4 MDa) wurde dieses Protein mit Hilfe von agaroseverstärkten 2,1% Polyakrylamidgelen isoliert. Für die Herstellung dieser Gele wurde die folgende Lösung auf 40°C im Wasserbad aufgewärmt und nach Erreichen der Temperatur mit frischem Ammoniumperoxodisulfat (APS) und aufgekochter Agarose komplettiert.

Tab.2.10. Zusammensetzung des Titin-Geles

Lösung	Trenngel 2,1%
Acrylamid/Bis	1,4 ml
H ₂ O	6,67 ml
Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 µl
TEMED	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5 %	6,67 ml

Bei dem Einlaufen von den Proben in das Sammelgel wurde die Stromstärke von 20 mA eingestellt, für die Titingele waren es 2,5 mA pro Gel. Anschließend wurde die Stromstärke bis entsprechend 30 mA und 3,5 mA pro ein Gel erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde im Falle der SDS Gele nach etwa 40 Minuten und im Falle der Titingele nach etwa 5 Stunden im Fall der Titingele beendet.

Die Gele wurden entweder über 1 Stunde mit Imperial Färbelösung gefärbt und anschließend mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) entfärbt oder für weitere biochemische Analyse in Semi-Dry Verfahren geblottet.

Western Blot Analysen

Die mittels SDS PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von Semi-Dry Western Blotting für die weitere Analyse auf eine PVDF Membrane übertragen. Zu diesem

Zweck wurden in Anodenpuffer getränkte Whatmann Papiere auf die Anodenplatte des Turbo Transfer Blottingsystems platziert. Anschließend wurde die PVDF Membran durch das Schwenken in Methanol aktiviert und auf die vorhandenen Whatmannpapiere gelegt. Auf der PVDF Membran wurde dann ein Polyakrylamidgel platziert und mit Kathodenpuffer getränkten Whatmann Papieren abgedeckt. Pro cm² des Geles wurde die Stromstärke von 1,5 mA angelegt. Nach 12 Minuten (SDS-Gele) bzw. 20 Minuten (Titingele) wurde der Transfer gestoppt. Die Membran wurde 30 Sekunden lang in Serva-Blue Lösung gefärbt und anschließend in Destain-Lösung entfärbt. Anhand der Färbung konnte die Proteinbeladung der Gele überprüft werden. Anschließend wurden die Blots vollständig in 1xTBST entfärbt und über 1 Stunde mit 2% BSA in 1xTBST blockiert. Die Blots wurden über Nacht mit primären Antikörpern inkubiert, danach mindestens 3 mal 5 Minuten lang mit 1xTBST gewaschen und über 2 Stunden mit entsprechenden, Meeretich-Peroxidase- (HRP) gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Die Liste der verwendeten Antikörper ist auf der Seite 43 zu finden. Für die Visualisierung der Banden mit bestimmten Antikörpern wurde eine 1:1 verstärkte Chemolumineszenz (ECL)-Reagenzien Lösung angesetzt und mit den Blots inkubiert. Die daraus resultierenden Chemolumineszenz-Signale wurden mit Hilfe des Fusion FX7 Chemolumineszenz-Imagers dokumentiert.

2.2.4. Biophysikalische Methoden

Kraftmessung von einzelnen Kardiomyozyten

Einzelne Kardiomyozyten wurden aus eingefrorenem Gewebe isoliert. Hierzu wurde ein kleines Gewebestück gekühlt auf dem Trockeneis abgeschnitten und mit Hilfe eines Ultrathurrax mit 750 rpm in 100 µl Relaxationslösung homogenisiert. Zur Permeabilisierung wurden die gewonnenen Zellen mit 2% Triton Lösung für 3 Minuten lang inkubiert. Nach dem Häuten der Kardiomyozyten wurde die Zellsuspension 3 Mal bei 1000 rpm abzentrifugiert und bei jedem Schritt wurde das Pellet mit Relaxationslösung (RS) gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf Eis bis zur weiteren Verwendung maximal 10 Stunden gelagert. Einzelne Kardiomyozyten aus den db/db Herzen konnten nur mit Hilfe einer Perfusion isoliert werden. Diese wurde durch Dr. Annette Kronenbitter isoliert. Die Messung der passiven Kräfte erfolgte mit Hilfe eines Messaufbaus der Firma Aurora Scientific Instruments. Hierzu wurden die Zellen in RS-Lösung auf einem Deckgläschen unter einem Nikon Eclipse Ti Mikroskop platziert. Anschließend wurde eine einzelne Zelle an Force Transducer und Längengeber geklebt (Abb.2.5.) Nach dem Aushärten des Silikon-Klebstoffes (eine 2:1 Mischung aus

Dow Corning 3145 und 3140) wurde die Zellgröße bestimmt. Jede Zelle wurde auf eine Ruhesarkomerlänge der Sarkomere von 1,9 μm eingestellt und im Anschluss in 5 Stufen auf etwa 2,4 μm gedehnt. Für jede Stufe wurden die jeweiligen passiven Kräfte gemessen und anschließend auf Querschnittsfläche umgerechnet (Abb.2.6).

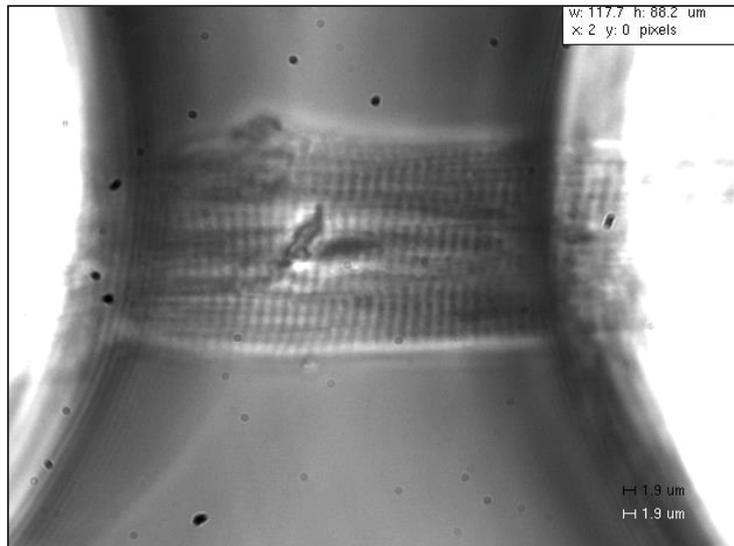


Abb.2.5. Mikroskopbild eines einzelnen Kardiomyozytes. Permeabilisiertes Kardiomyozyt wurde an Force Transducer (links) und Längengeber (rechts) angeklebt. Die Sarkomerlänge und Zellgröße Parameter können mit Hilfe vom Aurora Scientific Instruments Software bestimmt werden.

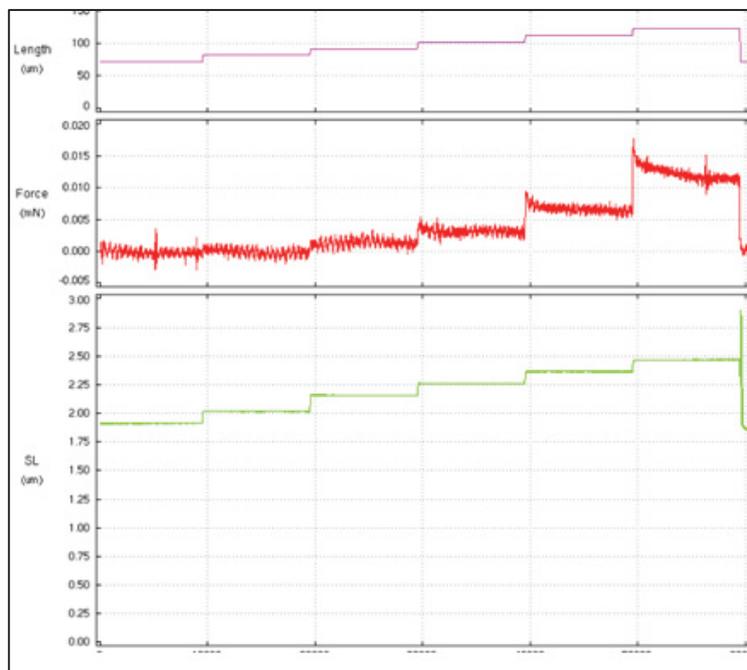


Abb. 2.6. Exemplarische Kraftmessung eines einzelnen Kardiomyozytes. Die Länge der Kardiomyozyten wurde mit Hilfe der mitgelieferten Aurora Software bestimmt und anschließend wurde die Messung so programmiert, dass die Kardiomyozyten stufenweise auf eine maximale Sarkomerlänge von 2,4 bis 2,5 μm gedehnt wurden. Während der einzelnen Dehnungsschritte wurde die passive Kraft aufgenommen.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

RNA Isolation und qPCR

RNA wurde vom Remote Bereich des linken Ventrikels und vom *M. Quadriceps* isoliert. Zu diesem Zweck wurde RNeasy® Fibrous Tissue Kit verwendet. Für die RNA Aufreinigung wurde etwa 10 mg Gewebe benutzt. Anschließend wurde die RNA Menge spektrophotometrisch (NanoDrop) quantifiziert und 450 ng RNA wurden mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit in cDNA transkribiert. Es wurden 10 ng der jeweiligen cDNA in einer qPCR Reaktion eingesetzt und in einem StepOne Real-Time PCR System amplifiziert. Die Auswertung erfolgte mittels einer $\Delta\Delta C_t$ Methode. *Nuclear migration protein nudC* (NUDC) wurde als Referenzgen verwendet.

2.2.6. Assays

Interleukin-6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Es wurden jeweils 100 μ l des isolierten Blutplasmas für das Maus-IL-6 ELISA Kit verwendet. Die Vorgehensweise zur Bestimmung der IL-6 Konzentration erfolgte gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls.

Proteasom Assay

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden Gewebeproben aus dem *remote* Bereich des linken Ventrikels verwendet. Etwa 3 mg Gewebe wurde auf dem Trockeneis gekühlt mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und in einer PBS Lösung mit 100 mM EDTA im UltraThurrax homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 Sekunden lang im Ultraschallbad beschallt und 15 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch mit Hilfe eines BCA Assays gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls bestimmt. Jeweils 10 μ g Protein der einzelnen Proben wurden für das Proteasom-Glo Assay eingesetzt und die Trypsin-like, Chymotrypsin-like und Caspase-like Aktivitäten des Proteasoms wurden lumineszent gemäß Herstellerprotokoll gemessen.

2.3. Analyse der Daten

Für die statistische Auswertung wurden die Imperial gefärbten Proteinbanden und Western Blots densitometrisch mit Hilfe der ImageJ (National Institutes of Health) Software analysiert. Die Diagrammbalken präsentieren die Mittelwerte und die

jeweiligen Standardfehler (SEM). Jeder Versuch wurde für die statistische Relevanz mindestens drei Mal wiederholt. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines Student T-Tests bzw. eines *one-way* oder *two-way* ANOVA und Bonferroni Tests. Alle resultierenden p-Werte, welche kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant bewertet.

2.4. Software

Bei der Erstellung dieser Doktorarbeit wurden die folgenden Programme verwendet: Adobe Photoshop CS6, Aurora Scientific Instruments Software, GraphPad Prism 6, LabChart, ImageJ, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und SigmaPlot 10, StepOne™ Software v2.3.

3. Ergebnisse

3.1. Verwendete Tiermodelle

Bei den Versuchen wurden 3 Tiermodelle untersucht: **(1)** heterozygote db/+ Mäuse nach 60 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion; **(2)** ein Modell für Typ-2-Diabetes: db/db Mäuse nach 60 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion; **(3)** Wildtyp (WT) Mäuse nach 60 Minuten Ischämie und 3 Wochen Reperfusion. Die Ischämie wurde mit Hilfe der LAD (*left anterior descending artery*) Ligatur beim geschlossenen Thorax ausgelöst. Zuerst wurde die ischämische Region des Myokards bei den Gruppen **(1)** und **(2)** analysiert. Anschließend erfolgte Analyse des *remote* Myokards dieser Tiermodelle. Zuletzt wurde bei der Gruppe **(3)** nur das *remote* Gebiet des Herzens untersucht.

3.2. Ischämische Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion

3.2.1. Titin-abhängige passive Steifigkeit im ischämischen Bereich des Herzens 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt

Um herauszufinden, ob I/R akute Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit in der ischämischen Region des Herzens induziert, wurden Messungen der passiven Spannung (*passive tension*, PT) an isolierten, permeabilisierten Kardiomyozyten durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass die PT der Kardiomyozyten nach Ischämie und 24-stündiger Reperfusion im infarzierten Myokard vergleichbar mit der PT der Sham operierten Mäusen war und somit durch einen Myokardinfarkt nicht modifiziert wurde (Abb.3.1.A). Eine Messung der PT diabetischer Kardiomyozyten aus dem ischämischen Gebiet des Herzens konnte auf Grund der starken Zellschädigungen nicht durchgeführt werden.

3.2.2. Titinisoformenverhältnis im ischämischen Gebiet der db/+ und db/db Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt

Die Veränderung des Titinisoformenverhältnisses ist einer der Mechanismen, die zur Modulation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit führen können. Mit Hilfe von Imperial-gefärbten 2,1% SDS-PAGE Gelen wurde die Isoformenzusammensetzung bestimmt. Das Verhältnis der Titinisoformen im Infarktgebiet ($70,65 \pm 1,6\%$ N2B) der

db/+ Herzen war 24 Stunden nach einer Ischämie mit der Isoformenzusammensetzung im linken Ventrikel der gesunden Tiere ($74,5 \pm 0,87\%$ N2B) vergleichbar. Es wurde anschließend analysiert, ob die diabetische Stoffwechsellage bei den db/db Mäusen basale Veränderungen des Titinisoformen-Verhältnisses verursacht. Die Expression der N2B-Isoform betrug im linken Ventrikel der diabetischen Mäuse $74 \pm 0,81\%$ und war somit im Vergleich mit db/+ Tieren ($74,5 \pm 0,87\%$) nicht signifikant verändert. Ähnlich wie bei den db/+ Mäusen wurde das Titinisoformenverhältnis im ischämischen Gebiet der db/db Herzen ($75,83 \pm 2,44\%$) in Folge einer I/R nicht modifiziert (Abb.3.1.B).

3.2.3. Akute Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen im ischämischen Myokard in Folge eines Herzinfarktes

Mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper wurde anschließend die Phosphorylierung der elastischen Domänen in der I-Banden-Region von Titin analysiert. Die Phosphorylierung der PEVK-Region, sowohl an der Phosphorylierungsstelle S11878 (Abb.3.1.C) als auch S12022 (Abb.3.1.D) wurde nach 60-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion in dem ischämischen Gebiet des db/+ Myokards signifikant um jeweils $83,12 \pm 21\%$ und $80,36 \pm 22,92\%$ erhöht. Die Aktivität der PKC α Kinase, die diese Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region phosphoryliert, hatte in ischämischem Myokard ebenso signifikant ($+49,67 \pm 10,59\%$) zugenommen (Abb.3.2.A).

Gleichzeitig wurde eine Tendenz zur Erhöhung der N2-B(us) Phosphorylierung an den Stellen S4010 ($p=0,089$) und S4099 ($p=0,097$) beobachtet (Abb.3.1.E, F). Troponin I Phosphorylierung, die ein Marker der PKA- und PKG-abhängigen Phosphorylierung ist, wurde in Folge eines Infarkts im ischämischen Gebiet signifikant um $52,78 \pm 12,65\%$ erhöht (Abb.3.2.B). Aktivität von ERK 1/2, die ebenso in der Lage ist, die Phosphorylierungsstelle S4010 zu phosphorylieren war signifikant um $35,53 \pm 14,54\%$ angestiegen (Abb.3.2.C).

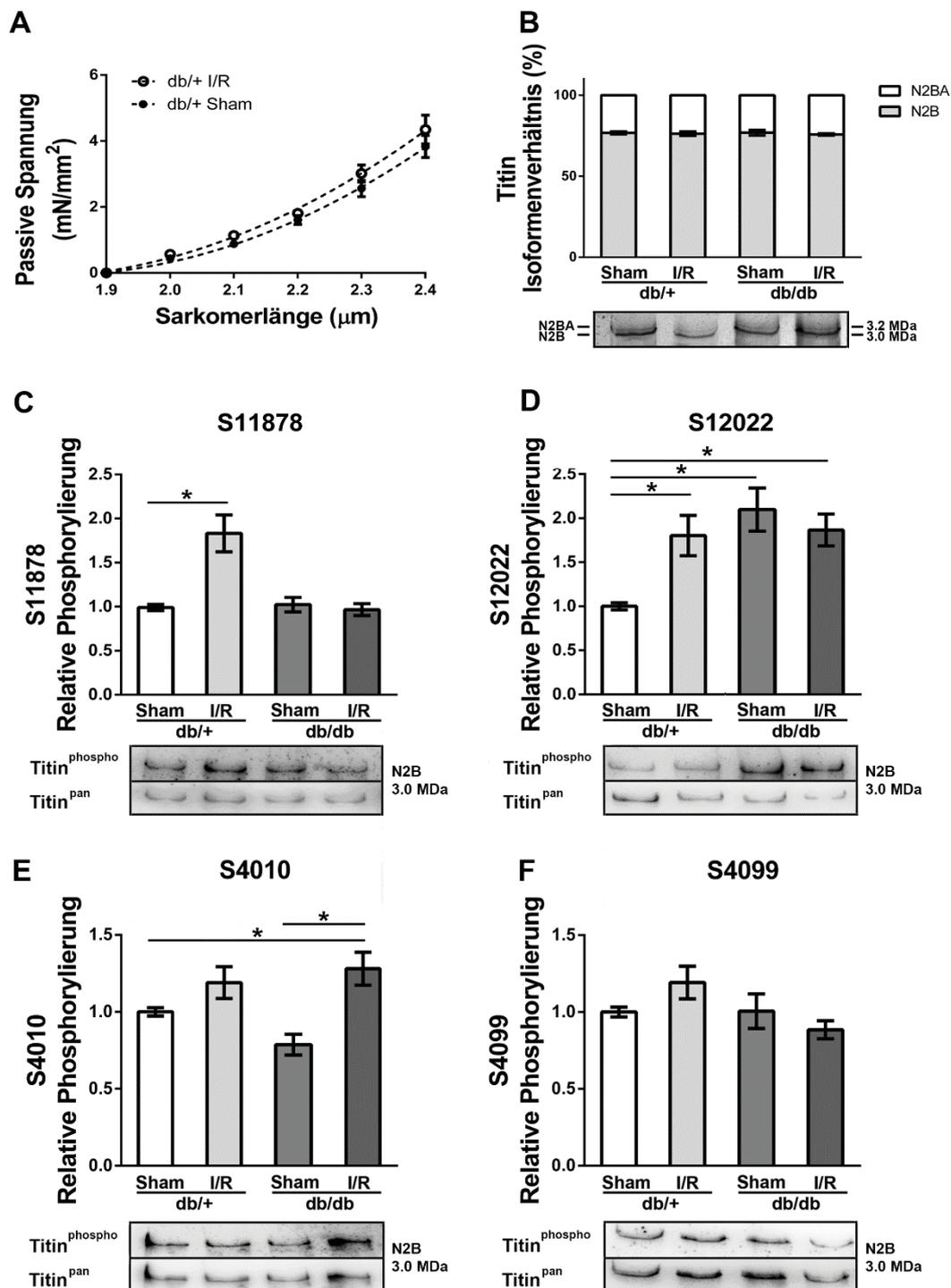


Abb.3.1. Modifikationen der Titineigenschaften im ischämischen Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Minuten/24Stunden). (A) Passive Spannung im ischämischen Gebiet der db/+ Herzen nach 24-stündiger Reperfusion. Die Linien repräsentieren die polynomische Kurvenanpassung. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe) (B) Titinisoformenverhältnis im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Mäuse vor (Sham) und 24 Stunden nach einer I/R. Das durchschnittliche Titinisoformenverhältnis wird als N2BA+N2B=100% angegeben (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative gefärbte Titingele werden unter den entsprechenden Balken angezeigt (C) Modifikationen der S11878 und (D) S12022 Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region sowie (E) S4010 und (F) S4099 in der N2-B(us) Region im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Mäuse nach 24-stündiger Reperfusion. Die Daten wurden auf

Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative Blots werden unter den entsprechenden Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA).

3.2.4. Basale Modifikationen der Titineigenschaften in db/db Herzen führen zur modifizierten Antwort auf Myokardischämie im infarzierten Myokard

Die Analysen mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper wurden ebenfalls im ischämischen Myokard der db/db Mäuse vor und nach I/R durchgeführt, um zu testen, ob Typ-2-Diabetes zur basalen Veränderungen der Titinphosphorylierung führt, die die Antwort der diabetischen Herzen auf Myokardinfarkt verändern könnten. Eine basal erhöhte Phosphorylierung von S12022 ($109,86 \pm 24,48\%$ höher im Vergleich mit db/+ Sham operierten Mäusen) wurde im linken Ventrikel der db/db Mäuse beobachtet (Abb.3.1.D). Aktivität der PKC α Kinase, die diese Stelle phosphoryliert wurde ebenso um $49,7 \pm 10,59\%$ signifikant erhöht (Abb.3.2.A).

Anders als bei den db/+ Tieren steigt bei den db/db Tieren die Phosphorylierung der PEVK-Region im ischämischen Gebiet des Herzens in Folge eines akuten Myokardinfarkts nicht weiter an (Abb.3.1.D). Ein gleiches Phänomen wurde in der Aktivität der dafür zuständigen PKC α -Aktivität beobachtet (Abb.3.2.A). Die Phosphorylierung der N2-B(us) Region an der Stelle S4010 im ischämischen Gebiet der diabetischen Herzen wurde in Folge einer I/R um $49,39 \pm 10,69\%$ signifikant erhöht. Es wurde zusätzlich eine Tendenz zur Erhöhung der Troponin I ($p=0,1$) und ERK 1/2 ($p=0,15$) Phosphorylierung in dem ischämischen Gebiet der diabetischen Herzen nach akutem Myokardinfarkt beobachtet (Abb. 3.2. B, C).

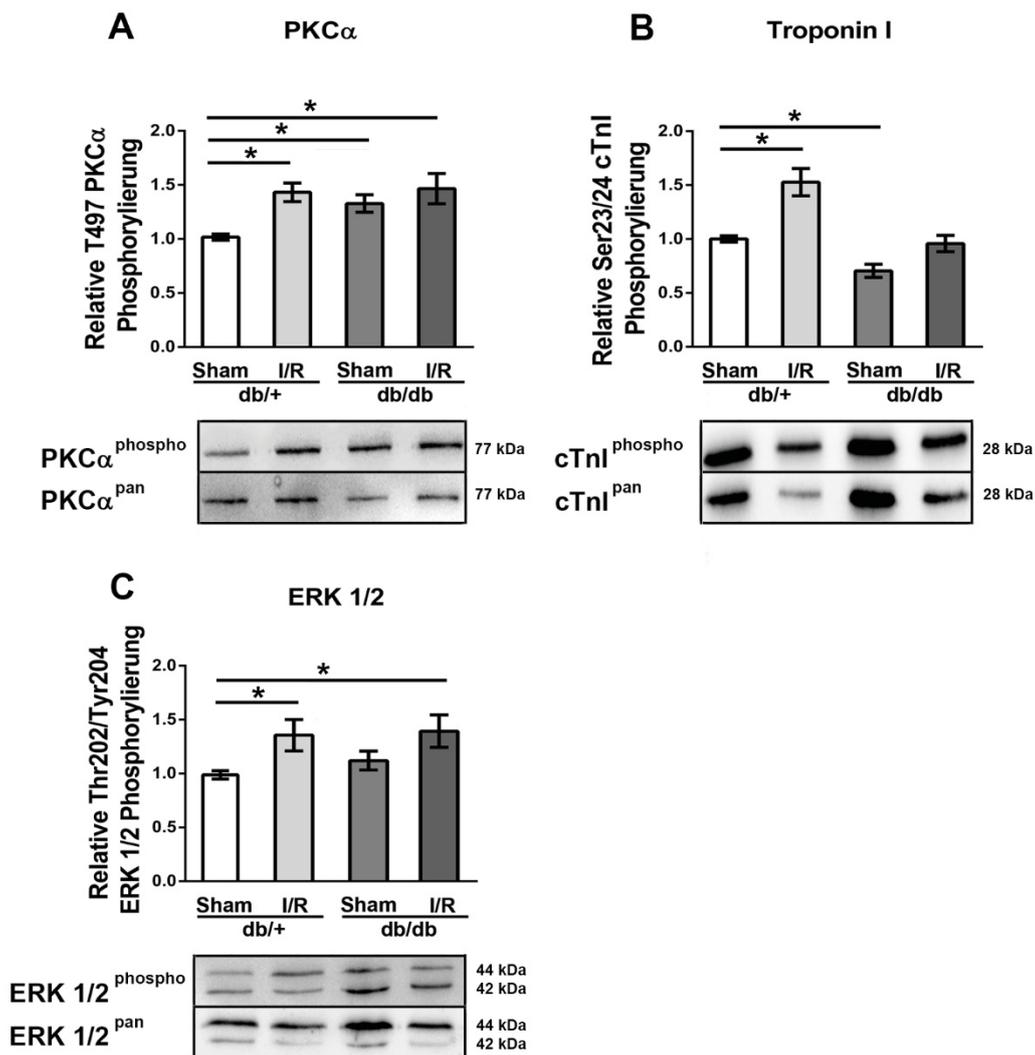


Abb.3.2. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Tiere in Folge eines akuten Myokardinfarktes. (A) Modifikationen der PKC α - (B) Troponin I- (C) und ERK 1/2 - Phosphorylierung im ischämischen Gebiet des Herzens der db/+ und db/db Tiere nach 60-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative Blots werden unter den entsprechenden Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA).

3.2.5. Modulation der mRNA Expression der ECM-Proteine im ischämischen Gebiet der db/+ und db/db Herzen akut nach I/R

Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix beteiligen sich zusammen mit Titin an der gesamten Steifigkeit des Herzens. Eine dynamische Adaption der beiden Komponenten findet unter verschiedenen patophysiologischen Bedingungen statt. Aus diesem Grund wurde die mRNA Expression von Typ-I und Typ-III Kollagen sowie

Lysyloxidasen-Homologen (Loxl1 und Loxl2), die für die Quervernetzung der Kollagenfasern verantwortlich sind, mit Hilfe der qPCR quantitativ bestimmt.

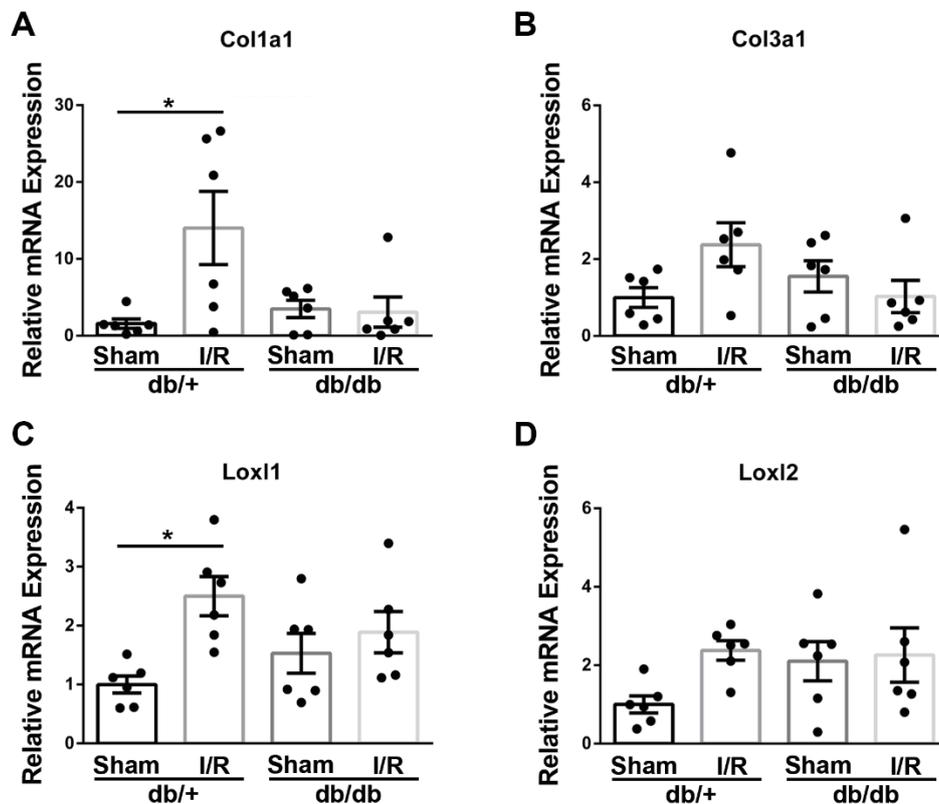


Abb.3.3. Umstrukturierung der ECM im ischämischen Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Folge eines akuten Herzinfarktes. Die mRNA Expression von (A) Typ-I-Kollagen – Col1a1; (B) Typ-III-Kollagen – Col3a1; (C) Lysyloxidase Homolog 1 – Loxl1; (D) Lysyloxidase Homolog 2 – Loxl2 im ischämischen Bereich des Herzens bei db/+ und db/db Mäusen vor und nach dem Myokardinfarkt (60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 in *one-way* ANOVA).

Es konnte beobachtet werden, dass die mRNA Expression von Typ-I-Kollagen und Loxl1 schon 24 Stunden nach dem Myokardinfarkt im ischämischen Gebiet des Herzens bei den db/+ Mäusen um jeweils $1400,02 \pm 476,99\%$ und $150,16 \pm 33,41\%$ signifikant erhöht wurde. Die mRNA Expression von Typ-III-Kollagen (p=0,087) und Loxl2 (p=0,11) wurde in diesem Bereich des Herzens ebenso tendenziell erhöht. Die basale mRNA Expression der ECM-Proteine im diabetischen Myokard ist mit der mRNA Expression im Herzen der db/+ Mäuse vergleichbar und wurde in Folge einer I/R nicht akut modifiziert (Abb.3.3).

3.3. Remote Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion

3.3.1. Titinisoformenverhältnis im *remote* Gebiet der db/+ und db/db Herzen akut nach einem Myokardinfarkt

Die neuesten Studien weisen darauf hin, dass ein akuter, permanenter Myokardinfarkt zum schnellen Anstieg der passiven Steifigkeit im *remote* Bereich des Myokards führt. Ziel dieser Studie war zu testen, ob dies auch der Fall nach I/R ist und ob die Diabetes-induzierten Veränderungen der Titineigenschaften die Anpassungsmechanismen in dem *remote* Myokard nach dem Myokardinfarkt beeinträchtigen könnten. Ähnlich wie im ischämischen Myokard war die Expression der Titinisoformen im *remote* Myokard 24 Stunden nach einem Herzinfarkt (60 Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion) unverändert (76,8±0,9% N2B bei Sham db/+ Tieren und 76,25±1,31% N2B bei db/+ I/R Mäusen). Es wurden ebenso keine Veränderungen der Titinisoformen-Expression bei db/db Mäusen beobachtet, sowohl basal, als auch im *remote* Myokard nach I/R (76,82±1,7% N2B im db/db Myokard und 75,77±0,62% N2B im nicht-ischämischen Gebiet des diabetischen Herzens) (Abb.3.4).

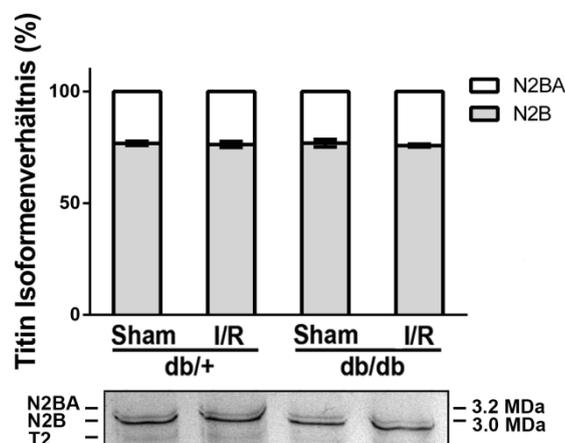


Abb.3.4. Titinisoformenverhältnis im *remote* Myokard der db/+ und db/db Mäuse nach Ischämie und Reperfusion (60 Minuten/24Stunden). Das durchschnittliche Titinisoformenverhältnis wird als N2BA+N2B=100% angegeben. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative gefärbte Titingele werden unter den entsprechenden Balken angezeigt.

3.3.2. Erhöhte Titin-abhängige passive Steifigkeit im nicht-ischämischen Bereich des Herzens nach I/R und Beeinträchtigung dieser Antwort bei db/db Mäusen

Nach 60-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion wurde eine signifikante Erhöhung der passiven Spannung im nicht-ischämischen Bereich des Myokards der db/+ Mäuse beobachtet (Abb.3.5.A). Die Messungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit der einzelnen Kardiomyozyten aus dem *remote* Gebiet der db/db Herzen haben gezeigt, dass diese schon vor I/R basal erhöht ist und nicht weiter in Folge einer I/R erhöht wird (Abb.3.5.B).

3.3.3. Akute Veränderungen der Phosphorylierung von elastischen Titindomänen im *remote* Myokard in Folge eines Herzinfarktes

Phosphorylierung der elastischen Domänen in der I-Banden Region von Titin wurde auch im *remote* Myokard analysiert. Dank Western-Blot Analysen konnte festgestellt werden, dass I/R einen akuten Anstieg der PEVK-Phosphorylierung an der S11878 ($+53,23 \pm 14,24\%$) in Kardiomyozyten des *remote* Myokards der db/+ Mäuse verursacht (Abb.3.5.C). Entsprechend wurde Aktivität der PKC α um $54,28 \pm 19,25\%$ signifikant erhöht (Abb.3.6.A). Die Phosphorylierung der N2-B(us) Region wurde in Folge einer I/R im *remote* Myokard der db/+ Mäuse nicht signifikant verändert. Man beobachtet jedoch eine Tendenz zur Reduzierung der S4010 Phosphorylierung ($p=0,65$) und ERK 1/2 Aktivität ($p=0,63$), die diese Stelle in der N2-B(us) phosphoryliert (Abb.3.5.E; Abb.3.6.C).

3.3.4. Unterschiedliche Modifikationen der Titineigenschaften im *remote* Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Antwort auf I/R

Anschließend wurde getestet, ob sich die Antwort des diabetischen *remote* Myokards der db/db und db/+ Mäuse auf I/R unterscheidet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die diabetischen Kardiomyozyten eine basal erhöhte PEVK-Phosphorylierung an den Stellen S11878 ($35,78 \pm 12,39\%$ höher als bei db/+ Sham) und S12022 ($97,08 \pm 21,74\%$ höher im Vergleich mit db/+ Sham) aufweisen (Abb.3.5.C,D). Die Aktivität der PKC α wurde im diabetischen Myokard ebenso signifikant um $49,51 \pm 16,11\%$ erhöht (Abb.3.6.A).

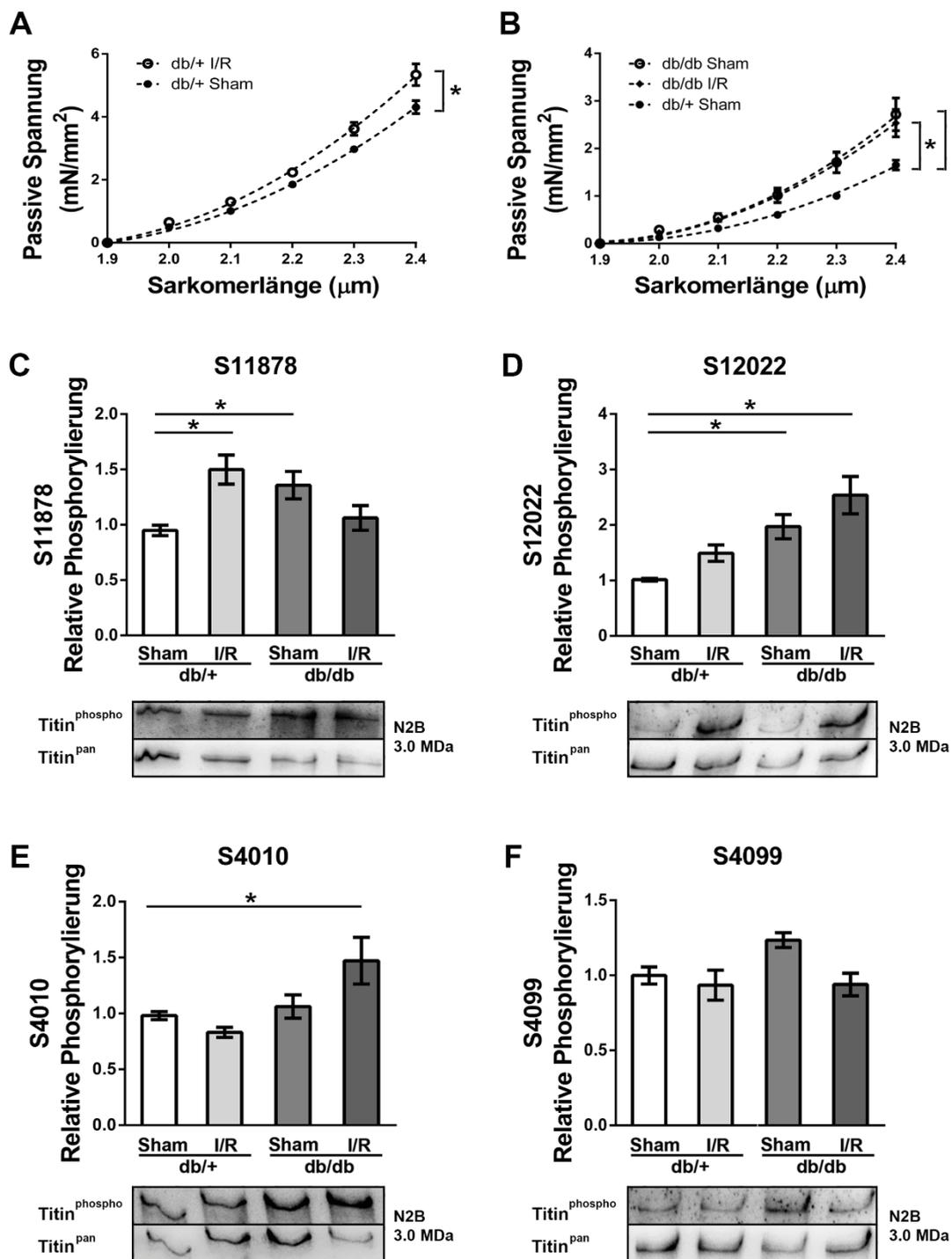


Abb.3.5. Modifikationen der Titineigenschaften im nicht-ischämischen Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Minuten/24Stunden). (A) Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit in dem *remote* Gebiet des Myokards nach einer I/R bei den db/+ (B) und db/db Mäusen. Die Linien repräsentieren die polynomische Kurvenanpassung. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikanter Unterschied der gesamten passiven Spannung-Sarkomerlänge (PT-SL) Beziehung ($p < 0,05$ in *two-way ANOVA*) (C) Modifikationen der S11878 und (D) S12022 Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region sowie (E) S4010 und (F) S4099 in der N2-B(us)-Region nach Myokardinfarkt im *remote* Myokard der db/+ und db/db Mäuse (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die

Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative Blots werden unter den entsprechenden Balkendiagrammen gezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA).

Phosphorylierung der PEVK-Region und Aktivität der PKC α im diabetischen *remote* Myokard war in Folge einer I/R nicht weiter gestiegen, was im nicht-ischämischen Myokard der db/+ Mäuse beobachtet werden konnte (Abb.3.5.C,D; Abb.3.6.A). Phosphorylierung anderer elastischer Region N2-B(us) in dem I-Bande Segment des Titins scheint bei den db/db Mäusen basal nicht verändert zu sein. Nach der I/R wird jedoch eine Tendenz zur Erhöhung der S4010 Phosphorylierung ($p=0,051$) und ERK 1/2 Aktivität ($p=0,21$) im *remote* Myokard der db/db Tiere beobachtet. Diese Modifikation konnte nicht im *remote* Gebiet des Myokards der gesunden db/+ Tiere nach I/R festgestellt werden (Abb.3.5.E; Abb.3.6.C).

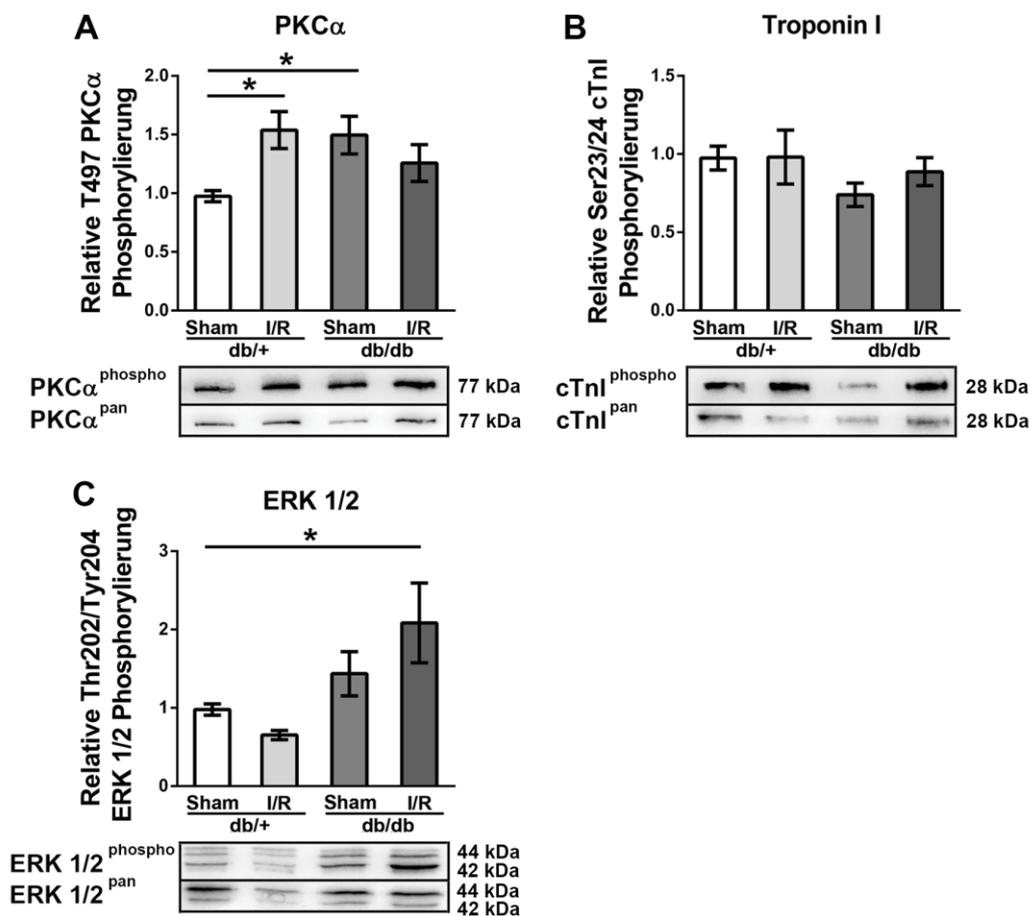


Abb.3.6. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tiere in Folge eines akuten Myokardinfarkts. (A) Veränderungen der PKC α - (B) Troponin I- (C) und ERK 1/2 Phosphorylierung in *remote* Region des Herzens bei db/+ und db/db Tieren nach 60-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Repräsentative Blots werden unter den entsprechenden Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA).

Die Daten zur PKC α Aktivität im remote Myokard, die durch die Promovendin erhoben wurden, wurden als Teilergebnis einer Studie 2018 im *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* veröffentlicht: Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorressen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stuhler K, **Isić M**, Krüger M, Schmitt JP. Impaired Ca $^{2+}$ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 119:28-39 (2018).

3.3.5. I/R-bedingte Modifikationen der ECM-Proteine im *remote* Gebiet des Herzens der db/+ und db/db Mäuse

Die quantitativen Analysen der mRNA Expression von Typ-I und Typ-III Kollagen sowie Lysyloxidasen-Homologen 1 und 2 mittels real-time PCR wurden auch im nicht-ischämischen Bereich des Herzens nach I/R bei gesunden und diabetischen Tieren durchgeführt. Anders als im infarzierten Myokard wurden 24 Stunden nach einer I/R keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Kollagenfasern im *remote* Myokard der db/+ Mäuse beobachtet (Abb.3.7.A, B). Die mRNA Expression der Lox11 ($p=0,19$) scheint jedoch schon 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt tendenziell anzusteigen (Abb.3.7.C).

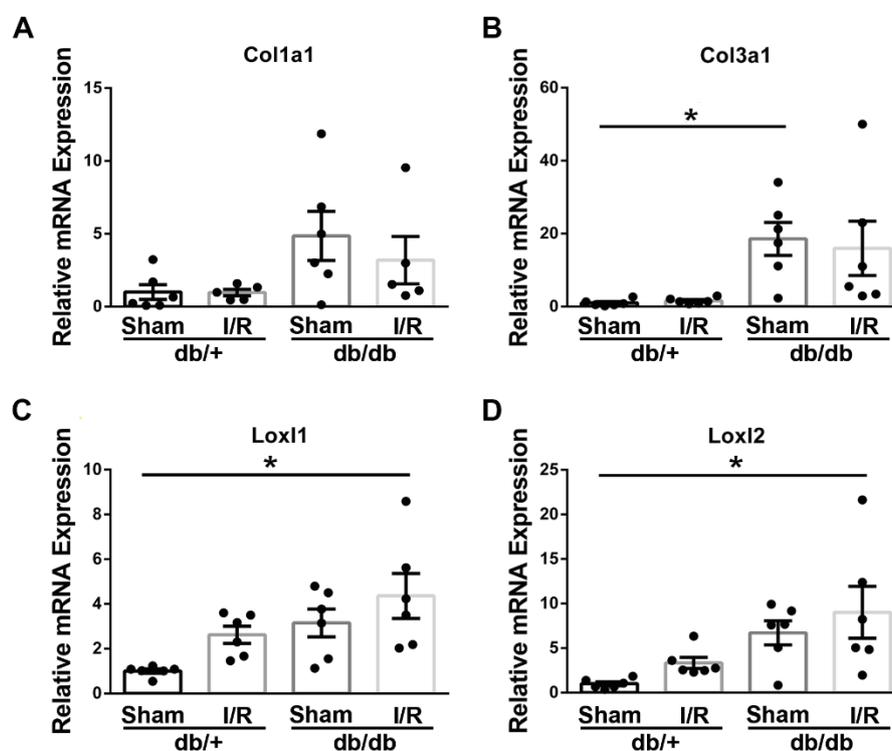


Abb.3.7. Umstrukturierung der extrazellulären Matrix im *remote* Myokard der db/+ und db/db Mäuse in Folge eines akuten Herzinfarktes. Die mRNA Expression von (A) Typ-I-Kollagen – Col1a1; (B) Typ-III-Kollagen – Col3a1; (C) Lysyloxidase Homolog 1 – Lox11; (D) Lysyloxidase Homolog 2 – Lox12 im nicht-ischämischen Bereich des Herzens bei db/+ und db/db Mäusen vor und nach dem Myokardinfarkt (60

Minuten Ischämie/24 Stunden Reperfusion). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=5-6 Gewebe pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 in *one-way* ANOVA).

Weitere Versuche weisen darauf hin, dass die mRNA Expression von Col3a1 bei db/db Mäusen basal signifikant um $1756 \pm 452,66\%$ erhöht wird. Es wurde auch eine Tendenz zur Erhöhung der Col1a1 (p=0,079), Loxl1 (p=0,061) und Loxl2 (p=0,058) mRNA Expression im diabetischen Myokard beobachtet. Ähnlich wie bei db/+ Mäusen wurde die mRNA Expression der ECM-Proteine im *remote* Myokard der diabetischen Mäuse nach der I/R nicht signifikant erhöht (Abb.3.7).

3.3.6. Interleukin-6 vermittelt *in vitro* Veränderungen der Titineigenschaften

Interleukin-6 wird in Folge eines Myokardinfarkts sowie bei Diabetikern verstärkt ausgeschüttet. Es wurde *in vitro* in adulten Rattenkardiomyozyten getestet, ob dieses Zytokin die beobachteten Veränderungen der Titineigenschaften vermitteln könnte.

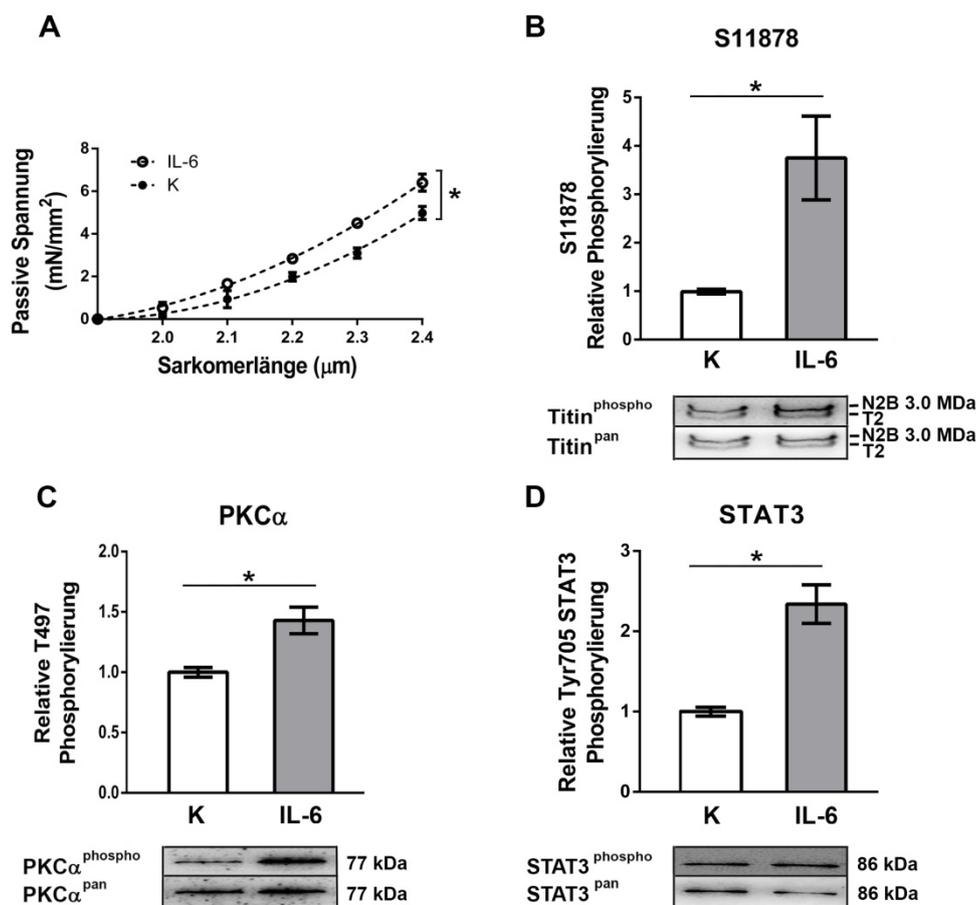


Abb.3.8. Interleukin-6-bedingte *in vitro* Modifikationen der Titin-abhängigen Steifigkeit und Titinphosphorylierung in adulten Rattenkardiomyozyten. (A) Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit der adulten Rattenkardiomyozyten nach 15-minütiger Behandlung mit IL-6. Die Linien repräsentieren die polynomische Kurvenanpassung. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM

angegeben (n=9 Zellen pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikanter Unterschied der gesamten passiven Spannung-Sarkomerlänge (PT-SL) Beziehung ($p < 0,05$ in *two-way* ANOVA) (B) Western Blot Analysen der Titinphosphorylierung an der S11878 (C) Aktivität der PKC α und (D) STAT3 Kinase. Die Daten wurden auf nicht behandelte Zellen normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 einzelnen Experimenten. Die repräsentativen Blots werden unter den jeweiligen Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in Student T-Test).

Zu diesem Zweck wurden adulte Rattenkardiomyozyten isoliert und anschließend über 15 Minuten mit IL-6 stimuliert. Aktivierung der IL-6 Signaltransduktion wurde durch die Erhöhung der STAT3 Phosphorylierung ($+134 \pm 24\%$) bestätigt. Es konnte beobachtet werden, dass die Titin-abhängige passive Steifigkeit der Kardiomyozyten nach der Stimulation mit IL-6 innerhalb von 15 Minuten signifikant zunahm. Dieser Effekt könnte durch die verstärkte Phosphorylierung von S11878 in der PEVK-Region ($+275,02 \pm 86,4\%$) und die erhöhte PKC α ($+43 \pm 11\%$) Aktivität erklärt werden (Abb. 3.8).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse (Kapitel 3.3.6.) wurden von der Promovendin eigenständig erhoben und als Teilergebnis in folgender Studie 2016 im *Circulation Research* veröffentlicht: Kötter S, **Kazmierowska M**, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M. Titin-based cardiomyocyte stiffening contributes to early adaptive ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 119:1017-1029 (2016)

3.3.7. IL-6-Ausschüttung und mRNA Expression im *remote* Myokard wird bei db/db Mäusen nach I/R beeinträchtigt

Es wurde anschließend untersucht, ob sich die IL-6 Ausschüttung nach der I/R in den db/db und db/+ Mäusen unterscheidet. Zu diesem Zweck wurde die IL-6 Konzentration im Blutplasma der Tiere mit Hilfe von ELISA bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die IL-6 Konzentration im Blutplasma der db/+ Tiere 24 Stunden nach dem Myokardinfarkt etwa 5-fach erhöht wurde. Die IL-6 Konzentration im Blutplasma der db/db Mäuse war im Vergleich mit db/+ Sham operierten Mäusen signifikant höher ($+124,52 \pm 47,84$ pg/ml). Nach dem Myokardinfarkt wurde die IL-6 Konzentration im Blutplasma der db/db Tiere jedoch nicht erhöht, sondern sank auf Kontrollwerte wie in den db/+ Sham operierten Tieren ab ($22,46 \pm 2,84$ pg/ml) (Abb.3.9.A).

Weiterhin wurde getestet, ob sich die mRNA Expression von IL-6 im *remote* und ischämischen Myokard zwischen den einzelnen Tiermodellen unterscheidet. Im ischämischen Herzgewebe von db/+ Tieren wurde eine signifikante Erhöhung der IL-6 mRNA Expression ($+633,54 \pm 296,3\%$) beobachtet. Im *remote* Myokard war diese

zumindest tendenziell erhöht ($p=0,62$). Im diabetischen Myokard der db/db Mäuse war basal nur eine schwache Tendenz zur Erhöhung der IL-6 mRNA Expression im Vergleich mit db/+ Tieren sichtbar ($p=0,71$). Diese wurde in Folge eines Myokardinfarktes nicht verändert (Abb.3.9.B, D).

Es ist bekannt, dass Skelettmuskeln unter mechanischem Stress IL-6 ins Plasma ausschütten können (Welc und Clanton, 2013). Daher wurde getestet, ob IL-6 in den Skellettmuskeln (*M.Quadriceps*) der diabetischen Tiere und in Folge eines Myokardinfarktes verstärkt exprimiert wird. In keinen der untersuchten Mausmodelle konnten Unterschiede in der muskulären IL-6 Expression festgestellt werden (Abb.3.9.C).

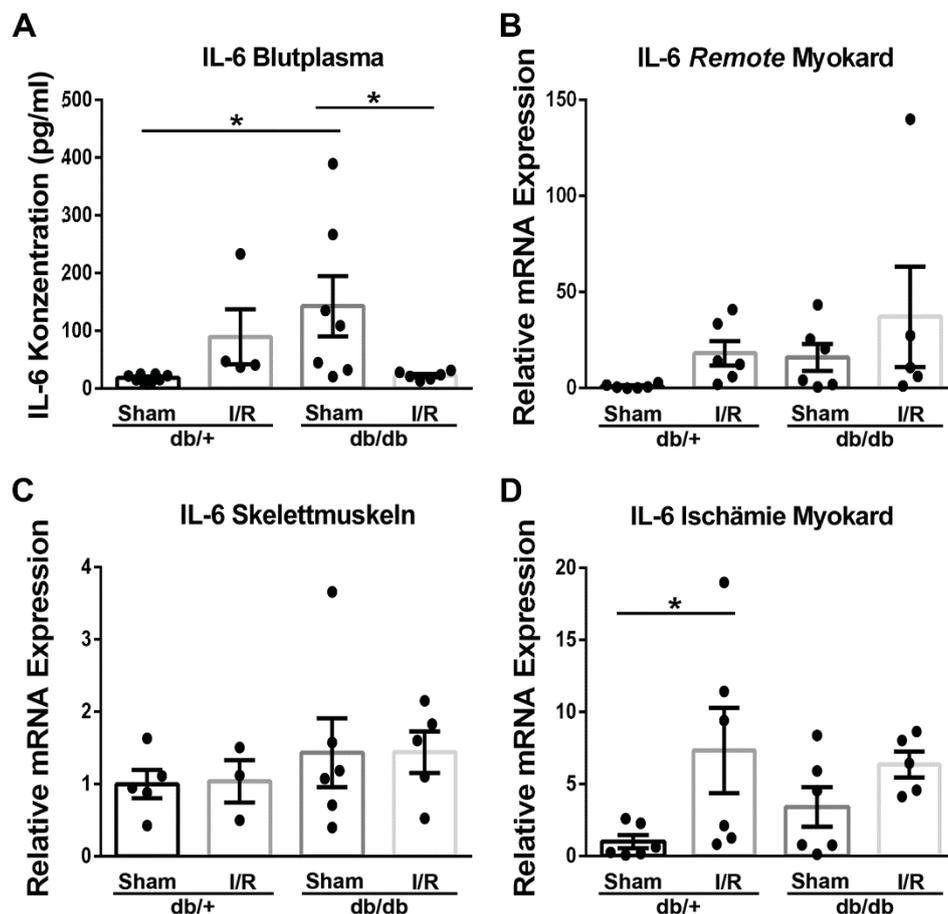


Abb.3.9. Veränderungen der IL-6 Konzentration im Blutplasma und der mRNA Expression von IL-6 im Herzen und Skelettmuskeln der db/+ und db/db Mäuse akut nach I/R. (A) IL-6 Konzentration (pg/ml) im Blutplasma (B) IL-6 mRNA Expression im *remote* Myokard, (C) *M. Quadriceps* und (D) im infarzierten Bereich des Myokards bei db/+ und db/db Mäusen basal und nach I/R. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM ($n=3-6$ Tiere pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikante Unterschiede ($p<0,05$ in *one-way* ANOVA).

3.3.8. Autophagie und proteasomaler Abbau im *remote* Myokard der db/+ und db/db Mäuse akut nach I/R

Anschließend wurde getestet, ob erhöhte mechanische Belastung des *remote* Myokards in gesunden und diabetischen Mäusen nach I/R zur Aktivierung der Autophagie und des proteasomalen Abbaus, die auch an der Degradation von Titin teilnehmen, führen könnte.

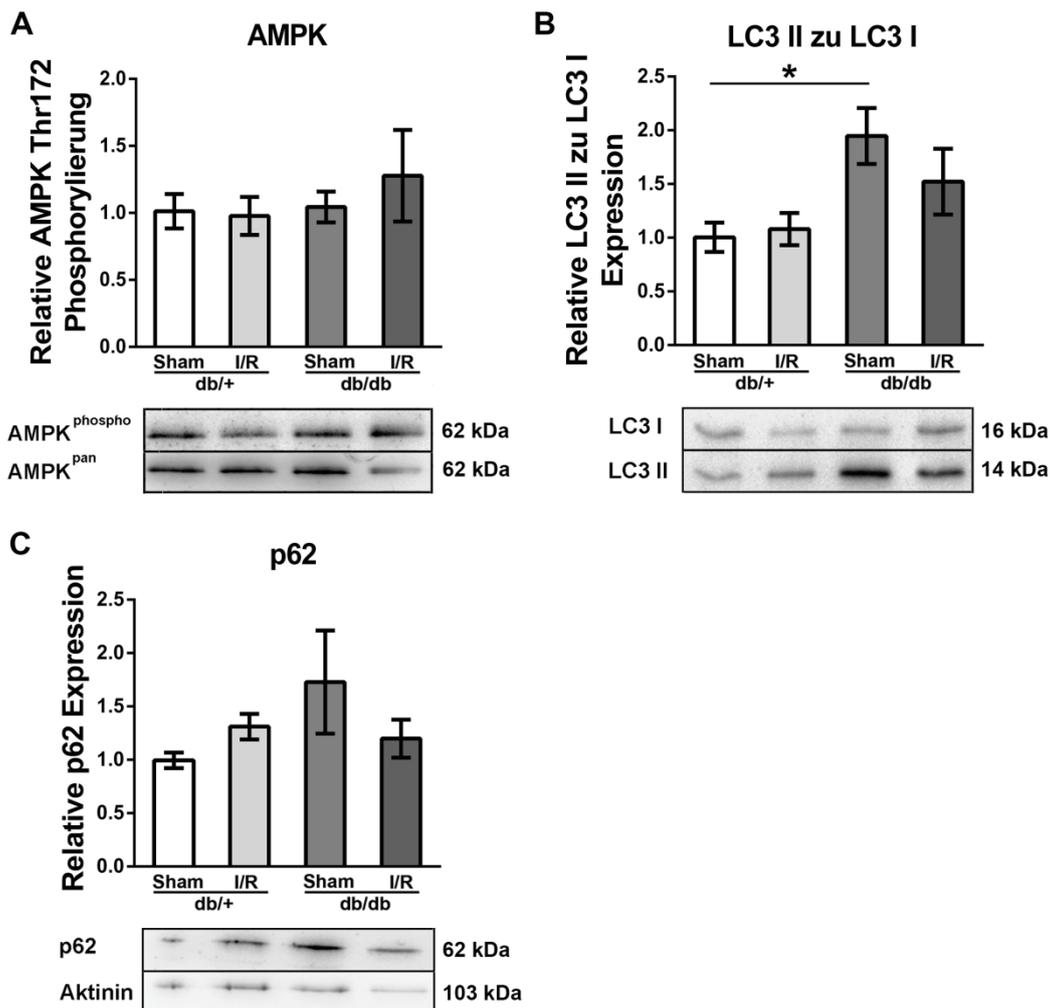


Abb.3.10. Veränderungen der AMPK-Aktivität und Expression der anderen Autophagie-Marker im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tiere 24 Stunden nach einem Herzinfarkt (A) Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), (B) Das Verhältnis der Expression von LC3II zu LC3I, (C) Expression des Autophagiemarkers p62 im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tieren nach I/R. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=mind. 6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Die repräsentativen Blots werden unter den Balkendiagrammen gezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in one-way ANOVA).

Autophagiemarker wie LC3 und p62 wurden akut nach einer I/R in dem *remote* Myokard nicht signifikant verändert. Bei den db/db Tieren wurde jedoch basal erhöhte Expression der LC3 II ($+98,49 \pm 27,23\%$) und die Tendenz zur Erhöhung der p62 Expression festgestellt ($p=0,12$) (Abb.3.9C,D). Es wurden keine signifikanten Veränderungen dieser Autophagie-Marker im diabetischen Myokard in Folge einer I/R beobachtet. Aktivität der AMPK Kinase, die die Aktivierung der Autophagie vermittelt, wurde in den untersuchten Tiermodellen ebenfalls nicht signifikant moduliert (Abb.3.10.A).

Mit Hilfe der Western Blot Analysen konnte auch die Expression der proteasomalen Untereinheit (PSMA) bestimmt werden. Es wurde eine klare Tendenz zur Erhöhung der Proteasommenge im *remote* Myokard in Folge einer I/R ($p=0,33$) bei db/+ Tieren beobachtet. Die PSMA Expression wurde bei den Sham operierten diabetischen db/db Tieren um $95,41 \pm 42\%$ erhöht und wurde nach akutem Myokardinfarkt nicht verändert (Abb.3.11.D). Zusätzlich wurden Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-Aktivität des Proteasoms untersucht. Nach 24 stündiger Reperfusion waren die Trypsin- und Caspase- Aktivitäten des Proteasoms nicht signifikant verändert und auch in den db/db Herzen scheinen diese Aktivitäten nicht durch einen akuten Myokardinfarkt betroffen zu sein. Chymotrypsin-Aktivität wird jedoch in der frühen Phase nach I/R im nicht-ischämischen Myokard der db/+ Tiere tendenziell erhöht ($p=0,23$). Eine gleiche Tendenz wurde basal in den db/db Herzen beobachtet ($p=0,16$). Diese Aktivität wurde in Folge einer I/R bei den db/db Tieren tendenziell weiter erhöht ($p=0,13$) (Abb.3.11).

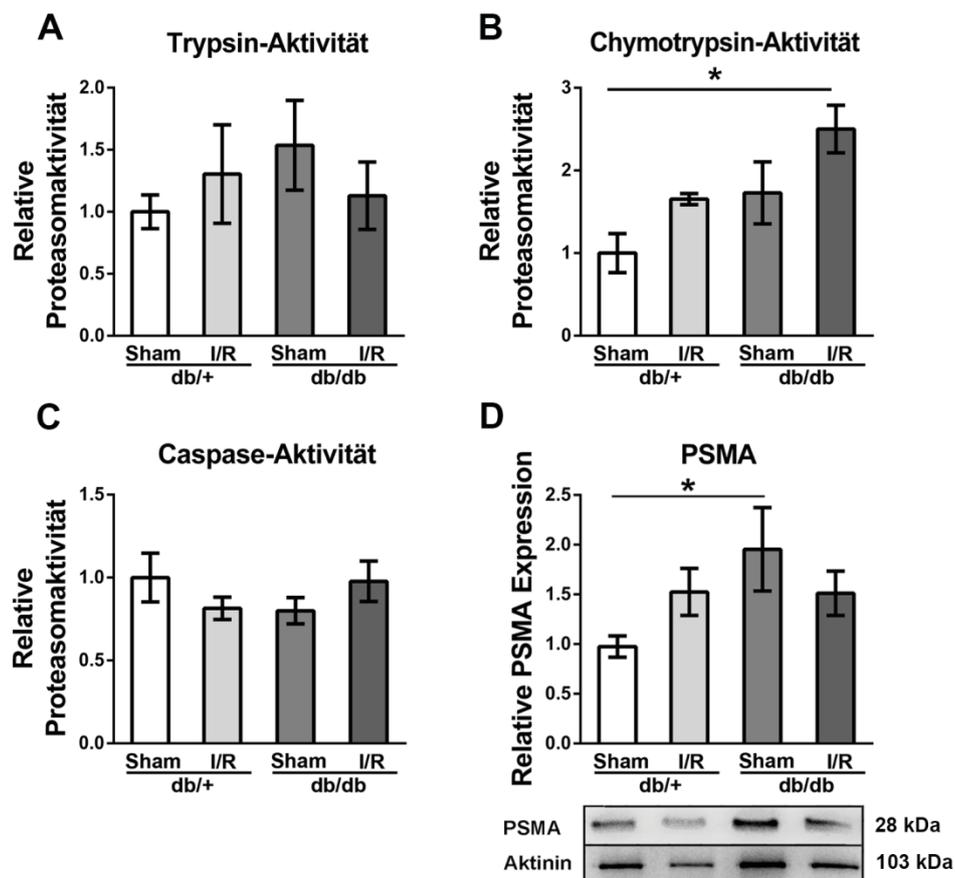


Abb.3.11. Analyse der verschiedenen Proteasomaktivitäten und PSMA Expression im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tiere (basal und nach I/R). Die Daten zeigen (A) Trypsin-, (B) Chymotrypsin- und (C) Caspase-Aktivität des Proteasoms und (D) PSMA Expression im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tiere vor und nach 60 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion. Die Proteasomaktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und auf die db/+ Herzen normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). *Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 in *one-way* ANOVA).

3.4. Remote Region des Myokards – 60 Minuten Ischämie/3 Wochen Reperfusion

3.4.1. Titin-abhängige Steifigkeit und Titinisoformenverhältnis im *remote* Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt

Anschließend wurde untersucht, ob der akute Anstieg der passiven Steifigkeit, der nach 24-stündiger Reperfusion im *remote* Myokard der db/+ Tiere beobachtet wurde, in späteren Phasen nach einem Herzinfarkt (60 Minuten Ischämie/3 Wochen Reperfusion) weiterhin vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurde die passive Spannung der einzelnen Kardiomyozyten aus dem nicht-ischämischen Bereich des Herzens der Wildtypmäuse 3 Wochen nach Myokardinfarkt gemessen. Es konnte nachgewiesen

werden, dass die Erhöhung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im *remote* Myokard nur transient war, da 3 Wochen nach Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede der passiven Spannung im nicht-ischämischen Bereich des Herzens mehr vorlagen (Abb.3.12.A).

Die Analyse der Titinisoformenexpression zeigte, dass die N2BA- und N2B-Isoformen im gleichen Maße im Myokard der Sham operierten Mäuse ($70,84 \pm 2,42\%$ N2B) und im *remote* Gebiet des Herzens 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt exprimiert werden ($74,01\% \pm 1,87\%$ N2B) (Abb.3.12.B).

3.4.2. Modifikationen der Titinphosphorylierung im *remote* Myokard nach Ischämie und 3 Wochen Reperfusion

Da die Titineigenschaften auch mittels solcher posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung der elastischen Elemente modifiziert werden können, wurden diese mittels phospho-spezifischen Antikörpern analysiert. 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt (I/R) wurde beobachtet, dass die Phosphorylierung der S11878 immer noch signifikant um $69,54 \pm 23,32\%$ in dem *remote* Myokard erhöht war (Abb.3.12.C). Auch die Phosphorylierung der S12022 war zwar nicht signifikant, aber tendenziell höher ($p=0,055$) als in den Sham operierten Tieren (Abb.3.12.D). Eine Tendenz zur erhöhten PKC α Aktivität, die diese beiden Stellen phosphoryliert, wurde ebenso erkannt ($p=0,083$) (Abb.3.13.A).

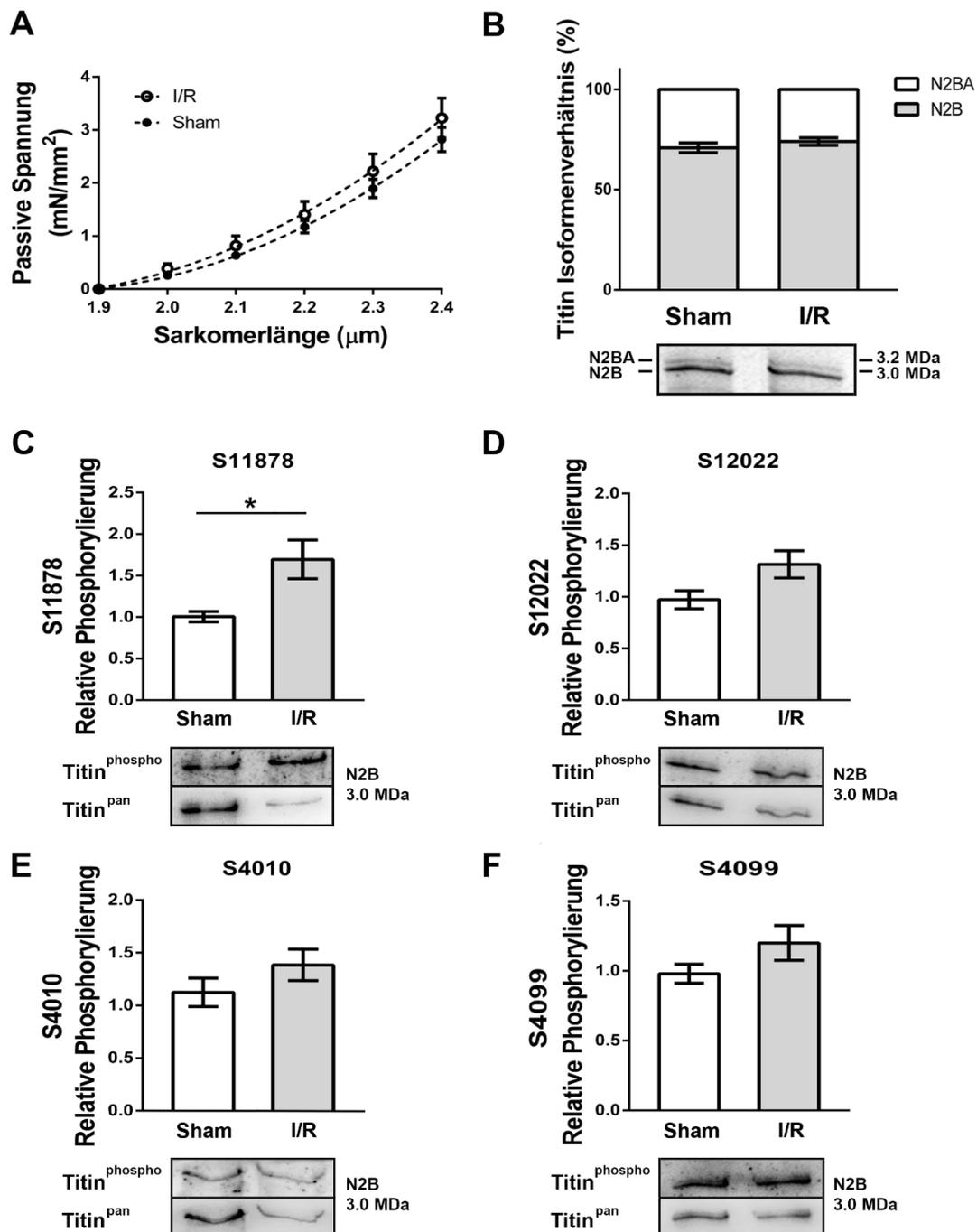


Abb.3.12. Modifikationen der Titineigenschaften im *remote* Myokard in Folge einer Ischämie und Reperfusion (60 Minuten/3 Wochen) (A) Passive Spannung im nicht-ischämischen Gebiet des Herzens nach 3-wöchiger Reperfusion. Die Linien repräsentieren die polynomische Kurvenanpassung. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). (B) Titinisoformenverhältnis in der *remote* Region des Herzens vor (Sham) und nach der I/R. Das durchschnittliche Titinisoformenverhältnis wird als N2BA+N2B=100% angegeben; Repräsentative Titinbanden werden unter den entsprechenden Balken angezeigt (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe) (C) Modifikationen der S11878 und (D) S12022 Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region sowie (E) S4010 und (F) S4099 in der N2-B(us) Region im *remote* Myokard. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Die repräsentativen Blots werden unter den Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 in Student T-Test).

Es konnten keine signifikanten Modifikationen der N2-B(us) Region beobachtet werden. Eine Tendenz zur Steigerung der Phosphorylierung von S4010 ($p=0,22$) und S4099 ($p=0,15$) sowie eine signifikante Phosphorylierung von Troponin I ($+25,3\pm 8,38\%$) war jedoch erkennbar (Abb.3.12.E, F; Abb.3.13.B).

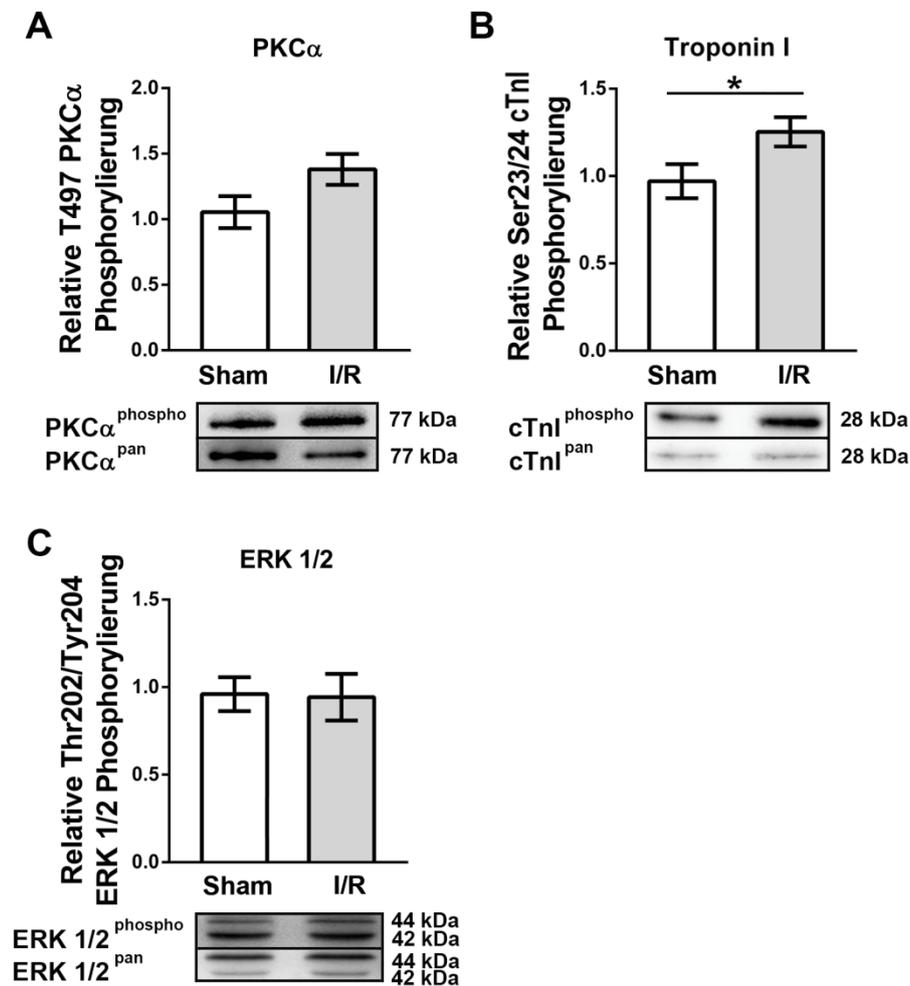


Abb.3.13. Veränderungen der Kinasenaktivitäten im *remote* Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt (A) Modifizierte Aktivität von PKC α , (B) Phosphorylierung der Troponin I und (C) ERK 1/2 nach 60-minütiger Ischämie und 3-wöchiger Reperfusion. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM ($n=6$ Gewebe pro Versuchsgruppe). Die repräsentativen Blots werden unter den Balkendiagrammen gezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p<0,05$ in Student T-Test).

3.4.3. mRNA Expression der ECM-Proteine im *remote* Gebiet des Herzens 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt

3 Wochen nach einer Ischämie wurden im nicht-ischämischen Bereich des Herzens keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der ECM-Proteine festgestellt. Sowohl Col1a1, Col3a1, als auch Loxl1 und Loxl2 mRNA Expression 3 Wochen nach I/R war mit der Expression bei den Sham-operierten Tieren vergleichbar (Abb.3.14).

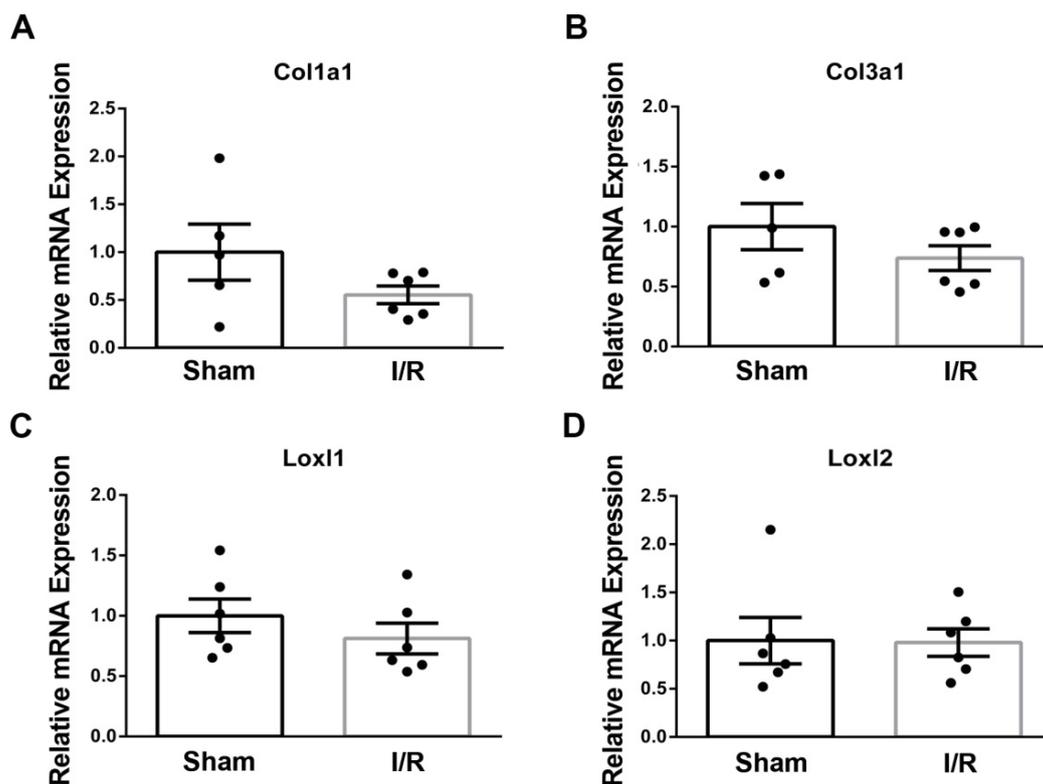


Abb.3.14. mRNA Expression der ECM-Proteine im *remote* Myokard 3 Wochen nach einer Ischämie. Die mRNA Expression von (A) Kollagen Typ I – Col1a1; (B) Kollagen Typ III – Col3a1; (C) Lysyloxidase Homolog 1 – Loxl1; (D) Lysyloxidase Homolog 2 – Loxl2 im nicht-ischämischen Bereich des Herzens 3 Wochen nach dem Myokardinfarkt (I/R). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe).

3.4.4. Myokardiale mRNA Expression von IL-6 3 Wochen nach einem Herzinfarkt

Die quantitativen Analysen der mRNA Expression von IL-6 wurden auch im *remote* Myokard nach 60-minütiger Ischämie und 3 Wochen Reperfusion durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass zu diesem Zeitpunkt der Myokardremodellierung, IL-6 nicht mehr verstärkt im nicht-ischämischen Bereich des Herzens exprimiert wird (Abb.3.15.).

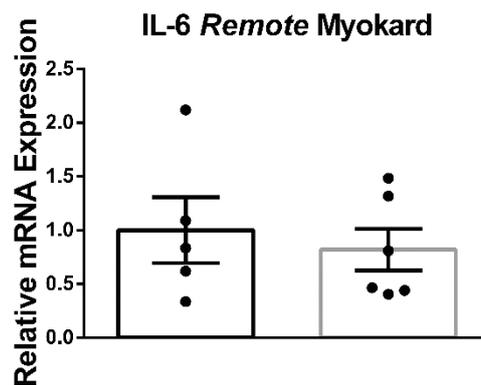


Abb.3.15. IL-6 mRNA Expression im *remote* Myokard 3 Wochen nach einer Ischämie. Die mRNA Expression von (A) Kollagen Typ I – Col1a1; (B) Kollagen Typ III – Col3a1; (C) Lysyloxidase Homolog 1 – Loxl1; (D) Lysyloxidase Homolog 2 – Loxl2 im nicht-ischämischen Bereich des Herzens 3 Wochen nach dem Myokardinfarkt (I/R). Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe).

3.4.5. Autophagie und proteasomaler Abbau im *remote* Myokard 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt

Anschließend wurde analysiert, ob Autophagie und proteasomaler Abbau, die an der Degradation von Titin beteiligt sind, in späteren Phasen der Myokardremodellierung im *remote* Myokard aktiviert oder reduziert werden. Ähnlich wie 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion, wurden die Autophagie Marker: AMPK, LC3 und p62 und Proteasommenge im nicht-ischämischen Gebiet des Herzens 3 Wochen nach Myokardinfarkt untersucht. Die Aktivität der AMP-abhängigen Kinase wurde zu diesem späteren Zeitpunkt tendenziell erhöht ($p=0,07$) (Abb.3.16A). Außerdem wurde beobachtet, dass die Expression von LC3 II signifikant um $71,84 \pm 9,21\%$ erhöht wurde. Gleichzeitig wurde die p62 Expression zumindest tendenziell in diesem Bereich des Herzens reduziert ($p=0,16$) (3.16.C, D).

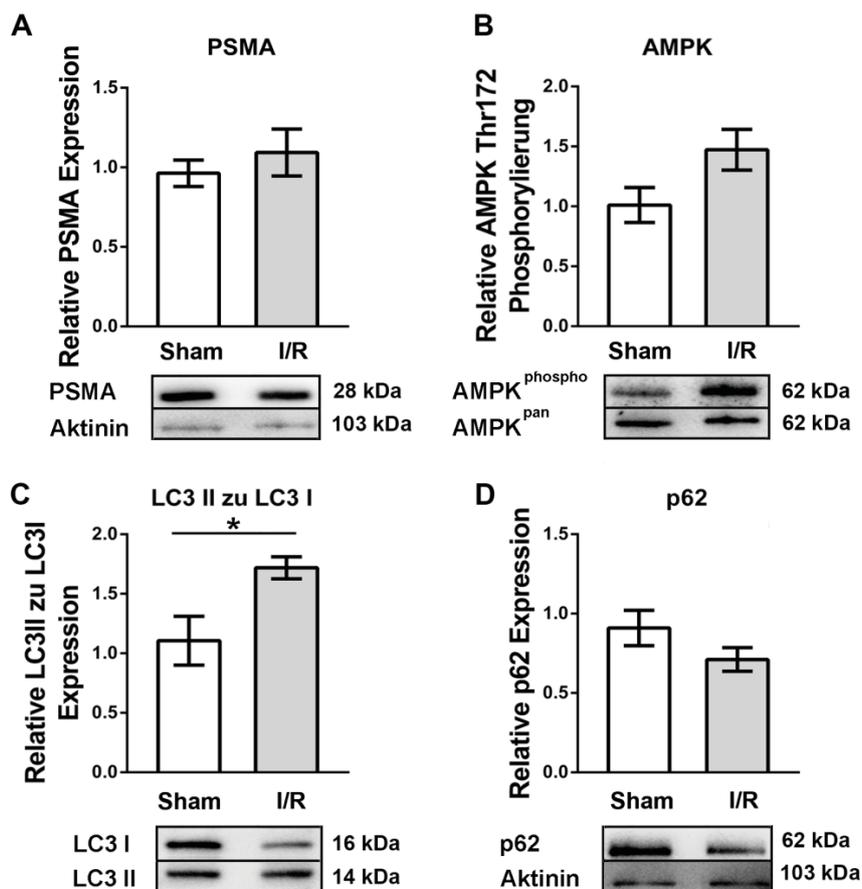


Abb.3.16. Veränderungen der AMPK-Aktivität und Expression der anderen Autophagie-Marker sowie Expression des Proteasoms im *remote* Myokard 3 Wochen nach einem Herzinfarkt (A) Expression der proteasomalen Untereinheit α , **(B)** Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), **(C)** Das Verhältnis der Expression von LC3II zu LC3I, **(D)** Expression des Autophagiemarkers p62 im *remote* Myokard der db/+ und db/db Tieren nach I/R. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normalisiert. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM (n=6 Gewebe pro Versuchsgruppe). Die repräsentativen Blots werden unter den Balkendiagrammen gezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05 in Student T-Test)

Die Expression von PSMA war in der späteren Phase der Myokardheilung unverändert (3.16.B).

3.5. Neuregulin-1-vermittelte Veränderungen der Titineigenschaften

Anschließend sollte es in adulten Rattenkardiomyozyten getestet werden, ob Neuregulin-1 (NRG-1) *in vitro* die Veränderungen der Titineigenschaften induziert. Die isolierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden hierfür eine Stunde lang mit NRG-1 stimuliert. In einem anderen Ansatz wurden die Zellen mit NRG-1 und Metformin, einem oft bei Typ-2-Diabetes Erkrankten verwendetem Medikament gleichzeitig behandelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation der

Rattenkardiomyozyten mit NRG-1 zur signifikanten Abnahme der PEVK-Phosphorylierung an der S11878 um $28,78 \pm 5,16\%$ führte und PKC α -Aktivität um $17,35 \pm 4,81\%$ reduzierte. Diese Effekte konnten in der Anwesenheit von Metformin nicht beobachtet werden und ein signifikanter Anstieg der PKC α -Aktivität wurde nach gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit NRG-1 und Metformin festgestellt (Abb. 3.17. A, D).

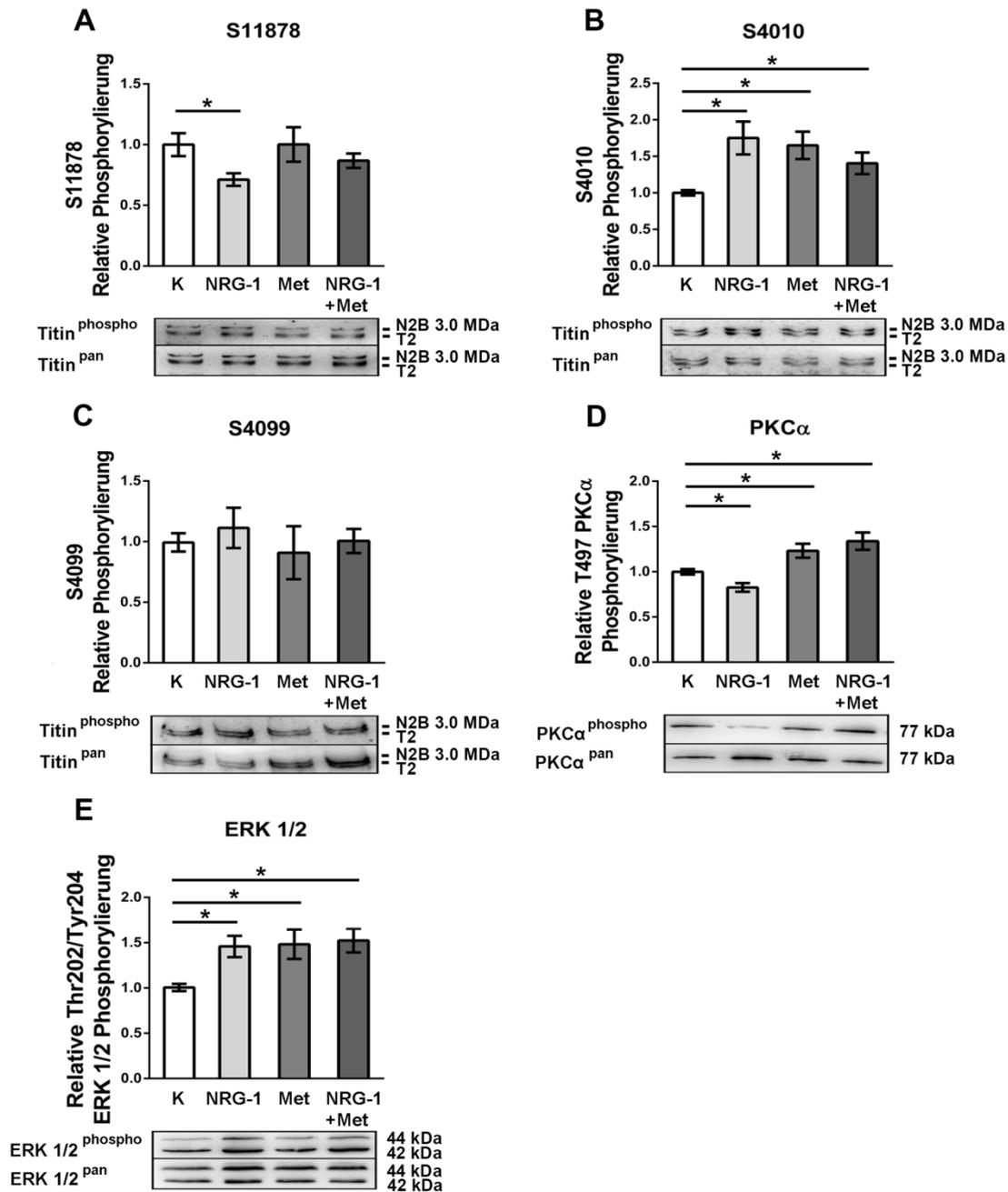


Abb.3.17. *In vitro* Einfluss von Neuregulin-1 (NRG-1) und Metformin (Met) auf Titinphosphorylierung und Aktivität der Kinasen. Adulte Rattenkardiomyozyten wurden mit NRG-1 (100 $\mu\text{mol/L}$), Metformin

(Met, 20 mmol/L) oder mit NRG-1 und Metformin gleichzeitig über 60 Minuten stimuliert. Die nicht behandelten Zellen (K) wurden als Kontrolle verwendet. Titinphosphorylierung an der **(A)** S11878, **(B)** S4010 und **(C)** S4099 sowie Aktivität von **(D)** PKC α und **(E)** ERK 1/2. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert \pm SEM von n=4-6 einzelnen Experimenten. Die repräsentativen Blots werden unter den Balkendiagrammen angezeigt. *Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA).

Phosphorylierung an der S4010 wurde durch Stimulation mit NRG-1 um 77% erhöht. Die Behandlung der Zellen mit Metformin führte zum Anstieg der Phosphorylierung in dieser Region um etwa 50%, wohingegen mit NRG-1 und Metformin stimulierte Zellen eine Erhöhung der S4010 Phosphorylierung um 32% aufwiesen (Abb.3.17.B). Phosphorylierung an der S4099 wurde sowohl durch NRG-1 als auch Metformin nicht modifiziert (Abb.3.17.C). NRG-1, Metformin und Kombination der beiden Substanzen, führte zur verstärkten Aktivität der ERK 1/2 (Abb.3.17.E).

Alle Daten zu NRG-1 vermittelten Veränderungen der Titineigenschaften (Kapitel 3.5.) wurden von der Promovendin eigenständig erhoben und als Teilergebnis in folgender Studie 2018 in *Circulation Research* veröffentlicht: Hopf AE, Andresen C, Kötter S, **Isić M**, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M. Diabetes-induced cardiomyocyte passive stiffening is caused by impaired insulin-dependent titin modification and can be modulated by neuregulin-1. *Circ Res* 123(3):342-355 (2018)

4. Diskussion

Die Titin-abhängige passive Steifigkeit wird im Herzen unter pathologischen Bedingungen moduliert. Die molekularen Mechanismen, die den Veränderungen der Elastizität nach dem Myokardinfarkt und bei den diabetischen Patienten zu Grunde liegen sind nur unzureichend bekannt. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von experimentellen Mausmodellen die Titinmodifikationen des nicht-ischämischen Myokards in Folge einer Ischämie und Reperfusion charakterisiert. Zusätzlich wurden Mechanismen identifiziert, die diese Modifikationen bei db/db Mäusen beeinflussen könnten. Eine potenzielle Behandlungsmethode der durch diabetische Stoffwechsellage induzierten Modifikationen der Titinphosphorylierung mit Neuregulin-1 (NRG-1) wurde ebenfalls getestet.

4.1. Akute Modulation der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im ischämischen Gebiet des Myokards

Die durchgeführten Versuche haben nachgewiesen, dass die Titineigenschaften akut nach einem Myokardinfarkt im infarzierten Bereich des Herzens moduliert werden. Schon 24 Stunden nach einer Ischämie (I/R) wurde ein massiver Anstieg der PKC α -abhängigen PEVK-Phosphorylierung im ischämischen Myokard beobachtet, was zu einer Zunahme der passiven Steifigkeit führen sollte (Hidalgo et al., 2009). Gleichzeitig wurde aber die Phosphorylierung der Troponin I (die auf eine erhöhte Aktivität der PKA und PKG hinweist) und die Aktivität der ERK 1/2 Kinase signifikant erhöht. Die verstärkten Kinasenaktivitäten führten zur tendenziellen Erhöhung der N2-B(us)-Phosphorylierung. Im Gegensatz zur Phosphorylierung der PEVK-Region resultiert dies in einer Reduktion der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten. Die entgegengesetzte Wirkung der posttranslationalen Modifikationen führte wahrscheinlich dazu, dass sich die Effekte auf passive Spannung aufgehoben haben und schließlich keine signifikanten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im infarzierten Myokard beobachtet werden konnten. Kötter et al. haben die passive Spannung des ischämischen Myokards in einem *ex vivo* Modell der I/R (20 Minuten Ischämie/60 Minuten Reperfusion) gemessen und festgestellt, dass die PT akut erhöht wurde. In diesem Modell wurde jedoch nur ein Anstieg der PEVK-Phosphorylierung beobachtet und die Phosphorylierung der N2-B(us) wurde nicht modifiziert (Kötter et al., 2016). Es ist bekannt, dass die myokardiale Ischämie durch lokale Ausschüttung von Katecholaminen zur β -adrenergen Stimulation des infarzierten

Gebiets des Herzens führt. Innerhalb der ersten Minuten nach einem Myokardinfarkt wird die extrazelluläre Akkumulation von Noradrenalin jedoch durch verschiedene Mechanismen begrenzt (Schömig et al., 1991). Dies könnte erklären wieso erst zu dem späteren Zeitpunkt nach einer Ischämie eine signifikante Erhöhung der PKA Aktivität (die durch β -adrenerge Signalwege stimuliert wird) beobachtet wurde. In der vorliegenden Studie wurde auch eine erhöhte Aktivität der ERK 1/2 Kinase beobachtet, die in der Arbeit von Kötter et al. nicht festgestellt wurde. Andere Studien berichten dagegen, dass die ROS Bildung in Folge einer I/R durch noch nicht bekannte Mechanismen die ERK 1/2 aktivieren kann (Vassalli et al., 2012). Zusätzlich sollte man beachten, dass der durch Kötter et al. durchgeführte Ischämie/Reperfusion-Versuch *ex vivo* stattgefunden hat und dass aus diesem Grund verschiedene Stimuli fehlen könnten, die in einem Körper (*in vivo*) vorhanden wären. Oxidativer Stress im Rahmen einer Myokardischämie könnte auch zu anderen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. S-Gluthathionylierung und S-Sulfonylierung der Ig-Domänen im elastischen Titinsegment führen. Diese Modifikationen hemmen die Rückfaltung der sekundären Strukturen der Ig-Domänen und reduzieren somit die Titin-abhängige Steifigkeit. Auf diese Weise könnte der Einfluss von PEVK-Phosphorylierung auf passive Spannung neutralisiert werden. Eine Analyse der durch oxidativen Stress induzierten Titin-Veränderungen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht durchgeführt werden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine I/R zwar schnelle Veränderungen der Titineigenschaften im ischämischen Myokard initiiert, jedoch haben diese keinen Einfluss auf passive Kardiomyozytensteifigkeit in der frühen Phase der Ventrikelremodellierung.

4.2. Diabetische Stoffwechsellage beeinflusst die Veränderungen der Titinphosphorylierung im ischämischen Myokard

In Herzen der db/db Mäuse wurde basal, ähnlich wie in den kardialen Biopsien der diabetischen Patienten (Hopf et al., 2018) eine Erhöhung der PEVK-Phosphorylierung und der PKC α Aktivität festgestellt. Es ist bekannt, dass PKC α Signaltransduktion unter hyperglykämischen Bedingungen auf Grund der erhöhten Diacylglycerol-Synthese induziert wird (Gerald und King, 2010). Außerdem kann die erhöhte Insulinkonzentration in den frühen Phasen des Typ-2-Diabetes direkt zu chronischer

Aktivierung der PKC α -Aktivität beitragen (Hopf et al., 2018). Dieser Effekt führt zum Anstieg der passiven Kardiomyozytensteifigkeit. Tendenziell wurde auch die Phosphorylierung der N2-B(us) (S4010) und Troponin I reduziert, was die Erhöhung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im Herzen der db/db Mäuse zusätzlich verstärkt. Dies könnte durch gestörte Signaltransduktion der cAMP-abhängigen PKA bei diabetischen Tieren verursacht werden, wie auch Bockus und Humphries berichtet haben (Bockus und Humphries, 2015). Eine Reduktion der Titinphosphorylierung wurde auch durch Hamdani et al. in 16-wöchigen db/db Mäusen beobachtet. Dies wurde jedoch mit reduzierter Konzentration der myokardialen cGMP, sowie niedrigerer Aktivität von PKG erklärt, was in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt wurde (Hamdani et al., 2014). Anders als bei den db/+ Tieren wurde die Phosphorylierung der PEVK-Region sowie die Aktivität der PKC α in Folge eines akuten Myokardinfarktes im infarzierten Bereich des Herzens von db/db Tieren nicht weiter erhöht. Die diabetischen Kardiomyozyten sind wahrscheinlich auf Grund der basal erhöhten PEVK-Phosphorylierung nicht in der Lage auf Stimuli zu antworten, die normalerweise zur verstärkten Phosphorylierung dieser Region führen würden. Ähnlich wie Kardiomyozyten heterozygoter db/+ Tiere, reagieren die diabetischen Zellen auf I/R mit einem Anstieg der N2-B(us) Phosphorylierung im infarzierten Bereich. Leider war es auf Grund sehr starker Zellschädigungen nicht möglich Kraftmessung der einzelnen Kardiomyozyten aus dem infarzierten Bereich durchzuführen. Anhand der biochemischen Daten lässt sich jedoch vermuten, dass die basal erhöhte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten der db/db Mäuse nach einer I/R reduziert wird. Eine Reduktion der passiven Spannung nach einem akuten Myokardinfarkt könnte negative Auswirkungen auf die Sarkomerfunktion haben. Ein steifes Titin schützt vor Überdehnung der Sarkomere, zu der es auf Grund der erhöhten mechanischen Belastung der überlebenden Kardiomyozyten kommen kann. Die Reduktion der passiven Steifigkeit könnte somit also zur Beeinträchtigung der Pumpfunktion führen. Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass Titin eine wichtige Rolle in der Längen-abhängigen Aktivierung (*length-dependent activation* - LDA) spielt (Linke, 2018). LDA wird als erhöhte Ca²⁺ Empfindlichkeit des kardialen kontraktiven Apparates und erhöhte Zuckungskraft auf Grund der Muskeldehnung definiert. Wahrscheinlich wird die mechanische Dehnung von Titin durch Proteine der dicken Myofilamente wahrgenommen und durch das Myosinbindende-Protein C (MyBP-C) an die dünnen Filamente übertragen, was zur LDA führt (Linke et al., 2018). Die LDA wurde bei Ratten, die sehr elastische kardiale N2BA Titinisoform exprimieren, signifikant reduziert (Ait-Mou et al., 2016). Reduktion

der Titin-abhängigen Steifigkeit könnte damit die Kontraktilität der Myofilamente beeinträchtigen. Natürlich darf man nicht ausschließen, dass die I/R weitere posttranslationale Modifikationen von Titin verursacht, die die passive Spannung zusätzlich modulieren.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die diabetischen Herzen basale Veränderungen der Titineigenschaften aufweisen, die die Modulation der Titinphosphorylierung im ischämischen Bereich des Herzens nach einer I/R beeinflussen. Wahrscheinlich führt diese modifizierte Antwort des infarzierten Myokards auf eine I/R zur Abnahme der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit, die negative Auswirkungen auf die Pumpfunktion des Herzens haben könnte.

4.3. Titin-abhängige Steifigkeit wird akut auch im nicht-ischämischen Gebiet des Herzens moduliert

In den bisherigen Studien wurde hauptsächlich die Myokardremodellierung im ischämischen Bereich des Herzens untersucht. Die neuesten Versuche weisen jedoch darauf hin, dass auch nicht-ischämisches, sogenanntes *remote* Myokard durch die Auswirkungen eines Myokardinfarkts betroffen wird. Dieser Bereich des Herzens spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen globalen Herzfunktion, da im infarzierten Myokard viele Kardiomyozyten sterben oder nicht in der Lage sind, ihre Funktion auszuüben. Die Modulationen der Signalwege, die im ischämischen Myokard festgestellt wurden, können nicht direkt auf das *remote* Gebiet des Herzens übertragen werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Myokardremodellierung in diesem Bereich des Herzens genauer zu analysieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen Studie zeigen, dass Titinmodifikationen in dem nicht-ischämischen Myokard, zu denen es in Folge eines permanenten Myokardinfarktes kommt, für die Bewahrung der richtigen Pumpfunktion des Herzens von großer Bedeutung sind. Eine wirksame Behandlung nach dem akuten Myokardinfarkt beruht auf der Minimalisierung der Infarktschäden und Rettung des lebensfähigen Myokards durch die myokardiale Reperfusion mit Hilfe von Angioplastie (perkutane transluminale Angioplastie – PTA). Somit wird die tatsächliche Situation bei Patienten besser durch das Ischämie/Reperfusion (I/R) Modell wiedergespiegelt. Die Reperfusion des Herzens führt zur Abnahme der Mortalität der Patienten, limitiert die Infarktgröße und reduziert die Wahrscheinlichkeit der Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion und Herzinsuffizienz (Keeley et al., 2003; Westman et al., 2016). Überraschenderweise ist die Wiederherstellung des Blutflusses und Reoxygenierung jedoch mit

Verschlimmerung der Gewebeschädigung und tiefgreifender Entzündungsreaktion assoziiert. Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (Eltschig und Eckle, 2011). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal analysiert, ob es zu akuten Veränderungen der Titineigenschaften auch in einem Tiermodell von Ischämie und Reperfusion kommt und ob diese vielleicht auf Grund des Reperfusionsschadens modifiziert werden. Ähnlich wie Kötter et al. (2016) in einem Modell des permanenten Myokardinfarktes beobachtet haben, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es akut, 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion zum signifikanten Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im nicht infarzierten, vitalen Myokard kommt. Dieser Effekt wurde durch massive Erhöhung der PEVK-Phosphorylierung und erhöhter Aktivität der dafür zuständigen PKC α verursacht. Die N2-B(us) Phosphorylierung scheint in diesem Bereich des Herzens 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt nicht betroffen zu sein, obwohl die Aktivität der ERK 1/2 Kinase tendenziell reduziert wurde. Die Modulation der Titineigenschaften im *remote* Myokard akut nach einer I/R unterscheidet sich somit nicht von Titinmodifikationen in einem Modell des permanenten Myokardinfarktes. In der frühen Phase der Herzremodellierung scheint das Reperfusionsschaden die Anpassung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit nicht zu beeinflussen.

Es stellt sich die Frage, ob die Veränderung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit einen positiven oder negativen Einfluss auf die kardiale Pumpfunktion hat. Kötter et al. (2016) postulierten, dass die akute Versteifung des nicht ischämischen Myokards nach dem Herzinfarkt von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der ventrikulären Funktion ist. Titin beschleunigt die Rückführung von Myosin zur zentralen Position in dem Sarkomer und könnte auf diese Weise die strukturelle Stabilität der Sarkomere in Situationen mit vielen Kontraktion-Relaxation Zyklen erhöhen (Kötter et al., 2016). Darüber hinaus fördert das steifere Titin die längenabhängige Aktivierung des Sarkomers. Dank diesem wichtigen Mechanismus ist der infarzierte linke Ventrikel in der Lage die erhöhte Volumenbelastung zu verarbeiten (Cazorla et al., 2001; Kötter et al., 2016). Der schnelle Anstieg der Titinsteifigkeit in der nicht ischämischen Region könnte zudem die Überdehnung und den Tod der lebenden Kardiomyozyten verhindern und auf diese Weise die sarkomerischen und zellulären Schäden in den ersten Stunden und Tagen nach einem Myokardinfarkt reduzieren. Der Rückgang der passiven Steifigkeitserhöhung 10 Tage nach Myokardinfarkt (bzw. 3 Wochen nach einer I/R, was später beschrieben wird) könnte bedeuten, dass die erhöhte Titin-abhängige passive Steifigkeit nicht mehr notwendig ist, wenn die Kollagen-basierte

Narbe gebildet wird und für die Stabilität des linken Ventrikels sorgt. Die Daten schließen jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass die anhaltende Titin-induzierte Versteifung der Sarkomere im *remote* Bereich des Herzens zur mechanischen Belastung führen könnte und dadurch die infarzierte Region destabilisiert (Kötter et al., 2016).

Die vorliegende Arbeit konnte somit bestätigen, dass ein akuter Myokardinfarkt auch im Falle einer I/R zum schnellen Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im *remote* Bereich des Herzens führt, der wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisation der Sarkomere nach einem Myokardinfarkt spielt.

4.4. I/R-bedingte Anpassungsmechanismen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit werden im diabetischen Herzen beeinträchtigt

Weiterhin wurde untersucht, ob Diabetes-induzierte Titinmodifikationen einen Einfluss auf Veränderungen der passiven Steifigkeit in Folge eines Myokardinfarktes im *remote* Bereich des Herzens haben. Basal hat das diabetische Septum, ähnlich wie der linke Ventrikel der diabetischen Herzen eine erhöhte Titin PEVK-Phosphorylierung und PKC α Aktivität sowie reduzierte Troponin I Phosphorylierung aufgewiesen. Die oben genannten Veränderungen verursachten basal erhöhte passive Spannung der diabetischen Kardiomyozyten. Nach einer I/R im *remote* Myokard der db/db Mäuse wurde die PEVK-Phosphorylierung und PKC α Aktivität nicht weiter erhöht, wie es im *remote* Myokard der db/+ Tiere in Folge einer I/R beobachtet werden konnte. Die Phosphorylierung der Titin N2-B(us) Region wurde in Antwort auf eine I/R im *remote* Myokard der db/db Tiere ebenso anders als bei den db/+ Mäusen moduliert. Die diabetischen Kardiomyozyten des nicht ischämischen Myokards reagierten mit einem tendenziellen Anstieg der ERK 1/2 Aktivität und der S4010 Phosphorylierung. Dies wurde in dem *remote* Myokard der gesunden Mäuse nach I/R nicht beobachtet. Die beobachteten Veränderungen führten dazu, dass die passive Spannung der diabetischen Kardiomyozyten in diesem Bereich des Myokardes nicht weiter erhöht wurde, wie es der Fall bei den db/+ Tieren war. Somit unterscheiden sich die gesunden und diabetischen Herzen in der Antwort auf Myokardinfarkt. Basierend auf diesen Befund kann davon ausgegangen werden, dass die basal gestörten Signalwege u.a. der PKC α in den diabetischen Herzen zu einer chronischen Veränderung der

Titineigenschaften führen, die eine akute/transiente Modulation der passiven Steifigkeit in Folge einer Ischämie und Reperfusion verhindern.

Klinische Daten zeigen, dass die Herzen diabetischer Patienten empfindlicher auf ischämischen Schaden reagieren (Kenneth et al., 2001). Die Sensibilität der Diabetes-Tiermodelle auf Herzinfarkt wird in der Literatur dagegen kontrovers diskutiert. Manche Studien konnten nachweisen, dass diabetische Herzen weniger empfindlich auf Ischämie und Reperfusion reagieren, während andere Studien auf höhere Sensibilität und größeren Herzschaden hingewiesen haben. Wieder andere Untersuchungen konnten keine Unterschiede in der Regeneration der diabetischen Herzen nach einem Myokardinfarkt feststellen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse steht noch aus. Höchstwahrscheinlich ist die Sensibilität der diabetischen Tiere für Ischämie vom Dauer und Schweregrad des diabetischen Zustands und der Ischämie und von dem Fettsäurenspiegel abhängig (Übersicht in Paulson, 1997). Es stellt sich natürlich die Frage, ob die beeinträchtigte Modulation der Titin-abhängigen Steifigkeit in den diabetischen Kardiomyozyten die Aufrechterhaltung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt beeinflussen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diabetische Tiere nicht in der Lage sind die passive Spannung im *remote* Myokard nach einem Herzinfarkt (Ischämie/Reperfusion) zu erhöhen. Dadurch könnte den db/db Mäusen ein wichtiger Anpassungsmechanismus fehlen und das Risiko der Komplikationen nach einem Myokardinfarkt könnte aus diesem Grund steigen und die Überlebensrate deutlich reduzieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die zusätzliche Versteifung von Titin auch negative Auswirkungen haben könnte. Typ-2-Diabetes ist durch erhöhte Anlagerung von Kollagen und damit verbundene Fibrose des Myokards charakterisiert. In den Versuchen konnte eine erhöhte mRNA Expression von Kollagen und Lysyloxidasen beobachtet werden, die auf Entwicklung einer myokardialen Fibrose hinweisen könnte. Dies führt zusammen mit der erhöhten Titin-abhängigen passiven Kardiomyozytensteifigkeit zur sehr hohen gesamten Steifigkeit des Myokards, die diastolische Dysfunktion verursachen könnte. Eine weitere Zunahme der passiven Spannung z.B. durch die Erhöhung der PEVK-Phosphorylierung im *remote* Bereich des Herzens könnte eine zunehmende mechanische Belastung zur Folge haben und sogar die Entstehung von Herzrupturen begünstigen.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Versuche, dass eine diabetische Stoffwechsellage basale Veränderungen der Titineigenschaften zur Folge hat, die nach

einer I/R die Anpassungsreaktion des *remote* Myokards der db/db Tiere beeinträchtigen und einen weiteren Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit hemmen. Da dieser Prozess wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion nach einem Myokardinfarkt von großer Bedeutung ist, könnte sich diese Störung der Anpassungsmechanismen negativ auf das Überleben der diabetischen Patienten auswirken.

4.5. IL-6 könnte die beobachteten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit vermitteln

Eine Studie von Savvatis et al. zeigte, dass die Titinphosphorylierung durch IL-6 moduliert wird. In einem Mausmodell für akute Herzmuskelentzündung, die sich durch hohe IL-6 Plasmakonzentration auszeichnet, wurde die Phosphorylierung von Titin mit Hilfe einer phosphospezifischen Pro-Q Diamond-Färbung gelektrophoretisch analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Gesamt-Titinphosphorylierung bei den infizierten Tieren mit hohen IL-6 Plasmawerten signifikant reduziert war. Die Behandlung der Tiere mit dem IL-6 Rezeptorantikörper (Tocilizumab), welche die IL-6 Signaltransduktion hemmt, führte zur Normalisierung der Gesamtphosphorylierung von Titin. In der Studie wurde weder die Phosphorylierung bestimmter Stellen in elastischen Titin PEVK- und N2-B(us)- Regionen noch der Einfluss von IL-6 Signaltransduktionshemmung auf Titin-abhängige passive Steifigkeit untersucht (Savvatis et al., 2014). In der hier vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* getestet, welche Auswirkungen IL-6 auf die Titin-abhängige passive Steifigkeit in adulten Rattenkardiomyozyten hat und welche elastische Titin-Phosphorylierungsstellen nach einer IL-6-Stimulation moduliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine kurzfristige Behandlung der Zellen mit IL-6 zu einem akuten Anstieg der PKC- α abhängigen PEVK-Phosphorylierung und Steigerung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit führt. Es wäre daher denkbar, dass die erhöhte Freisetzung von IL-6 innerhalb der ersten 24 Stunden nach I/R, die schnelle Erhöhung der passiven Spannung der Kardiomyozyten in der frühen Phase nach I/R zumindest teilweise erklären könnte. Kötter et al. (2016) haben gezeigt, dass Modifikationen der Titineigenschaften nach dem Myokardinfarkt auch *in vivo* durch IL-6 vermittelt werden können. In Mäusen, die vor dem Myokardinfarkt mit dem IL-6-Rezeptorantikörper Tocilizumab behandelt worden sind, wurde drei Tage nach dem Infarkt eine signifikant niedrigere passive Steifigkeit als in den unbehandelten Tieren festgestellt. 3 Wochen später wurde bei diesen Mäusen eine stärker ausgeprägte Dilatation sowie eine

Verdünnung des linken Ventrikels beobachtet, was im weiteren Verlauf zu häufigeren Herzrupturen führen könnte (Müller et al., 2014). Diese Befunde unterstützen die hier untersuchte Hypothese, dass die IL-6-abhängige Erhöhung der Titin-bedingten passiven Steifigkeit für die Stabilisierung des linken Ventrikels sorgen könnte.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine chronisch erhöhte Konzentration von IL-6 im Blutplasma der db/db Tiere beobachtet werden, die allerdings nach der I/R im Gegensatz zu gesunden Tiere durch noch unbekannte Mechanismen reduziert wurde. Auch die mRNA Expression von IL-6 im *remote* Myokard der db/db Mäuse, wurde in Folge eines Myokardinfarktes nicht erhöht. Eine Studie von Suchal et al. zeigte, dass die IL-6 Konzentration im Blutplasma der STZ-behandelten Ratten nach I/R im Vergleich mit diabetischen Sham operierten Tieren signifikant erhöht wurde (Suchal et al., 2017). Die Messung der IL-6 Konzentration erfolgte jedoch nach 45-minütiger Ischämie und 60-minütiger Reperfusion. Es könnte sein, dass zu dem späteren Zeitpunkt der Reperfusion zu Veränderungen der Mechanismen kommt, die die IL-6 Signaltransduktion hemmen (z.B. SOCS3 Proteine) oder an dem Abbau von IL-6 teilnehmen und im Resultat 24 Stunden nach einer Ischämie bei den db/db Tieren die Unterdrückung der Entzündung beobachtet wird. Eine Studie von Waern et al. zeigte, dass Mastzellen den Interleukin-6-Spiegel senken können. Aktivierung der Mastzellen führt zur Freisetzung der aktiven Serinprotease-Proteoglykane Komplexe. Diese Enzyme sind in der Lage IL-6 zu degradieren und könnten somit den IL-6-Spiegel bei den db/db Mäusen nach I/R vermindern (Waern et al., 2016). Da IL-6 *in vitro* zum Anstieg der PEVK-Phosphorylierung und Titin-abhängigen passiven Steifigkeit führte, kann man vermuten, dass die fehlende Erhöhung der IL-6 Konzentration *in vivo* bei db/db Mäusen nach I/R, einer der Gründe für den fehlenden Anstieg der passiven Spannung sein könnte.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Interleukin-6 die Titin-abhängige passive Steifigkeit direkt und akut modulieren kann und dass dieser Mechanismus zumindest teilweise die Modifikationen der passiven Spannung bei diabetischen Tieren nach einem Myokardinfarkt erklären kann.

4.6. Die Erhöhung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im *remote* Myokard ist transient

Kötter et al. (2016) haben festgestellt, dass die passive Spannung der Kardiomyozyten 3 Tage nach dem permanenten Myokardinfarkt immer noch erhöht war. 10 Tage nach dem Myokardinfarkt nahm die Titin-abhängige passive Steifigkeit dagegen wieder

signifikant ab. Genau in dieser Zeitspanne, zwischen dem 3. und 10. Tag wird die Kollagen-basierte Narbe im linken Ventrikel gebildet (Nah und Rhee, 2009). Es wurde postuliert, dass die Titin-abhängige Steifigkeit überflüssig wird, wenn es zur ECM-abhängigen Versteifung in dem Ventrikel kommt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Titinmodifikationen und Titin-abhängige passive Steifigkeit 3 Wochen nach einem Myokardinfarkt untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass zu diesem Zeitpunkt, die passive Spannung der Kardiomyozyten im *remote* Myokard vergleichbar mit der Steifigkeit des Sham-operierten Myokards war. Kötter et al. (2016) haben beobachtet, dass nach 10 Tagen die Phosphorylierung der PEVK-Region im *remote* Myokard normalisiert worden ist und die Phosphorylierung der S4010 signifikant reduziert wurde. In dem hier verwendeten Modell, war die PEVK-Phosphorylierung nach 3 Wochen jedoch ähnlich wie nach 24 Stunden erhöht. Zusätzlich wurde ein starker Trend zur Erhöhung der Phosphorylierung der N2-B(us)-Region beobachtet. Die gleichzeitige Phosphorylierung beider elastischer Titin Regionen könnte zu einem Ausgleichen der Effekte auf die passive Steifigkeit führen. Eine Veränderung der Signaltransduktion der PKC α , PKA oder PKG Kinasen zwischen dem 10. und 21. Tag nach einem Myokardinfarkt könnte die beobachteten Unterschiede der Titinphosphorylierung erklären. Es sollte auch beachtet werden, dass der Myokardinfarkt in den durch Kötter et al. (2016) durchgeführten Versuchen durch permanente LAD Ligatur initiiert wurde. In der vorliegenden Arbeit fand nach der Ischämie eine Reperfusion statt. Der Reperfusionsschaden könnte somit die modifizierte Titinphosphorylierung verursachen.

3 Wochen nach dem Myokardinfarkt war die mRNA Expression der ECM-Proteine im nicht-ischämischen Bereich des Herzens unverändert. Dies weist darauf hin, dass in dieser Phase die Kollagen-basierte Narbe schon gebildet worden ist und die Expression der ECM-Proteine nicht weiterhin erhöht werden muss. Die durchgeführten Versuche unterstützen die Hypothese, dass der akute Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit in dem nicht-ischämischen Myokard nur transient ist und nach der Ausbildung der Kollagenarbe wieder reduziert wird. Die mRNA Expression von IL-6 im *remote* Gebiet des Herzens war 3 Wochen nach Myokardinfarkt mit der Expression in den Sham-operierten Tieren vergleichbar. Trotzdem wurde die erhöhte PEVK-Phosphorylierung im *remote* Myokard beobachtet. Das weist darauf hin, dass neben IL-6 auch andere Faktoren die Titineigenschaften nach Myokardinfarkt modulieren.

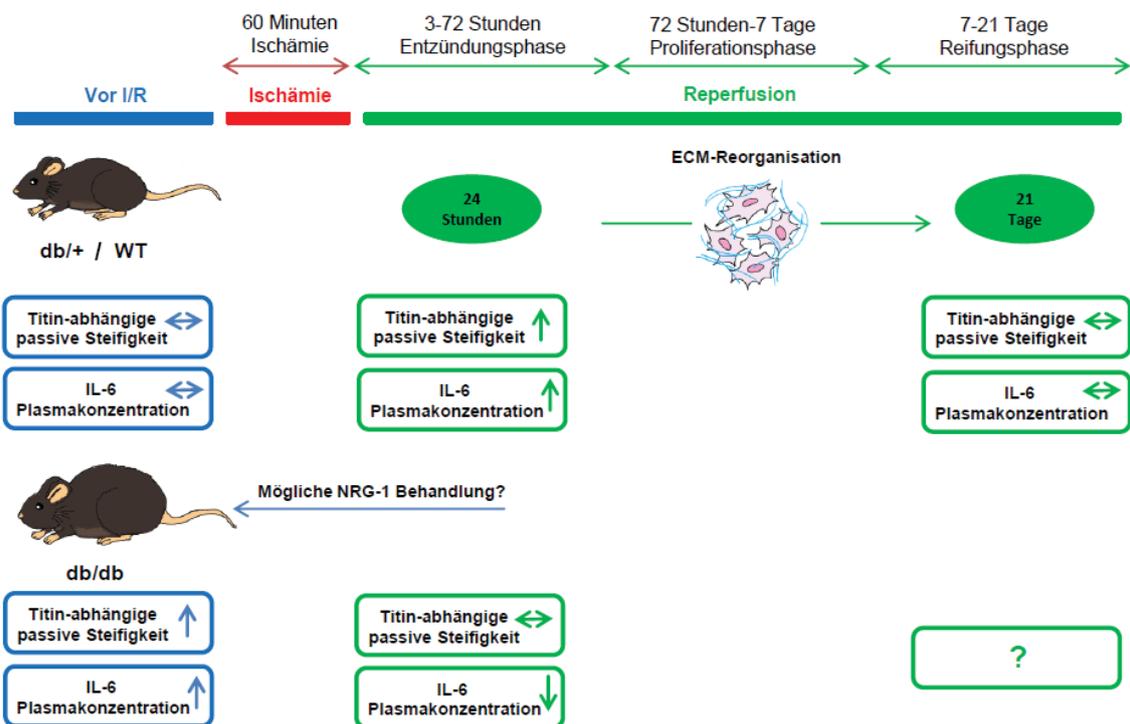


Abb.4.1. Veränderungen der Titineigenschaften und IL-6 Konzentration im *remote* Myokard nach Ischämie/Reperfusion bei db/+ oder WT und db/db Mäusen.

Die Daten zeigen, dass der initiale Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im *remote* Myokard transient ist. In den späteren Phasen der Myokardremodellierung, wenn die Kollagennarbe vorhanden ist, könnte diese für die strukturelle Stabilität des infarzierten Myokards sorgen, weshalb eine Titin-abhängige Versteifung der Kardiomyozyten nicht mehr nötig ist (Abb.4.1.).

4.7. Proteinqualitätskontrolle nach Myokardinfarkt und bei Typ-2-Diabetes

Proteasomaler Abbau

Titin ist auf Grund der enormen Größe sehr anfällig für die Fragmentierung und Degradation und gehört zu den ersten Proteinen, die in Folge einer Ischämie abgebaut werden (Hein et al., 1994). Kötter et al. konnten eine erhöhte Menge des proteolytischen Titinfragments (T2, ca.2 MDa) im *remote* Myokard feststellen, was auf einen gesteigerten Titin-Umsatz in diesem Bereich des infarzierten Herzens hinweist. Die Mechanismen des Titin Ab- und Umbaus sind bislang nur unzureichend untersucht. Inhibition des Proteasoms in embryonalen Rattenkardiomyozyten führte zum Anstieg der K48-abhängigen Polyubiquitinierung von Titin, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass ein Teil des Titin-Abbaus durch das Ubiquitin-Proteasom-System

katalysiert wird (Kötter et al., 2016). Es ist ebenso bekannt, dass die Proteindegradation auf Grund des Insulinmangels und der Insulinresistenz erhöht wird. Hu et al. konnten beweisen, dass Ubiquitin-Proteasom-System im diabetischen Herzen der STZ-Mäuse aktiviert wird (Hu et al., 2008). Somit könnte auch Titinumsatz im diabetischen Myokard betroffen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der Proteasomaktivität im *remote* Myokard nach einer I/R und damit verbundene mögliche Effekte auf den Titinumsatz getestet. Zusätzlich wurde überprüft, ob Diabetes diese Antwort auf eine I/R und somit den Titinabbau beeinträchtigen kann.

Kötter et al. haben 3 Tage nach permanenter LAD Ligation einen massiven Anstieg des ubiquitinierten Titins im *remote* Myokard trotz der erhöhten Trypsin-Proteasomaktivität festgestellt. 10 Tage nach MI wurde sowohl die Proteasomaktivität als auch Titinubiquitinierung wieder zu den basalen Werten reduziert. Es wurde postuliert, dass der erhöhte hämodynamische Stress einen gesteigerten Abbau der sarkomerischen Proteine, inklusive des Titifilaments, im *remote* Myokard induziert und dass trotz erhöhter Proteasomaktivität es in diesem Bereich zur Akkumulation ubiquitinerter Proteine kommt. Mit Beginn der Narbenbildung werden wahrscheinlich Stress und somit die zellulären Schäden in dem lebenden Myokard reduziert (Kötter et al., 2016). Die von mir durchgeführten Versuche unterstützen diese Hypothese. In der vorliegenden Arbeit konnte nämlich gezeigt werden, dass schon 24 Stunden nach einer Ischämie die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms wahrscheinlich auf Grund der erhöhten Proteasommenge im *remote* Gebiet des Herzens tendenziell erhöht wurde. Die Proteasomexpression wurde 3 Wochen nach dem Myokardinfarkt wieder normalisiert und mit Sham-operierten Tieren vergleichbar. Die Messungen der Proteasomaktivität zu diesem Zeitpunkt sollen noch durchgeführt werden, um dies bestätigen zu können.

Trotz der tendenziellen Erhöhung der Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms und des signifikanten Anstiegs der PSMA2 Expression im Herzen der diabetischen db/db Mäuse, scheint die Anpassungsreaktion im *remote* Myokard der diabetischen Tiere zumindest in der frühen Phase nach I/R nicht betroffen zu sein. Die Proteasomaktivität wird in Folge einer I/R weiter erhöht, so wie das der Fall bei den db/+ Tieren war. Es schließt jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass diese in der späteren Phase der Herzremodellierung beeinträchtigt wird und zum schlechteren Überleben der diabetischen Mäuse nach Myokardinfarkt beiträgt. Li et al. konnten zeigen, dass die proteasomale Aktivität nur 4 Wochen nach der STZ Behandlung erhöht war und 8

Wochen nach der STZ-Verabreichung vermindert worden ist. Man vermutet, dass die initiale Erhöhung der proteasomalen Aktivität ein kompensatorischer Mechanismus gegen erhöhten proteotoxischen Stress ist. Die Proteasomaktivität nimmt während der fortschreitenden Entwicklung des Diabetes ab, was durch bioenergetische Störung verursacht sein könnte (Li et al., 2017). Aus diesem Grund wäre es wichtig, die Diabetes-bedingte Modulierung des Proteasom-Ubiquitin-Systems und derer Einfluss auf Modifikationen des *remote* Myokards nach I/R in verschiedenen Stadien der Erkrankung zu analysieren. Die zukünftigen Studien sollten auch genauer untersuchen, ob die Modifikationen der proteasomalen Aktivität im *remote* Myokard der diabetischen Mäuse direkt zu modifizierten Titin-Umsatz führen.

Autophagie

Autophagie, die höchstwahrscheinlich auch an dem Abbau von Titin beteiligt ist, wurde in der frühen Phase nach I/R im *remote* Myokard der db/+ Tiere nicht beeinträchtigt. 3 Wochen später konnte beobachtet werden, dass die Expression von LC3 II, das während der Bildung der Autophagosome gebildet wird, signifikant erhöht wurde. Es soll jedoch beachtet werden, dass eine erhöhte LC3 II Expression auch auf eine Hemmung des Autophagosomsabbaus hinweisen kann. Da weder die Expression von p62, das bei der Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom abgebaut wird, noch AMPK Aktivität signifikant verändert wurden, kann man nicht eindeutig feststellen, ob Autophagie im *remote* Myokard 3 Wochen nach einer I/R gehemmt oder aktiviert wird. Weitere Analyse der Autophagiemarker sollte dies genauer überprüfen.

Die signifikant erhöhte LC3 II und die tendenziell verstärkte p62 Expression im diabetischen Myokard weist auf eine basale Beeinträchtigung der Autophagie bei db/db Mäusen hin. Ouyang et al. konnten ebenso zeigen, dass Diabetes die kardiale Autophagie unterdrückt und zur Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie beiträgt (Ouyang et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden in der frühen Phase nach I/R im diabetischen *remote* Myokard keine signifikanten Veränderungen der Autophagiemarker beobachtet. Es sollte jedoch weiter getestet werden, ob die Autophagie in den späteren Phasen der Remodellierung des diabetischen Myokards beeinträchtigt wird, und so zum gestörten Titin-Umsatz führt und zum schlechteren Überleben der diabetischen Patienten nach MI beitragen könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass proteasomaler Abbau, Autophagie und somit wahrscheinlich auch der Titinumsatz trotz der basalen Modifikationen auf

Grund der diabetischen Stoffwechsellage, in der akuten Phase nach einer I/R im *remote* Myokard der db/db Mäuse nicht beeinträchtigt werden.

4.8. Mögliche Behandlung der Diabetes-induzierten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit

Bislang ist es klinisch nicht möglich die erhöhte Mortalität der diabetischen Patienten nach Myokardinfarkt nur durch glykämische Kontrolle zu reduzieren (Patel et al., 2008). Aus diesem Grund sind neue Strategien nötig, die diabetische Patienten vor überschüssigem Ischämie/Reperfusion Schaden schützen könnten. Da die diastolische Dysfunktion ein Hauptmerkmal der diabetischen Kardiomyopathie ist und in einem hohen Maß durch posttranslationale Modifikation des Sarkomerproteins Titin verursacht wird, könnte eine therapeutische Intervention, die zur Normalisierung dieser pathologischen Modifikationen von Titin im diabetischen Herzen führt, durchaus erfolgsversprechend sein. Eine Verbesserung der diastolischen Elastizität könnte z.B. durch eine Erhöhung der Expression der elastischen N2BA Titinisoform oder Induzierung der Produktion der sogar mehr elastischen fetalen Isoform, erreicht werden. Manipulation des alternativen Spleißens von Titin durch Reduktion der Expression oder der Aktivität von RBM20 könnte hierfür eine mögliche Herangehensweise sein (Guo et al., 2012; LeWinter und Granzier, 2014). Die neuesten Studien von Liss und Mitarbeitern haben ein vielversprechendes Arzneimittel identifiziert – Kardenolide, die in der Lage sind, RBM20 zu inhibieren und Titin-Elastizität zu modulieren (Liss et al., 2018). Ein weiteres Beispiel der therapeutischen Anwendungen von Titineigenschaften im diabetischen Herzen ist Sildenafil, ein Inhibitor der Phosphodiesterase 5A (PDE5A). PDE5A ist ein Enzym das cGMP hydrolysiert und die PKG-Signaltransduktion beeinträchtigt. Durch die Hemmung von PDE5A erhöht Sildenafil die PKG-abhängige Phosphorylierung der N2B Region (Krüger et al., 2009; Bishu et al., 2011). Die beeinträchtigte cGMP Signaltransduktion kann auch pharmakologisch mit Sitagliptin (SITA), dem Inhibitor der Dipeptidylpeptidase-4 behandelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass SITA die cGMP Verfügbarkeit und PKG-vermittelte Titinphosphorylierung erhöht und auf diese Weise die Kardiomyozytensteifigkeit reduziert (Hamdani et al., 2014).

Neuere Studien berichten, dass der Wachstumsfaktor - Neuregulin-1 (NRG-1) ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung der diabetischen Kardiomyopathie sein könnte. Bei den STZ-behandelten Ratten wurde eingeschränkte Herzfunktion

festgestellt, die sich unter anderem durch den reduzierten linksventrikulären systolischen Druck (LVSP) und den erhöhten linksventrikulären diastolischen Druck (LVEDP) manifestiert hat. Die Behandlung mit rekombinantem humanen NRG-1 (rhNRG-1) konnte diese Symptome signifikant mildern und die Herzfunktion verbessern. Die genauen Mechanismen, die dazu geführt haben, sind aber noch nicht bekannt (Li et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob mit Hilfe von Neuregulin-1 die durch Diabetes induzierten Veränderungen der Titineigenschaften behandelt werden könnten. Es konnte gezeigt werden, dass die basal erhöhte Titin-abhängige passive Steifigkeit im diabetischen Herzen der db/db Tiere durch erhöhte PEVK-Phosphorylierung und reduzierte Phosphorylierung der N2-B(us) Region verursacht wird. Mit Hilfe der mit NRG-1 stimulierten adulten Rattenkardiomyozyten sollte getestet werden, ob die beobachteten Diabetes-induzierte Modifikationen von Titin durch NRG-1 normalisiert werden können. Nach einer 1-stündigen Behandlung der Zellen mit NRG-1 wurde eine Aktivierung der ERK 1/2 und eine Deaktivierung der PKC α mit entsprechender Erhöhung der Phosphorylierung von S4010 und Reduzierung der Phosphorylierung an der S11878 festgestellt. Diese Veränderungen wären in der Lage die Diabetes-induzierten Modifikationen der Titinphosphorylierung auszugleichen und somit die passive Spannung der Kardiomyozyten zu reduzieren. Hopf et al. haben *in vivo* Versuche mit Apolipoprotein E-defizienten Mäusen durchgeführt, bei denen *Diabetes mellitus* mit STZ induziert worden ist und getestet, ob eine NRG-1-Verabreichung die Diabetes-induzierten Modifikationen der Titineigenschaften normalisiert (Hopf et al., 2018). Die chronische Behandlung der Tiere mit NRG-1 hat die Diabetes-assoziierten Veränderungen der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit über erhöhte PKG und ERK 1/2, sowie reduzierte PKC α Aktivität neutralisiert.

Das Medikament Metformin, wird oft zur Senkung des erhöhten Blutzuckerspiegels bei der Behandlung von Typ-2-Diabetes Patienten eingesetzt. Eine Behandlung mit Neuregulin-1 (NRG-1) müsste also bei gleichzeitiger Gabe von Metformin erfolgen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich getestet, ob Metformin ähnlich wie NRG-1, die Titinphosphorylierung bei Diabetikern korrigieren könnte. Es wurde beobachtet, dass Metformin zwar in der Lage ist die N2-B(us) Phosphorylierung zu normalisieren, jedoch wurde gleichzeitig auch die PEVK-Phosphorylierung erhöht. Aus diesem Grund wurde anschließend analysiert, ob die vorteilhaften Effekte der NRG-1 Behandlung auch in der Anwesenheit von Metformin vorhanden sind. Nach der gleichzeitigen Behandlung der Kardiomyozyten mit Metformin und NRG-1 wurde festgestellt, dass NRG-1 nicht

mehr in der Lage ist, die PKC α -abhängige PEVK-Phosphorylierung zu reduzieren. Aus diesem Grund ist fraglich, ob eine NRG-1 Gabe in Metformin-behandelten Patienten sinnvoll wäre. Außerdem könnte die chronische Anwendung von NRG-1 bei Patienten, die unter diabetischer Kardiomyopathie leiden, auf Grund der pro-hypertrophischen Wirkung von NRG-1 negative Auswirkungen haben, und ggf. sogar eine kardiale Hypertrophie induzieren. Daher sollte in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss von NRG-1 auf die Modulation der Titineigenschaften *in vivo* bei Tieren mit Typ-2-Diabetes, bei gleichzeitiger Behandlung mit Metformin oder Insulin, intensiv erforscht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, auf welche Weise das NRG-1 die Titineigenschaften moduliert und dass diese Substanz die Diabetes-bedingten Veränderungen der Titinphosphorylierung normalisieren könnte.

4.9. Zusammenfassung

Zusammenfassend wird aus den Beobachtungen geschlossen, dass der initiale, Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im *remote* Myokard transient ist und nur in der frühen Phase der Myokardremodellierung für die Stabilität des nicht-ischämischen Myokards sorgt. Die vorliegende Arbeit zeigt auch zum ersten Mal, dass die diabetische Stoffwechsellage bei db/db Mäusen zu Veränderungen der Titineigenschaften führt, die die Anpassungsmechanismen nach Myokardinfarkt im *remote* Myokard beeinträchtigen können. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob die Modulation der Titin-basierten passiven Steifigkeit im diabetischen Herzen eine der Gründe des schlechteren Überlebens der diabetischen Patienten in Folge eines Myokardinfarkts ist. Die Veränderungen der Titineigenschaften in Folge eines Myokardinfarktes und bei db/db Mäusen könnten zumindest teilweise durch die Wirkung von Interleukin-6 erklärt werden. Diese Arbeit präsentiert auch den möglichen, therapeutischen Ansatz von Neuregulin-1 in der Behandlung der Diabetes-induzierten Modifikationen der passiven Steifigkeit. Die hier durchgeführten Studien weisen darauf hin, dass die Titin-abhängige passive Steifigkeit ein wichtiges Element der frühen funktionellen Adaptation des lebenden Myokards auf erhöhte mechanische und physiologische Ansprüche nach I/R ist, und dass diese adaptive Antwort durch diabetische Stoffwechsellage negativ beeinträchtigt werden könnte.

Originalarbeiten

- Hopf AE, Andresen C, Kötter S, **Isić M**, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M (2018) Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res* 123: 342-355.
- Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stühler K, **Isić M**, Krüger M, Schmitt JP (2018) Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 119:28-39.
- Kötter S, **Kazmierowska M**, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M (2016) Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res* 119:1017-1029.

Literaturverzeichnis

1. Aaronson PI, Ward JPT, Connolly MJ (2013) *The cardiovascular system at a glance* (4th ed.). Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell:88-89.
2. Ahmed AM (2002) History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 23:373-378.
3. Ait-Mou Y, Hsu K, Farman GP, Kumar M, Greaser ML, Irving TC, de Tombe PP (2016) Titin strain contributes to the Frank-Starling law of the heart by structural rearrangements of both thin- and thick-filament proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:2306-2311.
4. Alegre-Cebollada J, Kosuri P, Giganti D, Eckels F, Rivas-Pardo A, Hamdani N, Warren CM, Solaro RJ, Linke WA, Fernandez JM (2014) S-gluthathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell* 156:1235-1246.
5. Ansley DM, Wang B (2013) Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol* 229:232-241.
6. Antoons G, Sipido KR (2008) Targeting calcium handling in arrhythmias. *Europace* 10:1364-1369.
7. Aronson D, Rayfield E, Cheseboro J (1997) Mechanism determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 126:296-306.
8. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G (2011) Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*. 8:292-300.
9. Baliga RP, Pimental DR, Zhao YY, Simmons WW, Marchionni MA, Sawyer DB, Kelly RA (1999) NRG-1 induced cardiomyocyte hypertrophy: role of PI-3 kinase, p70 (S6K) and MEK-MAPK, RSK. *Am J Physiol* 277:H2026-H2037.
10. Banerjee S (2012) Insulin in acute myocardial infarction with diabetes. *Medicine Update* 22:240-248.
11. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89:1065–72.
12. Beedle AEM, Lynham S, Garcia-Manyes S (2016) Protein S-sulfenylation is a fleeting molecular switch that regulates non-enzymatic oxidative folding. *Nat Commun* 7:12490.
13. Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *K Leukoc Biol*; 81:1-5.
14. Bishu K, Hamdani N, Mohammed SF, Kruger M, Ohtani T, Ogut O, Brozovich FV, Burnett JC Jr, Linke WA, Redfield MM (2011) Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation* 124: 2882-2891.
15. Bockus LB, Humphries KM (2015) cAMP-dependent protein-kinase (PKA) signaling is impaired in the diabetic heart. *J Biol Chem* 290:29250-29258.
16. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC Jr (2007) Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension* 49:1128-1133.
17. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111:774–781.
18. Boudina S, Abel ED (2010) Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metabol Disord* 11:31-39.
19. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkenin JD (2004) PKC-

- alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10: 248-254.
20. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, Szweda LI (2001) Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 276:30057–30063.
 21. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, Szweda LI (2001) Oxidative modifications of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 276:30057-30063.
 22. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb, Wu Y, Trombitas K, Labeit S, Granzier H (2000) Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86:59-67.
 23. Cazorla O, Wu Y, Irving TC, Granzier H (2001) Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* 88:1028-1035.
 24. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo* 23:245-258.
 25. Chauveau C, Rowell J, Ferreiro A (2014) A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat* 35:1046–1059.
 26. Christia P, Frangogiannis NG (2013) Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 43:986-995.
 27. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ (1995) Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart *Am J Pathol* 147:325-338.
 28. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, Récalde A, Zouggari Y, Yin KY, Bruneval P, Renault G, Marchiol C, Bonnin P, Lévy B, Bonecchi R, Locati M, Combadière C, Silvestre JS (2012) The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2206-2213.
 29. Cohen MV, Yang XM, Neumann T, Heusch G, Downey JM (2000) Favorable remodeling enhances recovery of regional myocardial function in the weeks after infarction in ischemically preconditioned hearts. *Circulation* 102:579-583.
 30. Cote GM, Miller TA, LeBrasseur NK, Kuramochi Y, Sawyer DB (2005) Neuregulin 1-alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res* 311:135-146.
 31. Couchonnal LF, Anderson ME (2008) The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 23:151-159.
 32. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JPT, Lennon L, Eiriksdottir G, Rumley A, Whincup PH, Lowe GDO, Gudnason V (2008) Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS medicine* 5: e78.
 33. Dastidar AG, McAlindon E, Rodrigues JC, Baritussio A, Scatteia A, De Garate E, Lawton CB, Bucciarelli-Ducci Chiara (2016) Remote myocardium is also affected in acute myocardial infarction: evidence from advanced CM relaxometry. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 18: P219.
 34. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Hunt G, Wu WJ, Tan W, Bolli R (2004) IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res* 64:61–71.
 35. De Resende MM, Kauser K, Mill JG (2006) Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Scie* 78:3066-3073.
 36. Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burrell LM (2005) Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *53:1245-1256*.

37. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangiogannis NG (2010a) The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48:504-511.
38. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangiogannis NG (2010b) CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol* 176:2177-2187.
39. Dos Remedios, Gilmour (2017) An historical perspective of the discovery of titin filaments. *Biophys Rev* 9:179-188.
40. Echouffo-Tcheugui JB, Kolte D, Khera S, Aronow HD, Abbott JD, Bhatt DL, Fonarow GC (2018) Diabetes mellitus and cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Am J Med* 131:778-786.
41. Eltschig HK, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 17:1391-1401.
42. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK (2005) Cardiac remodelling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol* 14:1-11.
43. Figueiredo-Freitas C, Dulce RA, Foster MW, Liang J, Yamashita AM, Lima-Rosa FL, Thompson JW, Moseley MA, Hare JM, Nogueira L, Sorenson MM, Pinto JR (2015) S-Nitrosylation of sarcomeric proteins depresses myofilament Ca²⁺ sensitivity in intact cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal* 23:1017-1034.
44. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D (2015) The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* 74:62-68.
45. Frangiogannis NG (2006a) Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr med chem* 13:1877–93.
46. Frangiogannis NG (2006b) The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal* 8:1907-39
47. Frangiogannis NG (2014) The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nat Rev Cardiol* 11:255-265.
48. Frangiogannis NG, Mendoza LH, Smith CW, Michael LH, Entman ML (2000) Induction of the synthesis of the C-X-C chemokine interferon-gamma-inducible protein-10 in experimental canine endotoxemia. *Cell Tissue Res*. 302:365-76.
49. Frangiogannis NG, Smith CW, Entman ML (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53:31–47.
50. Franssen C, González Miqueo A (2016) The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24: 259-267.
51. French BA und Kramer CM (2007) Mechanisms of post-infarct left ventricular remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech* 4:185-196.
52. Fukazawa R, Miller TA, Kuramochi Y, Frantz S, Kim YD, Marchionni MA, Kelly RA, Sawyer DB (2003) Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Moll Cell Cardiol* 35:1473-1479.
53. Fukuda N, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S (2010) Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. *J Moll Cell Cardiol* 48:876-881.
54. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL (2005) Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol* 125:257-71.
55. Gautel M (2011) Cytoskeletal protein kinase: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch* 462:119-134.
56. Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Fürst DO (1996) The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* 109: 2747-2754.
57. Gautel M, Leonard K, Labeit S (1993) Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J* 12:3827-3834.
58. Geraldès P, King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106:1319-1331.

59. Gombozhapova A, Rogovskaya Y, Shurupov V, Rebenkova M, Kzhyshkowska J, Popov S, Karpov R, Ryabov V (2017) Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling. *Journal of Biomedical Science* 24:13.
60. Granger CB, Califf RM, Young S, Candela R, Samaha J, Worley S, Kereiakes DJ, Topol EJ (1993) Outcome of patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents. The Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *J Am Coll Cardiol* 21:920-925.
61. Granzier HL, Irving TC (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules and intermediate filaments. *Biophys J* 68:1027-1044.
62. Gräter F, Shen J, Jiang H, Gautel M, Grubmüller H (2005) Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J* 97:825-834.
63. Greaser ML, Berri M, Warren CM, Mozdziak PE (2002) Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 23:473-482.
64. Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS (2005) Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 26:389-400.
65. Grützner A, Garcia-Manyes S, Kötter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA (2009) Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J* 97:825-834.
66. Gui C, Zhu L, Hu M, Lei L, Long Q (2011) Neuregulin-1/ErbB signaling is impaired in the rat model of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 21:414-420.
67. Guo W, Schafer S, Greaser ML, Radke MH, Liss M, Govindarajan T, Maatz H, Schulz H, Li S, Parrish AM, Dauksaite V, Vakeel P, Klaassen S, Gerull B, Thierfelder L, Regitz-Zagrosek V, Hacker TA, Saube KW, Dec GW, Ellinor PT, MacRae CA, Spallek B, Fischer R, Perrot A, Ozcelik C, Saar K, Hubner N, Gotthardt M (2012) RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nat Med* 18:766-773.
68. Haas AV, McDonnell ME (2017) Pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 47:51-63.
69. Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, Plettig L, López B, Ottenheijm CA, Becher PM, González A, Tschöpe C, Díez J, Linke WA, Leite-Moreira AF, Paulus WJ (2013a) Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 6:1239-1249.
70. Hamdani N, Hervent AS, Vandekerckhove L, Matheeußen V, Demolder M, Baerts L, De Meester I, Linke WA, Paulus WJ, De Keulenaer GW (2014) Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovasc Res* 104:423-431.
71. Hamdani N, Herwig M, Linke WA (2017) Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev* 9:225-237.
72. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios CD, Duncker DJ, Stienen GJ, van der Velden J (2008) Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 77:649-658
73. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA (2013b) Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 112:64-674.
74. Hanson J, Huxley HE (1953) Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 172:530-532.
75. Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R, Arai T, Taguchi H, Yanagida M, Hirner S, Labeit D, Labeit S, Sorimachi H (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Mol Biol* 282:14801-14814.

76. Hayat SA, Patel B, Khattar RS, Malik RA (2004) Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin Sci* 107:539-557.
77. He C, Zhu H, Li H, Zou MH, Xie Z (2013) Dissociation of Bcl-2-Bcln1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes* 62:1270-1281.
78. Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A, Schaper J (1994) Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26:1291-1306.
79. Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsaprailis G, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier HL (2013b) The multifunctional Ca (2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol* 54:90–97.
80. Hidalgo CG, Granzier H (2013) Tuning the molecular giant titin through phosphorylation-role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med* 23:165-171.
81. Hidalgo CG, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105:631–638.
82. Hidalgo CG, Methawasin M, Chung C, Bogomolovas J, Gasch A, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier H (2012) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protei kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates titin N2B and PEVK spring elements. *Biophys J* 102:559a.
83. Holbro T, Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:195-217.
84. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isi \acute{c} M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röll W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M (2018) Diabetes-induced cardiomyocyte passive stiffening is caused by impaired insulin-dependent titin modification and can be modulated by neuregulin-1. *Circ Res* 123:342-355.
85. Horowitz R (1999) The physiological role of titin in striated muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 138:57-96.
86. Hsin J, Strümpfer J, Lee EH, Schulten K (2011) Molecular origin of the hierarchical elasticity of titin: simulation, experiment and theory. *Annu Rev Biophys* 40:187-203.
87. Hu J, Klein JD, Du J, Wang XH (2008) Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitinproteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology* 149:5384–5390.
88. Hudson BD, Hidalgo CG, Gotthard M, Granzier HL (2010) Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *J Mol Cell Cardiol* 48:972-978.
89. Iwasaka T, Takahashi N, Nakamura S, Sugiura T, Tarumi N, Kimura Y, Okubo N, Taniguchi H, Matsui Y, Inada M (1992) Residual left ventricular pump function after acute myocardial infarction in NIDDM patients. *Diabetes care* 15:1522-1526.
90. Iyer RP, Patterson NL, Zouein FA, Ma Y, Dive V, de Castro Bras LE, Lindsey ML (2015) Early matrix metalloproteinase-12 inhibition worsens post-myocardial infarction cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. *Int J Cardiol* 185:198-208.
91. Jaffe AS, Spadaro JJ, Schechtman K, Roberts R, Ge-Itman EM, Sobel BE (1984) Increased congestive heart failure after myocardial infarction of modest extent in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 108:31-37.
92. Jia G, Hil MA, Sowers JR (2018) Diabetic cardiomyopathy. An update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ Res.* 122(14):624-638.
93. Jiang L, Huang Y, Hunyor S, dos Remedios CG (2001) Cardiomyocyte apoptosis is associated with increased wall stress in chronic failing left ventricle. *Eur Heart J* 24:742-751.
94. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S (2014) Patophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. *Lancet* 383:1068-1083.

95. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Ono K, Nagao K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Kawasaki M, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S (2011) Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: 2261-2271.
96. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP (1974) Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol.* 34:29-34.
97. Keeley EC, Boura JA, Grines CL (2003) Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 361:13-20.
98. Kjaergaard SC, Hansen HH, Fog L, Bulow I, Christensen PD (1993) In-hospital outcome for diabetic patients with acute myocardial infarction in the thrombolytic era. *Scand Cardiovasc J* 33:166-170.
99. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE (2011) Left ventricular remodeling in heart failure. *JACC: Cardiovascular Imaging* DOI: 10.1016/j.jcmg.2010.10.008
100. Kötter S, Gout L, von Frieling-Salewsky, Müller AE, Helling S, Marcus K, dos Remedios C, Linke WA, Krüger M (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 99:648-656.
101. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Goressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M (2016) Titin-based cardiac myocyte stiffening contributes to early adaptive ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 119:1017-1029.
102. Kötter S, Andresen C, Krüger M (2014a) Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem* 395:1341-1352.
103. Kötter S, Unger A, Hamdani N, Lang P, Vorgerd M, Nagel-Steger L, Linke WA (2014b) Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol* 204:187-202.
104. Krüger (2015) Chapter: Posttranslational modification of the titin springs: dynamic adaptation of passive sarcomere stiffness. *Cardiac cytoarchitecture: How to maintain a working heart.* Springer International Publishing Switzerland.
105. Krüger M, Babicz K, von Frieling-Salewsky M, Linke WA (2010) Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Moll Cell Cardiol.* 48:910-916.
106. Krüger M, Kötter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104:87-94.
107. Krüger M, Linke WA (2006) Protein kinase A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 27:435-444.
108. Krüger M, Linke WA (2009) Titin-based mechanical signaling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46:490-498.
109. Krüger M, Linke WA (2011) The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem* 286:9905-9912.
110. Krüger M, Sachse C, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Klede S, Linke WA (2008) Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ Res* 102:439-447.
111. Krysiak J, Unger A, Beckendorf L, Hamdani N, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, dos Remedios CG, Sheikh F, Gergs U, Boknik P, Linke WA (2018) Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat Commun* 9:262.
112. Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H (2004) Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* 94:505-513.

113. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L, Ehler E, Udd B, Gautel M (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308:1599-1603.
114. Lee EH, Hsin J, Mayans O, Schulten K (2007) Secondary and tertiary structure elasticity of titin Z1Z2 and a titin chain model. *Biophys J* 93:1719-1735.
115. Lemmens K, Doggen K, De Keulenaer GW (2007) Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease. Implications for therapy of heart failure. *Circulation* 116:954-960.
116. Lemmens K, Fransen P, Sys SU, Brutsaert DL, De Keulenaer GW (2004) Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* 109:324-326.
117. LeWinter MM, Granzier H (2014) Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 63:207-212.
118. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H (2007) Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta* 375:1-9.
119. Li B, Tian J, Sun Y, Xu TR, Chi RF, Zhang XL, Hu XL, Zhang Y, Qin FZ, Zhang WF (2015) Activation of NADPH oxidase mediates increased endoplasmic reticulum stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rabbits. *Biophysica Acta* 1852:805-815.
120. Li B, Zheng Z, Wei Y, Wang M, Peng J, Kang T, Huang X, Xiao J, Li Y, Li Z (2011) Therapeutic effects of neuregulin-1 in diabetic cardiomyopathy rats. *Cardiovasc Diabetol* 10:69.
121. Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, Marszalek PE, Fernandez JM (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 418:998–1002.
122. Li J, Ma W, Yue G, Tang Y, Kim I, Weintraub NL, Wang X, Su H (2017) Cardiac proteasome functional insufficiency plays a pathogenic role in diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.11.013
123. Liehn EA, Postea O, Curaj A, Marx N (2011) Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality. *J Am Coll Cardiol* 58:2357-2362
124. Lindsey ML, Mann DL, Entman ML, Spinale FG (2003) Extracellular matrix remodeling following myocardial injury. *Ann Med* 35:316-326.
125. Linke WA (2018) Titin gene and protein functions in passive and active muscle. *Annu Rev Physiol* 80:389-411.
126. Linke WA, Grützner A (2008) Pulling single molecules of titin by AFM—recent advances and physiological implications. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 456:101-115.
127. Linke WA, Hamdani N (2014) Gigantic business. Titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 114:1052-1068.
128. Linke WA, Popov VI, Pollack GH (1994) Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J* 67:782-792.
129. Liss M, Radke MH, Eckhard J, Neuenschwander M, Dauksaite V, von Kries JP, Gotthardt M (2018) Drug discovery with an RBM20 dependent titin splice reporter identifies cardenolides as lead structures to improve cardiac filling. *PLoS One* 13: e0198492.
130. Lundby A, Secher A, Lage K, Nordsborg NB, Dmytriyev A, Lundby C, Olsen JV (2012) Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues. *Nat Commun* 3:876.
131. Ma S, Wang Y, Chen Y, Cao F (2015) The role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 1852:271-276.
132. Mak KH, Moliterno DJ, Granger CB, Miller DP, White HD, Wilcox RG, Califf RM, Topol EJ (1997) Influence of diabetes mellitus on clinical outcome in the thrombolytic era of acute myocardial infarction. GUSTO-I Investigators. Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. *J Am Coll Cardiol* 30:171-179.

133. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95:708–716.
134. Malmberg KA, Efendic S, Rydén LE (1994) Feasibility of insulin-glucose infusion in diabetic patients with acute myocardial infarction. A report from the multicenter trial: DIGAMI. *Diabetes care* 17:1007-1114.
135. Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, Siniscalchi M, Martis S, Ferraraccio F, Guastafierro S, Nicoletti G, Barbieri M, Coppola A, Rossi F, Paolisso G, D'Amico M (2008) The ubiquitin-proteasome system contributes to the inflammatory injury in ischemic diabetic myocardium: the role of glycemic control. *Cardiovasc Pathol* 18: 332-345.
136. Maruyama K, Matsubara S, Natori R, Nonomura Y, Kimura S (1977) Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function. *J Biochem* 82:317–337.
137. Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE, Kaye D (2018) Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy. *JACC* 71:339-351.
138. Matsui Y, Morimoto J, Uede T (2010) Role of extracellular matrix proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World Journal of Biological Chemistry* 1:69-80.
139. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M (1998) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395:863-869.
140. Mebratu Y und Tesfaigzi (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8:1168-1175.
141. Mescher A (2009) Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12. Edition. McGraw-Hill Education Ltd
142. Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP (2011) Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44:890-898.
143. Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 333:951-964.
144. Mukamal KJ, Nesto RW, Cohen MC, Muller JE, Maclure M, Sherwood JB, Mittleman MA (2001) Impact of diabetes on long-term survival after acute myocardial infarction: comparability of risk with prior myocardial infarction. *Diabetes care* 24:1422-1427.
145. Müller J, Goressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschner I, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J, Fischer JW (2014) Interleukin-6 dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 109:440.
146. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110:155–162.
147. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106:1333–1341.
148. Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA (2003) Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil* 24:175-189.
149. Neumann DA (2008) Kinesiology of the Musculoskeletal System: Foundations for Rehabilitation (2. Edition) St. Louis [u.a.]: Mosby.
150. Ouyang C, You J, Xie Z (2014) The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol* 71:71-80.
151. Pape HS, Kurtz A, Silbernagl S (2014) Physiologie (7., Vollständig überarb. Aufl.) Stuttgart [u.a.]: Thieme.

152. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F (2008) Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358:2560-2572.
153. Paulson DJ (1997) The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 34:104-112.
154. Politou AS, Thomas DJ, Pastore A (1995) The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J* 69:2601–2610
155. Prabhu S, Frangogiannis NG (2016) The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. From Inflammation to fibrosis. *Circulation Research* 199:91-112.
156. Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Krüger M, Opitz CA, Linke WA (2005) Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol* 126:461-480.
157. Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schäfer LV, Brandmeier B, Gräter F, Grubmüller H, Gaub HE, Gautel M (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13385-13390.
158. Qu D, Liu J, Lau CH, Huang Y (2014) IL-6 in diabetes and cardiovascular complications. *Br J Pharmacol* 171:3595-3603.
159. Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Ziesenniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F (2012) *J Biol Chem* 287:29273-29284.
160. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80:227-236.
161. Santos PE, Barcellos LC, Mill JG, Masuda MO (1995) Ventricular action potential and L-type calcium channel in infarct-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6:1004-1014.
162. Savvatis K, Müller I, Fröhlich M, Pappritz K, Zietsch C, Hamdani N, Grote K, Schieffer B, Klingel K, Van Linthout S, Linke WA, Schultheiss HP, Tschöpe C (2014) Interleukin-6 receptor inhibition modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis. *Basic Res Cardiol* 109:449.
163. Scheller J, Rose-John S (2006) Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195:173-183.
164. Schilling JD, Mann DL (2012) Diabetic cardiomyopathy: bench to bedside. *Heart Fail Clin* 8:619-631.
165. Schömig A, Haass M, Richardt G (1991) Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 12 Suppl F:38-47.
166. Sebestyen MG, Wolff JA, Greaser ML (1995) Characterization of a 5,4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci* 108:3029-3037.
167. Solomon SD, St John SM, Lamas GA, Plappert T, Rouleau JL, Skali H, Moya L, Braunwald E, Pfeffer MA (2002) Ventricular remodeling does not accompany the development of heart failure in diabetic patients after myocardial infarction. *Circulation* 106:1251-1255.
168. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-817.
169. St. John Sutton MG and Sharpe N (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 101:2981-2988.
170. Stein B, Weintraub WS, Gebhart SSP, Cohen-Bernstein CL, Grosswald R, Liberman HA, Douglas JS, Morris DC, King SB (1995) Influence of diabetes mellitus on early

- and late outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 91:979-989.
171. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T, Braunwald E, Jaffe AS, MILIS Study Group (1989) The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol* 14:49-57.
 172. Stuart SDF, De Jesus NM, Lindsey ML, Ripplinger CM (2016) The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91:114-122.
 173. Suchal K, Malik S, Khan SI, Malhotra RK, Goyal SN, Bhatia JB, Kumari S, Ojha S, Arya DS (2017) Protective effect of mangiferin on myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE/MAPK pathways. *Sci Rep* 7:42027.
 174. Takemura G, Miyata S, Kawase Y, Okada H, Maruyama R, Fujiwara H (2006) Autophagic degeneration and death of cardiomyocytes in heart failure. *Autophagy* 2: 212–214.
 175. Talman V und Ruskoaho H (2016) Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res* 365:563-581.
 176. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*; 94:276-283.
 177. Trombitas K, Redkar A, Centner T, Wu Y, Labeit S, Granzier H (2000) Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophys J* 79:3226-3234.
 178. Van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJA (2007). Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 170:818-829.
 179. Vassalli G, Milano G, Moccetti T (2012) Role of mitogen-activated protein kinases in myocardial ischemia-reperfusion injury during heart transplantation. *J Transplant* 2012:928954.
 180. Waern I, Karlsson I, Pejler G, Wernersson S (2016) IL-6 and IL-17A degradation by mast cells is mediated by a serglycin: serine protease axis. *Immunity, Inflammation and Disease* 4:70-79.
 181. Wang K, McClure J, Tu A (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *PNAS* 76:3698–3702.
 182. Wang X, Guo Z, Ding Z, Mehta JL (2018) Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 7: e008024.
 183. Warren CM, Krzesinski PR, Campbell KS, Moss RL, Greaser ML (2004) Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mech Dev* 121:1301-1312.
 184. Weber KT, Sun Y, Bhattacharaya SK, Ahokas RA, Gerling IC (2013) Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodeling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 10:15-26.
 185. Welc SS, Clanton TL (2013) The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol* 98:359-371.
 186. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, Waksman R, Bonow RO, Wu E, Epstein SE (2016) Inflammation as a driver of adverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 17:2050-2060.
 187. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S (2005) MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 350:713-722.
 188. Wollert KC, Drexler H (2001) The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart failure reviews* 6:95–103.

189. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H (2002) Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 90:1181-1188.
190. Yang S, Zheng R, Hu S, Ma Y, Choudhry MA, Messina JL, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH (2004) Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2183–91.
191. Young ME, McNulty P, Taegtmeyer H (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: part II. Potential mechanisms. *Circulation* 109:121-130.
192. Young-Nah D, Rhee MY (2009) The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean Circulation Journal*, DOI 10.4070 / kj.2009.39.10.393
193. Zarich SW, Nesto RW (2007) Cardiovascular effects of acute hyperglycemia in STEMI. Implications and treatment of acute hyperglycemia in the setting of acute myocardial infarction. *Circulation* 115:436-439.
194. Zhang M, Kass DA (2011) Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol Sci* 32:360-365.
195. Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA, Kelly RA (1998) Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes: persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273: 10261-10269.
196. Zou N, Ao L, Cleveland JC Jr, Yang X, Su X, Cai GY, Banerjee A, Fullerton DA, Meng X (2008) Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*; 294:H2805-2813.
197. Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, Huebener P, Taffet G, Entman M, Frangogiannis NG (2007) Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 74:313-322.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, welche auf die eine oder andere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Martina Krüger, die mir das Thema überlassen hat und mit großem Interesse den Fortgang der Untersuchungen verfolgt hat. Ich bin für Ihre stete Hilfsbereitschaft, engagierte Betreuung und vor allem für Ihren Optimismus in Momenten der Verzweiflung sehr dankbar.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens und das Mentoring bedanke ich mich auch bei Prof. Ulrich Rüter.

Ich bedanke mich ebenso herzlich für die freundliche Aufnahme, angenehme Arbeitsatmosphäre, tolle Zeit im Labor sowie während zahlreicher Sommerfeste, Weihnachtsfeiern und verschiedener Konferenzen bei allen Mitarbeitern und Medizindoktoranden der AG Krüger. Mein besonderer Dank gilt für Dr. Sebastian Kötter, der mit seinem Rat zur Seite stand und mich in die Kraftmessung eingeführt hat. Frau Sabine Bongardt danke ich für Ihre fachliche Unterstützung, die Einführung in die Isolation der adulten Rattenkardiomyozyten sowie nette gemeinsame Zeit im Büro. Bedanken möchte ich mich natürlich auch für viele ermunternde und aufbauende Gespräche bei meiner Promotionskommilitonin Senem Salcan.

Ein großer Dank gilt für Prof. Axel Gödecke und Mitarbeiter seiner AG für die gemeinsame Zeit im Institut sowie die Möglichkeit der Mitbenutzung verschiedener Geräte.

Ich möchte mich bei diesem Anlass auch bei Prof. Joachim Schmitt und seiner AG für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 1116 und für seine Unterstützung bei den OPs bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier für Dr. Annette Kronenbitter, die bei diesem Projekt eine große Hilfe war und die adulten Mausekardiomyozyten für die Kraftmessungen isoliert hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der SFB Facility: Dr. Simone Goressen und Herrn Dominik Semmler für die Einführung in das Modell der Ischämie/Reperfusion bei geschlossenem Thorax und das Operieren der Mäuse bedanken. Dem Herrn Semmler bin ich für die OPs der db/db Mäuse besonders dankbar.

Für die Bereitstellung von Interleukin-6 bedanke ich mich beim Prof. Scheller. Dem Prof. Klöcker bin ich ebenso für die Möglichkeit der Benutzung des Western Blot Imagers dankbar.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Der Dr. Sandra Berger aus dem SFB Büro danke ich ganz herzlich für die stetige Hilfe bei den organisatorischen Angelegenheiten.

Na koniec chciałabym serdecznie podziękować moim najbliższym, moim dziadkom Krystynie i Józefowi, cioci Danusi i wujkowi Robertowi, jak również moim najlepszym przyjaciółkom Ani, Beacie, Besmi i Monice, za to, że zawsze mnie wspierali, trzymali za mnie kciuki i wierzyli we mnie w momentach największego zwątpienia.

Am Ende möchte ich mich bei meinem Ehemann Mirsad bedanken, der für mich die größte Stütze während der Anfertigung dieser Arbeit war.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 22.10.2018

Malgorzata Isic

Lebenslauf

Person

Name Malgorzata Isić
Geburtsname Kaźmierowska
Geburtsdatum 09.07.1990
Geburtsort Rypin, Polen
Staatsangehörigkeit polnisch
Familienstand verheiratet

Promotion

03/2015-2018 Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225
Düsseldorf
Doktormutter: Prof. Dr. Martina Krüger
Thema Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf adaptive
Titin Modifikationen nach myokardialer
Ischämie/Reperfusion

Studium

03/2015 Beginn der **Promotion** am Institut für Herz- und
Kreislaufphysiologie, Düsseldorf
10/2012-09/2014 **Masterstudium: Biotechnologie** an der Nikolaus-
Kopernikus-Universität in Toruń, Polen
10/2013-06/2014 Erasmus Studentenaustausch an der Westfälischen
Wilhelms-Universität in Münster
10/2009-06/2012 **Bachelorstudium: Biotechnologie** an der Nikolaus-
Kopernikus-Universität in Toruń, Polen

Schulbildung

09/2006-06/2009 Allgemeinbildendes Lyzeum in Lidzbark Warmiński,
Polen, **Abitur**
09/2003-06/2006 Gymnasium Nr. 1 in Lidzbark Warmiński, Polen
09/1997-06/2003 Johannes-Paul-II-Grundschule in Rypin, Polen

Düsseldorf, den 22.10.2018

XXII