

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

**Einfluss β -adrenerger Stimulation auf die kardiale
Myofilamentsteifigkeit**

Dissertation

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

vorgelegt von
Philipp Michael Johannes Lassak
(2019)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zusammenfassung - deutsch

Die autonome Funktion des Herzens wird durch das vegetative Nervensystem reguliert. Am Arbeitsmyokard wird eine Steigerung der Leistung über die Bindung von Katecholaminen an β -Adrenorezeptoren (β -AR) vermittelt. Die Aktivierung des klassischen β -adrenergen Signalwegs in Kardiomyozyten resultiert in einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A (PKA). In den Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards werden von der PKA unter anderem die L-Typ-Kalziumkanäle und das die SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) inhibierende Phospholamban phosphoryliert, was zu einer Zunahme des Kalziumein- bzw. ausstroms während der Herzaktion führt. Des Weiteren werden die Proteine Myosin-binding-Protein C (MyBP-C) und Troponin I im Myofilament PKA-abhängig phosphoryliert; dies bewirkt zusammen eine Steigerung der Inotropie und Lusitropie. Ein Ziel dieser Arbeit war aufzuklären, ob auch Titin im Rahmen β -adrenerger Stimulation PKA-abhängig phosphoryliert wird und über eine daraus resultierende Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit zur positiven Lusitropie beitragen kann.

Titin bildet zusammen mit dem dicken und dünnen Filament das Sarkomer, die kleinste funktionelle Einheit der Herz- und Skelettmuskulatur. Ein Titinmolekül überspannt ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Bande. Durch seine elastischen Eigenschaften im I-Band bestimmt Titin die passive Myofilamentsteifigkeit. Neben der vor allem aus kollagenem Bindegewebe bestehenden extrazellulären Matrix ist Titin ein bestimmender Faktor der passiven Steifigkeit der Herzmuskulatur, die für die diastolische Funktion des Herzens von großer Bedeutung ist.

Außerdem spielt das Titinfilament, das als einziges Filament über die gesamte Länge des Sarkomers ausgebildet ist, eine entscheidende Rolle im Rahmen der längenabhängigen Aktivierung. Die längenabhängige Aktivierung bildet die molekulare Grundlage des Frank-Starling-Gesetzes des Herzens, das den Zusammenhang der Steigerung des Auswurfvolumens bei Steigerung des enddiastolischen Volumens der Ventrikel beschreibt.

Die passive Steifigkeit von Titin kann unter anderem durch Phosphorylierung elastischer I-Band-Regionen moduliert werden (Linke und Hamdani, 2014). Eine PKA- (Yamasaki *et al.*, 2002, Krüger und Linke, 2006), PKG- (Krüger *et al.*, 2009) und ERK-abhängige (Raskin *et al.*, 2012, Perkin *et al.*, 2015) Phosphorylierung der N2-B *unique sequence* (N2-Bus) im I-Band von Titin führt zu einer Verminderung der passiven Steifigkeit. Eine PKC α -abhängige Phosphorylierung der PEVK-Region, die hauptsächlich aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) besteht und auch im I-Band von Titin liegt, führt zu einer Steigerung der passiven Steifigkeit (Hidalgo *et al.*, 2009). CaMKII δ phosphoryliert sowohl die N2-Bus als auch die PEVK-Region und führt zu einer Verminderung der passiven Steifigkeit (Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013). Mittels Massenspektrometrie wurden Serin- und Threonin-Reste innerhalb der N2-Bus und der PEVK-Region identifiziert, die von den oben genannten Kinasen phosphoryliert werden. In der N2-Bus konnte unter anderem die konservierte PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle S4010 identifiziert werden (Kötter *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss β -adrenerger Stimulation auf die passive Myofilamentsteifigkeit zunächst an isolierten adulten Rattenkardiomyozyten untersucht. In diesem Modell wurden über den gesamten Sarkomerlängenbereich tendenziell erniedrigte passive Kräfte im Vergleich zur Kontrolle gemessen, die jedoch nur bei einer Sarkomerlänge von 2,2 μ m eine statistisch signifikante Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit zeigten. Die Titinphosphorylierung wurde mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot analysiert und zeigte sich an der Phosphorylierungsstelle S4010 in der N2-Bus für mit Isoproterenol oder mit dem β -Blocker Propranolol behandelten Kardiomyozyten nicht signifikant verändert.

In weiteren Untersuchungen an isolierten, retrograd perfundierten Mäuseherzen wurde für eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol eine signifikante Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit in Einzelzellmessungen nachgewiesen. Diese Änderungen der passiven Myofilamentsteifigkeit liegen im physiologischen Bereich, der in der Literatur mit 1,7 bis 2,3 μ m angegeben wird (Allen und Kentish, 1985). Es ist somit anzunehmen, dass die hier nachgewiesene Änderung der passiven Myofilamentsteifigkeit auch im intakten Organ zu dem positiv lusitropen Effekt der β -adrenergen Stimulation beiträgt. Der Einsatz von Propranolol führte hier zu keiner signifikanten Änderung der passiven Steifigkeit. Die Analyse der Titinphosphorylierung erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot an vier unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen – S4010 und S4099 in der N2-Bus, S11878 und S12022 in der PEVK-Region. Die vermutete Steigerung der PKA-abhängigen Phosphorylierung an S4010 konnte für eine alleinige Stimulation mit Isoproterenol nicht nachgewiesen werden. Dafür konnte bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Propranolol und Isoproterenol, bei Überwiegen der β -adrenergen Stimulation, eine statistisch signifikante Steigerung der Phosphorylierung an S4010 gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die signifikante Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit nach β -adrenerger Stimulation nicht eindeutig einer veränderten Phosphorylierung der untersuchten Phosphorylierungsstellen zugeordnet werden konnte. Zukünftige Analysen sind nötig, um die Änderungen der Titinphosphorylierung im Rahmen der β -adrenergen Stimulation weiter aufzuklären. Auch die mögliche Identifizierung bisher unbekannter Phosphorylierungsstellen im Titin könnte in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung sein.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit eine Abnahme der relativen längenabhängigen Aktivierung nach β -adrenerger Stimulation an permeabilisierten Papiliarmuskelfasern aus retrograd perfundierten Mäuseherzen gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Abnahme der längenabhängigen Aktivierung sehr wahrscheinlich durch die Änderung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit bei β -adrenerger Stimulation verursacht wird. Weil neben Titin auch Troponin I und MyBP-C an der Regulation der längenabhängigen Aktivierung beteiligt sind und beide Proteine im Rahmen der β -adrenergen Stimulation phosphoryliert werden, bedarf es weiterer Untersuchungen zur Bestätigung dieses Zusammenhanges.

Zusammenfassung - englisch

The vegetative nervous system regulates the autonomic heart function. At the level of the cardiac myocytes, an increase of cardiac power is transmitted by catecholamines binding β -adrenergic receptors (β -AR). Activation of the classical β -adrenergic signal pathway results in an increased activation of protein kinase A (PKA). PKA phosphorylates amongst others L-type Calcium channels and Phospholamban, a protein which inhibits SERCA, inducing an increased cardiac calcium influx during systole. Further Myosin-binding-Protein C (MyBP-C) and Troponin I, both located in the myofilament, are phosphorylated by PKA resulting in an increase of inotropy and lusitropy. The major aim of this study was to reveal if titin is phosphorylated by PKA through β -adrenergic stimulation and contributes to lusitropy by decreased passive tension of the myofilaments.

Together with the thick and thin filament, titin builds the sarcomere, the smallest functional unit of cardiac and skeletal muscles. One titin molecule spans a half sarcomere from Z-disc to M-band. Titin's compliant I-Band regions determine passive stiffness of the myofilament. Besides the extracellular matrix component collagen, titin is the most important factor of myocardial passive tension, which is highly relevant in diastolic function of the heart.

Furthermore, because of its giant length titin forms the structural backbone of the sarcomere continuously and is a central element in regulation of length dependent activation of the myocardium. Length dependent activation is the molecular basis of the Frank-Starling law of the heart, which describes the relationship between an increased stroke volume due to an increased end diastolic volume.

Titin-based passive tension is modulated through phosphorylation of its compliant I-band regions (Linke und Hamdani, 2014). PKA- (Yamasaki et al., 2002, Krüger und Linke, 2006), PKG- (Krüger et al., 2009) and ERK-dependent (Raskin et al., 2012, Perkin et al., 2015) phosphorylation of N2-B unique sequence (N2-Bus) in titin's I-band leads to a decrease in cardiomyocyte passive tension. PKC α -dependent phosphorylation of PEVK-region, which contains mostly proline (P), glutamate (E), valine (V) and lysine (K) and is also localised in titin's I-band, leads to an increase in cardiomyocyte passive tension (Hidalgo et al., 2009). CaMKII phosphorylates amino acids in both, N2-Bus and PEVK-region, and leads to a decrease of passive tension (Hamdani et al., 2013c, Hidalgo et al., 2013). By the use of mass spectroscopy serine and threonine residues in the N2-Bus and PEVK-region, which are phosphorylated by the kinases mentioned above, were identified. In N2-Bus the conserved PKA-dependent phosphosite S4010 was described among others (Kötter et al., 2013).

In this study, the influence of β -adrenergic stimulation on cardiac passive tension was investigated on adult rat cardiac myocytes. In this model, a statistically significant decrease in passive tension was only shown for a sarcomere length of 2.2 μ m, even though there was a decrease in passive tension over the whole range. Titin's phosphorylation was analysed by Western blot with phosphospecific antibodies. No statistically significant difference in phosphorylation was obtained at the phosphosite S4010 in the N2-Bus of cardiac myocytes between β -adrenergic stimulation with Isoproterenol and with the β -blocker Propranolol. In further studies with isolated retrograde perfused mouse hearts, a significant decrease of passive tension was detected in single cell measurements after stimulation with Isoproterenol. These changes in passive tension of myofilament were detected at the physiological sarcomere length range of 1.7 - 2.3 μ m (Allen und Kentish, 1985). Therefore, it can be suggested that the shown decrease in passive tension contributes to the positive lusitropy of β -adrenergic stimulation in the non-failing heart. A treatment with the β -blocker Propranolol caused no significant change in passive tension. Titin's phosphorylation was analysed in Western blot studies with phosphospecific antibodies against four different phosphosites – S4010 and S4099 in N2-Bus, S11878 and S12022 in PEVK-region. An increase of PKA-dependent phosphorylation at S4010 after a stimulation with Isoproterenol could not be shown. However, after a treatment with Propranolol and Isoproterenol and a dominance of β -adrenergic stimulation, a significant increase of phosphorylation at S4010 was detected. Taken together, the statistically significant decrease in passive tension after β -adrenergic stimulation could not be correlated with a distinct change in titin's phosphorylation at the four analysed phosphosites. Further studies are needed to elucidate the change in titin's phosphorylation at different phosphosites and their interactions through β -adrenergic stimulation. In this context, the identification of yet unknown phosphosites could play an important role.

In addition, this study shows a decrease in length dependent activation of permeabilized papillary muscle strips through β -adrenergic stimulation of retrograde perfused mouse hearts. The results obtained in this study indicate, that the decrease in length dependent activation is most likely caused by altered titin-based myofilament passive tension. Because troponin I and MyBP-C are also involved in regulation of length dependent activation and both proteins are phosphorylated in reaction to β -adrenergic stimulation, further studies are needed to confirm the proposed model.

Abkürzungen

A-Band	anisotropes Band
ADP	Adenosindiphosphat
AKAP	<i>A-kinase anchoring proteins</i>
AR	Adrenorezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BDM	2,3-Butandionmonoxim
BNP	B-Typ natriuretischem Peptid
C	Celsius
Ca	Kalzium
CaMK II	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Chlor
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FN	Fibronectin
G_i	inhibitorischen G-Protein
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GRK	G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinasen
G_s	stimulatorisches G-Protein
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HF	Herzfrequenz
HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HI	Herzinsuffizienz
I-Band	isotropes Band
IE	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
K	Lysin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAD	<i>Left anterior descending</i>
L_p	Persistenzlänge
LV-Ballon	linksventrikulärer Ballon
LVP	linksventrikulärer Druck
M-Band	Mittel-Band
MDa	Megadalton
Mg	Magnesium
min	Minute

MLP	<i>Muscle LIM protein</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter-Quecksilbersäule
mN	Millinewton
MyBP-C	Myosin-bindendes-Protein C
N2-Bus	<i>N2-B unique sequence</i>
Na	Natrium
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
p	p-Wert (Signifikanzwert)
P	Prolin
PDE	Phosphodiesterase
Perf	Perfusionsgeschwindigkeit
PKA	Proteinkinase A
PKCα	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase C α
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PVDF	Polyvinylendifluorid
rpm	<i>rounds per minute</i>
S	Serin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TK	Titinkinase
U/ml	Units pro Milliliter
us	<i>unique sequence</i>
V	Valin
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>β-adrenerge Stimulation des Herzens</i>	<i>1</i>
1.1.1	Vegetatives Nervensystem am Herzen.....	1
1.1.2	Klassischer β-adrenerger Signalweg	1
1.1.3	Signaltransduktion des β2-Adrenorezeptors über das inhibitorische G-Protein..	2
1.1.4	Desensitivierung der β-adrenergen Signalkaskade	3
1.1.5	Kompartimentierung der β-adrenergen Signalkaskade	3
1.1.6	β-Arrestin vermittelte Signaltransduktion.....	3
1.1.7	Veränderungen der β-adrenergen Signalkaskaden bei Herzinsuffizienz und β-Blocker	4
1.2	<i>Aufbau und Funktion des Sarkomers</i>	<i>5</i>
1.2.1	Drei-Filament-System des Sarkomers	5
1.2.2	Mechanismus der Muskelkontraktion.....	6
1.2.3	Regulation der Kontraktion	7
1.3	<i>Titin.....</i>	<i>8</i>
1.3.1	Struktur.....	8
1.3.2	Modulation der passiven Steifigkeit durch Phosphorylierungen im I-Band	10
1.3.3	I-Band Phosphorylierungen im Rahmen der Pathophysiologie des Herzens	12
1.4	<i>Fragestellung.....</i>	<i>14</i>
2	Material und Methoden.....	15
2.1	<i>Material.....</i>	<i>15</i>
2.1.1	Puffer und Lösungen	15
2.1.2	Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten	17
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Antikörper	19
2.1.5	Laborgeräte	19
2.2	<i>Methoden</i>	<i>20</i>
2.2.1	Zellkultur adulter Rattenkardiomyozyten	20
2.2.2	Retrograde Perfusion des isolierten Mäuseherzens („Langendorff-Perfusion“)	21
2.2.3	Biophysikalische Messverfahren	23
2.2.3.1	Messung der passiven Steifigkeit einzelner Kardiomyozyten.....	23
2.2.3.2	Messung der relativen längenabhängigen Aktivierung gehäuteter Papiliarmuskelfasern.....	24
2.2.4	Proteinbiochemie	25
2.2.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.2.4.2	Western Blot.....	26
2.2.5	Software	27
2.2.6	Statistische Datenanalyse.....	27
3	Ergebnisse	28
3.1	<i>Adulte Rattenkardiomyozyten.....</i>	<i>28</i>
3.1.1	Passive Steifigkeit nach β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol.....	28
3.1.2	Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin nach β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol.....	30

3.1.3	Indirekter Nachweis der Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol	31
3.2	<i>Retrograd perfundierte Mäuseherzen („Langendorff-Herzen“)</i>	32
3.2.1	Änderung hämodynamischer Messgrößen während der retrograden Perfusion isolierter Mäuseherzen durch β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol bzw. β -adrenerge Blockade mit Propranolol	32
3.2.2	Abnahme der passiven Steifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol	35
3.2.3	Abnahme der längenabhängigen Aktivierung von gehäuteten Papillarmuskelfasern nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol	38
3.2.4	Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin nach β -adrenerger Stimulation	39
3.2.5	Indirekter Nachweis der Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A	43
3.2.6	Änderung der Aktivität der Proteinkinase $C\alpha$ nach β -adrenerger Stimulation ..	44
4	Diskussion	45
4.1	<i>Myofilamentsteifigkeit und Status der Titinphosphorylierung an S4010 im Rahmen β-adrenerger Stimulation</i>	45
4.1.1	Isolierte adulte Rattenkardiomyozyten	45
4.1.2	Retrograd perfundierte Mäuseherzen	46
4.1.2.1	Einfluss von Isoproterenol	46
4.1.2.2	Einfluss von Propranolol	48
4.1.2.3	Einfluss der gleichzeitigen Gabe von Propranolol und Isoproterenol	49
4.2	<i>Titinphosphorylierung an S4099, S11878 und S12022</i>	49
4.3	<i>Einfluss der β-adrenerger Stimulation auf die relative längenabhängige Aktivierung</i>	52
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	54
6	Anhang	62
7	Danksagung	63

1 Einleitung

1.1 β -adrenerge Stimulation des Herzens

1.1.1 Vegetatives Nervensystem am Herzen

Das vegetative Nervensystem reguliert die Funktionen der inneren Organe und des Kreislaufs. Es ist in zwei hauptsächlich antagonistisch wirkende Teile, das sympathische und das parasympathische Nervensystem, aufgeteilt. Das im Gastrointestinaltrakt vorhandene enterische Nervensystem wird als der dritte Teil des vegetativen Nervensystems bezeichnet. Der Sympathikus wirkt am Zielorgan über den Neurotransmitter Noradrenalin und das im Nebennierenmark gebildet Hormon Adrenalin hauptsächlich leistungsfördernd und wird auch als adrenerges System bezeichnet. Der Parasympathikus wirkt über den Neurotransmitter Acetylcholin am Zielorgan und hat eine erholende, den Stoffwechsel fördernde Wirkung. Der Parasympathikus wird auch als cholinerges System bezeichnet.

Am Sinusknoten des Herzens bewirkt eine sympathische Aktivierung eine Steigerung der Herzfrequenz (Chronotropie), eine schnellere Überleitung der Erregung von den Vorhöfen auf die Ventrikel im Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) (Dromotropie) und eine Steigerung der Kontraktilität (Inotropie), sowie eine Steigerung der Relaxationsfähigkeit (Lusitropie) am Myokard der Ventrikel. Der Parasympathikus innerviert am Herzen nur den Sinusknoten, den AV-Knoten und die Vorhöfe und wirkt so negativ chronotrop und negativ dromotrop.

Die adrenerge Stimulation wird durch Bindung von Noradrenalin und Adrenalin an Adrenorezeptoren (AR) übertragen. Alle AR gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein coupled receptor, GPCR*) und bestehen aus sieben transmembranären Helices. Es werden die Typen α -1 und α -2, sowie β -1, β -2 und β -3 unterschieden. Diese sind im Organismus unterschiedlich verteilt und lösen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aus. Am Myokard sind hauptsächlich die Betarezeptoren für die Vermittlung der oben genannten positiven Inotropie und Lusitropie verantwortlich. 75 - 80 % der β -AR gehören am gesunden Herzen zum Subtyp β -1, 15 - 18 % zu β -2. Die übrigen Anteile fallen auf den β -3 AR, der unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich inaktiv ist (Capote *et al.*, 2015).

1.1.2 Klassischer β -adrenerger Signalweg

Die Aktivierung von β -1 und β -2 AR in Kardiomyozyten führt zur Dissoziation von α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit des intrazellulären heterotrimeren G-Proteins. Die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins (G_s) aktiviert die Adenylatcyclase, welche die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Zyklisches AMP ist ein *second messenger* und aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die PKA vermittelt durch Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten unterschiedlicher Proteine spezifische Änderungen in der Physiologie der Kardiomyozyten. So führt die Phosphorylierung des L-Typ-Kalziumkanals und des Ryanodin-Rezeptors zu einem vermehrten Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum bzw. dem sarkoplasmatischen Retikulum während der Plateauphase des Aktionspotentials, was eine Steigerung der durch Kalzium ausgelösten Kontraktion zur Folge hat. Phospholamban verliert durch PKA-abhängige Phosphorylierung an Serin-16 seinen inhibierenden Effekt auf die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA, *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*),

die während der Diastole Kalzium aus dem Zytosol ins sarkoplasmatische Retikulum pumpt. Dies führt durch den daraus folgenden erhöhten Kalziumausstrom zu einer positiven Lusitropie. Durch eine erhöhte Kalziumladung des sarkoplasmatischen Retikulums kommt es wiederum zu einem vermehrten Kalziumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum während der Systole und damit zu einer positiven Inotropie (MacLennan und Kranias, 2003). Die Phosphorylierung von Troponin I, das dem an der kalziumabhängigen Aktivierung der Kontraktion beteiligten Troponinkomplex angehört (siehe Abschnitt 1.2.2), wirkt durch eine Verminderung der Kalziumsensitivität des Myofilaments positiv lusitrop (Sakthivel *et al.*, 2005). Des Weiteren wird im Myofilament das Myosin-bindende-Protein C (MyBP-C) von der PKA phosphoryliert, was zu einer Steigerung der Kontraktilität führt (Tong *et al.*, 2008).

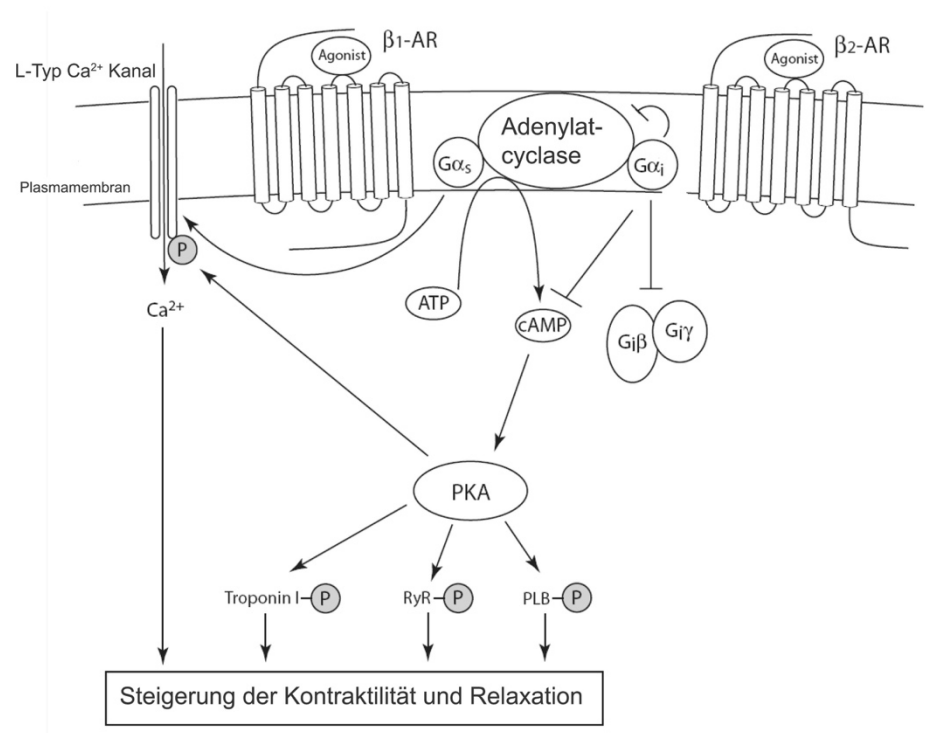


Abb. 1: Die klassische β -adrenerge Signalkaskade in Kardiomyozyten führt zu einer Steigerung der Kontraktilität (modifiziert nach Madamanchi, 2007). Die Bindung eines Agonisten am β_1 -Adrenorezeptor (AR) oder β_2 -AR führt zur Kopplung und Aktivierung des stimulatorischen heterotrimeren G-Proteins (G_s), das zu $G_s\alpha$ und $G_s\beta\gamma$ dissoziiert. $G_s\alpha$ aktiviert die Adenylatcyclase, die die Reaktion von Adenosinatriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die Proteine innerhalb des Kardiomyozyts phosphoryliert (P), darunter L-Typ Kalziumkanäle in der Plasmamembran, Troponin I im Myofilament, sowie den Ryanodinrezeptor (RyR) und Phospholamban (PLB) am sarkoplasmatischen Retikulum. Dies resultiert in einer Steigerung der Kontraktilität und Relaxation. Zusätzlich kann der β_2 -AR nach Bindung eines Agonisten mit dem inhibitorischen G-Protein (G_i) koppeln, das nach Aktivierung zu $G_i\alpha$ und $G_i\beta\gamma$ dissoziiert. $G_i\alpha$ hemmt die Adenylatcyclase, was zu einer Verminderung der Kontraktilität führt.

1.1.3 Signaltransduktion des β_2 -Adrenorezeptors über das inhibitorische G-Protein

Im Unterschied zum β_1 -Rezeptor ist durch den β_2 -Rezeptor neben der oben beschriebenen klassischen Signalkaskade auch eine Signalweiterleitung über das Pertussistoxin-sensitive

inhibitorische G-Protein (G_i) möglich (Xiao *et al.*, 1995). Die Signalkaskade über β_2 -AR- G_i hat eine antagonistische Wirkung zum $\beta_{1,2}$ -AR- G_s Signalweg. Die Aktivität der Adenylatcyclase wird vermindert und folglich wird auch die Bildung von cAMP verringert, sowie die Aktivität der PKA und ihre positiven Effekte auf Inotropie und Lusitropie reduziert. Die unterschiedliche Signaltransduktion des β_2 -AR wird durch Phosphorylierung desselben beeinflusst. Eine PKA-abhängige Phosphorylierung des β_2 -AR führt zu einem Wechsel der Signaltransduktion von G_s zu G_i (Daaka *et al.*, 1997a) und auch eine Phosphorylierung des β_2 -AR durch die G-Proteingekoppelter-Rezeptorkinase 2 (GRK 2), die eine zentrale Rolle bei der ligandenabhängigen Desensitivierung spielt, führt zu einer vermehrten Signaltransduktion via G_i (Zhu *et al.*, 2012). Dieser Wechsel in der Signalweiterleitung ist eine Erklärung, warum eine persistierende Stimulation des β_2 -AR im Gegensatz zu einer β_1 -Überstimulation, die proapoptotisch auf Kardiomyozyten wirkt, kardioprotektiv ist (Zhu *et al.*, 2001).

1.1.4 Desensitivierung der β -adrenergen Signalkaskade

Eine Aktivierung des β -AR führt ligandenabhängig zu einer Desensitivierung. So interagiert die β -Untereinheit des G-Proteins nach Dissoziation von der α -Untereinheit mit G-Proteingekoppelten-Rezeptorkinasen (GRK) (Daaka *et al.*, 1997b). GRK 2 phosphoryliert daraufhin den aktivierten β -AR, was einerseits die Affinität des β -AR zu G_s vermindert, andererseits über eine Interaktion mit β -Arrestin die Internalisierung des Rezeptors in *clathrin-coated pits* und endosomale Vesikel begünstigt (Ferguson, 2001). Außerdem wird der β -AR unabhängig von seinem Aktivitätszustand von der PKA phosphoryliert. Dies führt zur Abkopplung des heterotrimeren G-Proteins und einer funktionalen Desensitivierung (Ferguson, 2001, Capote *et al.*, 2015).

1.1.5 Kompartimentierung der β -adrenergen Signalkaskade

Durch Kompartimentierung wird die Aktivierung der Signalkaskaden innerhalb der Zelle örtlich unterschiedlich verteilt. Phosphodiesterasen (PDE) bauen cAMP ab und können so das durch die Stimulation vermittelte Signal zeitlich und örtlich innerhalb der Zelle begrenzen (Najafi *et al.*, 2016). Die Stimulation des β -AR mit einer minimalen Dosis eines Agonisten führt zu einer PKA-abhängigen Phosphorylierung des β -AR an der Zellmembran, jedoch nicht zur PKA-abhängigen Phosphorylierung von Phospholamban am sarkoplasmatischen Retikulum oder von Troponin I im Myofilament. Eine Inhibition von PDE 4, der für den Abbau von cAMP bedeutendsten PDE in Kardiomyozyten, hat nach Stimulation mit einer minimalen Dosis eines β -adrenergen Agonisten eine vermehrte Phosphorylierung von Phospholamban und Troponin I zur Folge, die sonst nur bei einer vielfachen Dosis des Agonisten zu beobachten ist (De Arcangelis *et al.*, 2010). In den Zellkompartimenten wird die PKA durch Ankerproteine, *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs), positioniert. AKAPs binden die regulatorische Untereinheit der PKA, aber auch andere Enzyme der cAMP-Signalkaskade und garantieren so die örtliche Aktivierung der Signalkaskaden (Perino *et al.*, 2012). Im Myofilament wurden Troponin T (Sumandea *et al.*, 2011) und Myomegalin (Uys *et al.*, 2011) als AKAP identifiziert.

1.1.6 β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktion

Die Signaltransduktion des β -AR kann auch über Signalkaskaden, die unabhängig von der klassischen cAMP-PKA-Kaskade sind, ablaufen. So wurde eine von der PKA unabhängige Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) durch β_1 -adrenerge

Stimulation beschrieben. Sie ist unter anderem für den proapoptotischen Effekt der β 1-Stimulation in Kardiomyozyten verantwortlich (Zhu *et al.*, 2003).

Des Weiteren können Signale vom GPCR über β -Arrestin unabhängig vom G-Protein vermittelt werden (Lefkowitz und Shenoy, 2005). β -Arrestin vermittelt durch Bindung an den phosphorylierten GPCR nicht nur, wie oben beschrieben, eine Desensitivierung und Internalisierung, sondern ist Teil alternativer Signalkaskaden. Am β 2-AR wurde die über β -Arrestin vermittelte Aktivierung von ERK 1/2 (Shenoy *et al.*, 2006) und der p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) (Gong *et al.*, 2008) beschrieben.

In diesem Zusammenhang ist die durch den Liganden beeinflussbare (*ligand-biased*) Signaltransduktion von Bedeutung (Woo und Xiao, 2012). Verschiedene Agonisten führen an GPCR zu unterschiedlichen Konformationsänderungen, die die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen und zu einer vermehrten Signalweiterleitung über entweder G-Proteine oder β -Arrestin führen. Für den β 2-AR konnte die Signaltransduktion über β -Arrestin unter anderem für die endogenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, sowie den β -adrenergen Agonisten Isoproterenol nachgewiesen werden (Drake *et al.*, 2008, Littmann *et al.*, 2015).

1.1.7 Veränderungen der β -adrenergen Signalkaskaden bei Herzinsuffizienz und β -Blocker

Der Begriff der Herzinsuffizienz beschreibt das Unvermögen des Herzens ausreichend Blut durch den Kreislauf zu pumpen, um den Bedarf des Körpers zu decken. Unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz, führt sie zu einem *Circulus vitiosus* aus neurohumoralen Stimulation und Umbau bzw. Hypertrophie des Herzens. Die Aktivität des adrenergen Systems ist bei Herzinsuffizienz gesteigert. Akut führt dies über die klassische β -adrenerge Signalkaskade (β -AR- G_s -cAMP-PKA) zu einer Steigerung der Herzleistung. Langfristig überwiegen durch Änderungen der β -adrenergen Signalkaskaden jedoch negative Effekte auf die Herzleistung (Woo und Xiao, 2012). Der β 1-AR wird, im Gegensatz zum β 2-AR, auf mRNA- und Proteinebene seltener exprimiert und seine Verteilungsdichte an der Plasmamembran ist um 50% reduziert (Bristow *et al.*, 1989). Ein weiteres Zeichen der Desensitivierung des β 1-AR- G_s Signalwegs ist die erhöhte Expression von GRK 2 (Ungerer *et al.*, 1993). Im Signalweg des β 2-AR kommt es durch den oben beschriebenen Mechanismus zu einem Wechsel in der Kopplung des β 2-AR von G_s zu G_i . Insgesamt wird bei chronischer Herzinsuffizienz die β adrenerge Signalkaskade von der die Kontraktilität fördernden β -AR- G_s Signalkaskade zur β -AR- G_i Signalkaskade verschoben (Lymperopoulos *et al.*, 2013).

Um diesen Mechanismen entgegen zu wirken werden β -Blocker zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt (McMurray *et al.*, 2012). β -Blocker sind kompetitive Antagonisten am β -AR. β -Blocker der ersten Generation, wie Propranolol, sind nicht selektiv. Das bedeutet, sie blocken sowohl den β 1- als auch den β 2-AR. Die zweite Generation der β -Blocker, wie zum Beispiel Metoprolol, zeichnet sich durch eine höhere Selektivität für den β 1-AR aus. Da der β 1-AR hauptsächlich am Herzen vorkommt, werden sie auch als kardioselektiv bezeichnet. Die dritte Generation der β -Blocker kann selektiv (zum Beispiel Nebivolol) oder nicht selektiv (zum Beispiel Carvedilol) sein. Carvedilol besitzt zusätzlich eine periphere vasodilatative Wirkung durch die Blockade von α 1-AR (Lymperopoulos *et al.*, 2013). Ab einer Herzinsuffizienz mit Atembeschwerden bei leichter Anstrengung (Stadium 2 nach *New York Heart Association*) ist

bei Fehlen von Kontraindikationen eine Therapie mit einem β -Blocker der zweiten oder dritten Generation empfohlen. Wie in randomisierten Studien gezeigt werden konnte, kommt es durch diese Behandlung zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion, sowie zu einer Verringerung der Mortalität (McMurray *et al.*, 2012).

Der therapeutische Nutzen der β -Blocker wird unter anderem ihrem Schutz vor einer Überstimulation durch Katecholamine zugesprochen. Unter einer β -Blockertherapie kommt es zu einer Resensitivierung des β -adrenergen Signalwegs mit Erhöhung der β_1 -AR-Dichte und Verbesserung der adrenergen, inotropischen Reserven (Lohse *et al.*, 2003). Außerdem führt die durch Senkung der Herzfrequenz verlängerte Diastole zu einer Steigerung des koronaren Blutflusses bei gleichzeitig verringerter kardialer Arbeit (Lympieropoulos *et al.*, 2013).

1.2 Aufbau und Funktion des Sarkomers

1.2.1 Drei-Filament-System des Sarkomers

Die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften Skelett- und Herzmuskulatur ist das Sarkomer (Abb. 2). In einer Myofibrille ist eine Vielzahl an Sarkomeren sowohl hintereinander als auch parallel zueinander angeordnet. Das Sarkomer besteht aus dem dicken Filament, das hauptsächlich aus Myosin besteht, dem dünnen Filament, das F-Aktin enthält, und dem Titinfilament. In der Skelettmuskulatur wird zusätzlich das Nebulinfilament gebildet. Die Filamente sind so angeordnet, dass sich unter mikroskopischer Sicht eine Querstreifung im Längsschnitt des Muskels ergibt. Es erfolgt eine Unterteilung in eine Z-Scheibe, das isotrope Band (I-Band), das anisotrope Band (A-Band) und das Mittel-Band (M-Band). Die Z-Scheiben bilden die lateralen Begrenzungen eines einzelnen Sarkomers. Gleichzeitig stellen sie die Verbindungsstelle zum benachbarten Sarkomer dar, denn zwei benachbarte Sarkomere teilen sich eine Z-Scheibe. In der Z-Scheibe sind das Aktinfilament und das Titinfilament verankert. Im M-Band, das exakt in der Mitte zwischen zwei Z-Scheiben liegt, sind das Myosinfilament und das Titinfilament über Myomesin verankert. Die Aktin- und Myosinfilamente überlappen sich, wobei eine Kontraktion zu einem Ineinandergleiten der beiden Filamente führt. Der Bereich des Sarkomers, indem das Aktinfilament an die Z-Scheibe grenzt und nicht mit dem Myosinfilament überlappt, wird aufgrund seiner nicht doppelt lichtbrechenden (isotropen) Eigenschaft in der Polarisationsmikroskopie als I-Band bezeichnet. Lichtmikroskopisch erscheint es hell mit der dunklen Z-Scheibe in der Mitte. Die Breite des I-Bands variiert abhängig von der Kontraktion des Sarkomers. Das anisotrope (A-)Band beinhaltet das dicke Filament und bricht das polarisierte Licht doppelt. Im Lichtmikroskop erscheint es dunkel. Es ist unabhängig von der Kontraktion etwa 1,6 μm lang (Heinrich *et al.*, 2014).

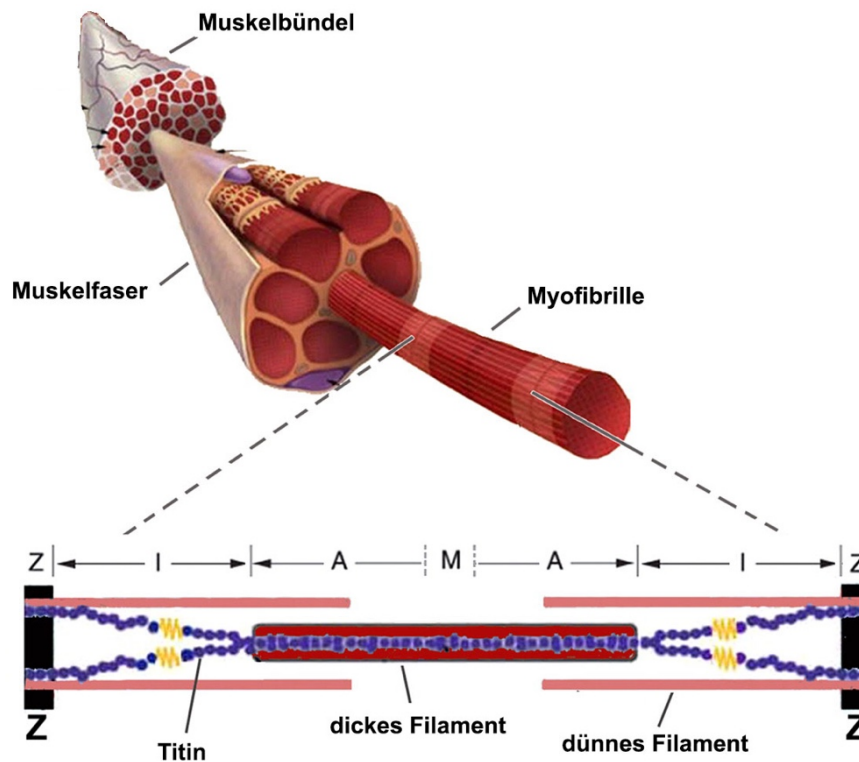


Abb. 2: Schematische Darstellung des Sarkomers (modifiziert nach Ottenheim *et al.*, 2011). Die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften Muskulatur besteht aus drei Filamenten, dem dünnen und dicken Filament und dem Titinfilament. Das dünne Filament besteht hauptsächlich aus Aktin und ist in der Z-Scheibe (Z) verankert. Das dicke Filament besteht hauptsächlich aus Myosin, das mit seiner Kopfdomäne Querbrücken zum Aktinfilament ausbildet. Das Titinfilament überspannt ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zum Mittel (M)-Band (M). I, Isotropes (I)-Band; A, anisotropes (A)-Band.

1.2.2 Mechanismus der Muskelkontraktion

Die Muskelkontraktion beruht auf dem Mechanismus der Gleitfilamenttheorie. Dabei gleiten das dicke und das dünne Filament weiter ineinander, ohne sich selbst zu verkürzen. Es kommt zu einer Verkürzung des Sarkomers, wobei das I-Band schmaler wird, während das A-Band in seiner Länge konstant bleibt (Heinrich *et al.*, 2014).

Auf molekularer Ebene beruht die Verkürzung während der Kontraktion auf dem Myosinquerbrückenzyklus. Myosin ist ein hexameres Protein, das aus zwei schweren Ketten mit jeweils einer Stab-, Hals- und Kopfdomäne, sowie zwei regulatorischen und zwei essentiellen leichten Ketten besteht. Die Kopfdomänen binden an Aktin und besitzen eine enzymatische Aktivität zur Hydrolyse von ATP. Während des Myosinquerbrückenzyklus führt eine Bindung von ATP an den Myosinkopf zur Dissoziation des Myosinkopfes von Aktin. Die anschließende Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat hat eine Konformationsänderung des Myosinkopfes zur Folge, der daraufhin an Aktin bindet. Die Freisetzung des Phosphatrestes führt zur Konformationsänderung des an Aktin gebundenen Myosins, dem sogenannten Kraftschlag. Die Myosin- und Aktinfilamente werden dabei ineinandergeschoben. Zum Abschluss des Querbrückenzykluses wird ADP freigesetzt (Heinrich *et al.*, 2014).

Die Aktivierung der Kontraktion erfolgt kalziumabhängig. Im Skelettmuskel wird durch eine Depolarisation der Zellmembran der Dihydropyridinrezeptor aktiviert, der mit dem Ryanodinrezeptor in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums verbunden ist und so die Permeabilität des selbigen für Kalzium erhöht. Dies hat einen Kalziumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol zur Folge. Im Herzmuskel wird der Kalziumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol durch den Ryanodinrezeptor über einen Kalziumeinstrom von extrazellulär durch L-Typ-Kalziumkanäle getriggert. Das dem dünnen Filament zugeordnete Protein Tropomyosin und der Troponinkomplex regulieren zusammen die Kalzium-abhängige Kontraktion am Myofilament. Der Troponinkomplex besteht aus dem tropomyosinbindenden Troponin T, dem kalziumbindenden Troponin C und dem inhibitorischen Troponin I. Bei Relaxation blockiert Tropomyosin die Bindungsstelle für Myosin am F-Aktin. Die Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytosol führt durch eine Bindung von Kalziumionen an Troponin C zu einer Konformationsänderung des Troponinkomplexes, die wiederum eine Freigabe der Myosinbindungsstelle an F-Aktin durch Tropomyosin bewirkt und so das Ablaufen des Querbrückenzyklus ermöglicht (Schmidt und Lang, 2007).

1.2.3 Regulation der Kontraktion

Die Stärke der Kontraktion wird durch verschiedene Mechanismen in der Kalzium-abhängigen Signaltransduktion reguliert. So ist eine Erhöhung des Kalziumein- und ausstroms mit einer Steigerung der Kontraktilität verbunden.

Am Herzmuskel werden Kontraktion und Relaxation zusätzlich über posttranslationale Modifizierungen von Proteinen des Myofilaments reguliert, die durch β -adrenerge Stimulation vermittelt werden. Wie unter 1.1 beschrieben, hat der klassische β -adrenerge Signalweg über β -AR- G_s -cAMP eine Aktivierung der PKA zur Folge. Die Phosphorylierung des Myosin-bindenden Proteins C (MyBP-C) im dicken Filament durch die PKA führt zu einer erhöhten Kraftentwicklung (Tong *et al.*, 2008). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I hat durch Senkung der Kalziumsensitivität des Troponinkomplexes eine Beschleunigung der Relaxation zur Folge (Layland *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung des Titinfilaments nach β -adrenerger Stimulation und die Auswirkung auf die Myofilamentsteifigkeit ist Thema dieser Arbeit. Weitere PKA-abhängige Phosphorylierungen von Phospholamban und des L-Typ-Kalziumkanals führen über einen erhöhten Kalziumeinstrom bzw. schnelleren Kalziumaustrom zur stärkeren Kontraktion und schnelleren Relaxation.

Die längenabhängige Aktivierung ist ein weiterer Mechanismus, der die Stärke der Kontraktion reguliert. Dabei wird eine stärkere Kraft bei größerer Ausgangssarkomerlänge erzeugt. Dieser Effekt ist in der Herzmuskulatur deutlich stärker ausgeprägt als in der Skelettmuskulatur. Die längenabhängige Aktivierung ist die zelluläre Grundlage für das Frank-Starling-Gesetz des Herzens, das den Zusammenhang der Vergrößerung des Schlagvolumens durch Steigerung des enddiastolischen Volumens beschreibt (de Tombe *et al.*, 2010). Der molekulare Mechanismus der längenabhängigen Aktivierung ist bisher nicht vollständig bekannt. Die Hypothese des *inter-filament spacing* vermutete eine räumliche Annäherung des dicken und dünnen Filaments durch Streckung der Kardiomyozyten bei konstantem Zellvolumen und eine daraus folgende vermehrte Ausbildung von Myosinquerbrücken. Diese Hypothese wurde kontrovers diskutiert (Fuchs und Martyn, 2005, de Tombe *et al.*, 2010) und konnte in einer aktuellen Arbeit ausgeschlossen werden (Ait-Mou *et al.*, 2016). Andererseits wurde bei steigender

Sarkomerlänge eine Zunahme der Kalziumsensitivität des Myofilaments beschrieben, die vom Myofilament selbst abhängig ist. Es gibt Hinweise, dass fest gebundenen Myosinquerbrücken mittels eines Rückkopplungsmechanismus die Aktivierung des Myofilaments beeinflussen (Fitzsimons und Moss, 1998) und dass die Kooperativität der kalziumabhängigen Aktivierung der Kontraktion durch Längenänderungen beeinflusst wird (Razumova *et al.*, 2000, de Tombe *et al.*, 2010). Desweiteren wird diskutiert, dass Titin mit seiner Verbindung zwischen dickem und dünnen Filament eine wichtige Rolle im Zusammenhang der längenabhängigen Aktivierung spielt (Cazorla *et al.*, 2001, Hanft *et al.*, 2014). In einem experimentellen Mausmodell konnte die Abschwächung der längenabhängigen Aktivierung durch die Reduzierung der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit gezeigt werden (Methawasin *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen titinbasierter Myofilamentsteifigkeit und längenabhängiger Aktivierung bestätigt und mittels Röntgenbeugungsanalysen (*small angle X-ray diffraction*) eine zugabhängige strukturelle Umordnung im dünnen und dicken Filament beschrieben (Ait-Mou *et al.*, 2016). Ob β -adrenerge Stimulation durch die Modulation der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit einen Einfluss auf die längenabhängige Aktivierung hat, war eine der Fragestellungen dieser Arbeit.

1.3 Titin

1.3.1 Struktur

Titin ist das größte bekannte Protein in Säugetieren. Das humane Titingen auf Chromosom 2 umfasst eine Sequenz von 294 kB und beinhaltet 363 Exons, die zusammengenommen für ein 4,2 MDa großes Protein kodieren (Bang *et al.*, 2001). Ein einzelnes Titinmolekül durchspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band und ist somit als drittes Filament des Sarkomers das einzige Filament, das über die gesamte Länge des Sarkomers ausgebildet ist. Funktionell spielt es mit seinen elastischen Regionen im I-Band eine wichtige Rolle als molekulare Feder und bestimmt zusammen mit der extrazellulären Matrix die passive Steifigkeit der Muskulatur (Linke *et al.*, 1994). Titin positioniert Myosin im Zentrum des Sarkomers, was für eine optimale Kraftentwicklung von Bedeutung ist. Außerdem dient es als Vorlage für die Myofibrillenassemblierung (Krüger und Linke, 2011).

Durch alternatives Spleißen werden unterschiedliche Isoformen von einem einzigen Titingen translatiert. In der Skelettmuskulatur werden je nach Muskel unterschiedlich große Varianten (3,3 – 3,7 MDa) der skelettmuskelspezifischen N2A-Isoformen exprimiert. Im *Musculus soleus* kommt die größte N2A-Isoform mit 3,7 MDa vor (Prado *et al.*, 2005). Im Herzmuskel werden eine kürzere und steifere N2B-Isoform (3,0 MDa) und mehrere größere N2BA-Isoformen (3,2 – 3,7 MDa) koexprimiert (Siehe Abb. 3). Das Verhältnis der beiden kardialen Isoformtypen variiert in der perinatalen Entwicklung. Im embryonalen Herz wird eine 3,7 MDa große N2BA-Isoform exprimiert. Nach der Geburt kommt es zu einer vermehrten Expression der N2B-Isoform (Opitz *et al.*, 2004, Warren *et al.*, 2004). Im adulten Herz unterscheidet sich das Verhältnis von N2BA zu N2B in verschiedenen Spezies. Im linken Ventrikel des Menschen beträgt der N2BA-Anteil etwa 35-40 % (Kötter *et al.*, 2013), in der Maus 15-20 % (Kötter *et al.*, 2016).

Die einzelnen Regionen des Titins werden anhand der jeweiligen Position im Sarkomer benannt und sind in Abb. 3 dargestellt. In der Z-Scheibe ist Titin mit seinem NH₂-Terminus verankert. Die beiden Z-repeats 1 und 2 (Z1 und Z2) von zwei antiparallelen Titinmolekülen binden an Telethonin. Der Z1/Z2-Telethoninkomplex bleibt unter Zug stabil (Lee *et al.*, 2006)

und wird zusammen mit dem *Muscle LIM protein* (MLP), das wiederum mit Telethonin interagiert, als ein Mechanosensor im Sarkomer betrachtet (Knoll *et al.*, 2002, Linke, 2008). Außerdem ist Titin in der Z-Scheibe mit Nebulin (Witt *et al.*, 2006) bzw. dem herzspezifischen Nebulette (Moncman und Wang, 1999) und α -Actinin 2 (Labeit *et al.*, 2006) verbunden. Alpha-Actinin verbindet zusätzlich die sogenannten Z-repeats, sowie die letzte Ig-Domäne in der Z-Scheibe (Z9) und die erste Ig-Domäne im I-Band von Titin mit Aktin und sorgt damit für eine Anlagerung des Titinfilaments an das dünne Filament für ungefähr 100 nm ausgehend von der Mitte der Z-Scheibe (Trombitas und Granzier, 1997, Linke, 2008).

Die Länge der I-Band Region von Titin variiert je nach Isoform von 800 kDa in der N2B-Isoform bis 1,5 MDa in der N2A-Isoform des Soleusmuskels (Freiburg *et al.*, 2000). Die meisten alternativen Spleißvorgänge betreffen die I-Band Region von Titin, sodass sich die kardialen Isoformen N2BA und N2B hauptsächlich im I-Band unterscheiden (Siehe Abb. 3). Die längeren N2BA-Isoformen beinhalten neben den proximalen und distalen Ig-Domänen die mittleren Ig-Domänen, sowie die auch im Skelettmuskel exprimierte N2A-Domäne. Die für die Herzmuskulatur spezifische N2B-Domäne mit ihrer 572 Aminosäuren umfassenden N2-B *unique sequence* (N2-Bus) und die auch im Skelettmuskel vorhandene PEVK-Domäne, die hauptsächlich aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) besteht, werden in beiden kardialen Isoformtypen exprimiert. Funktionell bedeutend ist die Elastizität der I-Band-Region. Die meisten I-Band-Domänen wirken als entropische Federn. Sie sind bei niedriger Sarkomerlänge aufgewickelt (*coiled*) und liegen in einem Zustand hoher Entropie vor (Li *et al.*, 2002, Granzier und Labeit, 2004). Durch Zugkräfte können sie extendiert werden, wobei sie nach Abklingen der Zugkraft wieder in den Ausgangszustand zurückkehren. Bei niedrigen Kräften kommt es zunächst zu einer Streckung der Verbindungen zwischen den einzelnen Ig-Domänen; höhere Kräfte bewirken ein Entfalten der PEVK-Domäne und der N2-Bus. Ig-Domänen werden nur bei großen Kräften entfaltet. Unter physiologischen Bedingungen kommt dies nur bei einer geringen Anzahl der proximalen Ig-Domänen vor, wobei die distalen Ig-Domänen gefaltet bleiben (Li *et al.*, 2002, Linke und Hamdani, 2014). Die Persistenzlänge (L_p) beschreibt die Rigidität eines Biopolymers und ist so ein Maß für die Steifigkeit (Linke und Grützner, 2008). Eine Verlängerung der L_p geht mit einer Reduktion der Steifigkeit einher. Die auf den Eigenschaften von Titin basierende Myofilamentsteifigkeit bestimmt zusammen mit der extrazellulären Matrix die passive Steifigkeit des jeweiligen Muskels (Linke *et al.*, 1994).

Die Myofilamentsteifigkeit kann durch eine Änderung des Verhältnisses in der Expression der beiden kardialen Isoformtypen moduliert werden. Eine Erhöhung des Anteils der N2BA-Isoformen, die länger und elastischer als die N2B-Isoform sind, führt zu einer Verringerung der Myofilamentsteifigkeit (Cazorla *et al.*, 2000). Des Weiteren führt oxidativer Stress durch die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der N2-Bus zu einer Stabilisierung der Domäne mit Verkürzung der L_p und damit zu einer Steigerung der Myofilamentsteifigkeit (Grützner *et al.*, 2009, Beckendorf und Linke, 2015). Zusätzlich kann unter oxidativem Stress eine S-Glutathionylierung von Cystein-Resten in den durch Dehnung entfalteten Ig-Domänen des I-Bands erfolgen. Dies führt zur Blockierung des Rückfaltens der Ig-Domänen und damit zur Erhöhung der L_p und einer Verminderung der passiven Steifigkeit (Alegre-Cebollada *et al.*, 2014). Die Modulation der Myofilamentsteifigkeit durch Phosphorylierung im Titin I-Band wird unter 1.3.2 beschrieben.

Das 2,1 MDa große A-Band Titin wird im Gegensatz zum I-Band Titin in der Skelett- und Herzmuskulatur konstitutiv exprimiert. Es besteht aus Ig- und Fibronectin 3 (FN3) -Domänen, die hauptsächlich in *super-repeats*, bestehend aus entweder sieben oder elf Domänen, angeordnet sind. Diese *super-repeats* kommen in sechsfacher bzw. elffacher Ausführung vor (Linke, 2008). Das A-Band Titin ist durch seine Bindung von FN3-Domänen an Myosin nicht elastisch und wird durch die selbe Periodizität der elf-Domänen *super-repeats* und der Myosinfilamente als Gerüst für den Aufbau des Sarkomers angesehen (Labeit *et al.*, 1992, Tskhovrebova und Trinick, 2004).

Das COOH-terminale M-Band Titin besteht aus zehn Ig-Domänen (M1-M10), die jeweils aus sieben antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen bestehen. Dazwischen befinden sich sieben *unique sequences*, die alternativ gespleißt werden. Das M-Band Titin interagiert mit Obscurin (Pernigo *et al.*, 2015) und Obscurin-like1-Protein. Über Myomesin ist es mit dem Myosinfilament verankert und verleiht diesem Komplex mechanische Stabilität. (Fukuzawa *et al.*, 2008). Am Übergang zum A-Band ist die Titinkinase (TK) lokalisiert. Die TK ist eine selbstinhibierende Serin/Threonin-Kinase, die durch eine Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert wird, was zu einer Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin führt (Krüger und Linke, 2009). Mechanischer Stress führt zu einer Konformationsänderung der TK-Domäne und erlaubt so die Bindung von ATP, Autophosphorylierung und Aktivierung (Grater *et al.*, 2005). Der TK wird deshalb eine Funktion als Kraftsensor zugeschrieben.

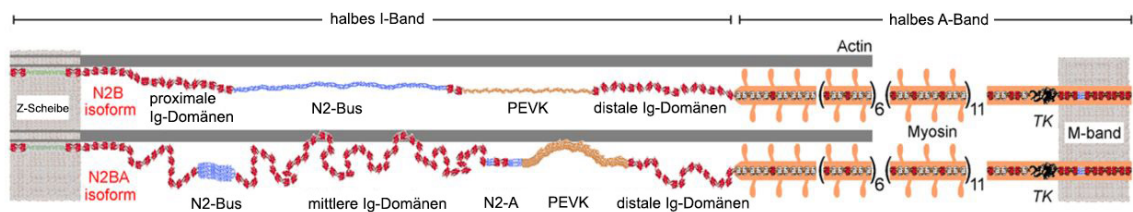


Abb. 3: Struktur der kardialen Titinisoformen (Linke und Hamdani, 2014). Es ist ein halbes Sarkomer mit der steiferen N2B- und der elastischeren N2BA-Isoform abgebildet. Ig steht für *immunoglobulin-like*; PEVK, Titinregion reich an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K); TK, Titinkinase-Domäne; us, *unique sequence*.

1.3.2 Modulation der passiven Steifigkeit durch Phosphorylierungen im I-Band

Durch Phosphorylierung elastischer Regionen im Titin I-Band kann die passive Myofilamentsteifigkeit moduliert werden. Neben den anderen die Myofilamentsteifigkeit modulierenden Mechanismen, wie die Änderung des Verhältnisses der beiden kardialen Isoformtypen (N2BA und N2B) oder die posttranslationalen Modifikationen im I-Band durch oxidativen Stress, lässt sich die Myofilamentsteifigkeit durch Phosphorylierungen im elastischen I-Band dynamisch modulieren (Kötter *et al.*, 2014).

Die N2-Bus wird von der PKA (Yamasaki *et al.*, 2002, Krüger und Linke, 2006), der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) (Krüger *et al.*, 2009), der *extracellular signal regulated kinase* 1/2 (ERK1/2) (Raskin *et al.*, 2012, Perkin *et al.*, 2015) und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II delta (CaMKII δ) (Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013) phosphoryliert (Siehe Abb. 4). Die PEVK-Region wird von der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase Ca^{2+} (PKC α)

(Hidalgo *et al.*, 2009) und der CaMKII δ (Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013) phosphoryliert. Die Phosphorylierungen in der N2-Bus haben eine Verlängerung der L_p zur Folge und führen somit zu einer Reduktion der passiven Steifigkeit (Yamasaki *et al.*, 2002, Krüger und Linke, 2006, Krüger *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung der PEVK-Region durch PKC α führt zu einer Verkürzung der L_p und zu einer Steigerung der passiven Steifigkeit (Hidalgo *et al.*, 2009). Eine Aktivitätssteigerung der CaMKII δ , die sowohl die N2-Bus als auch die PEVK-Region phosphoryliert, führt zu einer Verminderung der passiven Steifigkeit, was mit dem Überwiegen der Phosphorylierung der N2-Bus begründet wird (Hamdani *et al.*, 2013c). Die gegensätzlichen Effekte auf die L_p und die passive Steifigkeit durch Phosphorylierungen in der N2-Bus und der PEVK-Region sind bisher auf molekularer Ebene nicht aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung könnte die instabilisierende Wirkung durch das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten in die aus vielen sauren Aminosäuren bestehende und damit schon negativ geladene N2-Bus sein (Kötter *et al.*, 2013). Dies hätte eine Verminderung der Steifigkeit zur Folge. Umgekehrt besteht die PEVK-Region vermehrt aus basischen Aminosäuren. Das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten hätte hier durch elektrostatische Anziehung einen stabilisierenden Effekt, was zu einer erhöhten Steifigkeit führen könnte.

Mittels Autoradiographie und Massenspektrometrie wurden Serin (S)- und Threonin (T)-Reste in der N2-Bus und der PEVK-Region identifiziert, die durch die oben genannten Kinasen phosphoryliert werden. In der N2-Bus wurden S4185 als PKA- und PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle, S4010 und S4065 als PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen, sowie S4092 und S4099 als PKG-abhängige Phosphorylierungsstellen identifiziert (Krüger *et al.*, 2009, Kötter *et al.*, 2013). Die Nummerierung bezieht sich auf die gesamte humane Titinsequenz (UniProtKB accession number Q8WZ42-1). Serin 4010 und S4099 sind evolutionär konserviert und kommen neben dem Menschen auch in der Ratte und der Maus vor. ERK 1/2 phosphoryliert ebenfalls S4010, sowie die humanen Phosphorylierungsstellen S3918 und S3960 (Raskin *et al.*, 2012). Für die CaMKII δ wurden in der N2-Bus zehn Phosphorylierungsstellen identifiziert, wovon S3750, S4062 und S4209 konserviert sind (Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013). Des Weiteren wurden innerhalb der PEVK-Region für die CaMKII δ die konservierten Phosphorylierungsstellen T12007, S12009 und S12022 identifiziert (Hamdani *et al.*, 2013c). PKC α phosphoryliert die beiden konservierten Serinreste S11878 und S12022 in der PEVK-Region (Hidalgo *et al.*, 2009).

Für die Untersuchung der Titinphosphorylierung und ihren Einfluss auf die passive Myofilamentsteifigkeit wurden in den oben genannten Studien hauptsächlich rekombinante Kinasen verwendet. Die Titinphosphorylierung erfolgte *in vitro*. Die PKA-abhängige Phosphorylierung der N2-Bus wurde zusätzlich in mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol behandelten Kardiomyozyten nachgewiesen, wobei keine Phosphorylierungsstellen-spezifische Methode verwendet wurde (Yamasaki *et al.*, 2002). Auch die PKG-abhängige Phosphorylierung von Titin wurde *in vivo* in einem Tierexperiment nach Behandlung mit dem Phosphodiesterase V-Hemmer Sildenafil und B-Typ natriuretischem Peptid (BNP) durch Rückphosphorylierungsanalysen bestätigt (Bishu *et al.*, 2011).

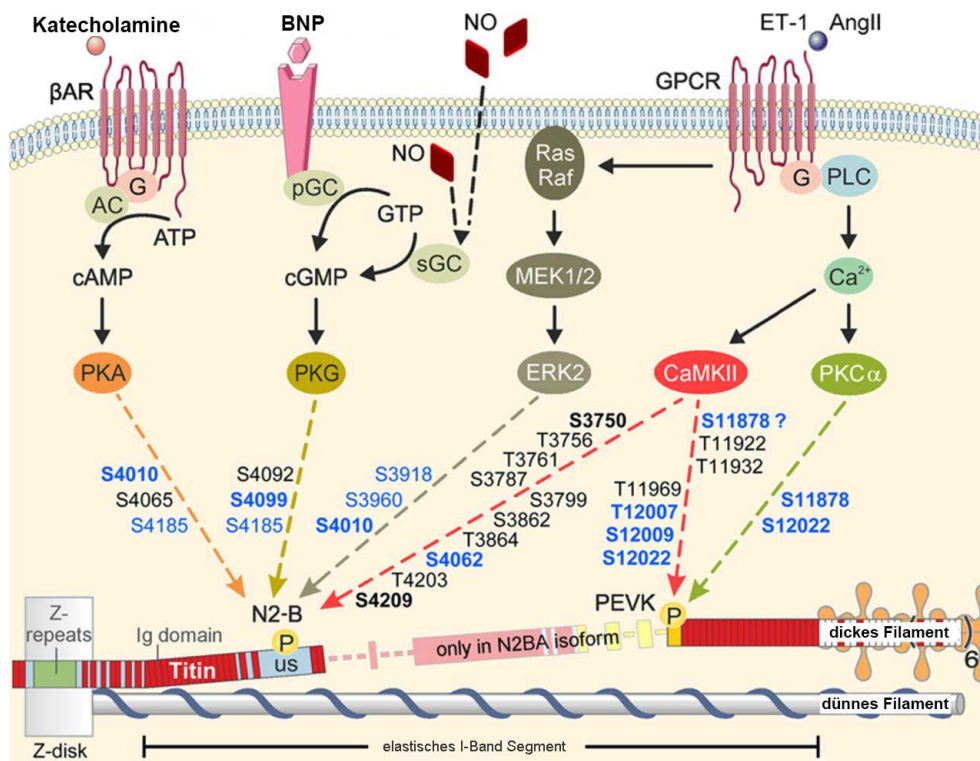


Abb. 4: Proteinkinasen phosphorylieren kardiales Titin innerhalb der N2-B *unique sequence* (N2-Bus) und der an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) reichen Titinregion (PEVK) (Linke und Hamdani, 2014). Die klassischen Signalwege der Kinasen sind zusätzlich dargestellt. Die Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2-Bus und der PEVK-Region sind nach der humanen Titinsequenz nummeriert (UniProtKB accession number Q8WZ42-1). Evolutionär konservierte Phosphorylierungsstellen sind fett, die durch eine Phosphorylierungsstellen-spezifische Methode bestätigten sind in blau, alle anderen sind in normaler schwarzer Schrift dargestellt. βAR, β-Adrenorezeptor; AC, Adenylatcyclase; AngII, Angiotensin II; CaMKII, *Ca2+/-calmodulin-dependent protein kinase-II*; ERK2, *extracellular signal-regulated kinase-2*; ET-1, Endothelin-1; G, kleines G-Protein; GPCR, G-Protein-gekoppelter-Rezeptor; MEK1/2, MAPK/ERK Kinase-1 und -2; NO, Stickstoffmonoxid; PEVK, Titinregion reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin; pGC, membrangebundene (*particulate*) Guanylylcyclase; PKA, Proteinkinase A; PKCα, Proteinkinase Ca; PKG, cGMP-abhängige Proteinkinase G; PLC, Phospholipase C; Raf, *rat brosarcoma protein*; Ras, *rat sarcoma protein*; sGC, lösliche (*soluble*) Guanylylcyclase; und us, *unique sequence*.

1.3.3 I-Band Phosphorylierungen im Rahmen der Pathophysiologie des Herzens

Die Modulation der Myofilamentsteifigkeit durch Phosphorylierungen im Titin I-Band spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Herzens. Analysen von menschlichen Herzbiopsien und Herzen aus verschiedenen tierexperimentellen Modellen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen obengenannte Serin- oder Threoninreste in der N2-Bus und der PEVK-Region wiesen unter pathophysiologischen Bedingungen eine veränderte Titinphosphorylierung auf (Linke und Hamdani, 2014). In Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und von Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) wurde eine verminderte Phosphorylierung der PKA/PKG-abhängigen Phosphorylierungsstellen S4010, S4099 und S4185 im Vergleich mit Spenderherzen nachgewiesen. Die PKCα- (und CaMKII-) abhängige Phosphorylierungsstelle S11878 zeigte für DCM und HCM eine vermehrte Phosphorylierung (Kötter *et al.*, 2013). Für die beiden CaMKIIδ-abhängigen

Phosphorylierungsstellen S4062 in der N2-Bus und S12022 in der PEVK-Region wurde eine verminderte Phosphorylierung bei herzinsuffizienten Patienten gezeigt (Hamdani *et al.*, 2013c). In einem experimentellen Hundemodell für Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (*heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF*) war die Phosphorylierung der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S4010 und der PKG-abhängigen S4099 vermindert, wobei die Phosphorylierung der PKC α -abhängige Phosphorylierungsstelle S11878 erhöht war (Hamdani *et al.*, 2013a). Vergleichbar dazu war in einem tierexperimentellen Ratten-*HFpEF*-Modell die Titinphosphorylierung an S4010 in der N2-Bus vermindert, an S12022 in der PEVK-Region erhöht und an S11878 (in der PEVK-Region) unverändert gegenüber gesunden Ratten (Hamdani *et al.*, 2013b). In einem Herzinfarktmodell der Maus, wo eine Ligatur des *Ramus interventrikulares anterior* der linken Herzkranzarterie (*Left anterior descending, LAD*) erfolgte, wurde nach drei Tagen im nicht ischämischen Myokard im Zusammenhang mit einer erhöhten passiven Steifigkeit eine verminderte Phosphorylierung an S4010, sowie eine vermehrte Phosphorylierung an S11878 und S12022 nachgewiesen (Kötter *et al.*, 2016). Des Weiteren wurde der Einfluss von akutem 20min-Laufbandtraining auf die kardiale Myofilamentsteifigkeit in Ratten untersucht und eine erniedrigte Titinphosphorylierung an S4099 und S12022, eine vermehrte Phosphorylierung an S11878 sowie eine unveränderte Phosphorylierung an S4010 im Zusammenhang mit einer erhöhten passiven Steifigkeit ermittelt (Müller *et al.*, 2014).

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob eine β -adrenerge Stimulation zu einer Abnahme der passiven kardialen Myofilamentsteifigkeit führt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine nach β -adrenerger Stimulation erfolgte Abnahme der passiven Myofilamentsteifigkeit mit einer Steigerung der PKA-abhängigen Phosphorylierung an S4010 in der N2-Bus von Titin korreliert.

Weiterführend sollte untersucht werden, ob eine β -adrenerge Stimulation im Zusammenhang mit der verminderten passiven Myofilamentsteifigkeit zu einer Abschwächung der längenabhängigen Aktivierung führt.

Diese Fragen sind insbesondere für den Zusammenhang von β -adrenerger Stimulation und der Steigerung der Herzleistung relevant. Wie bereits beschrieben wirkt eine β -adrenerge Stimulation am Myokard über PKA-abhängige Phosphorylierungen positiv inotrop und lusitrop. Es ist daher von Interesse, ob die PKA-abhängige Phosphorylierung von Titin bei einer β -adrenergen Stimulation stattfindet und ob diese durch eine Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit zum positiv lusitropen Effekt beiträgt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Aktivierungslösung (pH 6,85)	10 mM Imidazol 3 mM Ca^{2+} -EGTA 10 mM Na_2MgATP 3 mM MgCl_2 47,7 mM Na_2 -Creatinphosphat 2 mM DTT
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris/HCl, 100 mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x TBST
Heparinlösung	4 mg Heparin in Perfusionspuffer
Hoch-Kalziumlösung	0.4 mM CaCl_2 1.5 mM BSA in Perfusionspuffer
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocapronsäure 30 mM Tris / HCl
Krebs-Henseleit-Lösung	118 mM NaCl 25 mM NaHCO_3 1,2 mM MgSO_4 1 mM KH_2PO_4 4,7 mM KCl 1,25 mM CaCl_2 11 mM Glucose
Modifizierter Laemmli-puffer (pH 6,8) (SDS-Probenpuffer)	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3 % (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035 Serva Blue 10 % Glycerol 0,05 M Tris / HCl
Niedrig-Kalziumlösung	0,2 mM CaCl_2 1.5 mM BSA in Perfusionspuffer
Perfusionspuffer (pH 7,3)	130 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,25 mM MgCl_2 0,33 mM NaH_2PO_4 25 mM HEPES 20 mM Glukose 3 mM Pyruvate 5 mM Creatin

Material und Methoden

	2 mM Carnitin
	5 mM Taurin
Phosphat buffered saline (PBS)	150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 3 mM Dinatriumhydrogenphosphat
Phosphataseinhibitorcocktail (25x)	250 mM Natriumfluorid 5 mM Natriumorthovanadat 5 mM Natriumpyrophosphat Decahydrat 50 mM β -Glycerophosphat
Puffer niedriger ionischer Stärke	75 mM KCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,1 2 mM $MgCl_2$ 2 mM EGTA
PVDF destain	10 % Essigsäure 40 % Ethanol 50 % Aqua bidest
PVDF stain	0,075 % Serva Blue in Methanol
Relaxationslösung	10 mM Imidazol 3 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) 10 mM Adenosin 5`triphosphatdinatrium 3 mM Magnesiumchlorid 47.7 mM Kreatinphosphat 2 mM Dithiothreitol (DTT) 1 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail 4 % (v/v) Phosphataseinhibitorcocktail (25x)
Schneidelösung	100 nM $CaCl_2$ 6 U/ml Protease 85 U/ml Kollagenase Typ 2 1,5 mM BSA in Perfusionspuffer
10x SDS - Laufpuffer	250 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 2 M Glycin 1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCL pH 6.8 0,4% (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Stripping Buffer	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol
10x TBST	0,2 M Tris/ HCl, pH 7,4 1,5 M Natriumchlorid 1% Tween – 20
Verdauungspuffer	50 nM $CaCl_2$ 6 U/ml Protease 85 U/ml Kollagenase Typ 2 in Perfusionspuffer

2.1.2 Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

Tabelle 2: Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

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

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,3 Butandionmonoxim (BDM)	Sigma
Aceton	Merck
Acrylamid /Bis	Roth
Acrylamid /Bis 29:1	Biorad
Adenosin-5`triphosphatdinatrium	Appli Chem
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Ascorbinsäure	Sigma
Blebbistatin	Sigma
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	Capricon
Calciumchlorid	Sigma
Carnitin	Sigma
Creatin	Sigma
Creatinphosphatdinatrium (Na ₂ CrP)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detektion reagent)	7Bioscience
Elastosil RT 625 A/B	Wacker
Essigsäure	Appli Chem
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
β-Glycerophosphat	Sigma
Glycin	Roth

Material und Methoden

Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Harnstoff	Appli Chem
Heparin	Calbiochem
Heparin-Natrium-25000 IE	Ratiopharm
Hepes	Sigma
Imidazol	Sigma
<i>Imperial protein stain</i>	Pierce
Isofluran	Baxter AG
Isopropanol	Merck
Isoproterenol	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kollagenase Typ 2	Biochrom
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydroxid	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyrophosphat Decahydrat	Sigma
Nonident P40	Fluka
Penicillin Streptomycin	PAA
Propranolol hydrochloride	Sigma
Protease	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma
Pyruvat	Sigma
Salzsäure 32%	Merck
Serva Blue R	Serva Electrophoresis
β -Mercaptoethanol	Sigma
Taurin	Sigma
Temed	Appli Chem
Thioharnstoff	Sigma
Tricin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Appli Chem
Tween 20	Sigma

2.1.4 Antikörper

Die im Westernblot verwendeten käuflich zu erwerbenden Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
α -Phospho-Troponin I S23/24	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling, #4004
α -Troponin I	1:1000	Kaninchen	Cell Signalling, #4002
α -pPKC α T497	1:5000	Kaninchen	Abcam, ab76016
α -PKC α	1:10000	Kaninchen	Abcam, ab32376
α -rabbit-horse radish peroxidase conjugated	1:10000	Ziege	Cell Signalling, #7074

Von der Firma Eurogentec wurden Titinantikörper durch Immunisierung von Kaninchen produziert. Die Titinantikörper und die zur Impfung der Kaninchen verwendeten Antigene sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die angegebene Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des gesamten humanen Titingens (*UniProtKB accession number Q8WZ42*).

Tabelle 5: Titinantikörper

Antikörper	Verdünnung	Antigen	Quelle	Hersteller
α -pN2-Bus S4010	1:5000	pN2-Bus S4010 (VRIEEGKSLRFPC)	Kaninchen	Eurogentec
α -pN2-Bus S4099	1:2000	pN2-Bus S4099 (QANLFSEWLRNID)	Kaninchen	Eurogentec
α -pPEVK S11878	1:1000	pPEVK S11878 (CEVVLKSVLRKR)	Kaninchen	Eurogentec
α -pPEVK S12022	1:2000	pPEVK S12022 (LRPGSGGEKPP)	Kaninchen	Eurogentec
α -PEVK-pan	1:5000-10000	PEVK S11878 (CEVVLKSVLRKR)	Kaninchen	Eurogentec

2.1.5 Laborgeräte

Während der Laborarbeiten wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 6: Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	23MB35PM-B	LG
Binokular	S8AP0	Leica
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo scientific
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Drucksonde	Combitrans Transducer	B. Braun
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Fasermessapparatur	Myoscope-Skinned	Myotronic Heidelberg
Feinwaage	Ae163	Mettler

Material und Methoden

Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Kombischüttler	KL2	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	IKA RTC Classic	IKA
Microzentrifuge	mini CX73.1	Roth
Mikroskop	Eclipse Ti	Nikon
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Myozytenmessstand	Permeabilized Myocyte Test System 1600A; Force Transducer 403A	Aurora Scientific
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
Orbitalschüttler	Shaker DOS 10L	Neo Lab
PC	Paola	Chieftec
Perfusionssystem für isolierte Mäuseherzen	T206	Transonic Systems
pH Meter	MP220	Mettler Toledo
Reagentienschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Schlauchpumpen	Miniplus 3	Gilson
Spritzenperfusor	Pump 11 Elite	Havard Apparatus
Taumel-Rollenmischer	RMS-30V	CAT
Thermomixer/Heizblock	Compact 5350	Eppendorf
Thermostate	Thermo C10	Haake
Ultra-Turrax	VOS 14	VWR
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	Julabo 20B	Julabo
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge	Rotofix 32	Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur adulter Rattenkardiomyozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Organentnahmen und die Arbeit mit primären Zellen aus Tieren erfolgten nach den Vorgaben der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Aktenzeichen der ZETT: 029/11.

Männliche Wistar-Ratten im Alter zwischen 8 und 12 Wochen wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Der Thorax wurde eröffnet und Heparinlösung (78 U/ml Heparin) in das schlagende Herz injiziert. Dann wurde das Herz herauspräpariert, wobei die Aorta möglichst weit distal am Aortenbogen abgesetzt wurde. Anschließend wurde das Herz in eine Petrischale, die mit kalter Heparinlösung gefüllt war, überführt und gewogen. Dann wurde das Herz zur retrograden Perfusion mit der Aorta am Ende des Perfusionssystems aufgehängt und mit einem Bindfaden fixiert. Das Herz wurde zunächst für 5 min mit dem Perfusionspuffer + Heparin (11 U/ml) bei 100% Sauerstoffsättigung mit 7 ml/min perfundiert.

Anschließend wurde das Herz mit Verdauungspuffer für 25-35 min perfundiert. Die exakte Perfusionszeit für den Verdauungspuffer wurde unter Berücksichtigung des Gewichts des jeweiligen Herzens aus der Tabelle 10 (Anhang) abgelesen. Dann wurde das Herz vorsichtig von der Kanüle entfernt und in eine Petrischale mit Schneidelösung überführt, mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend in einem 50ml Falcon in vorgewärmter Schneidelösung für 15 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Alle fünf Minuten wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Im nächsten Schritt wurde, um nicht verdaute Gewebsanteile zu entfernen, die Suspension durch einen 200 µm Filter gefiltert und anschließend bei 500 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer Niedrig-Kalziumlösung resuspendiert und wiederum bei 500 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit der Hoch-Kalziumlösung wiederholt. Dann wurde das Pellet in der vorgewärmten Resuspensionsmedium resuspendiert und bei 37° C im Wasserbad für 10 min ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 500 rpm für 1 min zentrifugiert und im Kulturmedium für adulte Rattenkardiomyozyten, das Blebbistatin (12,5 nM) zur Verhinderung von Kontraktionen enthält, aufgenommen und bei 37° C im Brutschrank (21% O₂, 5% CO₂) gelagert. Nach einer Ruhephase von zwei Stunden erfolgte die weitere experimentelle Behandlung der Zellen, die unter Punkt 2.2.3.1 Messung der passiven Steifigkeit einzelner Kardiomyozyten und unter Punkt 2.2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beschrieben sind.

2.2.2 Retrograde Perfusion des isolierten Mäuseherzens („Langendorff-Perfusion“)

Mäuse vom Stamm C57BL/6 wurden mittels Genickbruch getötet. Zur Antikoagulation wurde ca. 5 min zuvor 1500 IE Heparin intraperitoneal injiziert. Das Herz wurde entnommen und zur retrograden Perfusion mit der Aorta am Ende des Perfusionssystems aufgehängt, wo es mit einem Bindfaden an einer Kanüle fixiert wurde. Zur Messung des linksventrikulären Drucks wurde ein mit Wasser befüllter Ballon, der mit einer Drucksonde (Combitrans Transducer, B. Braun) in Verbindung steht, über den linken Vorhof in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Das Herz wurde bei einem konstanten Perfusionsdruck von 80 mmHg retrograd perfundiert. Während des gesamten Versuchs wurden Perfusionsdruck, Perfusionsgeschwindigkeit, linksventrikulärer Druck und Herzfrequenz mit dem Computerprogramm LabChart (AD Instruments) aufgezeichnet (Abb. 5).

Das Herz wurde zunächst für 20 min mit Krebs-Henseleit-Lösung bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxidbegasung perfundiert. Anschließend erfolgten ab dem Zeitpunkt $t = 20\text{min}$ und $t = 30\text{ min}$ jeweils eine Zugabe von Isoproterenol, Propranolol oder der Kontrolllösung in die Perfusionslösung. Dafür wurde eine Kanüle, die mit einer Spritze verbunden wurde, oberhalb des Herzens ins Perfusionssystem gesteckt. Die Zugaben wurden jeweils bis zum Ende des Experiments nach insgesamt 40 min Perfusion durchgeführt, dauerten also 20 min für Zugabe 1 bzw. 10 min für Zugabe 2. Mit einem Spritzenperfusor (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus) erfolgte die Anpassung der Zugabe im Verhältnis 1:100 zur Perfusionsgeschwindigkeit des Herzens. Die Zugaben von Isoproterenol und Propranolol wurden in einer 10000-fachen Konzentration in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Als Antioxidans wurde jedem Ansatz Ascorbinsäure (1 mmol/l) zugesetzt. Direkt vor jedem Versuch erfolgte eine 100-fache Verdünnung der Stocklösungen mit Krebs-Henseleit-Lösung, sodass eine Zugabe im Verhältnis von 1:100 im Versuch erfolgen konnte.

In der Kontroll-Gruppe wurden für beide Zugaben Kontrolllösungen mit Ascorbinsäure verwendet. Bei den mit Isoproterenol zu stimulierenden Herzen wurde bei Zugabe 1 eine Kontrolllösung und bei Zugabe 2 Isoproterenol mit einer effektiven Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ in der Perfusionslösung gegeben. Bei den mit dem β -Blocker Propranolol zu behandelnden Herzen erfolgte bei Zugabe 1 die Gabe von Propranolol mit einer effektiven Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ in der Perfusionslösung, bei Zugabe 2 wurde die Kontrolllösung verabreicht. Bei den Herzen, die sowohl mit dem β -Blocker Propranolol als auch mit Isoproterenol zu behandeln waren, erfolgte bei Zugabe 1 die Gabe von Propranolol und bei Zugabe 2 Isoproterenol mit einer effektiven Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ (Propranolol) bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ (Isoproterenol). Das Experiment wurde nach jeweils 40 min retrograder Perfusion beendet.

Im Anschluss wurden die Papiliarmuskeln, sowie Muskelstränge der endokardialen Trabekel des linken Ventrikels unter einem Binokular mit Pinzette und Federschere entnommen und mit Minutien (Durchmesser 0,2 mm, Austerlitz) unter leichter Spannung auf einer mit Silikonkautschuk (Elastosil RT 625 A/B, Wacker) beschichteten Petrischale befestigt. Die Lagerung bis zum weiteren experimentellen Gebrauch erfolgte in einer Lösung von 50% Glycerol im Puffer niedriger ionischer Stärke bei -20°C .

Die übrigen Herzgewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum weiteren experimentellen Gebrauch gelagert.

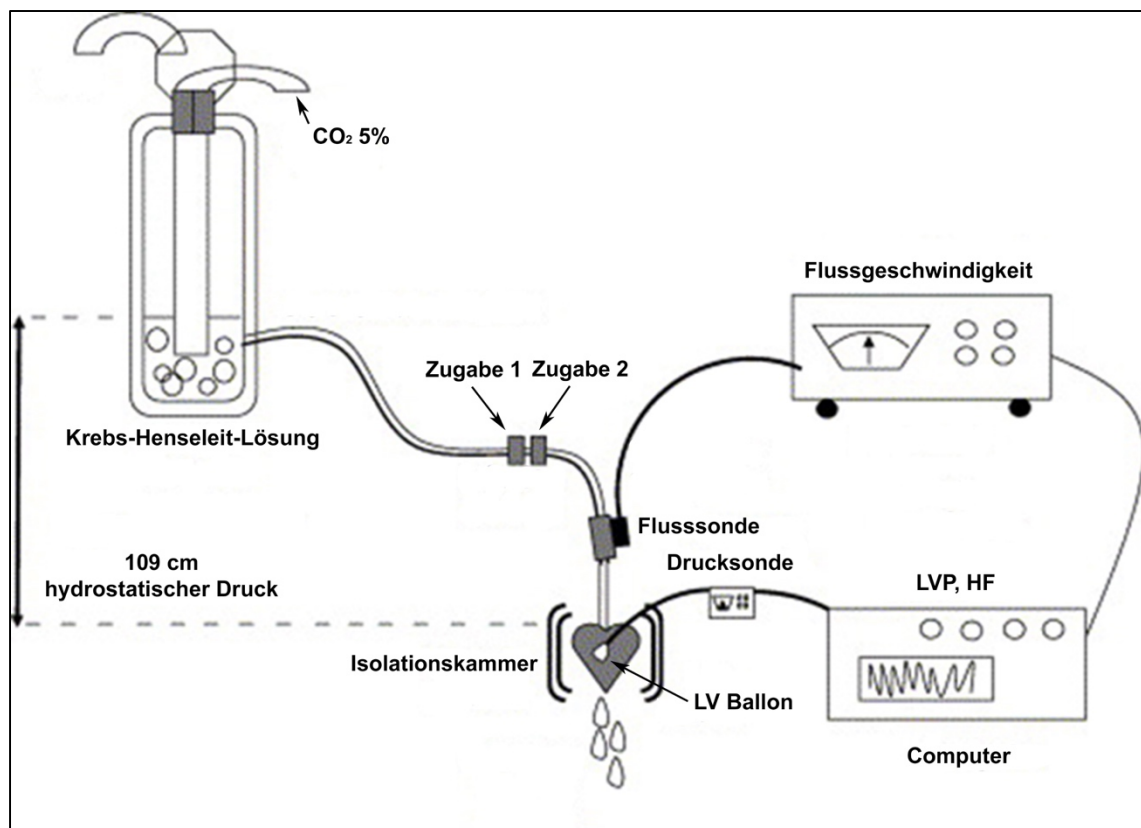


Abb. 5: Schematische Darstellung der retrograden Perfusion des isolierten Mäuseherzens (modifiziert nach Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007). LVP, Linksventrikulärer Druck; HF, Herzfrequenz; LV Ballon, linksventrikulärer Ballon; CO₂, Kohlenstoffdioxid.

2.2.3 Biophysikalische Messverfahren

2.2.3.1 Messung der passiven Steifigkeit einzelner Kardiomyozyten

Die passive Steifigkeit wurde einerseits an einzelnen Kardiomyozyten der Ratte, und andererseits an einzelnen Kardiomyozyten, die aus retrograd perfundierten Mäuseherzen isoliert wurden, gemessen. Der im gesamten Versuchsablauf verwendeten Relaxationslösung wurde 30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM) hinzugesetzt.

Die zuvor präparierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden nach einer Ruhephase von zwei Stunden in Kulturmedium mit Isoproterenol (10 $\mu\text{mol/l}$ für 5 min) oder mit Propranolol (2 $\mu\text{mol/l}$ für 15 min) stimuliert. Die Stocklösung von Isoproterenol und Propranolol wurden mit Ascorbinsäure (1 $\mu\text{mol/l}$) als Antioxidans angesetzt. Den als Kontrolle dienenden Kardiomyozyten wurde deshalb Ascorbinsäure beinhaltende Kontrolllösung im gleichen Verhältnis zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Relaxationslösung (inkl. BDM) resuspendiert und auf Eis gelagert.

Um aus den bei -80°C gelagerten Mäuseherzen einzelne Kardiomyozyten zu isolieren, wurden ca. 3-6 mg große Stücke aus dem linken Ventrikel mittels Skalpell entfernt und sofort in 100 μl eiskalte Relaxationslösung überführt. Das Gewebestück wurde mittels eines Ultra Turrax bei 800 Umdrehungen (U)/min für ca. 3 s homogenisiert. 50 μl des Überstands wurden aus dem Homogenisator abgenommen und in einem Eppendorfgefäß auf Eis gelagert, wobei möglichst größere Gewebstückchen im Homogenisator verbleiben sollten. Mit weiteren 50 μl frischer Relaxationslösung wurde der Homogenisator wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde mindestens drei Mal wiederholt bis das Gewebestück vollständig homogenisiert war.

Das Häuten erfolgte sowohl für die aus Gewebe isolierten Kardiomyozyten, als auch für die aus der Zellkultur stammenden Kardiomyozyten in Relaxationslösung mit 2 % Triton für ca. 3 min auf Eis. Eine entsprechende Menge der 10 %-Tritonlösung wurde dem Reaktionsgefäß mit der jeweiligen Zellsuspension hinzugefügt und vorsichtig durch langsames Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 3 min Inkubation wurde das Detergens wieder herausgewaschen. Dafür wurde die Probe drei bis fünf Mal bei 2000 U/min für 1 min bei 4°C zentrifugiert und jeweils der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit frischer Relaxationslösung resolubilisiert.

Die passive Steifigkeit der einzelnen Kardiomyozyten wurde am Myozytenmessstand der Firma Aurora Scientific (Permeabilized Myocyte Test System 1600A; Force Transducer 403A), der auf einem inversen Mikroskop (Nikon eclipse Ti) montiert ist, gemessen (Abb. 6).

Ein Volumen von 50-100 μl der Suspension der Kardiomyozyten wurde in Relaxationslösung auf einen Objektträger gegeben und ein Kardiomyozyt unter Sicht zwischen dem Kraftmesser (Force Transducer 403A, Aurora Scientific) und dem Längengeber (piezoelektrischer Motor) mittels Silikonkleber (Dow Corning 3140 und 3145-transparent, gemischt im Verhältnis 2:1) fixiert. Der Kleber war nach 40 min ausreichend ausgehärtet. Anschließend wurde die passive Kraft in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge gemessen. Die Bestimmung der Sarkomerlänge erfolgte mit einer CCD-Kamera (IMPERX, Aurora Scientific) und der Software HVSL 901A (Aurora Scientific) bei einer 40-fachen Vergrößerung. Ausgehend von einer Ruhesarkomerlänge von $1,9\text{ }\mu\text{m}$ wurden die Zelle in fünf Schritten auf die insgesamt 1,5-fache Länge gedehnt. Jede Länge wurde für 10 s gehalten, um mögliche Stressreaktionen

abzuwarten. Nach dem letzten Dehnungsschritt wurde die Zelle wieder auf ihre Ruhelänge verkürzt. So konnte eine mögliche Verschiebung der Ruhespannung detektiert werden. Das Ablesen der passiven Kraft erfolgte am Ende des jeweiligen Dehnungsschrittes. Die Kräfte wurden ins Verhältnis zur Querschnittsfläche der jeweiligen Zelle gesetzt, wobei näherungsweise eine rechteckige Querschnittsfläche der Zelle angenommen wurde. Für jede Zelle wurde das Messprotokoll dreimalig mit zwei Minuten Pause zwischen den Durchläufen durchgeführt.

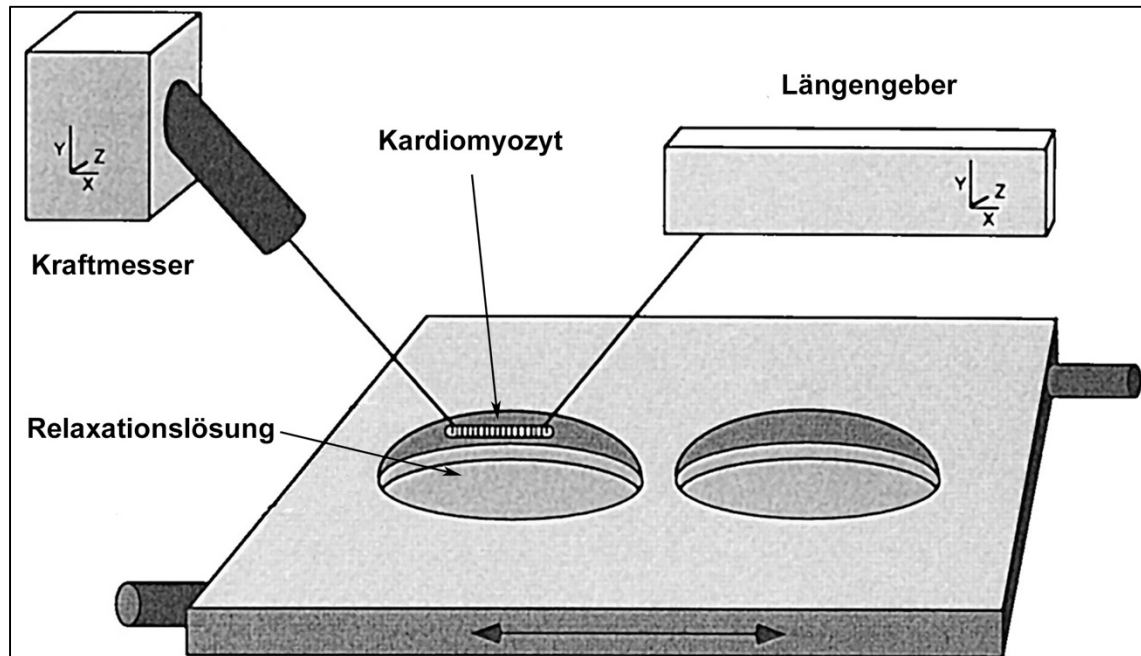


Abb. 6: Schematische Darstellung des Kardiomyozytenmessstandes (modifiziert nach van der Velden *et al.*, 1998).

2.2.3.2 Messung der relativen längenabhängigen Aktivierung gehäuteter Papiliarmuskelfasern

Die Papiliarmuskeln und Muskelfaserstränge der endokardialen Trabekel aus dem linken Ventrikel der zuvor retrograd perfundierten Mäuseherzen wurden zunächst gehäutet. Dies erfolgte in Relaxationslösung mit 3 % Triton-X-100 für eine Stunde auf Eis. Anschließend wurde das Detergens in drei Waschrissen durch Abnehmen der Lösung und Zugabe von frischer Relaxationslösung herausgewaschen.

Aus den einzelnen Muskeln wurden unter dem Binokular Muskelfasern mit einer Breite von 100-500 μm mit Pinzette und Skalpell präpariert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Muskelfasern in Relaxationslösung auf Eis gelagert.

Zur Messung der aktiven Kräfte wurde die Fasermessapparatur *MYOSCOPE-SKINNED* der Firma myotronic Heidelberg mit der Software *myodat* verwendet. Die Fasern wurden mit Metallklemmen zwischen einen Kraftaufnehmer und einen Längengeber gespannt und zunächst in Relaxationslösung überführt. Zur Bestimmung der Ruhelänge wurden die Muskelfasern durch kurzzeitige Überführung in kalziumhaltige Aktivierungslösung testweise aktiviert. Bei Unterschreitung der Ruhelänge ist nach Aktivierung kein sofortiger Kraftanstieg

detektierbar, da zunächst eine Verkürzung der nicht völlig gespannten Muskelfaser auftritt. Nach Bestimmung der Ruhelänge wurde die Faser einmalig maximal aktiviert und durch Rückführen in Relaxationslösung wieder relaxiert. Diese Messung wurde nicht verwertet, um eine Verfälschung der Messergebnisse durch eine mögliche Reorganisation der Sarkomerproteine auszuschließen.

Dann wurde das eigentliche Messprotokoll mit einer vollständigen Aktivierung aus der Ruhelänge gestartet. Dafür wurde die relaxierte Muskelfaser von der Relaxationslösung in die Aktivierungslösung überführt. Nach Erreichen eines Plateaus der gemessenen Kraft wurde die Faser wieder in Relaxationslösung überführt und die vollständige Relaxation abgewartet. Nach einer Ruhephase von ca. 2 min wurde die Faser passiv um 20 % der Ruhelänge gedehnt, erneut aktiviert und nach Erreichen der Maximalkraft relaxiert. Dieses Messprotokoll wurde für jede Faser mindestens zweimal durchgeführt. Für jedes einzelne Messpaar wurde die maximal entwickelte aktive Kraft nach Vordehnung in das Verhältnis zur vorherig gemessenen maximal entwickelten Kraft aus Ruhelänge gesetzt und so die relative Steigerung der aktiven Maximalkraft durch 1,2-fache Vordehnung der Papiliarmuskelfasern ermittelte.

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenauftrennung von Proteinen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Für die dafür nötige Proteinisolation wurden kultivierte Rattenkardiomyozyten oder Gewebeproben aus Mäuseherzen in modifiziertem Laemmli-puffer solubilisiert.

Zuvor wurden die Rattenkardiomyozyten nach einer Ruhephase von zwei Stunden im Kulturmedium mit Isoproterenol (10 $\mu\text{mol/l}$ für 5 min) oder mit Propranolol (2 $\mu\text{mol/l}$ für 15 min) stimuliert. Die Stocklösungen von Isoproterenol und Propranolol wurden mit Ascorbinsäure (1 $\mu\text{mol/l}$) als Antioxidans angesetzt. Den als Kontrolle dienenden Kardiomyozyten wurde deshalb Ascorbinsäure beinhaltende Kontrolllösung im gleichen Verhältnis zugesetzt. Die Zellen wurden nach Beendigung der Stimulation bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert, das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen im modifizierten Laemmli-puffer solubilisiert.

Die Gewebeproben wurden auf einem auf Eis gekühlten Uhrglas aus dem linken Ventrikel der Mäuseherzen mittels Skalpells herausgeschnitten und mit dem modifizierten Laemmli-puffer vermengt. Anschließend wurden die Proben für ca. 30 min auf Eis ruhen gelassen. Zum vollständigen Denaturieren der Proteine wurden die Proben unmittelbar vor dem Auftragen auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel bei 97° C für 3 min erhitzt und mit einer Tischzentrifuge für ca. 1 min zentrifugiert.

Zur Größenauftrennung von Proteinen kleinerer Größe als Titin wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Trenngelen mit einem Acrylamidanteil von 10 % und Sammelgelen verwendet (siehe Tabelle 7). Diese wurden mit den Gelelektrophoresesystemen Mini-PROTEAN der Firma Biorad und Mini-Twin der Firma Biometra durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach dem Aushärten mit Sammelgel überschichtet. Die SDS-PAGE wurde bei Stromstärken von 10-20 mA pro Gel in 1x Laufpuffer vorgenommen.

Tabelle 7: Standard SDS-Gel

Lösung	Trenngel 10 %	Sammelgel
30 % Acrylamidlösung	5 ml	0,667 ml
H ₂ O <i>bidest</i>	6,25 ml	3,025 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	3,75 ml	—
4x SDS-Sammelgelpuffer	—	1,25 ml
TEMED	7,5 µl	15 µl
APS	75 µl	50 µl
Gesamtvolumen	15 ml	5 ml

Zur Größenauftrennung von Titin wurden mit Agarose stabilisierte Gele mit einem Acrylamidanteil von 2,1 % verwendet. Dafür wurden die Gelelektrophoresesysteme Mini-PROTEAN der Firma Biorad und Mini-Twin der Firma Biometra verwendet. Alle Bestandteile außer APS und Agarose (siehe Tabelle 8) wurden zunächst zusammen in einem 50 ml Reaktionsgefäß im Wasserbad auf mindestens 48° C erwärmt und dann mit APS und der zuvor in der Mikrowelle aufgekochten Agarose gemischt. Die warme Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten pipettiert und die Polymerisierung für mindestens 90 min abgewartet. Bei späterer Verwendung wurden die Gele bei 4° C und hoher Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Titin-SDS-PAGE erfolgte bei Stromstärken von 1 - 5 mA pro Gel in 1x-Laufpuffer.

Tabelle 8: Titingel

Lösung	Titingel 2,1 %
30 % Acrylamidlösung	1,45 ml
H ₂ O <i>bidest</i>	6,5 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20 %	100 µl
TEMED	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5 %	6,78 ml
Gesamtvolumen	20 ml

2.2.4.2 Western Blot

Durch die Methode des *semidry* Western Blot wurden zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylendifluorid-Membran) übertragen. Dafür wurde das *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio Rad) verwendet. Drei *Whatman*-Papiere (3 MM) wurden in Anodenpuffer getränkt und auf die Anode des Western Blotsystems platziert. Eine zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde darübergelegt und das Polyacrylamidgel wiederum darauf positioniert. Anschließend wurden drei in Kathodenpuffer getränkte *Whatman*-Papiere darüber platziert. Um einen effizienten Transfer zu ermöglichen, wurden Luftblasen zwischen Membran und Polyacrylamidgel entfernt. Für den Transfer von Proteinen aus Gelen mit 10% Acrylamidanteil wurde eine Stromstärke von 2,5 A bei einer maximalen Spannung von 25 V für 7 min angelegt, für Titingele wurde eine Stromstärke von 1,5 A bei einer maximalen Spannung von 20 V für 20 min angelegt.

Zur Kontrolle des Proteinübertrags auf die PVDF-Membran wurde die Membran in PVDF-*Stain* für ca. 30 s inkubiert und anschließend in PVDF-*Destain* solange entfärbt bis die angefärbten Proteinbanden gut sichtbar waren. Für die weiteren Schritte wurden ausschließlich Membranen verwendet, die einen gleichmäßigen Proteintransfer aufwiesen. Daraufhin wurden die PVDF-Membranen einmal in TBST gewaschen und dann für mindesten eine Stunde mit 2% BSA in TBST blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit einem primären Antikörper (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5) in 0,5 % BSA in TBST über Nacht bei 4° C. Nach drei Waschschritten mit TBST wurde die PVDF-Membran mit dem gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, für mindestens eine Stunde in 0,5 % BSA in TBST inkubiert. Nach wiederum drei Waschschritten in TBST wurde die PVDF-Membran mit dem zuvor im Verhältnis 1:1 gemischten Chemielumineszenzreagenz 1 und 2 (*ECL reagent*) gleichmäßig bedeckt und die Signale mit dem Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) detektiert. Phosphorylierungsanalysen wurden auf ein und demselben Blot durch Verwendung phosphospezifischer und Gesamt-Antikörper durchgeführt (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5). Die phosphospezifischen primären Antikörper wurden durch eine 50-minütige Inkubation der PVDF-Membran in *stripping buffer* entfernt. Dem Puffer wurde β -Mercaptoethanol erst unmittelbar vor dem Gebrauch hinzugefügt. Anschließend wurden die Membranen 3-5-mal mit 1x TBST gewaschen, erneut mit 2 % BSA in TBST für mindestens eine Stunde blockiert und die Membranen mit dem primären Gesamt-Antikörper inkubiert. Für jeden verwendeten phosphospezifischen Antikörper wurde die Funktion des Strippingprotokolls überprüft, indem nach Inkubation im *stripping buffer* und erneuter Blockierung mit 2 % BSA in TBST nur eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper und anschließender Chemielumineszenzaufnahme erfolgte.

Die densitometrische Auswertung der durch Chemielumineszenz sichtbar gemachten Banden erfolgte mit ImageJ (NIH). Dabei wurde das Verhältnis der phosphospezifischen Signale zum Gesamtsignal derselben Bande berechnet. Diese detektierten Signale wurden wiederum auf die auf jedem Blot vorhandenen Kontrollen normiert und als relative Unterschiede angegeben. Jede Probe wurde auf mindestens drei verschiedenen Blots analysiert und die einzelnen Messwerte wurden gemittelt.

2.2.5 Software

Zusätzlich zur explizit im Text erwähnten Software wurde folgende Software im Rahmen der Doktorarbeit verwendet: SigmaPlot 13, Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Adobe Photoshop.

2.2.6 Statistische Datenanalyse

Die statistische Signifikanz der passiven Zugspannungen einzelner Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Sarkomerlänge wurde mittels zweifaktorieller ANOVA (*two-way ANOVA*) überprüft. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Unterschiede in der relativen längenabhängigen Aktivierung der Papiliarmuskelfasern, sowie der relativen Phosphorylierung der unterschiedlichen Proben wurde der *Mann-Whitney rank sum test*, sowie der *Student's t-test* verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen und in den Abbildungen entsprechend markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Adulte Rattenkardiomyozyten

3.1.1 Passive Steifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Um den Einfluss β -adrenerger Stimulation auf die passive Steifigkeit zu messen, wurden isolierte, adulte Rattenkardiomyozyten für fünf Minuten mit Isoproterenol (10 $\mu\text{mol/l}$) behandelt. Anschließend wurde die passive Steifigkeit von einzelnen gehäuteten Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Sarkomerlänge gemessen, wobei die Zelle dafür in fünf Schritten auf 150 % der Ausgangslänge gedehnt wurde. Ein Beispiel einer solchen Messung ist in Abb. 7 dargestellt.

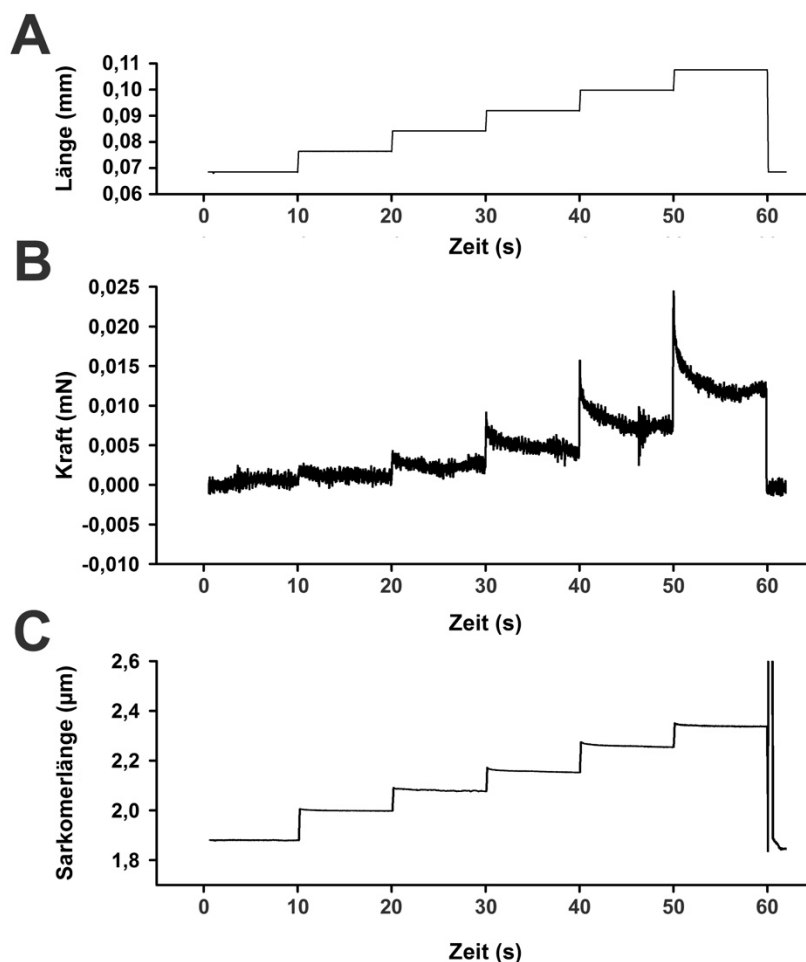


Abb. 7: Messung der passiven Kraft einer isolierten, adulten Rattenkardiomyozyte. Die Kardiomyozyte wurde ausgehend von der Ruhelänge in fünf Schritten auf die insgesamt 1,5-fache Länge gedehnt. Jede Länge wurde für 10s gehalten. Nach dem letzten Dehnungsschritt wurde die Zelle wieder auf ihre Ruhelänge verkürzt. (A) Schema des Messprotokolls: Stufenweise Längenänderung der Zelle durch den Längengeber (Piezoelektrischer Motor). (B) Aufzeichnung der passiven Kraft (Force Transducer 403A, Aurora Scientific). (C) Sarkomerlänge gemessen mit einer CDC-Kamera (IMPERX, Aurora Scientific).

Zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Zellen wurde aus den gemessenen passiven Kräften und der Querschnittsfläche der jeweiligen Zelle die passive Zugspannung berechnet. Die passive Zugspannung wurde in Abhängigkeit der Sarkomerlänge für Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen ($n = 18$ Zellen aus 7 unabhängigen Präparationen) und für mit Isoproterenol stimulierte Kardiomyozyten ($n = 21$ aus 7 unabhängigen Präparationen) ermittelt. (Abb. 8A) Bei einer Sarkomerlänge von $2,2\ \mu\text{m}$ besteht eine statistisch signifikante Abnahme der passiven Zugspannung von den mit Isoproterenol behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wobei die passive Zugspannung um $28,1 \pm 7,7\ \%$ erniedrigt ist. (Abb. 8B) Bei den Sarkomerlängen $2,0\ \mu\text{m}$; $2,1\ \mu\text{m}$; $2,3\ \mu\text{m}$ und $2,4\ \mu\text{m}$ ist der Mittelwert der gemessenen passiven Zugspannung für mit Isoproterenol stimulierte Kardiomyozyten jeweils kleiner als der der Kontrolle, jedoch bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

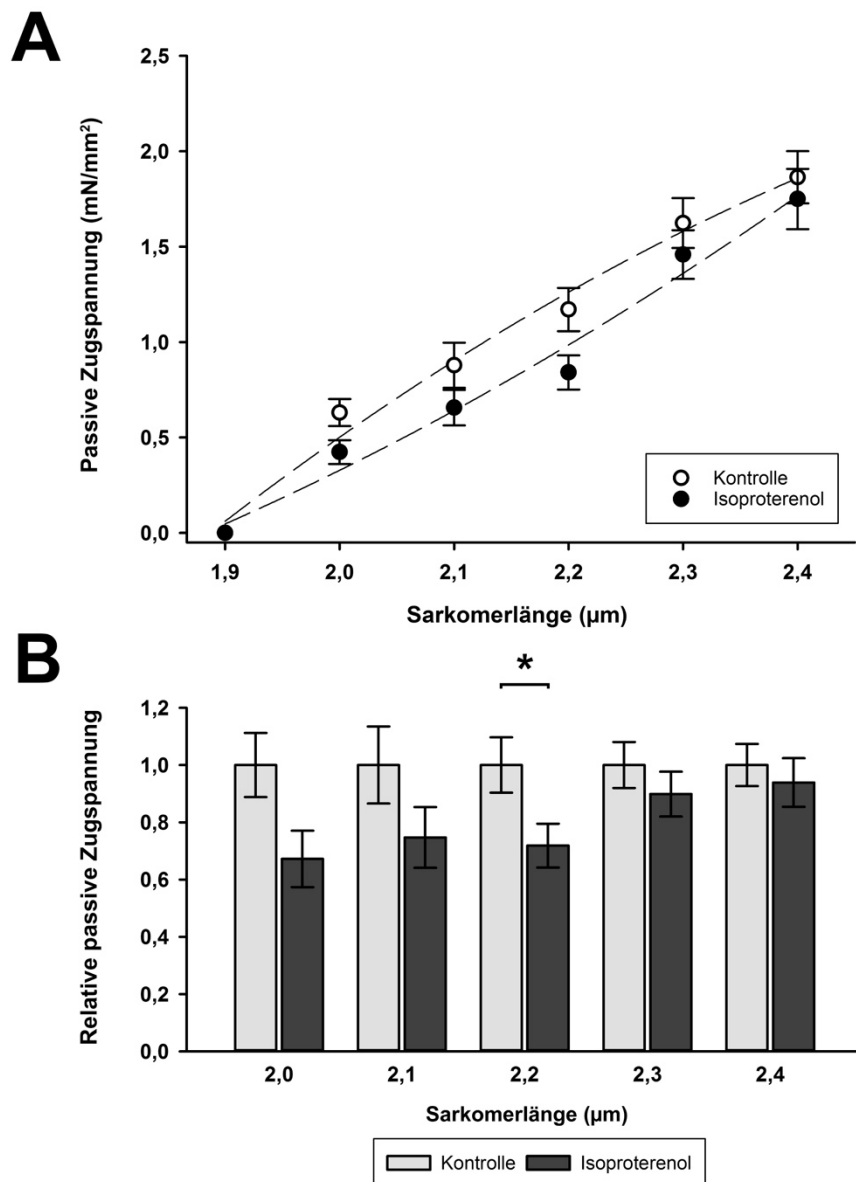


Abb. 8: Passive Zugspannung einzelner adulter Rattenkardiomyozyten in Abhängigkeit der Sarkomerlänge. Adulte isolierte Rattenkardiomyozyten wurden mit Isoproterenol (10 μmol/l für 5 min) behandelt und die passive Zugspannung mit der unbehandelten Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen verglichen. (A) Passive Zugspannung in mN/mm² in Abhängigkeit der Sarkomerlänge in μm von Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (n=18 aus 7 unabhängigen Präparationen, offene Symbole) und mit Isoproterenol behandelte Kardiomyozyten (n=21 aus 7 unabhängigen Präparationen, ausgefüllte Symbole). Es sind die Mittelwerte und der Standardfehler dargestellt. (B) Darstellung der relativen passiven Zugspannung für die unterschiedlichen Sarkomerlängen. Die passive Zugspannung ist auf die Kontrolle mit der jeweiligen Sarkomerlänge normiert. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert (p<0,05, two-way ANOVA und Mann-Whitney rank sum test).

3.1.2 Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin nach β-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Es wurde der Einfluss der β-adrenergen Stimulation bzw. der β-Rezeptorblockade in kultivierten adulten Kardiomyozyten auf den Phosphorylierungsstatus in der N2-Bus im I-Band von Titin analysiert.

In kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten konnte sowohl nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol (10 $\mu\text{mol/l}$ für 5 min) als auch nach β -Rezeptorblockade mit Propranolol (2 $\mu\text{mol/l}$ für 15 min) eine Tendenz zur erhöhten N2-Bus S4010-Titinphosphorylierung um $29,6 \pm 22,6 \%$ (Isoproterenol) bzw. $34,7 \pm 30,7 \%$ (Propranolol) festgestellt werden, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 9).

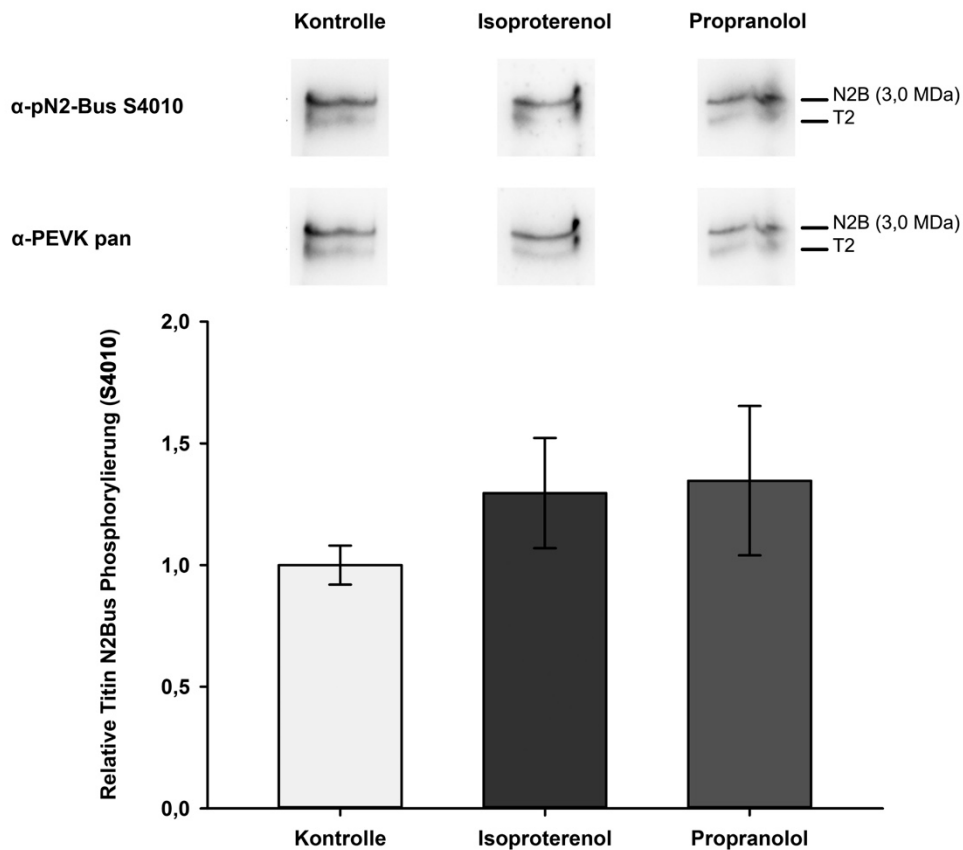


Abb. 9: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin (pN2-Bus S4010) im Western Blot nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol bzw. β -Blockade mit Propranolol in kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten. Oben: Repräsentativer Western Blot mit pN2-Bus S4010 Signal und korrespondierendem Gesamt-Titin Signal (PEVK pan). T2 = spezifische Degradationsbande des Titins. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM (n=19 Kontrolle, n=18 Isoproterenol, n=11 Propranolol; aus insgesamt 4 unabhängigen Präparationen).

3.1.3 Indirekter Nachweis der Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Um die Änderung der Aktivität der Proteinkinase A (PKA) in β -adrenerg stimulierten (Isoproterenol 10 $\mu\text{mol/l}$ für 5 min) bzw. β -blockierten (Propranolol 2 $\mu\text{mol/l}$ für 15 min) kultivierten, adulten Rattenkardiomyozyten nachzuweisen, wurde der Phosphorylierungsstatus des PKA-Substrats Troponin I an S23/24 (Noland *et al.*, 1995) analysiert.

In mit Isoproterenol stimulierten Kardiomyozyten war die Troponin I S23/24-Phosphorylierung im Vergleich zu Kontrollbedingungen um $172,9 \pm 74,6 \%$ statistisch signifikant erhöht. In mit

Propranolol behandelten Kardiomyozyten war die Troponin I S23/24-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 10).

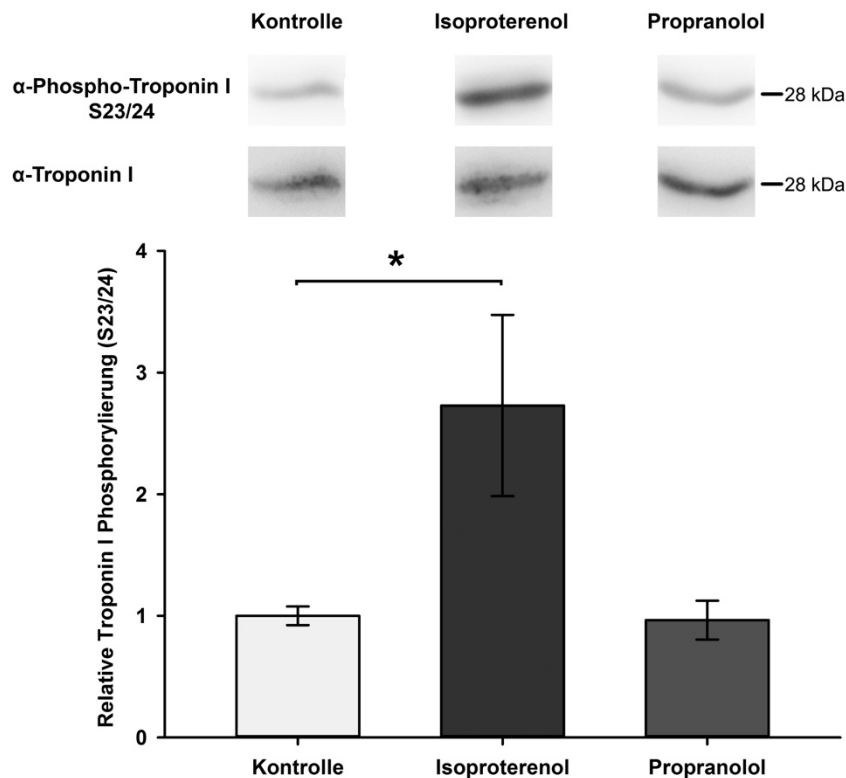


Abb. 10: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Troponin I (S23/24) im Westernblot nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol bzw. β -Blockade mit Propranolol in kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten. Oben: Repräsentativer Westernblot mit Phospho-Troponin I S23/24 Signal und korrespondierendem Troponin I Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM (n=6), Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*).

3.2 Retrograd perfundierte Mäuseherzen („Langendorff-Herzen“)

3.2.1 Änderung hämodynamischer Messgrößen während der retrograden Perfusion isolierter Mäuseherzen durch β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol bzw. β -adrenerge Blockade mit Propranolol

Um die Auswirkungen der β -adrenergen Stimulation auf die titinbasierte Myofilamentsteifigkeit zu analysieren, wurden Experimente an retrograd perfundierten, isolierten Mäuseherzen durchgeführt. Das experimentelle Vorgehen ist in Abb. 11 schematisch dargestellt.

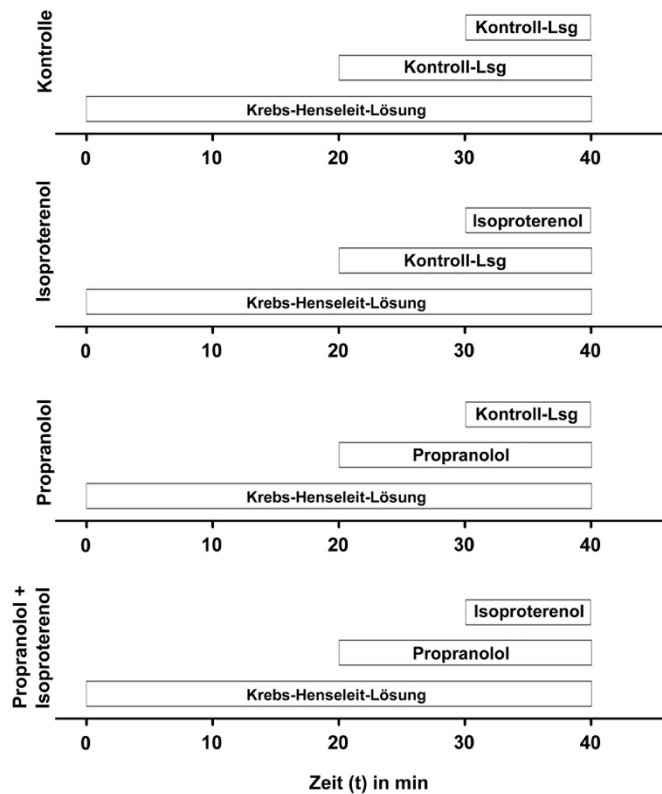


Abb. 11: Schematische Darstellung der Perfusionsprotokolle für die retrograde Perfusion der isolierten Mäuseherzen. Für die ersten 20 min erfolgte jeweils eine alleinige Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung. Ab 20 min und 30 min erfolgte jeweils eine Zugabe im Verhältnis 1/100 zur Perfusionsgeschwindigkeit, die bis zum Ende des Versuchs nach 40 min fortgeführt wurden. Alle Zugaben enthielten Ascorbinsäure mit einer effektiven Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ zum Perfusionsvolumen und waren in Krebs-Henseleit-Lösung gelöst. Isoproterenol wurde in einer effektiven Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ und Propranolol von 2 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde mit einem Ballon im linken Ventrikel gemessen und zusammen mit der Herzfrequenz (HF) und der Perfusionsgeschwindigkeit (Perf.) während des gesamten Versuchs aufgezeichnet. Die Messwerte für die Zeitpunkte $t = 20 \text{ min}$, $t = 30 \text{ min}$ und $t = 40 \text{ min}$ sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Nach Stimulation mit Isoproterenol stieg der LVP um $177 \pm 7,86 \text{ mmHg}$ an, die HF um $230 \pm 36,79 / \text{min}$ und die Perf. um $4,56 \pm 1,12 \text{ ml/min}$ (Abb. 12 rechte Spalte). In mit Propranolol behandelten Herzen fiel der LVP um $13,53 \pm 2,02 \text{ mmHg}$ ab, die HF um $85,33 \pm 8,76 / \text{min}$ und die Perf. um $0,43 \pm 0,04 \text{ ml/min}$ (Abb. 12 linke Spalte). In mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen fiel der LVP um $7,23 \pm 3,70 \text{ mmHg}$ ab und stieg dann um $100,67 \pm 29,69 \text{ mmHg}$ an, die HF fiel um $109,67 \pm 33,96 / \text{min}$ ab und stieg dann um $217,67 \pm 28,99 / \text{min}$ an und die Perf. fiel zunächst um $0,33 \pm 0,22 \text{ ml/min}$ ab und stieg dann um $1,56 \pm 0,83 \text{ ml/min}$ an (Abb. 12).

Tabelle 9: Linksventrikulärer Druck (LVP), Herzfrequenz (HF) und Perfusionsgeschwindigkeit (Perf.) zu den Zeitpunkten t = 20 min, t = 30 min und t = 40 min, sowie die jeweiligen Differenzen (Δ) von den Zeitpunkten t = 30 - t = 20 und t = 40 - t = 30. Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt.

	Kontrolle (n = 3) Mittelwert $\pm$ SEM	Isoproterenol (n = 3) Mittelwert $\pm$ SEM	Propranolol (n = 3) Mittelwert $\pm$ SEM	Propranolol + Isoproterenol (n = 3) Mittelwert $\pm$ SEM
LVP $t=20\text{min}$ (mmHg)	101,20 $\pm$ 7,35	79,30 $\pm$ 3,67	78,63 $\pm$ 4,10	69,57 $\pm$ 12,63
LVP $t=30\text{min}$ (mmHg)	102,37 $\pm$ 4,00	83,40 $\pm$ 3,33	65,10 $\pm$ 4,73	62,33 $\pm$ 8,93
LVP $t=40\text{min}$ (mmHg)	96,60 $\pm$ 3,77	261,23 $\pm$ 11,13	69,50 $\pm$ 2,88	163,00 $\pm$ 27,55
Δ LVP $t=30 - t=20$ (mmHg)	1,17 $\pm$ 3,67	4,10 $\pm$ 0,48	-13,53 $\pm$ 2,02	-7,23 $\pm$ 3,70
Δ LVP $t=40 - t=30$ (mmHg)	-5,77 $\pm$ 1,27	177,83 $\pm$ 7,86	4,40 $\pm$ 2,13	100,67 $\pm$ 29,69
HF $t=20\text{min}$ (/min)	371,67 $\pm$ 12,96	384,00 $\pm$ 9,39	407,67 $\pm$ 21,39	436,00 $\pm$ 28,6
HF $t=30\text{min}$ (/min)	407,33 $\pm$ 27,12	379,67 $\pm$ 8,57	322,33 $\pm$ 22,41	326,33 $\pm$ 11,22
HF $t=40\text{min}$ (/min)	391,00 $\pm$ 38,38	609,67 $\pm$ 28,44	281,67 $\pm$ 32,76	544,00 $\pm$ 37,80
Δ HF $t=30 - t=20$ (/min)	35,67 $\pm$ 23,18	-4,33 $\pm$ 2,18	-85,33 $\pm$ 8,76	-109,67 $\pm$ 33,96
Δ HF $t=40 - t=30$ (/min)	-16,33 $\pm$ 19,55	230,00 $\pm$ 36,79	-40,67 $\pm$ 10,43	217,67 $\pm$ 28,99
Perf. $t=20$ (ml/min)	3,96 $\pm$ 0,02	2,52 $\pm$ 0,08	3,14 $\pm$ 0,53	2,89 $\pm$ 0,56
Perf. $t=30\text{min}$ (ml/min)	3,95 $\pm$ 0,02	2,63 $\pm$ 0,13	2,72 $\pm$ 0,50	2,56 $\pm$ 0,52
Perf $t=40\text{min}$ (ml/min)	3,78 $\pm$ 0,06	7,19 $\pm$ 0,99	2,65 $\pm$ 0,44	4,11 $\pm$ 0,38
Δ Perf $t=30 - t=20$ (ml/min)	-0,01 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,05	-0,43 $\pm$ 0,04	-0,33 $\pm$ 0,22
Δ Perf $t=40 - t=30$ (ml/min)	-0,16 $\pm$ 0,03	4,56 $\pm$ 1,12	-0,06 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,83

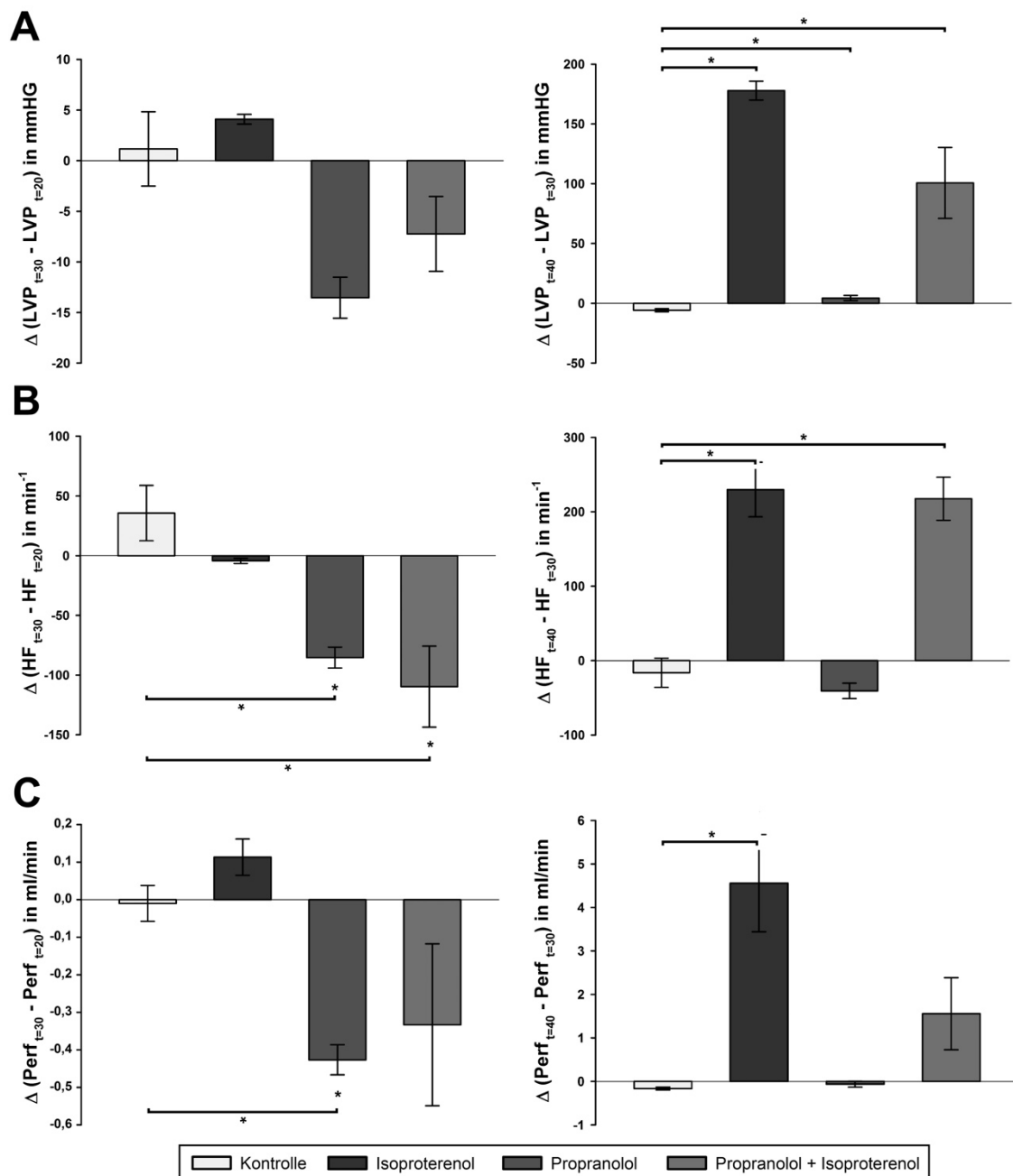


Abb. 12: Änderung des linksventrikulären Drucks (LVP) (A), der Herzfrequenz (HF) (B) und der Perfusionsgeschwindigkeit (Perf) (C) nach Zugabe von Kontrolllösung, Isoproterenol, Propranolol oder Propranolol + Isoproterenol in die Perfusionslösung von retrograd perfundierten isolierten Mäuseherzen. In der linken Spalte sind jeweils die Unterschiede zwischen $t = 30$ min und $t = 20$ min (nach Zugabe 1), in der rechten Spalte die Unterschiede zwischen $t = 40$ min und $t = 30$ min (nach Zugabe 2) dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$; *Student's t-test*).

3.2.2 Abnahme der passiven Steifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Um den Einfluss der β -adrenergen Stimulation bzw. der β -Rezeptorblockade auf die passive Steifigkeit einzelner Kardiomyozyten aus den oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen zu messen, wurden zunächst einzelne Kardiomyozyten aus den Herzgeweben

isoliert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Die passive Kraft wurde in Abhängigkeit der Sarkomerlänge gemessen. Ein Beispiel einer solchen Messung ist in Abb. 13 dargestellt.

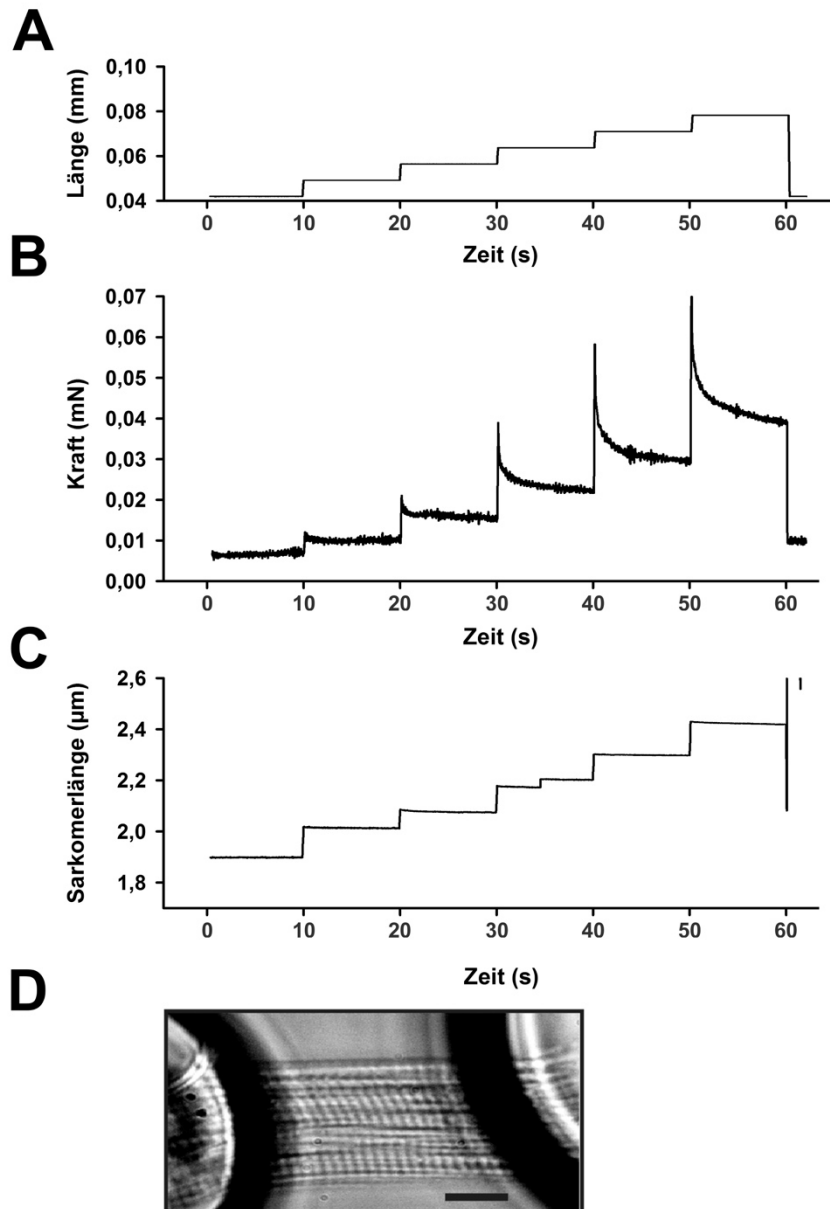


Abb. 13: Passive Kraftmessung einer einzelnen Kardiomyozyte nach Isolierung aus Herzgewebe. Ausgehend von der Ruhelänge wurden die Zellen in fünf Schritten auf die insgesamt 1,5-fache Länge gedehnt. Jede Länge wurde für 10 s gehalten. Nach dem letzten Dehnungsschritt wurde die Zelle wieder auf ihre Ruhelänge verkürzt. (A) Stufenweise Längenänderung der Zelle durch den Längengeber (Piezoelektrischer Motor). (B) Aufzeichnung der passiven Kraft (Force Transducer 403A, Aurora Scientific). (C) Sarkomerlänge gemessen mit einer CCD-Kamera (IMPERX, Aurora Scientific). (D) Repräsentatives Beispiel einer zwischen Kraftaufnehmer und Längengeber fixierten Kardiomyozyte. Der schwarze Balken entspricht 10 μm ; 400-fache Vergrößerung.

Zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Zellen wurde aus den gemessenen passiven Kräften und der Querschnittsfläche der jeweiligen Zelle die passive Zugspannung berechnet. Die passive Zugspannung wurde in Abhängigkeit der Sarkomerlänge für Kardiomyozyten aus den Geweben der oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen gemessen. Für die Gruppen Kontrolle ($n = 3$), Isoproterenol ($n = 3$), Propranolol ($n = 3$) und Propranolol + Isoproterenol ($n = 3$) wurden aus jedem Gewebe jeweils fünf bis sechs isolierte Kardiomyozyten gemessen.

Die passive Zugspannung der mit Isoproterenol stimulierten Herzen, sowie die passive Zugspannung der mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen ist über den gesamten Kurvenverlauf von einer Sarkomerlänge von 2,0 μm bis 2,4 μm im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant vermindert (Abb. 14 A). Relativ ist die passive Zugspannung bei einer Sarkomerlänge von 2,0 μm um $49,82 \pm 3,84 \%$ (Isoproterenol) bzw. um $60,23 \pm 3,66 \%$ (Propranolol + Isoproterenol) erniedrigt (Abb. 14 B). Für Propranolol behandelte Herzen lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrolle feststellen.

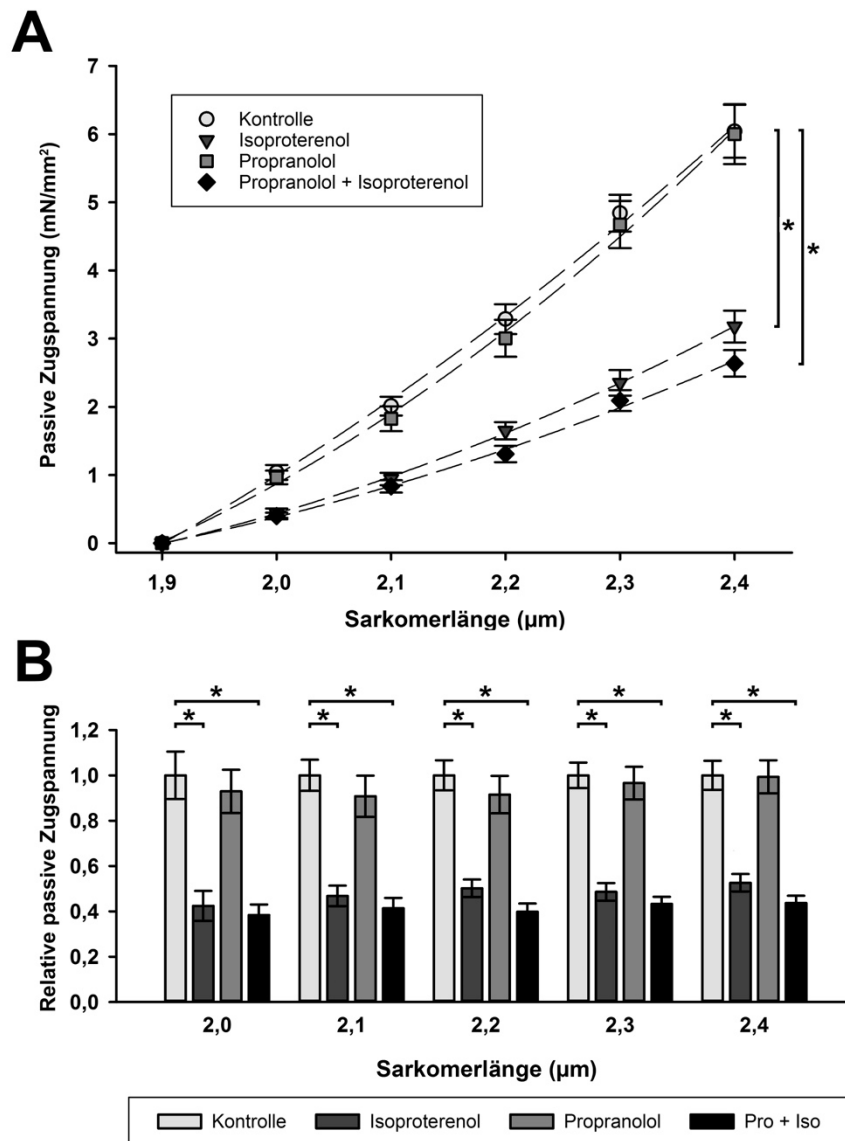


Abb. 14: Passive Zugspannung einzelner aus Mausgewebe isolierter Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Sarkomerlänge. Kardiomyozyten wurden durch Homogenisation aus Herzgewebe isoliert. Mäuseherzen wurden zuvor retrograd perfundiert und entweder mit Kontrolllösung, Isoproterenol, Propranolol oder Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso) behandelt. (A) Passive Zugspannung in mN/mm^2 in Abhängigkeit der Sarkomerlänge in μm . Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler dargestellt. ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 5-6 Zellen gemessen.) (B) Darstellung der relativen passiven Zugspannung für die unterschiedlichen Sarkomerlängen. Die passive Zugspannung ist auf die Kontrolle der jeweiligen Sarkomerlänge normiert. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, two-way ANOVA und Mann-Whitney rank sum test).

3.2.3 Abnahme der längenabhängigen Aktivierung von gehäuteten Papillarmuskelfasern nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol

Zur Messung der längenabhängigen Aktivierung wurden aus den oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen Papillarmuskeln und Muskelstränge der endokardialen Trabekel entnommen und aus diesen Muskelfasern präpariert und gehäutet. Die maximale aktive Kraft aus Ruhelänge, sowie die maximale aktive Kraft nach Vordehnung um 20 % wurden gemessen. Ein Beispiel einer Messung ist in Abb. 15 gezeigt.

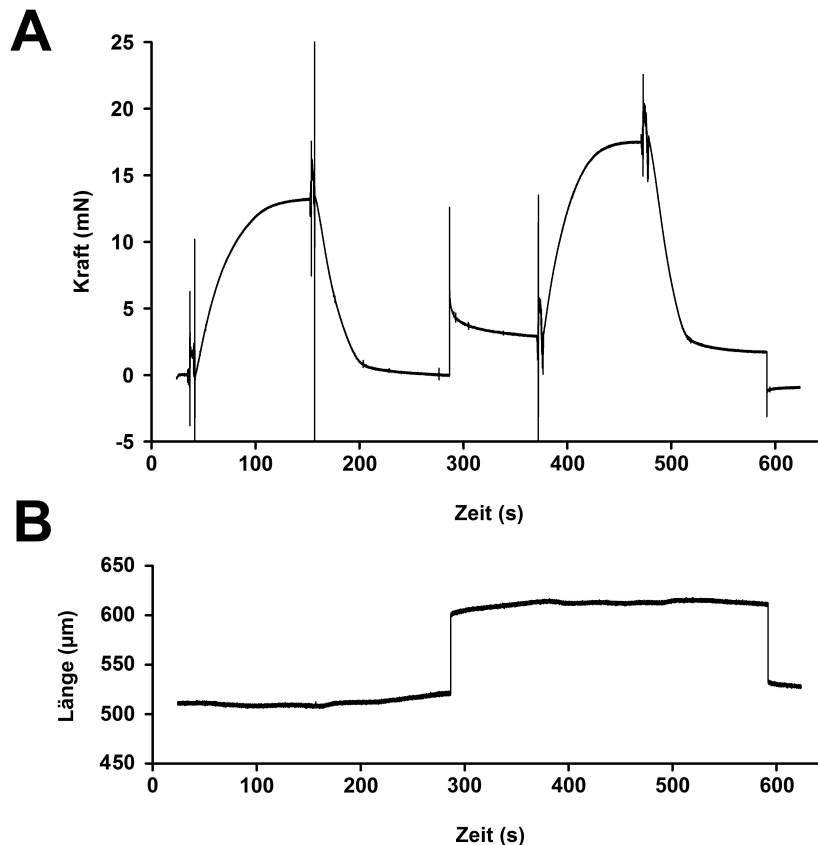


Abb. 15: Beispiel einer Messung der längenabhängigen Aktivierung einer gehäuteten Papillarmuskelfaser. (A) Aktiver Kraftanstieg nach Überführung der Faser von Relaxationslösung in kalziumhaltige Aktivierungslösung. Kraftabfall nach Rückführung der Faser in Relaxationslösung. Passiver Kraftanstieg nach Dehnung der Faser auf 120 % der Ruhelänge (siehe B) und erneuter aktiver Kraftanstieg nach Überführung in Aktivierungslösung. Die aktive Maximalkraft nach Vordehnung (ohne passive Kraft) wird in das Verhältnis zur Maximalkraft aus Ruhelänge gesetzt.

Aus dem Quotienten der maximalen aktiven Kraft nach Vordehnung und der maximalen Kraft aus Ruhelänge wurde die relative Änderung der maximalen aktiven Kraft für jede einzelne Faser berechnet. Für die Gruppen Kontrolle ($n = 3$), Isoproterenol ($n = 3$), Propranolol ($n = 3$) und Propranolol + Isoproterenol ($n = 3$) wurden aus jedem Gewebe von jeweils vier bis fünf Fasern die relative Änderung der maximalen aktiven Kraft durch 1,2-fache Vordehnung gemessen. Diese Messwerte wurden zur besseren Übersichtlichkeit auf die Kontrolle normiert. (Abb. 16)

Im Vergleich zur Kontrolle war die Änderung der maximalen aktiven Kraft nach Vordehnung um 20% von gehäuteten Fasern, die aus mit Isoproterenol behandelten Herzen stammen, um $21,08 \pm 1,6 \%$ verringert. Bei Fasern, die aus mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen stammen, war die Änderung der maximalen Kraft um $17,4 \pm 2,1 \%$ verringert. Für Fasern aus mit Propranolol behandelten Herzen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

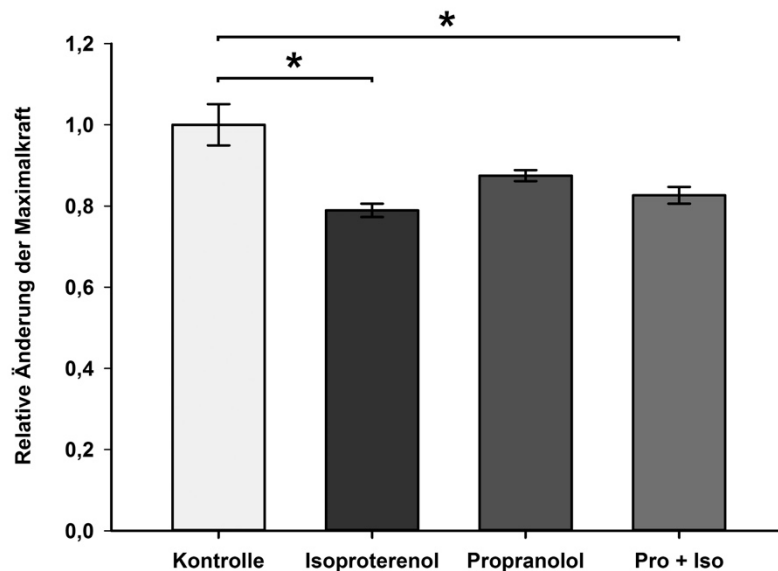


Abb. 16: Relative Änderung der aktiven Maximalkraft von gehäuteten Papiliarmuskelfasern durch Vordehnung um 20 %. Gehäutete Papiliarmuskelfasern wurden aus zuvor retrograd perfundierten Mäuseherzen präpariert, die entweder mit Kontrolllösung, Isoproterenol, Propranolol oder Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso) behandelt wurden. Die aktive Maximalkraft nach Vordehnung um 20 % wurde ins Verhältnis zur Maximalkraft aus der Ausgangslänge gesetzt. Dieses Verhältnis wurde wiederum auf die Kontrollgruppe normiert. Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler dargestellt. (n = 3 Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 4-5 Fasern gemessen.) Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*).

3.2.4 Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin nach β -adrenerger Stimulation

Der Einfluss der β -adrenergen Stimulation bzw. der β -Rezeptorblockade auf den Phosphorylierungsstatus der N2-Bus und der PEVK-Region im I-Band von Titin wurde in den oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen analysiert.

In mit Isoproterenol stimulierten Herzen zeigte sich, so wie auch in mit Propranolol behandelten Herzen, für die beiden Phosphorylierungsstellen in der N2-Bus (pN2-Bus S4010, pN2-Bus S4099) kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 17). Für mit Propranolol und Isoproterenol behandelte Herzen zeigten sich für beide in der N2-Bus untersuchten Phosphorylierungsstellen gegenläufige Entwicklungen (Abb. 17). So war die relative Phosphorylierung gegenüber der Kontrolle an pN2-Bus S4010 um $75,7 \pm 25,7 \%$ statistisch signifikant erhöht und an pN2-Bus S4099 um $24,6 \pm 10,8 \%$ statistisch signifikant erniedrigt.

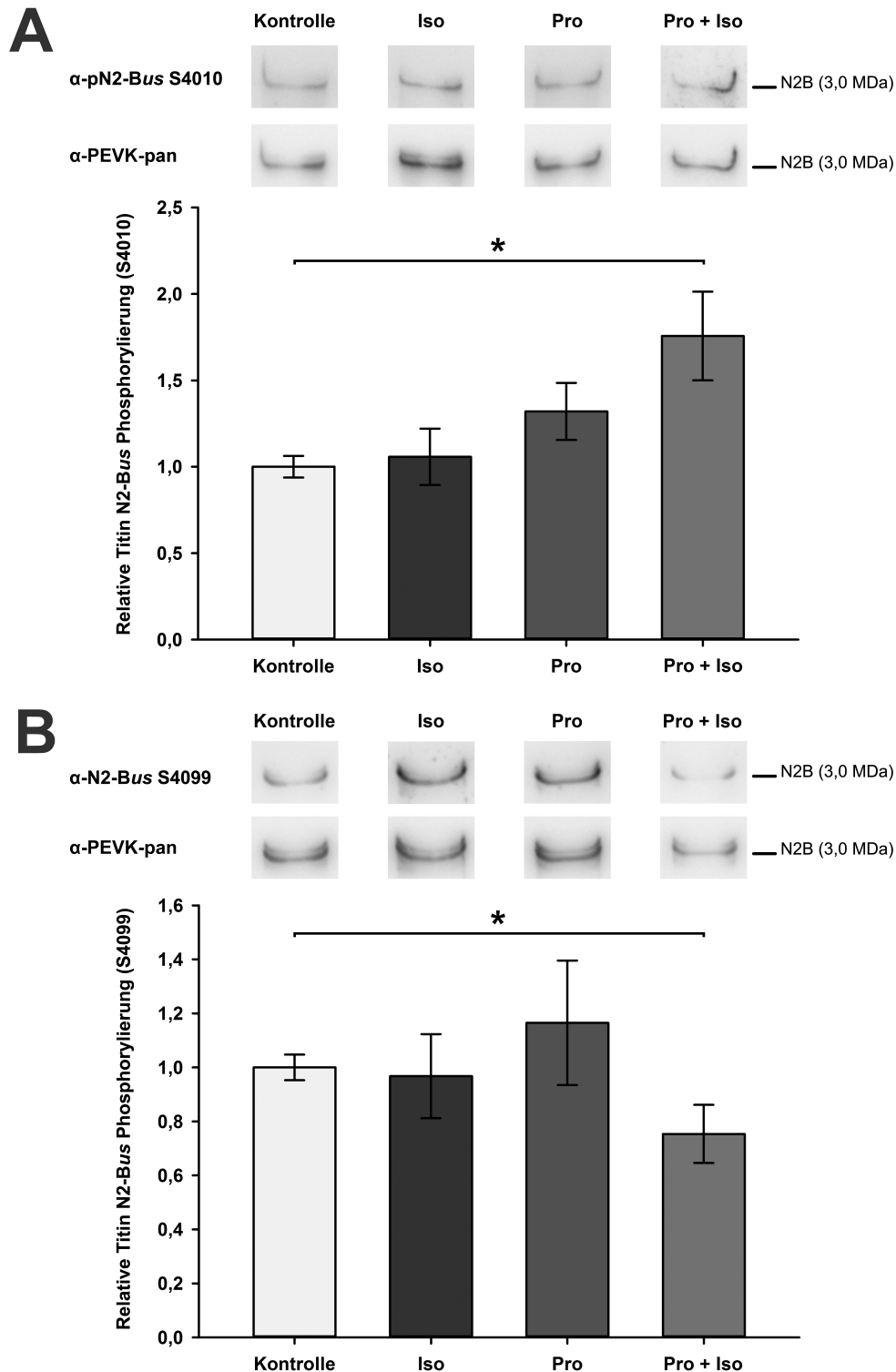


Abb. 17: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin in der N2-Bus im Western Blot nach Behandlung von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Isoproterenol, Propranolol bzw. Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso). (A) Oben: Repräsentativer Western Blot mit pN2-Bus 4010 Signal und korrespondierendem PEVK-pan Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 4-8 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*). (B) Oben: Repräsentativer Western Blot mit pN2-Bus 4099 Signal und korrespondierenden PEVK-pan Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 3-6 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, *Student's t-test*).

In mit Isoproterenol stimulierten Herzen zeigte sich für die beiden in der PEVK-Region untersuchten Phosphorylierungstellen gegenläufige Entwicklungen. Die relative Phosphorylierung war an pPEVK-11878 um $38,5 \pm 10,1$ % statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 18 A), an pPEVK-12022 jedoch um $156,8 \pm 40,5$ % statistisch signifikant erhöht (Abb. 18 B). Für mit Propranolol behandelte Herzen zeigte sich eine um $56,9 \pm 8,8$ % statistisch signifikante erniedrigte Phosphorylierung von pPEVK-11878, an pPEVK-12022 zeigte sich eine Tendenz zur vermehrten Phosphorylierung von $131,2 \pm 72,8$ % jedoch ohne statistische Signifikanz. Die mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Die relative Phosphorylierung war tendenziell um $37,9 \pm 18,2$ % erniedrigt (pPEVK-11878) bzw. um $118,7 \pm 74,6$ % erhöht (pPEVK-12022).

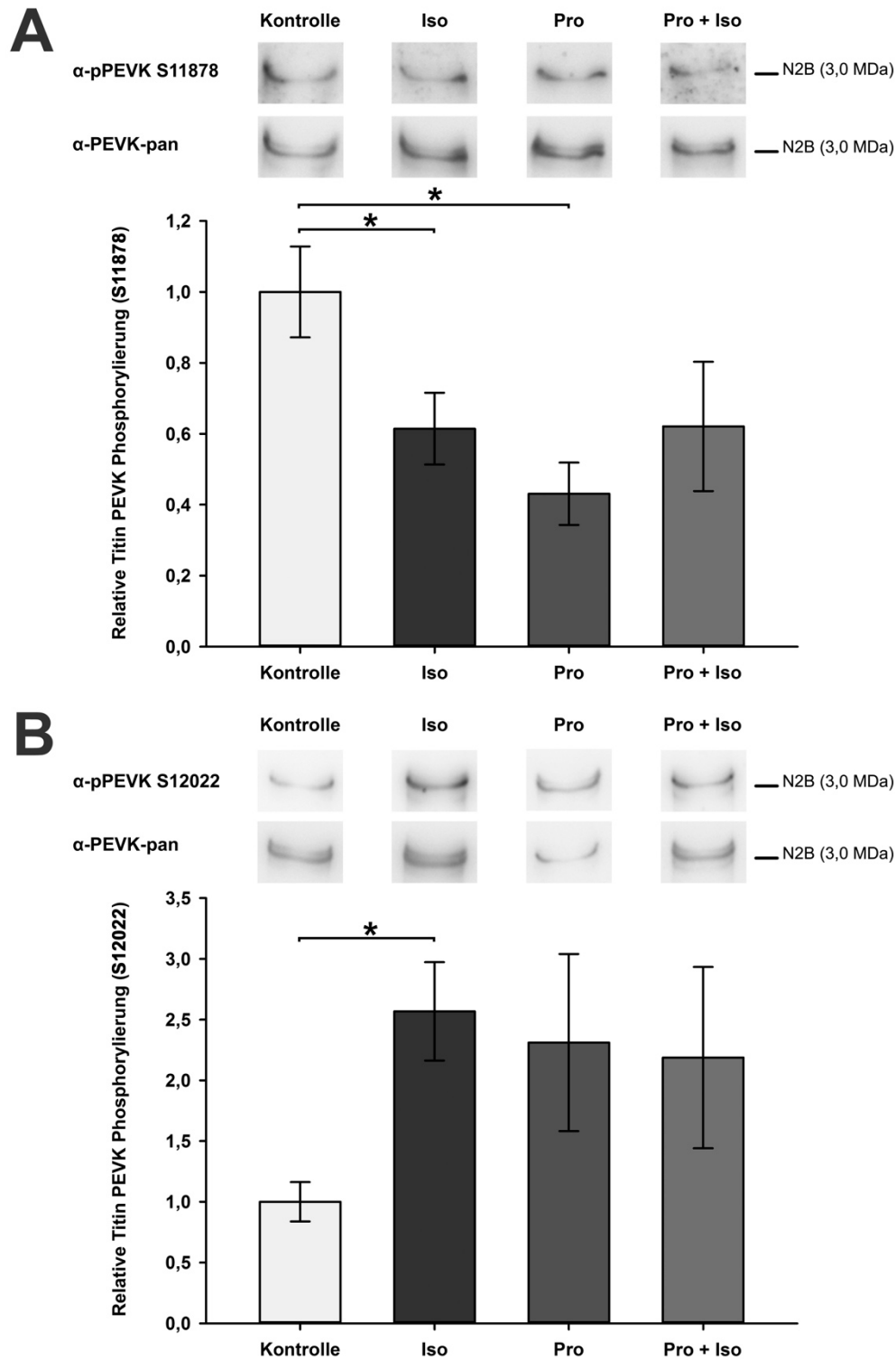


Abb. 18: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Titin in der PEVK-Region im Western Blot nach Behandlung von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Isoproterenol, Propranolol bzw. Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso). (A) Oben: Repräsentativer Western Blot mit pPEVK-S11878 Signal und korrespondierendem totalen Titin Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 3-4 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*). (B) Oben: Repräsentativer Western Blot mit pPEVK-S12022 Signal und korrespondierendem totalen Titin Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 3-4 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*).

3.2.5 Indirekter Nachweis der Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A

Um die Änderung der Aktivität der PKA in den oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen nachzuweisen, wurde der Phosphorylierungsstatus von Troponin I S23/24 analysiert.

In mit Isoproterenol stimulierten Herzen war die Troponin I S23/24-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle um $54,3 \pm 23,7 \%$ und in mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen um $86,3 \pm 27,5 \%$ jeweils statistisch signifikant erhöht. In mit Propranolol behandelten Herzen zeigte die Troponin I S23/24-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle eine tendenzielle Verminderung um $27,8 \pm 9,8 \%$, wobei statistisch kein signifikanter Unterschied bestand. (Abb. 19)

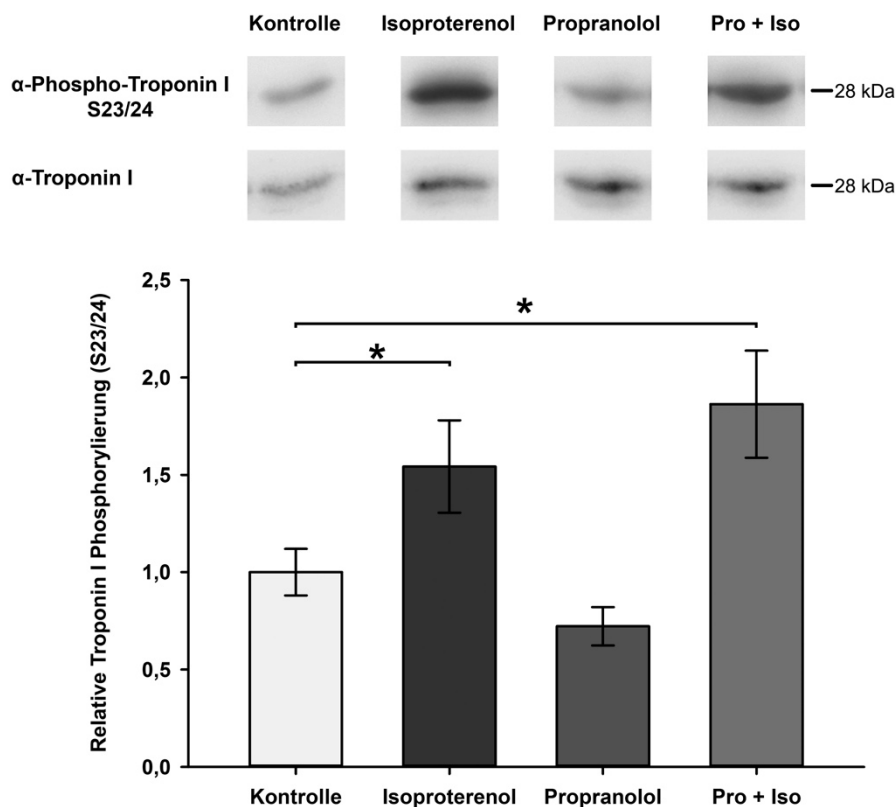


Abb. 19: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Troponin I (S23/24) im Westernblot nach Behandlung von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Isoproterenol, Propranolol bzw. Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso). Oben: Repräsentativer Westernblot mit Phospho-Troponin I S23/24 Signal und korrespondierendem Troponin I Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 3-4 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Mann-Whitney *rank sum test*).

3.2.6 Änderung der Aktivität der Proteinkinase Ca nach β -adrenerger Stimulation

Um die Änderung der Aktivität der Proteinkinase Ca (PKC α) in den oben beschriebenen retrograd perfundierten Mäuseherzen zu analysieren, wurde der Phosphorylierungsstatus von PKC α T497 untersucht.

In mit Isoproterenol stimulierten Herzen war die PKC α T497-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle um $35,5 \pm 9,2$ % statistisch signifikant verringert und in mit Propranolol behandelten Herzen um $39,2 \pm 4,4$ % statistisch signifikant verringert. In mit Propranolol und Isoproterenol behandelten Herzen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der PKC α T497-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. (Abb. 20)

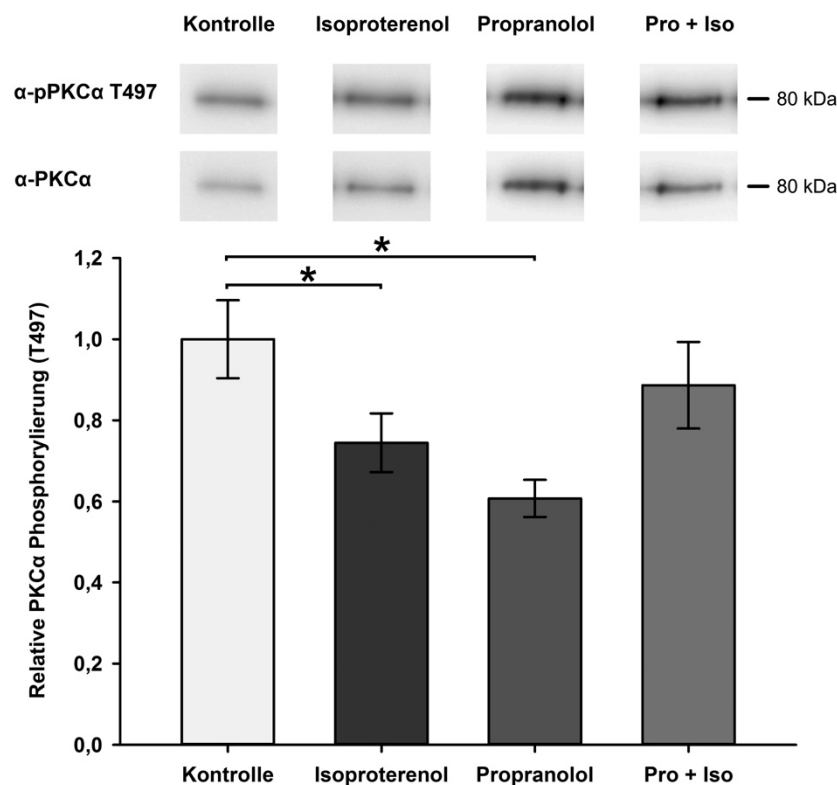


Abb. 20: Analyse des Phosphorylierungsstatus der PKC α (T497) im Western Blot nach Behandlung von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Isoproterenol, Propranolol bzw. Propranolol + Isoproterenol (Pro + Iso). Oben: Repräsentativer Western Blot mit pPKC α T497 Signal und korrespondierendem PKC α Signal. Unten: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3$ Gewebe pro Gruppe, pro Gewebe wurden 3-4 Proteinbanden analysiert). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Student's *t*-test).

4 Diskussion

4.1 Myofilamentsteifigkeit und Status der Titinphosphorylierung an S4010 im Rahmen β -adrenerger Stimulation

4.1.1 Isolierte adulte Rattenkardiomyozyten

Der Ausgangspunkt der nachfolgenden Diskussion ist die Arbeitshypothese, dass Isoproterenol durch β -adrenerge Stimulation eine PKA-abhängige Phosphorylierung an S4010 in der N2-Bus von Titin verursacht und zu einer Reduzierung der passiven Myofilamentsteifigkeit führt. Diese Hypothese wurde zunächst an isolierten adulten Rattenkardiomyozyten überprüft. Dafür wurde die passive Myofilamentsteifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol an einzelnen isolierten adulten Rattenkardiomyozyten gemessen. Obwohl über den gesamten Sarkomerlängenbereich tendenziell erniedrigte passive Kräfte im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden konnten, zeigte sich nur bei einer Sarkomerlänge von 2,2 μm eine statistisch signifikante Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit (Abb. 8). Eine suffiziente β -adrenerge Stimulation der adulten Kardiomyozyten wurde durch die gesteigerte PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I an S23/24 im Western Blot nachgewiesen (Abb. 10). Im Vergleich zu den Daten dieser Arbeit konnte in bisherigen Studien nach Behandlung mit rekombinanter PKA eine Abnahme der passiven Myofilamentsteifigkeit an isolierten adulten Rattenkardiomyozyten (Yamasaki *et al.*, 2002) und an permeabilisierten kardialen Muskelfasern des Menschen und der Ratte gezeigt werden (Krüger und Linke, 2006).

Bisher wurde eine Zunahme der allgemeinen Titinphosphorylierung nach PKA-Behandlung mittels Autoradiographie nachgewiesen (Yamasaki *et al.*, 2002, Krüger und Linke, 2006), sowie die PKA-abhängige Phosphorylierung der N2-B-Region an rekombinanten Titinfragmenten mittels *in-vitro-kinase assay* gezeigt (Yamasaki *et al.*, 2002). Auch für Rattenkardiomyozyten, die mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol stimuliert wurden, wurde in *backphosphorylation assays* eine Zunahme der Titinphosphorylierung nachgewiesen (Yamasaki *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in mit Isoproterenol behandelten Kardiomyozyten die Titinphosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S4010 in der N2-Bus tendenziell erhöht war, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 9).

Um zu testen, ob durch Blockierung des β -adrenergen Systems eine vermutete basale PKA-abhängige Titinphosphorylierung abgeschwächt werden kann, wurde der β -Blocker Propranolol eingesetzt. Kardiomyozyten, die mit dem β -Blocker Propranolol behandelt wurden, zeigten in der vorliegenden Arbeit jedoch keine statistisch signifikante Änderung der Phosphorylierung an S4010 (Abb. 9). Dabei ist zu beachten, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I S23/24 ebenfalls unverändert blieb (Abb. 10). Somit konnte eine Reduktion der Aktivität der PKA durch den β -Blocker Propranolol nicht eindeutig nachgewiesen werden. Weil in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von Propranolol auf die Titinphosphorylierung gezeigt werden konnte, wurde auf die Messung der passiven Steifigkeit von mit Propranolol behandelten Kardiomyozyten verzichtet.

Für weiterführende Untersuchungen des Einflusses der β -adrenergen Stimulation auf die passive Myofilamentsteifigkeit wurden retrograd perfundierte Mäuseherzen als Modell

gewählt. Im Vergleich zum Zellkulturmodell erfolgt hier die Stimulation am intakten Organ. Die Zellen befinden sich im Organverbund. Ein möglicher Einfluss der Bedingungen der Zellkultur auf die Signaltransduktion kann so ausgeschlossen werden. Zusätzlich ermöglicht das Modell der retrograd perfundierten Mäuseherzen die Überprüfbarkeit der erfolgreichen Stimulation anhand von hämodynamischen Messgrößen am perfundiertem Herz.

4.1.2 Retrograd perfundierte Mäuseherzen

4.1.2.1 Einfluss von Isoproterenol

Die Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol konnte an isolierten Kardiomyozyten von retrograd perfundierten Mäuseherzen durch Messungen der passiven Zugspannung nachgewiesen werden (Abb. 14). Die relative Reduktion der passiven Zugspannung war bei einer Sarkomerlänge von $2,0\ \mu\text{m}$ mit $57,6 \pm 6,6\ %$ vergleichbar zu der Reduktion um $67,2 \pm 12,0\ %$, die an adulten Rattenkardiomyozyten nach Inkubation mit rekombinanter PKA gemessen wurde (Yamasaki *et al.*, 2002). Yamasaki *et al.* beschreiben, dass die durch PKA-Behandlung vermittelte Steifigkeitsänderung von der Sarkomerlänge abhängig ist. So ist die relative Reduktion der passiven Zugspannung bei höheren Sarkomerlängen schwächer ausgeprägt. Krüger und Linke beschreiben den gleichen Effekt an gehäuteten Muskelfasern aus menschlichen Herzen, die mit rekombinanter PKA behandelt wurden (Krüger und Linke, 2006). Diese Beobachtung wird auch in der vorliegenden Arbeit nach β -adrenerger Stimulation bestätigt. Der relative Einfluss der β -adrenergen Stimulation ist demzufolge bei niedrigeren Sarkomerlängen stärker ausgeprägt als bei höheren Sarkomerlängen. Für Sarkomerlängen bis $2,2\ \mu\text{m}$ ist die passive Steifigkeit von kardialen Gewebe fast ausschließlich von der Myofilamentsteifigkeit abhängig (Linke *et al.*, 1994). Erst bei höheren Sarkomerlängen nimmt der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die passive Steifigkeit zu. Der physiologisch relevante Sarkomerlängenbereich wird in der Literatur mit $1,7 - 2,3\ \mu\text{m}$ angegeben (Allen und Kentish, 1985). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Änderungen der passiven Myofilamentsteifigkeit liegen in diesem physiologischen Bereich. Es ist somit anzunehmen, dass die hier nachgewiesene Änderung der passiven Myofilamentsteifigkeit auch im intakten Organ zu dem positiv lusitropen Effekt der β -adrenergen Stimulation beiträgt.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, ob eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol an retrograd perfundierten Mäuseherzen zu einer Steigerung der Phosphorylierung an S4010 in der N2-Bus von Titin führt. Zusammen mit einer Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit wurde bisher eine gesteigerte Titinphosphorylierung durch Behandlung mit rekombinanter PKA an adulten Rattenkardiomyozyten und humanen kardialen Muskelfasern nachgewiesen (Yamasaki *et al.*, 2002, Krüger und Linke, 2006). Die konservierte PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle S4010 wurde in der N2-Bus nachgewiesen und eine verringerte Phosphorylierung an dieser Stelle mit einer gesteigerten passiven Myofilamentsteifigkeit bei Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht (Krüger *et al.*, 2009, Kötter *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte nach β -adrenerger Stimulation von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Isoproterenol jedoch keine statistisch signifikante Änderung der Phosphorylierung an S4010 in Westernblotanalysen nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Suffizienz der β -adrenergen Stimulation wurde anhand von Perfusionsdaten, die eine Steigerung des linksventrikulären Drucks, der Herzfrequenz und der Perfusionsgeschwindigkeit zeigten (Abb. 12, rechte Spalte) und der vermehrten

Phosphorylierung an Troponin I S23/24 (Abb. 19) nachgewiesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der möglichen Kompartimentierung der Signaltransduktion eine Aktivierung der PKA am Titinfilament nicht im gleichen Maße wie an Troponin I erfolgte. Dagegen spricht jedoch sowohl die verwendete hohe Isoproterenoldosis von 10 $\mu\text{mol/l}$, als auch die signifikant verminderte Myofilamentsteifigkeit. Troponin I ist zudem wie auch Titin im Myofilament lokalisiert. In anderen Arbeiten bestand ebenfalls eine Diskrepanz zwischen der Titinphosphorylierung an S4010 und der PKA-abhängigen Phosphorylierung anderer Proteine in Kardiomyozyten. Die Analyse von Herzproben aus Ratten, die ein einmaliges Laufbandtraining für 20 min vollzogen hatten, zeigte keine signifikante Änderung der Phosphorylierung an S4010 bei gleichzeitig vermehrter PKA-abhängiger Phosphorylierung von Phospholamban an S16 (Müller *et al.*, 2014). In einer Studie mit einem experimentellen Herzinfarktmodell der Maus wurde eine verminderte Phosphorylierung an S4010 nachgewiesen, wobei dort die Phosphorylierung von Troponin I S23/24 nicht signifikant verändert war (Kötter *et al.*, 2016). Dagegen wurde eine gleichzeitige Verminderung der Titinphosphorylierung an S4010 und der PKA-abhängigen Phosphorylierung an Troponin I S23/24 in einer Studie an Hunden mit *HFpEF* gezeigt (Hamdani *et al.*, 2013a).

Zusätzlich zur PKA kann S4010 in der N2-Bus auch von ERK 1/2 phosphoryliert werden (Raskin *et al.*, 2012, Perkin *et al.*, 2015). Nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol wurde neben der PKA-Aktivierung auch eine Aktivierung der ERK 1/2 nachgewiesen (Schmitt und Stork, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von ERK 1/2 nicht überprüft. Ein Isoproterenol-induzierter Anstieg der ERK1/2-Aktivität hätte jedoch theoretisch in einer gesteigerten Phosphorylierung der S4010 Phosphorylierungsstelle resultieren müssen.

Für die humane Titinsequenz sind neben S4010 zwei weitere PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen, S4065 und S4185, innerhalb der N2-Bus bekannt (Kötter *et al.*, 2013). Die PKA-abhängige Phosphorylierung an S4065 ist bisher noch nicht durch weitere unabhängige Methoden bestätigt worden (Linke und Hamdani, 2014). In der Titinsequenz der Maus und der Ratte ist, im Vergleich zur humanen Titinsequenz, Serin an der Stelle 4065 durch Threonin ersetzt. Threonin kann wie auch Serin PKA-abhängig phosphoryliert werden. Für S/T4065 war im Rahmen dieser Arbeit kein phosphospezifischer Titinantikörper verfügbar, weshalb eine Analyse des Phosphorylierungsstatus nicht möglich war. Die Phosphorylierungsstelle S4185 ist nicht evolutionär konserviert und in der Maus und der Ratte nicht vorhanden (Kötter *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass weitere für die Myofilamentsteifigkeit relevante PKA-abhängige Phosphorylierungsstellen im Titin, auch außerhalb der N2-Bus und der PEVK-Region im I-Band, vorhanden sind. In Proteomdatenbanken sind insgesamt hunderte potentielle Titinphosphorylierungsstellen aufgelistet (Huttlin *et al.*, 2010, Linke und Hamdani, 2014). Die Identifizierung weiterer PKA-abhängiger Phosphorylierungsstellen im Titin und ihre Analyse im Rahmen der β -adrenergen Stimulation ist somit für das weitere Verständnis von Bedeutung.

Die passive Steifigkeit des Herzmuskels wird von der extrazellulären Matrix, insbesondere dem kollagenen Bindegewebe, und der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit bestimmt und spielt eine wichtige Rolle für die diastolische Funktion des Herzens (Linke *et al.*, 1994, Krüger und Linke, 2011). Mittels β -adrenerger Stimulation wird die Herzleistung durch eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen von Proteinen innerhalb der Kardiomyozyten gesteigert. Diese posttranslationalen Modifikationen werden hauptsächlich durch die auf dem klassischen

β -adrenergen Signalweg aktivierte PKA vermittelt. In Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards werden unter anderem die L-Typ-Kalziumkanäle und das die SERCA inhibierende Phospholamban durch die PKA phosphoryliert, was zu einer Zunahme des Kalziumein- bzw. ausstroms während der Herzaktion führt. Da die Kontraktion der Herzmuskulatur kalziumabhängig erfolgt, führt dies zu einer Zunahme der Inotropie und Lusitropie. Außerdem werden die myofilamentären Proteine MyBP-C und das bereits erwähnte Troponin I PKA-abhängig phosphoryliert, was auch positiv inotrope bzw. lusitrope Auswirkungen hat. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der kardialen Myofilamentsteifigkeit trägt in diesem Zusammenhang zur positiven Lusitropie bei β -adrenerger Stimulation bei.

4.1.2.2 Einfluss von Propranolol

Die Blockierung des β -adrenergen Signalwegs mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol in retrograd perfundierten Mäuseherzen zeigte keine Veränderung der passiven Myofilamentsteifigkeit. Auch die Phosphorylierung von S4010 in der N2-Bus blieb unverändert (Abb. 17). In Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz ist eine verminderte Phosphorylierung in der N2-Bus an S4010 zusammen mit einer gesteigerten passiven Myofilamentsteifigkeit nachgewiesen worden (Kötter *et al.*, 2013). Weiterhin zeigten Borbely *et al.*, dass die erhöhte passive Myofilamentsteifigkeit von Kardiomyozyten aus Herzbiopsien von herzinsuffizienten Patienten *in-vitro* durch eine PKA- oder PKG-Behandlung wieder reduziert werden kann (Borbely *et al.*, 2009). Daher besteht die Annahme, dass die erhöhte passive Myofilamentsteifigkeit bei Herzinsuffizienz eine Folge der verminderten PKA- und PKG-Aktivität ist. Da es bei Herzinsuffizienz zu einer Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges und einer verminderten Signalweiterleitung auf dem klassischen β -adrenergen Signalweg via PKA kommt (Lympieropoulos *et al.*, 2013), wurde für eine Blockade des β -adrenergen Systems mit Propranolol ein vergleichbarer Effekt vermutet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur chronischen Desensitivierung des β -adrenergen Signalwegs im Rahmen der Herzinsuffizienz war die Propranololbehandlung in dieser Arbeit aufgrund des verwendeten experimentellen Ansatzes am isolierten Herzen zeitlich deutlich eingeschränkt. Außerdem erfolgt die Desensitivierung des β -adrenergen Signalwegs bei Herzinsuffizienz durch eine chronische Überstimulation mit Katecholaminen, die nicht nur eine Desensitivierung des klassischen Signalwegs (β AR- G_s -cAMP-PKA), sondern unter anderem auch einen Wechsel in der Signalkaskade des β_2 -AR von G_s zu G_i zur Folge hat (Lohse *et al.*, 2003). Insgesamt können die komplexen Vorgänge bei Herzinsuffizienz nicht durch eine reine Blockade des β_1 - und β_2 -AR durch Propranolol imitiert werden.

Fraglich ist außerdem, ob in der vorliegenden Arbeit eine Verminderung der basalen Aktivität der PKA durch die Behandlung mit Propranolol erfolgte. Die PKA-Aktivität wurde indirekt durch die PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I an S23/24 untersucht. Für die Behandlung mit Propranolol konnte keine statistisch signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 19). Andere Studien zeigen eine Reduktion der Troponin I-Phosphorylierung nach Propranololgabe, die allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine Stunde zuvor intravenös an Mäusen erfolgte (Vikhorev *et al.*, 2014). Die grundsätzliche Wirkung des β -Blockers Propranolol konnte in dieser Arbeit dafür an den Daten der retrograden Herzperfusion aufgezeigt werden. So war nach Propranololgabe der linksventrikuläre Druck (LVP), die Herzfrequenz (HF) und die Perfusionsgeschwindigkeit (Perf.) reduziert (Abb. 12, linke Spalte).

Für Propranolol ist zusätzlich eine Aktivierung der ERK 1/2 nachgewiesen (Evans *et al.*, 2010). Da die PKA-abhängige Titinphosphorylierungsstelle S4010 auch von ERK 1/2 phosphoryliert werden kann (Raskin *et al.*, 2012, Perkin *et al.*, 2015), könnte eine reduzierte Aktivität der PKA durch eine gleichzeitige Steigerung der Aktivität der ERK 1/2 ausgeglichen werden. Die Aktivität der ERK 1/2 wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

4.1.2.3 Einfluss der gleichzeitigen Gabe von Propranolol und Isoproterenol

Der Einsatz des β -Blockers Propranolol zusammen mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol führte in der vorliegenden Arbeit zu einer statistisch signifikanten Verminderung der passiven Myofilamentsteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14). Es bestand allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zur alleinigen Stimulation mit Isoproterenol (Abb. 14). Propranolol ist ein kompetitiver Antagonist am β -AR und wird durch die in dieser Studie gewählte hohe Isoproterenoldosis vom β -AR verdrängt. Dies lässt sich in einer deutlichen Steigerung des linksventrikulären Drucks (LVP), der Herzfrequenz (HF) und der Perfusionsgeschwindigkeit (Perf.) während der retrograden Herzperfusion nach Isoproterenolgabe trotz gleichzeitiger β -Blockade erkennen (Abb. 12, rechte Spalte). Außerdem konnte eine gesteigerte PKA-abhängige Troponinphosphorylierung an S23/24 nachgewiesen werden (Abb. 19). Die β -adrenerge Stimulation überwiegt deutlich und führt somit zur Abnahme der passiven Myofilamentsteifigkeit.

Im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit Isoproterenol konnte für die gleichzeitige Behandlung von retrograd perfundierten Mäuseherzen mit Propranolol und Isoproterenol eine gesteigerte Titinphosphorylierung an S4010 nachgewiesen werden (Abb. 17). Der Unterschied in der Titinphosphorylierung an S4010 im Vergleich zu den alleine mit Isoproterenol stimulierten Herzen bleibt unklar. Möglicherweise ist die Stichprobengröße mit $N = 3$ zu klein, um für die mit Isoproterenol behandelten Herzen eine statistisch signifikante Änderung der S4010-Phosphorylierung nachzuweisen.

4.2 Titinphosphorylierung an S4099, S11878 und S12022

Um die Änderung der passiven Myofilamentsteifigkeit nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol durch mögliche Änderungen der Titinphosphorylierung an anderen Phosphorylierungsstellen als S4010 zu erklären, wurden drei weitere Phosphorylierungsstellen untersucht. So wurde die Phosphorylierung an der in der N2-Bus liegenden PKG-abhängigen Phosphorylierungsstelle S4099, sowie an den beiden PKC- und CaMKII δ -abhängigen Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 in der PEVK-Region analysiert.

Für eine Stimulation mit Isoproterenol zeigte sich keine Veränderung an der PKG-abhängigen Phosphorylierungsstelle S4099 (Abb. 17). Jedoch zeigten sich Veränderungen im Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region. An der Phosphorylierungsstelle S11878 konnte eine signifikant verminderte Phosphorylierung nachgewiesen werden, an S12022 zeigte sich im Gegensatz dazu eine signifikant erhöhte Phosphorylierung (Abb. 18). Die Phosphorylierungen in der PEVK-Region sind PKC α - und CaMKII δ -abhängig, wobei eine vermehrte Phosphorylierung zu einer Erhöhung der passiven Myofilamentsteifigkeit führt (Hidalgo *et al.*, 2009, Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013). Die Aktivität der PKC α , die in dieser Arbeit

anhand der PKC α -Phosphorylierung an T497 bestimmt wurde, war nach β -adrenerger Stimulation erniedrigt (Abb. 20). Auch Zhou *et al.* beschreiben für eine kurz andauernde β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol eine Verminderung der PKC-Aktivität an Rattenkardiomyozyten (Zhou *et al.*, 2007). Hingegen ist im Rahmen einer chronischen β -adrenergen Stimulation mit Isoproterenol, die zu einer Herzhypertrophie bei Mäusen führt, eine Steigerung der PKC-Aktivität beschrieben (Braun *et al.*, 2003). Die erniedrigte Phosphorylierung an S11878 in der vorliegenden Arbeit steht im Einklang mit der verminderten PKC α -Aktivität und der reduzierten Myofilamentsteifigkeit. Die im Gegensatz dazu stehende erhöhte S12022-Phosphorylierung in der PEVK-Region könnte durch die höhere Affinität der PKC α für S11878 gegenüber S12022 (Hidalgo *et al.*, 2009) und eine zusätzliche Aktivierung der CaMKII δ erklärt werden. Für die CaMKII δ ist eine Phosphorylierung von S11878 und S12022 beschrieben; die physiologische Relevanz ist jedoch für S11878 umstritten (Hamdani *et al.*, 2013c, Hidalgo *et al.*, 2013). Hamdani *et al.* beschreiben bei Steigerung der CaMKII δ -Aktivität eine Verringerung der passiven Steifigkeit, trotz Steigerung der PEVK-Phosphorylierung. Die Aktivität der CaMKII δ wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Inwiefern die PEVK-Phosphorylierung an den beobachteten Änderungen der Myofilamentsteifigkeit beteiligt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Die Behandlung mit β -Blocker hatte keinen Effekt auf die PKG-abhängige Phosphorylierungsstelle S4099 in der N2-Bus (Abb. 17). Die Analyse der Titinphosphorylierung in der PEVK-Region zeigte nach Behandlung mit Propranolol eine verminderte Phosphorylierung an S11878, aber keine signifikanten Veränderungen an S12022. Die Aktivität der PKC α war nach Gabe von Propranolol vermindert (Abb. 20). Für Propranolol ist eine direkte Inhibition der PKC beschrieben (Sozzani *et al.*, 1992), die für diese Beobachtung verantwortlich sein könnte. Eine relevante Auswirkung auf die Myofilamentsteifigkeit konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, obwohl prinzipiell bei einer verminderten PKC α -Aktivität von einer geringeren PEVK-Phosphorylierung und einer daraus resultierenden niedrigeren passiven Myofilamentsteifigkeit auszugehen ist (Hidalgo *et al.*, 2009).

Die gleichzeitige Behandlung von isolierten Mäuseherzen mit Propranolol und Isoproterenol führte im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit Isoproterenol zu einer verminderten Phosphorylierung an S4099 (Abb. 17), sowie einer unveränderten Phosphorylierung der beiden Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 in der PEVK-Region (Abb. 18). Es bleibt unklar, warum sich der Phosphorylierungsstatus bei gleichzeitiger Behandlung mit Propranolol und Isoproterenol von dem bei alleiniger Stimulation mit Isoproterenol unterscheidet. In beiden Fällen überwiegt die β -adrenerge Stimulation, was einerseits an der gesteigerten Troponinphosphorylierung an S23/24 (Abb. 19) und andererseits an der Steigerung des linksventrikulären Drucks (LVP), der Herzfrequenz (HF) und der Perfusionsgeschwindigkeit (Perf.) in der retrograden Herzperfusion abzulesen ist (Abb. 12, rechte Spalte). Auch die Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit im Vergleich zur Kontrolle entsprach bei gleichzeitiger Behandlung mit Propranolol und Isoproterenol jener bei alleiniger Stimulation mit Isoproterenol (Abb. 14). Die Reduktion der PKG-abhängigen Phosphorylierung an S4099 bei Behandlung mit Propranolol und Isoproterenol könnte durch einen *crosstalk* zwischen PKA und PKG auf Ebene der Phosphodiesterasen (PDE), die die jeweiligen *second messenger* cAMP und cGMP abbauen, vermittelt sein (Zhao *et al.*, 2016). Eine β -adrenerge Stimulation kann

insbesondere durch eine Steigerung der Aktivität der PDE 2 zu einer vermehrten Hydrolyse von cGMP führen und somit einer Verminderung der PKG-Aktivität bewirken (Zhao *et al.*, 2016).

Im Gegensatz dazu ist jedoch für eine β -adrenerge Stimulation am Herzen auch eine Steigerung der cGMP-Konzentration und Aktivität der PKG beschrieben (Kanai *et al.*, 1997, Takimoto *et al.*, 2005). Troponin I S23/24 kann auch PKG-abhängig phosphoryliert werden, wobei dies in einer deutlich geringeren Rate im Vergleich zur PKA erfolgt (Layland *et al.*, 2005). Die hier aufgezeigte vermehrte Phosphorylierung von Troponin I S23/24 (Abb. 19) kann deshalb als indirekter Nachweis der Aktivitätssteigerung der PKA interpretiert werden. Die Aktivität der PKG wurde in dieser Arbeit nicht spezifisch untersucht.

Die vermutete Steigerung der PKA-abhängigen Phosphorylierung an S4010 konnte für eine alleinige Stimulation mit Isoproterenol nicht nachgewiesen werden. Dafür konnte bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Propranolol und Isoproterenol, bei Überwiegen der β -adrenergen Stimulation, eine statistisch signifikante Steigerung der Phosphorylierung an S4010 gezeigt werden. Die bei Stimulation mit Isoproterenol detektierte verminderte Aktivität der PKC α könnte zusammen mit der verminderten Phosphorylierung in der PEVK-Region von Titin an S11878 die Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit erklären. Da jedoch auch bei Behandlung mit Propranolol eine Verminderung der PKC α -Aktivität mit verminderter Titinphosphorylierung an S11878 auftrat, kann in der vorliegenden Arbeit aus dieser Korrelation keine Aussage für die passive Myofilamentsteifigkeit abgeleitet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die signifikante Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit nach β -adrenerger Stimulation nicht eindeutig einer veränderten Phosphorylierung der untersuchten Phosphorylierungsstellen (S4010, S4099, S11878 und S12022) zugeordnet werden konnte.

Änderungen der Titinphosphorylierung an den jeweiligen Phosphorylierungsstellen, die einen entgegengesetzten Einfluss auf die passive Myofilamentsteifigkeit haben, wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben (Hamdani *et al.*, 2013b, Hamdani *et al.*, 2013c). Inwiefern sich Phosphorylierungen an unterschiedlichen Stellen in der N2-Bus und PEVK-Region in ihrem Einfluss auf die passive Myofilamentsteifigkeit ausgleichen können, oder ob einzelne Phosphorylierungsstellen einen größeren Effekt als andere auf die passive Myofilamentsteifigkeit haben können, ist noch nicht abschließend geklärt. Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Titinphosphorylierungen und ihr Einfluss auf die passive Myofilamentsteifigkeit bedarf weiteren Untersuchungen. Außerdem muss bedacht werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phosphorylierungsstellen nur eine Auswahl der bisher identifizierten Phosphorylierungsstellen im Titin I-Band darstellen, wobei insbesondere S4010 in der N2-Bus als konservierte PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle ausgewählt wurde. Die Existenz weiterer für die Myofilamentsteifigkeit relevanter Phosphorylierungsstellen ist, wie oben erläutert, wahrscheinlich (Linke und Hamdani, 2014). Es sind zukünftige Analysen nötig, um die Änderungen der Titinphosphorylierung im Rahmen der β -adrenergen Stimulation umfassend Phosphorylierungsstellen-spezifisch aufzuklären.

Die titinbasierte Myofilamentsteifigkeit kann zudem nicht nur durch Phosphorylierungen, sondern unter anderem auch durch oxidativen Stress moduliert werden (Beckendorf und Linke, 2015). Oxidativer Stress kann zum einen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken in der N2-Bus zu einer Steigerung der Myofilamentsteifigkeit führen. Zum anderen kann er durch

Glutathionylierung von Cystein in Ig-Domänen zu einer Verminderung der Myofilamentsteifigkeit führen. Die Glutathionylierung ist nur bei entfalteten Ig-Domänen möglich, wofür wiederum eine Dehnung des Myofilaments nötig ist. Eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol steigert den kardialen oxidativen Stress (Zhang *et al.*, 2005). Zukünftige Studien werden untersuchen müssen, inwiefern sich gesteigerter oxidativer Stress bei β -adrenerger Stimulation auf die titinbasierte Myofilamentsteifigkeit auswirken könnte.

4.3 Einfluss der β -adrenergen Stimulation auf die relative längenabhängige Aktivierung

Aktuelle Arbeiten zeigen eine Reduzierung der längenabhängigen Aktivierung in einem Maus- bzw. Rattenmodell mit verminderter titinbasierter Myofilamentsteifigkeit (Methawasin *et al.*, 2014, Ait-Mou *et al.*, 2016). In den dort verwendeten Tiermodellen ist der Spleißfaktor RBM 20 mutiert, was zur Expression einer überlangen Titinisoform und einer verminderten titinbasierten passiven Myofilamentsteifigkeit führt. Das Ergebnis dieser beiden Arbeiten lässt vermuten, dass auch eine durch veränderte Titin Phosphorylierung verminderte Myofilamentsteifigkeit zu einer Abschwächung der längenabhängigen Aktivierung führt. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Abnahme der längenabhängigen Aktivierung nach β -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol durch Messung der relativen Änderung der Maximalkraft an vorgedehnten permeabilisierten Papiliarmuskelfasern gezeigt werden. Neben Titin sind jedoch auch Troponin I und MyBP-C an der Regulation der längenabhängigen Aktivierung beteiligt (de Tombe *et al.*, 2010). Troponin I und MyBP-C werden jeweils nach β -adrenerger Stimulation PKA-abhängig phosphoryliert und sind so an der Steigerung der Lusitropie und Inotropie beteiligt. Die PKA-abhängige Phosphorylierung beider Proteine resultiert jeweils zusätzlich in einer Steigerung der längenabhängigen Aktivierung, wobei zwischen längenabhängiger Änderung der Kalziumsensitivität und längenabhängiger Änderung der Maximalkraft unterschieden werden sollte (Kumar *et al.*, 2015). Weiterhin konnte von Kumar *et al.* gezeigt werden, dass eine PKA-Behandlung von permeabilisierten Kardiomyozyten, die zu einer Phosphorylierung von Titin, Troponin I und MyBP-C führt, eine Steigerung der längenabhängigen Aktivierung hinsichtlich der Kalziumsensitivität zur Folge hat (Kumar *et al.*, 2015). Die Längenabhängigkeit der Maximalkraft ist jedoch nach PKA-Behandlung vermindert (de Tombe *et al.*, 2010, Hanft *et al.*, 2013, Kumar *et al.*, 2015), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach β -adrenerger Stimulation übereinstimmt (Abb. 16). Wird die PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin I und MyBP-C durch Mutationen der jeweiligen Phosphorylierungsstellen konstitutiv nachgeahmt und so isoliert untersucht, kommt es aber jeweils zu einer Steigerung der längenabhängigen Maximalkraft (Kumar *et al.*, 2015). Dies lässt vermuten, dass die PKA-abhängige Reduktion der titinbasierten Myofilamentsteifigkeit alleine für die Reduzierung der Längenabhängigkeit der Maximalkraft bei PKA-Behandlung verantwortlich ist (Kumar *et al.*, 2015). Diese Vermutung lässt sich auch auf die in dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der längenabhängigen Aktivierung der Maximalkraft nach Stimulation mit Isoproterenol übertragen (Abb. 16).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte durch die β -adrenerge Stimulation an retrograd perfundierten Herzen auch eine Phosphorylierung von Troponin I (Abb. 19) und MyBP-C, weshalb hier der Einfluss der verringerten passiven Myofilamentsteifigkeit nicht isoliert betrachtet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Reduktion der

längenabhängigen Aktivierung der Maximalkraft nach β -adrenergen Stimulation mit Isoproterenol an gehäuteten Papiliarmuskelfasern gezeigt werden. In Anbetracht der in dieser Arbeit nachgewiesenen Reduktion der passiven Myofilamentsteifigkeit durch β -adrenerge Stimulation kann hier ein kausaler Zusammenhang vermutet werden. Für einen Nachweis bedarf es jedoch weiterer Experimente, beispielsweise an Herzen mit mutiertem Troponin I und MyBP-C, die eine PKA-abhängige Phosphorylierung dieser beiden Proteine nicht möglich machen. So könnte der Einfluss der Änderung der passiven Myofilamentsteifigkeit auf die längenabhängige Aktivierung isoliert betrachtet werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ait-Mou, Y., Hsu, K., Farman, G. P., Kumar, M., Greaser, M. L., Irving, T. C. & De Tombe, P. P. **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 U S A*, 113, 2306-11.
- Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Giganti, D., Eckels, E., Rivas-Pardo, J. A., Hamdani, N., Warren, C. M., Solaro, R. J., Linke, W. A. & Fernandez, J. M. **2014**. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156, 1235-46.
- Allen, D. G. & Kentish, J. C. **1985**. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 17, 821-40.
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., 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.
- Beckendorf, L. & Linke, W. A. **2015**. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 25-36.
- Bishu, K., Hamdani, N., Mohammed, S. F., Krüger, M., Ohtani, T., Ogut, O., Brozovich, F. V., Burnett, J. C., Jr., Linke, W. A. & Redfield, M. M. **2011**. Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation*, 124, 2882-91.
- Borbely, A., Falcao-Pires, I., Van Heerebeek, L., Hamdani, N., Edes, I., Gavina, C., Leite-Moreira, A. F., Bronzwaer, J. G., Papp, Z., Van Der Velden, J., Stienen, G. J. & Paulus, W. J. **2009**. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*, 104, 780-6.
- Braun, M., Simonis, G., Birkner, K., Pauke, B. & Strasser, R. H. **2003**. Regulation of protein kinase C isozyme and calcineurin expression in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 41, 946-54.
- Bristow, M. R., Hershberger, R. E., Port, J. D., Minobe, W. & Rasmussen, R. **1989**. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol*, 35, 295-303.
- Capote, L. A., Mendez Perez, R. & Lympieropoulos, A. **2015**. GPCR signaling and cardiac function. *Eur J Pharmacol*, 763, 143-8.
- Cazorla, O., Freiburg, A., Helmes, M., Centner, T., McNabb, M., 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.
- Cazorla, O., Wu, Y., Irving, T. C. & Granzier, H. **2001**. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res*, 88, 1028-35.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. **1997a**. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390, 88-91.

- Daaka, Y., Pitcher, J. A., Richardson, M., Stoffel, R. H., Robishaw, J. D. & Lefkowitz, R. J. **1997b**. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2180-5.
- De Arcangelis, V., Liu, S., Zhang, D., Soto, D. & Xiang, Y. K. **2010**. Equilibrium between adenylyl cyclase and phosphodiesterase patterns adrenergic agonist dose-dependent spatiotemporal cAMP/protein kinase A activities in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*, 78, 340-9.
- De Tombe, P. P., Mateja, R. D., Tachampa, K., Ait Mou, Y., Farman, G. P. & Irving, T. C. **2010**. Myofilament length dependent activation. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 851-8.
- Drake, M. T., Violin, J. D., Whalen, E. J., Wisler, J. W., Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. **2008**. beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 283, 5669-76.
- Evans, B. A., Sato, M., Sarwar, M., Hutchinson, D. S. & Summers, R. J. **2010**. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 159, 1022-38.
- Ferguson, S. S. **2001**. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53, 1-24.
- Fitzsimons, D. P. & Moss, R. L. **1998**. Strong binding of myosin modulates length-dependent Ca²⁺ activation of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 83, 602-7.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereousse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J. S., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. **2000**. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- Fuchs, F. & Martyn, D. A. **2005**. Length-dependent Ca(2+) activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 199-212.
- Fukuzawa, A., Lange, S., Holt, M., Vihola, A., Carmignac, V., Ferreiro, A., Udd, B. & Gautel, M. **2008**. Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J Cell Sci*, 121, 1841-51.
- Gong, K., Li, Z., Xu, M., Du, J., Lv, Z. & Zhang, Y. **2008**. A novel protein kinase A-independent, beta-arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 283, 29028-36.
- Granzier, H. L. & Labeit, S. **2004**. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 94, 284-95.
- Grater, F., Shen, J., Jiang, H., Gautel, M. & Grubmuller, H. **2005**. Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J*, 88, 790-804.
- Grützner, A., Garcia-Manyes, S., Kötter, S., Badilla, C. L., Fernandez, J. M. & Linke, W. A. **2009**. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, 97, 825-34.
- Hamdani, N., Bishu, K. G., Von Frieling-Salewsky, M., Redfield, M. M. & Linke, W. A. **2013a**. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res*, 97, 464-71.

- Hamdani, N., Franssen, C., Lourenco, A., Falcao-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., Plettig, L., Lopez, B., Ottenheijm, C. A., Becher, P. M., Gonzalez, A., Tschope, C., Diez, J., Linke, W. A., Leite-Moreira, A. F. & Paulus, W. J. **2013b**. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*, 6, 1239-49.
- Hamdani, N., Krysiak, J., Kreusser, M. M., Neef, S., Dos Remedios, C. G., Maier, L. S., Krüger, M., Backs, J. & Linke, W. A. **2013c**. Crucial Role for Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II in Regulating Diastolic Stress of Normal and Failing Hearts via Titin Phosphorylation. *Circ Res*.
- Hanft, L. M., Biesiadecki, B. J. & McDonald, K. S. **2013**. Length dependence of striated muscle force generation is controlled by phosphorylation of cTnI at serines 23/24. *J Physiol*, 591, 4535-47.
- Hanft, L. M., Greaser, M. L. & McDonald, K. S. **2014**. Titin-mediated control of cardiac myofibrillar function. *Arch Biochem Biophys*, 552-553, 83-91.
- Heinrich, P. C., Müller, M. & Graeve, L. **2014**. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag.
- Hidalgo, C., 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, 631-8, 17 p following 638.
- Hidalgo, C. G., Chung, C. S., Saripalli, C., Methawasini, M., Hutchinson, K. R., Tsapralis, G., Labeit, S., Mattiazzi, A. & Granzier, H. L. **2013**. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M. E. & Gygi, S. P. **2010**. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 143, 1174-89.
- Kanai, A. J., Mesaros, S., Finkel, M. S., Oddis, C. V., Birder, L. A. & Malinski, T. **1997**. Beta-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 273, C1371-7.
- Knoll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P. & Chien, K. R. **2002**. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111, 943-55.
- Kötter, S., Andresen, C. & Krüger, M. **2014**. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*.
- Kötter, S., Gout, L., Von Frieling-Salewsky, M., Müller, A. E., Helling, S., Marcus, K., Dos Remedios, C., Linke, W. A. & Krüger, M. **2013**. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- Kötter, S., Kazmierowska, M., Andresen, C., Bottermann, K., Grandoch, M., Gorressen, S., Heinen, A., Moll, J. M., Scheller, J., Godecke, A., Fischer, J. W., Schmitt, J. P. & Krüger, M.

- 2016.** Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- Krüger, M., Kötter, S., Grützner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M. M., Butt, E., Dos Remedios, C. G. & Linke, W. A. **2009.** Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- Krüger, M. & Linke, W. A. **2006.** Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
- Krüger, M. & Linke, W. A. **2009.** Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 490-498.
- Krüger, M. & Linke, W. A. **2011.** The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- Kumar, M., Govindan, S., Zhang, M., Khairallah, R. J., Martin, J. L., Sadayappan, S. & De Tombe, P. P. **2015.** Cardiac Myosin-binding Protein C and Troponin-I Phosphorylation Independently Modulate Myofilament Length-dependent Activation. *J Biol Chem*, 290, 29241-9.
- Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A. & Trinick, J. **1992.** Towards a molecular understanding of titin. *Embo j*, 11, 1711-6.
- Labeit, S., Lahmers, S., Burkart, C., Fong, C., McNabb, M., Witt, S., Witt, C., Labeit, D. & Granzier, H. **2006.** Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol*, 362, 664-81.
- Layland, J., Solaro, R. J. & Shah, A. M. **2005.** Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 66, 12-21.
- Lee, E. H., Gao, M., Pinotsis, N., Wilmanns, M. & Schulten, K. **2006.** Mechanical strength of the titin Z1Z2-telethonin complex. *Structure*, 14, 497-509.
- Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. **2005.** Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-7.
- Li, H., Linke, W. A., Oberhauser, A. F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J. G., Lu, H., Marszalek, P. E. & Fernandez, J. M. **2002.** Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418, 998-1002.
- Linke, W. A. **2008.** Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77, 637-48.
- Linke, W. A. & Grützner, A. **2008.** Pulling single molecules of titin by AFM--recent advances and physiological implications. *Pflugers Arch*, 456, 101-15.
- Linke, W. A. & Hamdani, N. **2014.** Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- Linke, W. A., Popov, V. I. & Pollack, G. H. **1994.** Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J*, 67, 782-92.

- Littmann, T., Gottle, M., Reinartz, M. T., Kalble, S., Wainer, I. W., Ozawa, T. & Seifert, R. **2015**. Recruitment of beta-arrestin 1 and 2 to the beta2-adrenoceptor: analysis of 65 ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 355, 183-90.
- Lohse, M. J., Engelhardt, S. & Eschenhagen, T. **2003**. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*, 93, 896-906.
- Louch, W. E., Sheehan, K. A. & Wolska, B. M. **2011**. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 288-98.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G. & Koch, W. J. **2013**. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*, 113, 739-53.
- MacLennan, D. H. & Kranias, E. G. **2003**. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 566-77.
- Madamanchi, A. **2007**. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J Med*, 10, 99-104.
- Mcmurray, J. J., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Kober, L., Lip, G. Y., Maggioni, A. P., Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Ronnevik, P. K., Rutten, F. H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P. T., Voors, A. A., Zannad, F., Zeiher, A., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonet, L. A., Avraamides, P., Ben Lamin, H. A., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F. A., Guida, G. F., Hardman, S., Iung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J. N., Nielsen, O. W., Orn, S., Parissis, J. T. & Ponikowski, P. **2012**. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 14, 803-69.
- Methawasin, M., Hutchinson, K. R., Lee, E. J., Smith, J. E., 3rd, Saripalli, C., Hidalgo, C. G., Ottenheim, C. A. & Granzier, H. **2014**. Experimentally increasing titin compliance in a novel mouse model attenuates the Frank-Starling mechanism but has a beneficial effect on diastole. *Circulation*, 129, 1924-36.
- Moncman, C. L. & Wang, K. **1999**. Functional dissection of nebulin demonstrates actin binding of nebulin-like repeats and Z-line targeting of SH3 and linker domains. *Cell Motil Cytoskeleton*, 44, 1-22.
- Müller, A. E., Kreiner, M., Kötter, S., Lassak, P., Bloch, W., Suhr, F. & Krüger, M. **2014**. Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament stiffness. *Front Physiol*, 5, 449.
- Najafi, A., Sequeira, V., Kuster, D. W. & Van Der Velden, J. **2016**. beta-adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest*, 46, 362-74.
- Noland, T. A., Jr., Guo, X., Raynor, R. L., Jideama, N. M., Averyhart-Fullard, V., Solaro, R. J. & Kuo, J. F. **1995**. Cardiac troponin I mutants. Phosphorylation by protein kinases C and A and

- regulation of Ca(2+)-stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1. *J Biol Chem*, 270, 25445-54.
- Opitz, C. A., Leake, M. C., Makarenko, I., Benes, V. & Linke, W. A. **2004**. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 94, 967-75.
- Ottenheijm, C. A., Van Hees, H. W., Heunks, L. M. & Granzier, H. **2011**. Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300, L161-6.
- Perino, A., Ghigo, A., Scott, J. D. & Hirsch, E. **2012**. Anchoring proteins as regulators of signaling pathways. *Circ Res*, 111, 482-92.
- Perkin, J., Slater, R., Del Favero, G., Lanzicher, T., Hidalgo, C., Anderson, B., Smith, J. E., 3rd, Sbaizero, O., Labeit, S. & Granzier, H. **2015**. Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J*, 109, 2592-601.
- Pernigo, S., Fukuzawa, A., Pandini, A., Holt, M., Kleinjung, J., Gautel, M. & Steiner, R. A. **2015**. The crystal structure of the human titin:obscurin complex reveals a conserved yet specific muscle M-band zipper module. *J Mol Biol*, 427, 718-36.
- Prado, L. G., Makarenko, I., Andresen, C., Kruger, M., Opitz, C. A. & Linke, W. A. **2005**. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, 126, 461-80.
- Raskin, A., Lange, S., Banares, K., Lyon, R. C., Zieseniss, A., Lee, L. K., Yamazaki, K. G., Granzier, H. L., Gregorio, C. C., Mcculloch, A. D., Omens, J. H. & Sheikh, F. **2012**. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, 287, 29273-84.
- Razumova, M. V., Bukatina, A. E. & Campbell, K. B. **2000**. Different myofilament nearest-neighbor interactions have distinctive effects on contractile behavior. *Biophys J*, 78, 3120-37.
- Sakthivel, S., Finley, N. L., Rosevear, P. R., Lorenz, J. N., Gulick, J., Kim, S., Vanburen, P., Martin, L. A. & Robbins, J. **2005**. In vivo and in vitro analysis of cardiac troponin I phosphorylation. *J Biol Chem*, 280, 703-14.
- Schmidt, R. F. & Lang, F. **2007**. *Physiologie des Menschen*.
- Schmitt, J. M. & Stork, P. J. **2000**. beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J Biol Chem*, 275, 25342-50.
- Shenoy, S. K., Drake, M. T., Nelson, C. D., Houtz, D. A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R. T., Lichtarge, O. & Lefkowitz, R. J. **2006**. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 281, 1261-73.
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A. & Schulz, R. **2007**. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55, 113-26.

- Sozzani, S., Agwu, D. E., McCall, C. E., O'flaherty, J. T., Schmitt, J. D., Kent, J. D. & Mcphail, L. C. **1992**. Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. *J Biol Chem*, 267, 20481-8.
- Sumandea, C. A., Garcia-Cazarin, M. L., Bozio, C. H., Sievert, G. A., Balke, C. W. & Sumandea, M. P. **2011**. Cardiac troponin T, a sarcomeric AKAP, tethers protein kinase A at the myofilaments. *J Biol Chem*, 286, 530-41.
- Takimoto, E., Champion, H. C., Belardi, D., Moslehi, J., Mongillo, M., Mergia, E., Montrose, D. C., Isoda, T., Aufiero, K., Zaccolo, M., Dostmann, W. R., Smith, C. J. & Kass, D. A. **2005**. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res*, 96, 100-9.
- Tong, C. W., Stelzer, J. E., Greaser, M. L., Powers, P. A. & Moss, R. L. **2008**. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circ Res*, 103, 974-82.
- Trombitas, K. & Granzier, H. **1997**. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*, 273, C662-70.
- Tskhovrebova, L. & Trinick, J. **2004**. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. & Lohse, M. J. **1993**. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, 87, 454-63.
- Uys, G. M., Ramburan, A., Loos, B., Kinnear, C. J., Korkie, L. J., Mouton, J., Riedemann, J. & Moolman-Smook, J. C. **2011**. Myomegalin is a novel A-kinase anchoring protein involved in the phosphorylation of cardiac myosin binding protein C. *BMC Cell Biol*, 12, 18.
- Van Der Velden, J., Klein, L. J., Van Der Bijl, M., Huybregts, M. A., Stooker, W., Witkop, J., Eijlsman, L., Visser, C. A., Visser, F. C. & Stienen, G. J. **1998**. Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc Res*, 38, 414-23.
- Vikhorev, P. G., Song, W., Wilkinson, R., Copeland, O., Messer, A. E., Ferenczi, M. A. & Marston, S. B. **2014**. The dilated cardiomyopathy-causing mutation ACTC E361G in cardiac muscle myofibrils specifically abolishes modulation of Ca(2+) regulation by phosphorylation of troponin I. *Biophys J*, 107, 2369-80.
- Warren, C. M., Krzesinski, P. R., Campbell, K. S., Moss, R. L. & Greaser, M. L. **2004**. Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mech Dev*, 121, 1301-12.
- Witt, C. C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H. & Labeit, S. **2006**. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *Embo j*, 25, 3843-55.
- Woo, A. Y. & Xiao, R. P. **2012**. beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin*, 33, 335-41.
- Xiao, R. P., Ji, X. & Lakatta, E. G. **1995**. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*, 47, 322-9.

- 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, 1181-8.
- Zhang, G. X., Kimura, S., Nishiyama, A., Shokoji, T., Rahman, M., Yao, L., Nagai, Y., Fujisawa, Y., Miyatake, A. & Abe, Y. **2005**. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res*, 65, 230-8.
- Zhao, C. Y., Greenstein, J. L. & Winslow, R. L. **2016**. Roles of phosphodiesterases in the regulation of the cardiac cyclic nucleotide cross-talk signaling network. *J Mol Cell Cardiol*, 91, 215-27.
- Zhou, B., Wu, L. J., Tashiro, S., Onodera, S., Uchiumi, F. & Ikejima, T. **2007**. Activation of extracellular signal-regulated kinase during silibinin-protected, isoproterenol-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is tyrosine kinase pathway-mediated and protein kinase C-dependent. *Acta Pharmacol Sin*, 28, 803-10.
- Zhu, W., Petrashevskaya, N., Ren, S., Zhao, A., Chakir, K., Gao, E., Chuprun, J. K., Wang, Y., Talan, M., Dorn, G. W., 2nd, Lakatta, E. G., Koch, W. J., Feldman, A. M. & Xiao, R. P. **2012**. Gi-biased beta2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure. *Circ Res*, 110, 265-74.
- Zhu, W. Z., Wang, S. Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H. & Xiao, R. P. **2003**. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J Clin Invest*, 111, 617-25.
- Zhu, W. Z., Zheng, M., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., Kobilka, B. K. & Xiao, R. P. **2001**. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1607-12.

6 Anhang

Tabelle 10: Perfusionszeiten nach Herzgewicht für die Präparation adulter Rattenkardiomyozyten.
(Louch *et al.*, 2011)

Herzgewicht (g)	Zeit (min)	Herzgewicht (g)	Zeit (min)
0.1	5	1.3	21
0.2	5	1.4	23
0.3	5	1.5	25
0.4	7	1.6	26
0.5	8	1.7	28
0.6	10	1.8	30
0.7	12	1.9	31
0.8	13	2.0	33
0.9	15	2.1	35
1.0	16	2.2	36
1.1	18	2.3	38
1.2	20	2.4	40

7 Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Martina Krüger für die Möglichkeit meine Promotion am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu absolvieren bedanken. Insbesondere danke ich für die persönliche Betreuung, wo ich immer offene Türen vorgefunden habe. Auch für die Ermöglichung der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen im Rahmen der Doktorarbeit bin ich dankbar.

Dr. Sebastian Kötter danke ich für die intensive und freundschaftliche Betreuung der Laborarbeiten und die Durchsicht meiner Arbeit.

Anna Eliane Müller danke ich für die Anleitung zu Beginn der Laborarbeiten und die Präparation der adulten Rattenkardiomyozyten, Sabine Bongart für die vielseitige technische Unterstützung und die guten Worte, Malgorzata Isic für die Präparation der adulten Rattenkardiomyozyten, Julia Albrecht für die tatkräftige Unterstützung bei der Langendorff-Perfusion.

Mein ganz besonderer Dank gilt für die herzliche Aufnahme ins gesamte Team der AG Krüger, wo ich mich jederzeit gut aufgehoben gefühlt habe und eine schöne Zeit verbracht habe. Neben den bereits oben genannten danke ich deshalb folgenden Mitgliedern der AG Krüger mit denen ich während meiner Zeit im Labor zusammenarbeiten durfte: Dr. Christian Andresen, Selem Sahin und Matthias Kreiner.

Der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die finanzielle Unterstützung des Freisemesters, das ich im Rahmen der Doktorarbeit absolviert habe.

Meiner Familie und ganz besonderes meinen Eltern danke ich für die bedingungslose Unterstützung und die damit verbundene Freiheit während meines Studiums.

Meiner Freundin Laura danke ich für das Korrekturlesen, aber ganz besonders für die lebenswürdige Motivation und Unterstützung.