

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

Der Einfluss von Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung auf die Titin-basierte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im Großtiermodell

Dissertation

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

Vorgelegt von
Celerina Jahns

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. Nat. Martina Krüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

„Schritt – Atemzug – Besenstrich“
aus dem Buch „Momo“ von Michael Ende

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Postervorstellung im Rahmen der European Muscle Conference 2019 in Canterbury, GB:
Jahns, C., Kötter, S., Bongardt, S. Skyschally, A., Heusch, G., Kleinbongard, P., Krüger, M., 2019, Rapid modulation of titin-based cardiomyocyte stiffness by ischemic preconditioning in pig hearts,

Der Abstract wurde veröffentlicht im *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, "The European Muscle Conference 2019 Special Issue", Juni 2019.

Zusammenfassung

Der Herzinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. In Folge des Myokardinfarkts kommt es zu einem Verlust von Herzgewebe und einem daraus resultierenden Funktionsverlust des infarzierten Myokards. Die Anpassungsmechanismen des nicht-infarzierten (*remote*) Myokardanteils auf den plötzlichen Funktionsverlust benachbarter Areale sind noch weitestgehend unbekannt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Ischämie/Reperfusion im *remote* Myokard zu einem akuten Anstieg der Titin-basierten Kardiomyozytensteifigkeit führt, vermutlich, um die Herzaktion des durch den Substanzverlust geschwächten Myokards aufrecht zu erhalten. Ursächlich für den Anstieg der Titin-basierten passiven Steifigkeit sind unter anderem durch die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase PKC α vermittelte Phosphorylierungen in der elastischen PEVK-Region Titins. Titin ist mit bis zu 3,7 MDa das größte Protein des menschlichen Körpers und ist neben Aktin und Myosin ein Filamentprotein des Sarkomers. Hier ist es für viele wichtige Funktionen zuständig, allen voran die Beeinflussung der passiven Dehnbarkeit beziehungsweise Steifigkeit des Herzmuskelgewebes. Etwa 10 Tage nach einem Myokardinfarkt hat sich im infarzierten Bereich eine fibrotische Infarkttnabe gebildet und es kommt auch im *remote* Myokard wieder zu einer Abnahme der passiven Steifigkeit von Titin.

Aus Versuchen am Schweinemodell ist bekannt, dass durch ischämische Präkonditionierung (IPC), also dem eigentlichen Infarkt vorausgehende Zyklen einer vorübergehenden Myokardischämie, die Infarktgröße und somit den Gewebeverlust deutlich reduzieren kann. Welche Signalwege an dem Prozess der IPC beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zunächst die im Mausmodell beobachteten Veränderungen der Titin-Eigenschaften auch am Großtiermodell des Schweins nachzuweisen. Weiterführend soll an diesem Modell der Einfluss einer IPC auf die infarkt-induzierten Titin-Veränderungen charakterisiert werden.

Zur Beantwortung dieser beiden Fragestellungen wurden Gewebebiopsien aus Schweineherzen verwendet, die entweder nur einer Ischämie (55 min) und anschließender Reperfusion (10 bzw. 120 min) ausgesetzt waren, oder einer Ischämie/Reperfusion mit vorausgegangener ischämischer Präkonditionierung (zwei Zyklen von jeweils 3 min mit 2 min Reperfusion dazwischen). Mittels Western Blot-Verfahren wurde die relative PKC α -vermittelte Phosphorylierung der zwei Serinreste S11878 und S12022 im Titin PEVK-Element, sowie die Aktivität der PKC α analysiert. Im Ischämie/Reperfusions-Modell zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung der PEVK-Region an S11878 und eine tendenzielle Steigerung an der Stelle S12022 sowie eine Erhöhung der PKC α -Aktivität während der Ischämie und zu beiden Reperfusionszeitpunkten. Im zweiten Modell mit vorangegangener IPC, zeigte sich bereits infolge der Präkonditionierung ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung an beiden Stellen der PEVK-Region, S11878 und S12022 sowie eine erhöhte Aktivität der PKC α und diese Veränderungen wurden durch den nachfolgenden Myokardinfarkt noch weiter verstärkt.

Die grundsätzlich erhöhte Phosphorylierung der Titin PEVK-Region lässt darauf schließen, dass es auch im Großtiermodell während einer Myokardischämie nicht nur zu einer schnellen Zunahme der Titin-basierten passiven Steifigkeit der Myozyten kommt, sondern dies darüber hinaus bereits nach 10 Minuten Ischämie im Rahmen der IPC dargestellt werden kann. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, inwiefern die beobachteten Veränderungen tatsächlich zu einer Zunahme der passiven Steifigkeit der Myozyten führen, und inwiefern der Anstieg der Titin-basierten Myozytensteifigkeit zu der kardioprotektiven Wirkung der IPC beiträgt.

Summary

Myocardial infarction is among the leading causes of death in the western industrial nations. The myocardial infarction leads to a loss of cardiac tissue, which then results in impaired function of the infarcted myocardium. The adaptive mechanisms of the non-infarcted (remote) region of the myocardium to the sudden loss of function of adjacent areas are still unknown. In a mouse model it was demonstrated that ischemia/reperfusion leads to an abrupt increase of titin-based stiffness in cardiomyocytes of the remote myocardium. The observed increase in titin-based passive stiffness is largely caused by phosphorylation of the elastic PEVK region of titin and is mediated by increased activation of the Ca^{2+} -dependent protein kinase PKC α . Titin is the biggest protein of the human body (up to 3,7 MDa) and next to actin and myosin a filament protein of the sarcomere. Apart from other important cellular functions titin is one of the main determinants of passive elasticity and stiffness of the heart muscle. Therefore, the observed cardiomyocyte stiffening could be an adaptive response to maintain the cardiac performance of the myocardium which has been weakened by the loss of substance. Approximately 10 days after myocardial infarction, a fibrotic scar has been formed in the infarcted area and the passive stiffness in the remote myocardium is decreasing.

Through pig experiments it is known that by ischemic preconditioning (IPC) by cycles of a temporary myocardial ischemia before the actual infarction, the infarct size and thus the loss of tissue can be significantly reduced. However, which signaling pathways contribute to the process of IPC is still not completely understood. The present study aimed to test if the changes of the titin properties which were observed in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion can also be shown in a large animal model (pig). Furthermore, the study tested the influence of IPC on the ischemia-induced modulation of Titin shall be characterised in this study.

To address the two questions, tissue biopsies were taken from pig hearts either exposed to only ischemia (55 min) and subsequent reperfusion (10 and 120 min, respectively) or ischemia/reperfusion after ischemic preconditioning (two cycles of 3 min each and 2 min reperfusion in between). Using Western blot analysis, the relative PKC α mediated phosphorylation of two sites, S11878 and S12022, in titin's PEVK region and also the phosphorylation of PKC α were examined.

In the ischemia/reperfusion model, a significant increase of phosphorylation of the PEVK region at S11878 and also a rise at S12022 as well as an increase of the PKC α activity could be demonstrated not only during ischemia but also at the two timepoints of reperfusion. In the preconditioned IPC hearts, there was already a significant increase of titin phosphorylation at both sites of PEVK region, S11878 and S12011 after preconditioning, as well as an increased activity of PKC α . These changes were even intensified by the following myocardial ischemia/reperfusion.

Taken together the data demonstrate that myocardial ischemia/reperfusion in mini pig hearts induces a rapid increase in titin-based passive stiffness of cardiomyocytes in the non-ischemic myocardium. Moreover, these modifications can be induced and accelerated by 10 min. of myocardial preconditioning. Future investigations need to prove to what extent the observed changes lead to an actual increase of passive stiffness of myocytes and how this increase contributes to the cardioprotective effect of IPC.

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>arbitrary units</i>
AAR	<i>area at risk</i>
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BL	<i>base line</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Ca²⁺	Kalzium
CaMKII	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cMyBPc	<i>cardiac myosin binding protein c</i>
cTnI	Kardiales Troponin I
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
GSSG	Glutathiondisulfid
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I/R	Ischämie/Reperfusion
I55	Ischämie nach 55 Minuten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPost	Ischämische Postkonditionierung
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
LAD	<i>left anterior descending</i>
LV	Linker Ventrikel
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDa	Megadalton

MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
NFκB	<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PCI	perkutane Koronarintervention
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R10	Reperfusion nach 10 Minuten
R120	Reperfusion nach 120 Minuten
RIC	<i>remote ischemic conditioning</i>
RIPC	<i>remote ischemic preconditioning</i>
RIPerC	<i>remote ischemic perconditioning</i>
RIPost	<i>remote ischemic postconditioning</i>
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel
SAFE	<i>salvage activating factor enhancement</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
S-S-Brücke	Disulfidbrücke
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T2	Degradationsbande von Titin
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
Temed	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Titin
us	<i>unique sequence</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Myokardinfarkt.....	1
1.1.1	Ätiologie und epidemiologische Relevanz.....	1
1.1.2	Pathophysiologie im Infarktgewebe.....	2
1.1.3	<i>Remodeling</i> im <i>remote</i> Myokard	4
1.1.4	Therapie und Reperfusionsschaden	5
1.2	Titin.....	7
1.2.1	Aufbau und Funktion	7
1.2.2	Modulation der passiven Steifigkeit.....	8
1.2.3	Titin-basierte passive Steifigkeit nach Myokardischämie.....	15
1.3	Ischämische Präkonditionierung	16
1.3.1	Lokale ischämische Präkonditionierung.....	16
1.3.2	Weitere Formen der ischämischen Konditionierung	18
2	Ziele der Arbeit	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Laborgeräte	22
3.1.2	Chemikalien.....	23
3.1.3	Puffer und Lösungen	24
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.5	Antikörper	25
3.1.6	Medikamente	26
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Experimentelle Ischämie/Reperfusion und ischämische Präkonditionierung am Schweineherzen	27
3.2.2	Biochemische Analyse	29
3.2.3	Auswertung.....	33
3.2.4	Statistik	34
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Verwendete Versuchsmodelle.....	35
4.2	Ischämie/Reperfusion.....	35

4.2.1	Titinisoformenzusammensetzung im Großtiermodell Schwein	35
4.2.2	Analyse der akuten Veränderung der PEVK-Region im <i>remote</i> Myokard nach I/R.	36
4.2.3	Analyse der akuten Veränderung der Kinaseaktivitäten im <i>remote</i> Myokard	40
4.3	Ischämische Präkonditionierung mit anschließender Ischämie/Reperfusion.....	42
4.3.1	Titinisoformenzusammensetzung nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender I/R	42
4.3.2	Analyse der akuten Veränderung der PEVK-Region im <i>remote</i> Myokard nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion	43
4.3.3	Analyse der akuten Veränderung der Kinaseaktivitäten im <i>remote</i> Myokard	46
5	Diskussion	48
5.1	I/R und IPC modifizieren die Titin-basierte Steifigkeit im Großtiermodell	48
5.2	Die Titinisoformenzusammensetzung wird durch akute ischämische Ereignisse nicht beeinflusst	48
5.2.1	Das Titinisoformenverhältnis im Großtiermodell Schwein.....	48
5.2.2	I/R und IPC haben keinen Einfluss auf die Titinisoformen und die Titindegradation	49
5.3	I/R und IPC induzieren posttranslationale Modifikationen des Proteins Titin.....	50
5.3.1	Ischämie/Reperfusion erhöht die passive Steifigkeit.....	50
5.3.2	Ischämische Konditionierung verstärkt Titinphosphorylierung	54
5.4	Limitationen	59
5.5	Schlussfolgerung	60
6	Literaturverzeichnis	62
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	70

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Ätiologie und epidemiologische Relevanz

Der Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (Murray et al., 2013). In Deutschland ist er die zweithäufigste Todesursache nach chronisch ischämischer Herzkrankheit (Statistisches Bundesamt, 2017). Ursächlich für einen Herzinfarkt ist in den meisten Fällen eine zuvor bestehende Artherosklerose. Diese kann in den Koronararterien des Herzens zur Bildung von Lipidplaques führen, was häufig in Stenosen resultiert und sich dann als koronare Herzkrankheit (KHK) äußert. Im Verlauf kann die fibröse Oberfläche der Plaques plötzlich rupturieren, oder seltener, erodieren. Der nun freiliegende Kern des Plaques begünstigt die Ausbildung eines Thrombus, was zum akuten Verschluss des betroffenen Gefäßes führt (Bentzon et al., 2014). Es kommt zur Minderperfusion und Nekrose des Myokards und definitionsgemäß zu einem Myokardinfarkt (Thygesen et al., 2018). Abzugrenzen davon ist die Myokardischämie, die zunächst nur die Gewebehypoxie im Myokard durch unzureichenden Blutfluss beschreibt. Der *Ramus interventricularis anterior* (engl. *left anterior descending* = LAD) der *Arteria coronaria sinistra* stellt hierbei die häufigste Lokalisation für einen akuten Verschluss dar (Burke et al., 2007).

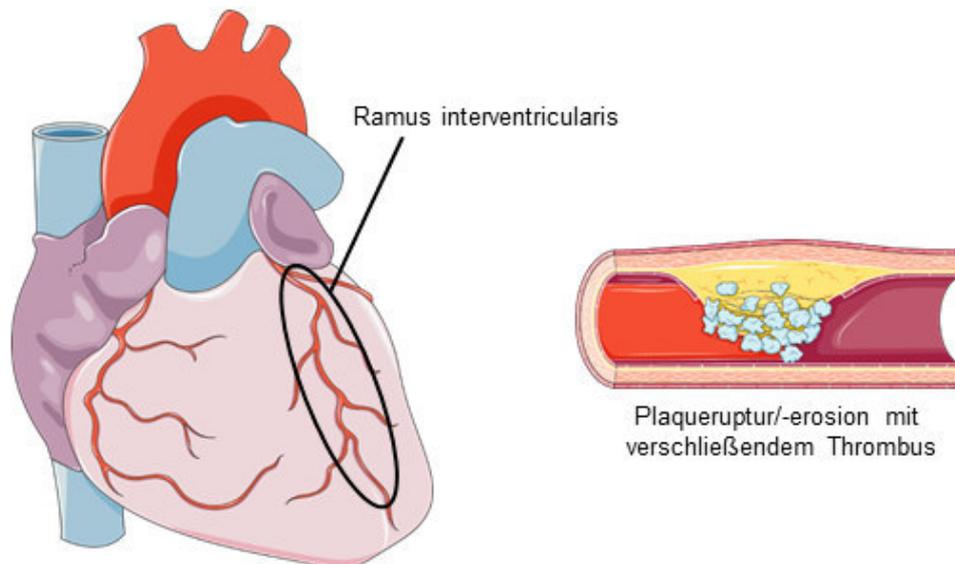


Abb. 1: Ätiologie des Myokardinfarkts (angelehnt an Thygesen et al. (2018), die Abbildung enthält modifizierte Elemente von Servier Medical Art, lizenziert unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (CC BY 3.0). <https://smart.servier.com>).

Zu sehen ist eine bildliche Darstellung des menschlichen Herzens. Gekennzeichnet ist der *Ramus interventricularis* der *Arteria coronaria sinistra*, der als häufigste Lokalisation für Myokardinfarkte gilt. Auf der rechten Seite ist ein Längsschnitt des Gefäßes dargestellt. Durch Artherosklerose kommt es in den Koronarien zur Ausbildung von lipidreichen Plaques (gelb), dessen fibröse Kappe rupturieren bzw. erodieren kann. Der freigelegte Kern begünstigt die Bildung eines Thrombus durch Thrombozytenaggregation (hellblau), der entweder zu einem vollständigen Verschluss oder zu einer hochgradigen Stenose führen kann.

Infolge des Herzinfarkts kann es zu verschiedenen Komplikationen für die Patienten kommen, die die hohe Sterblichkeitsrate erklären. In den ersten Tagen nach dem Ereignis, der Frühphase, spielen vor allem der plötzliche Herztod, Arrhythmien, die Linksherzinsuffizienz mit konsekutivem Lungenödem, der kardiogene Schock und Myokardrupturen eine Rolle. Längerfristig besteht dann die Gefahr in der Entwicklung eines Ventrikulaneurysmas oder einer globalen Herzinsuffizienz (Thygesen et al., 2018). Aufgrund dieser möglicherweise tödlichen Komplikation ist es essenziell, die Infarktgröße und somit den Gewebeverlust gering zu halten und dafür die genauen Pathomechanismen und die Einflussgrößen auf den Zelltod und den Funktionsverlust zu verstehen.

1.1.2 Pathophysiologie im Infarktgewebe

Auf pathophysiologischer Ebene kommt es im Infarktgewebe durch die Ischämie zum vermehrten Zelltod der Kardiomyozyten. Die ersten Veränderungen machen sich bereits in den ersten 15 min nach Infarkt bemerkbar (Jennings et al., 1974).

In der Zeit nach Gefäßverschluss können im Infarktgewebe drei Phasen beschrieben werden: die Inflammations-, Proliferations- und die Reifungsphase (Abb. 2). Die Inflammationsphase, eine sterile Entzündungsreaktion im Myokard, besteht vor allem aus der Einwanderung von Immunzellen und ist wichtig, um das Gewebe von geschädigten Zellen und zerstörter extrazellulärer Matrix zu befreien. Die nachfolgende Proliferationsphase dient der Reparatur des entstandenen Gewebeverlusts, bevor es dann zur Ausbildung und Festigung einer fibrotischen Narbe in der Reifungsphase kommen kann (Prabhu et al., 2016).

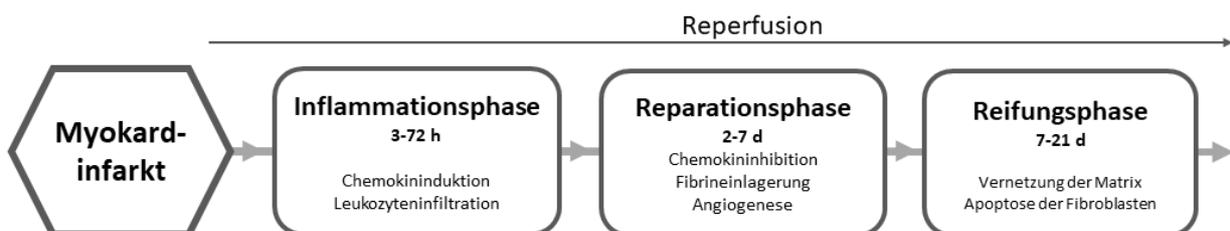


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der pathophysiologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt in der Infarktzone (angelehnt an Nah et al. (2009)).

Inflammationsphase

In der ersten Phase nach Infarkt stehen vor allem die Einwanderung von Immunzellen und die Ausschüttung von proinflammatorischen Chemokinen im Vordergrund, um die Schäden im Infarktgewebe zu beseitigen.

Während der Ischämie kommt es zur Hypoxie im Herzgewebe, wodurch sich die Permeabilität der Endothelzellen, und somit der Gefäßwände, grundsätzlich erhöht und so eine Migration

von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe ermöglicht. Zusätzlich werden von den nekrotischen Kardiomyozyten und auch der geschädigten extrazellulären Matrix sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt, die durch Bindung an *toll-like*-Rezeptoren (TLR) intrazelluläre Signalwege initiieren (MAPK- und NFκB-Signalweg). Dies führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen, was die Extravasation der aktivierten Leukozyten erleichtert (Ghigo et al., 2014).

Über die TLR wird auch das angeborene Immunsystem aktiviert. Es führt zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1β, TNF, IL-6 und IL-18 (Prabhu und Frangogiannis, 2016). Auch die noch intakten Kardiomyozyten scheinen die Immunantwort zu verstärken und für eine Freisetzung von Zytokinen (Gwechenberger et al., 1999) und Chemokinen (Tarzami et al., 2002) zu sorgen. Diese hervorgerufene Entzündungsreaktion, allen voran die Leukozyten, führt in der Inflammationsphase zu einer Beseitigung von Zellabfällen und zerstörten Gewebestandteilen, die im Infarktgebiet durch den Zelluntergang anfallen.

Reparations- und Proliferationsphase

Nach der Inflammationsphase folgt die Proliferationsphase, die eigentlich in zwei wichtige Abschnitte unterteilt werden muss, die fließend ineinander übergehen: die Reparations- und die Proliferationsphase. In der Reparationsphase muss zunächst die Inflammation beendet werden, damit in der Proliferationsphase eine fibrotische Narbe ausgebildet wird und neue Gefäße gebildet werden können.

In der Reparationsphase sind vor allem Immunzellen wie Neutrophile Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen wichtig. Den Makrophagen und Monozyten werden hierbei eine besondere Bedeutung zuteil, da sie ihre Funktion ändern können. 3-4 Tage nach Infarkt sind sie in der Inflammationsphase für die Beseitigung des geschädigten Gewebes zuständig, wirken also proinflammatorisch und proteolytisch. Hieran sind die M1-Makrophagen und bestimmte Monozyten (Ly6C^{hi}) beteiligt. In einer zweiten Phase, nach ungefähr 7 Tagen, werden vermehrt M2-Makrophagen und Ly6C^{lo}-Monozyten tätig, die in der Reparations- und Proliferationsphase antiinflammatorisch und profibrotisch sowie angiogen wirken und entsprechende Zytokine freisetzen (IL-10, TGF-β und VEGF) (Nahrendorf et al., 2007). Weiterhin essenziell für diese Phase sind die dendritischen Zellen, dessen Ziel es ist, die Inflammation zu beenden, zur Narbenbildung beizutragen und das Gefäßwachstum zu fördern (Anzai et al., 2012). Das Zusammenspiel dieser Zellen beendet die Inflammationsphase und leitet in die nächste Phase über.

Es folgt die Proliferationsphase. Hauptbestandteil ist die Aktivierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten, die maßgeblich an der Fibrosierung der Infarkt Narbe beteiligt sind (Turner et al., 2013). Die Transformation der Myofibroblasten wird vor allem durch TGF-

β induziert (Prabhu und Frangogiannis, 2016) und führt zu einem vermehrten Einbau von kontraktilen Proteinen, wie z.B. α -smooth muscle Aktin und einer embryonalen Isoform von Myosin (Turner und Porter, 2013). Nach Beseitigung der geschädigten Matrix in der Inflammationsphase, produzieren die Myofibroblasten zunehmend eine provisorische extrazelluläre Matrix aus Fibrin und Fibronectin und anderen matrizellulären Proteinen. Diese Übergangsmatrix dient als Gerüst für sämtliche Proliferationsvorgänge in der Infarktzone, wobei die mechanische Funktion hier eher eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr ist die extrazelluläre Matrix für das *signaling* zuständig und reguliert somit die Inflammations- und Reparationsphase (Dobaczewski et al., 2006). Zum Ende der Proliferationsphase hat sich eine provisorische, fibrotische Narbe gebildet, die in der nächsten Phase ausreifen muss.

Reifungsphase

Die Reifungsphase dient der Festigung der fibrotischen Narbe, die sich in der Proliferationsphase gebildet hat. Die extrazelluläre Matrix wird durch zunehmende Quervernetzung der Kollagenfasern gestärkt (Gonzalez-Santamaria et al., 2016). Die Aktivität der reparativen Zellen sowie der Einfluss von TGF- β und Angiotensin II nehmen immer weiter ab, ebenso wie andere profibrotische Signale (Prabhu und Frangogiannis, 2016). Gleichzeitig kommt es zur Ausschüttung von Interferon- γ , welches indirekt die Ausschüttung antifibrotischer Chemokine induziert (Bujak et al., 2009). Am Ende der Reifungsphase, etwa 7-21 Tage nach dem Infarktereignis, ist der Gewebeverlust somit durch eine fibrotische Narbe ersetzt.

1.1.3 Remodeling im remote Myokard

Nicht nur das infarzierte Gewebe durchläuft Veränderungen nach einem Myokardinfarkt, sondern auch das benachbarte, nicht direkt vom Infarkt betroffene Gewebe, das sogenannte *remote* Myokard, unterliegt Umbauprozessen (*remodeling*). Dieses *remodeling* ist einerseits für den Erhalt der Pumpfunktion wesentlich, andererseits aber auch mitverantwortlich für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (Talman et al., 2016).

Langfristig kommt es nach Myokardinfarkt im umliegenden *remote* Myokard vorrangig zu Fibrose und Hypertrophie (Sutton et al., 2000). Dem zu Grunde liegt eine unerwünschte Überaktivierung der Inflammations- bzw. Reparationsphase, die über die Infarktnarbe hinaus, auch das umliegende Gewebe reorganisiert (Francis Stuart et al., 2016).

Die Fibrosierung geschieht im infarzierten Gewebe zur Ausbildung einer Narbe, um das Risiko einer Ruptur des Ventrikels nach Infarkt zu vermindern. Im *remote* Bereich erhöht sich durch die Infarktnekrose und dem entsprechenden Gewebeverlust der mechanische Stress. Kompensiert wird dies nach einigen Tagen bis Wochen durch eine reaktive, interstitielle Fibrosierung, die ebenso wie die Infarktnarbe durch Fibro- und Myofibroblasten bewerkstelligt

wird. Dies führt im Myokard zu einer Versteifung (Talman und Ruskoaho, 2016). Beide Fibroseformen, im Infarktgewebe und *remote* Myokard, begünstigen die Entstehung von Arrhythmien, weil die elektrische Signalweiterleitung gestört wird (Francis Stuart et al., 2016). Des Weiteren können die fibrotischen Umbauprozesse für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz ursächlich sein (Gulati et al., 2013).

Der erhöhte mechanische Stress wird im *remote* Myokard zusätzlich zur Fibrose durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten kompensiert, um die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten und die Wandspannung im Ventrikel zu verringern (Heineke et al., 2006).

Durch die beiden kompensatorischen Mechanismen, Fibrose und Hypertrophie, wird jedoch die systolische und diastolische Funktion maßgeblich beeinträchtigt (Weber et al., 2013). Eine Herzinsuffizienz ist häufig die Folge und erhöht die Mortalität und verringert die Lebensqualität des Patienten.

All diese Veränderungen finden in den ersten Tagen bzw. Wochen nach Infarkt statt, sind also langfristige Anpassungen als Reaktion auf den Infarkt. Durch den Gewebeverlust ist der mechanische Stress jedoch bereits unmittelbar nach dem Ereignis erhöht. Um diesen Verlust zu kompensieren muss es schnelle Anpassungsmechanismen geben, die im umliegenden Myokard stattfinden. Ein Einflussfaktor, der auch in dieser Arbeit im Fokus steht, ist das Sarkomerprotein Titin. Es ist maßgeblich für die passive Dehnbarkeit in Muskelzellen verantwortlich. Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass nach Myokardinfarkt eine schnelle Modulation von kardialem Titin dazu beiträgt, dass das Protein selbst und somit auch die Kardiomyozyten des *remote* Myokards steifer werden. So kann der mechanische Stress bereits nach weniger als 3 Tagen zum Teil kompensiert werden (Kötter et al., 2016) (s. 1.2).

1.1.4 Therapie und Reperfusionsschaden

Nach einem Infarkt ereignis ist das oberste therapeutische Ziel das Erreichen der Reperfusion des betroffenen Myokards. Gängige Methoden hierfür sind innerhalb der ersten 120 min die perkutane Koronarintervention (PCI), außerhalb dieses Zeitfenster kommt meist eine medikamentöse Fibrinolyse zum Einsatz (Ibanez et al., 2018). Da bereits nach 20 min Ischämie die meisten Kardiomyozyten sterben (Reimer et al., 1977) ist ein schnelles Handeln essenziell für den Erhalt der Pumpfunktion des Herzens und wichtig für eine bessere Überlebenschance des Patienten.

Lange Zeit wurde angenommen, dass eine Reperfusion ausschließlich positive Effekte auf das betroffene Myokard hat. Bereits 1960 konnten Untersuchungen allerdings zeigen, dass es einen sogenannten Reperfusionsschaden gibt, bei dem Kardiomyozyten trotz oder gerade durch die Reperfusion zu Grunde gehen (Jennings et al., 1960). Die schädlichen Folgen der Reperfusion werden in vier verschiedene Formen kardialer Dysfunktionen eingeteilt: das

myokardiale *stunning*, das *no-reflow* Phänomen, die Reperfusionarrhythmien und der letale Reperfusionsschaden (Yellon et al., 2007).

Beim myokardialen *stunning* ist das Herz unmittelbar nach Infarkt mechanisch nicht in der Lage adäquat zu pumpen. Dieser Effekt ist unabhängig vom eigentlichen Schaden, der durch den Infarkt verursacht wurde, und hält für einige Tage bis Wochen an (Braunwald et al., 1982). Das *no-reflow* Phänomen bezeichnet einen Zustand, bei dem bei Beginn der Reperfusion sich der koronare Widerstand stark erhöht und somit keine angemessene Reperfusion stattfinden kann (Krug et al., 1966). Die Reperfusionarrhythmien kommen durch plötzliche Veränderungen in der Elektrophysiologie des Kardiomyozyten zustande, lassen sich aber in der Regel gut behandeln (Manning et al., 1984). Die schwerwiegendste und limitierende Form des Reperfusionsschaden ist die letale Form. Sie scheint den Schaden des eigentlichen Infarkts sogar zu verstärken, auch wenn dies schwierig *in situ* nachzuweisen ist. Interventionen zu Beginn der Reperfusion, z.B. pharmakologisch oder mechanisch, zeigen aber eine Verringerung des Schadens (Yellon und Hausenloy, 2007).

Die Genese des letalen Reperfusionsschaden lässt sich anhand der Pathophysiologie unter Infarktbedingungen nachvollziehen. Während des Infarkts kommt es zunächst zu einem Wechsel zum anaeroben Metabolismus. Entsprechend steigt der Laktatgehalt im Gewebe an und der pH-Wert sinkt. Die ATP-Konzentration verringert sich und es kommt intrazellulär zu einem Natrium- und Kalziumüberschuss. Dies stört die Kontraktionsfunktion des Herzmuskels erheblich (Hausenloy et al., 2013). Wird nun das Gefäß therapeutisch wieder eröffnet sorgt der plötzliche koronare Blutfluss für eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und es kommt zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Des Weiteren wird der pH-Wert im noch sauren Gewebe rapide wieder auf das Normalniveau angehoben. All diese Einflüsse tragen beim letalen Reperfusionsschaden gemeinsam zum Tod des Kardiomyozyten bei. Zum einen kommt es durch die ROS zur Porenbildung in den Mitochondrien, die die Apoptose von Myozyten einleiten. Zum anderen führt der Kalziumüberschuss zu einer Hyperkontraktion der Zelle, die eine ausreichende Ejektionsfraktion im Körperkreislauf verhindert (Hashmi et al., 2015). Somit wird der Schaden, der ursprünglich vom Infarkt verursacht wurde, verstärkt.

Jedoch lassen sich die Folgen des letalen Reperfusionsschaden durch verschiedene Maßnahmen abschwächen. Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders die ischämische Konditionierung interessant, die sich positiv auf die Infarktgröße nach Reperfusion auswirken kann. Vor allem die ischämische Präkonditionierung, lokal und *remote*, sowie auch die Post- und Perkonditionierung spielen hierbei eine wichtige Rolle (Zhao et al., 2003). Sie verzögern bzw. verhindern unter anderem die Porenbildung in den Mitochondrien, den übermäßigen intrazellulären Kalziumgehalt und auch die pH-Veränderung. All dies wird durch bestimmte

Signalwege vermittelt, die indirekt durch die ischämische Konditionierung aktiviert werden (Yellon und Hausenloy, 2007) (s. 1.3).

1.2 Titin

1.2.1 Aufbau und Funktion

Titin ist mit ungefähr 3,7 Megadalton (MDa) das größte monomere Protein im menschlichen Organismus. Neben Aktin und Myosin ergänzt es das Sarkomer um ein drittes Filament, dessen Funktion vor allem in der Strukturgebung und der Beeinflussung der Elastizität unter physiologischen sowie pathophysiologischen Zuständen des Sarkomers besteht (Labeit et al., 1997). Mit einer Länge von 1 μm ist es in der Lage die Hälfte eines Sarkomers zu überspannen und reicht von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Freiburg et al., 2000). Der NH_2 -Terminus des Proteins ist in der Z-Scheibe über die Proteine Nebulin (Witt et al., 2006), α -Actinin (Labeit et al., 2006) und Telethonin (Granzier et al., 2004) fixiert, während der COOH -Terminus mit der M-Linie verbunden ist (Obermann et al., 1996).

Titin besteht zu einem großen Teil aus sich wiederholenden Sequenzen von Immunglobulin-Domänen, Fibronectin-Typ-3-Domänen und Titin-spezifischen *unique sequences* (us) (Improta et al., 1996). Das Protein wird in seinem Grundaufbau in vier verschiedene Abschnitte eingeteilt: den Bereich in der Z-Scheibe, das I-Band, das A-Band und das M-Band (Abb. 3). Das I-Band ist mit der Z-Scheibe verankert und besteht aus proximalen Immunglobulin-Domänen, der N2B-Domäne, der PEVK-Region und den distalen Immunglobulin-Domänen (Linke et al., 1996). Das A-Band ist fest mit Myosin und dem *myosin-binding-protein C* verknüpft und stellt den größten Teil des Proteins dar (Tskhovrebova et al., 2004, Linke et al., 1994). Das M-Band ist in der M-Linie des Sarkomers verankert und beinhaltet Insertionssequenzen sowie die Titinkinase (Puchner et al., 2008).

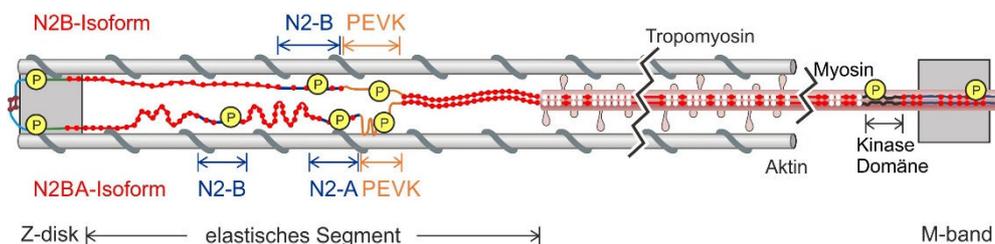


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Myofilamentproteins (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).

Das Protein Titin reicht von der Z-Scheibe bis zum M-Band im Sarkomer. Es besteht aus proximalen Immunglobulin-Domänen, der N2B-Domäne, der PEVK-Region und den distalen Ig-Domänen. Im kardialen Gewebe liegt Titin in zwei verschiedenen Isoformen vor (N2B, N2BA), die sich durch zusätzliche Ig-Domänen und einer N2A-Domäne unterscheiden (N2BA). Im M-Band befindet sich zusätzlich die Titinkinase.

Durch alternatives Spleißen kann Titin in verschiedenen Isoformen vorliegen, die alle durch das gleiche Gen (TTN) codiert werden (Bang et al., 2001). Im Herzmuskel sind die beiden Isoformtypen N2BA und N2B vertreten. Sie unterscheiden sich in der Zusammensetzung und Länge der I-Banden Region. Die längere und flexiblere N2BA-Isoform (3,2 MDa) enthält zusätzlich zur N2-B Domäne eine N2A-Domäne (Cazorla et al., 2000), entsprechend kürzer und steifer ist die N2B-Isoform (3 MDa). Je nachdem welche Isoform stärker exprimiert wird, beeinflusst dies die Steifigkeit bzw. Elastizität des Myozyten. Grundsätzlich kommt dem I-Band hierbei eine besondere Bedeutung zu, da es der elastische Teil von Titin ist, der die passive Steifigkeit des Proteins maßgeblich beeinflusst und wie eine molekulare Feder im Sarkomer fungiert (Granzier und Labeit, 2004).

Neben seinem Einfluss als molekulare Feder und Determinante der passiven Steifigkeit des Muskelgewebes ist Titin als Strukturprotein für den Zusammenbau des Sarkomers mit allen Myofilamenten als Grundgerüst essenziell. Durch seine stabile Assoziation an Myosin sorgt Titin zudem für strukturelle Integrität, indem es die zentrale Positionierung während des Kontraktionszyklus bewerkstelligt (Krüger et al., 2016). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für den Frank-Starling-Mechanismus (Helmes et al., 2003).

1.2.2 Modulation der passiven Steifigkeit

Die passive Steifigkeit des Myokards

Die Steifigkeit von Titin beeinflusst die passive Dehnbarkeit des Herzens und steht stets im Zusammenspiel mit dem in der extrazellulären Matrix befindlichen Kollagen des Herzmuskels (Kötter et al., 2013). Die Dehnbarkeit ist wichtig, um während der Herzaktion, vor allem während der Diastole, eine ausreichende Füllung der Herzkammern zu erzielen (Krüger et al., 2011). Bei vielen Herzerkrankungen, wie z.B. der hypertrophen Kardiomyopathie, führt eine schlechte Dehnbarkeit des Myokards zu einem geringeren enddiastolischen Volumen, somit zu einer geringeren Ejektionsfraktion, die für eine schlechtere Pumpfunktion des Herzens verantwortlich ist.

Die Modulation der Steifigkeit von Titin unterliegt zwei grundlegenden Mechanismen. Zum einen kann über die Veränderung der Zusammensetzung der beiden Isoformen N2BA und N2B im Herzen eine erhöhte bzw. erniedrigte Steifigkeit erlangt werden. Da dieser Prozess über das alternative Spleißen des TTN-Gens geschieht, ist dies ein mittel- bis langfristiger Mechanismus.

Eine andere, kurzfristigere Möglichkeit ist die posttranslationale Modifikation von Titin. Dazu gehören die Arginylation, oxidative Modifikationen und die Phosphorylierung (Hamdani et al., 2017). In dieser Arbeit liegt der Fokus vor allem auf der Phosphorylierung von zwei Titindomänen, die PEVK-Region und die N2-Bus in der elastischen I-Bande. Diese

Veränderung ist bereits nach wenigen Stunden nachweisbar und zählt somit zu einem schnellen Anpassungsmechanismus.

Veränderung der Isoformenzusammensetzung

Das Titin der quergestreiften Muskulatur wird, im Gegensatz zu anderen Sarkomerproteinen, lediglich von einem Gen (TTN) codiert. Durch alternatives Spleißen liegt Titin dann in verschiedenen muskelspezifischen Isoformen vor (Freiburg et al., 2000). Im Herzen werden die Isoformen N2BA und N2B exprimiert, wohingegen z.B. im Skelettmuskel nur die Isoform N2A vorkommt (Bang et al., 2001). Die beiden kardialen Isoformen unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der elastischen I-Bande. In der N2B-Isoform (beinhaltet das N2B Element) ist mit einer Größe von 3,0 MDa wesentlich kürzer und somit auch steifer als die N2BA-Isoform (Abb. 4). Diese beinhaltet neben dem N2B Element auch die N2A-Domäne und ist wesentlich unflexibler als die N2B-Isoform. Da sich zusätzlich in der N2BA-Isoform auch eine längere PEVK-Region befindet, trägt dies zu der insgesamt erniedrigten Steifigkeit bei (Freiburg et al., 2000). Beide Isoformen werden im kardialen Gewebe koexprimiert und kommen sogar gemeinsam im selben Sarkomer vor. Das Verhältnis der Zusammensetzung der Isoformen entscheidet über die Steifigkeit des Gewebes. Myokardgewebe, welches mehr von der N2B-Isoform enthält ist demnach steifer als Myokardgewebe, in dem die N2BA-Isoform dominiert (Granzier und Labeit, 2004).

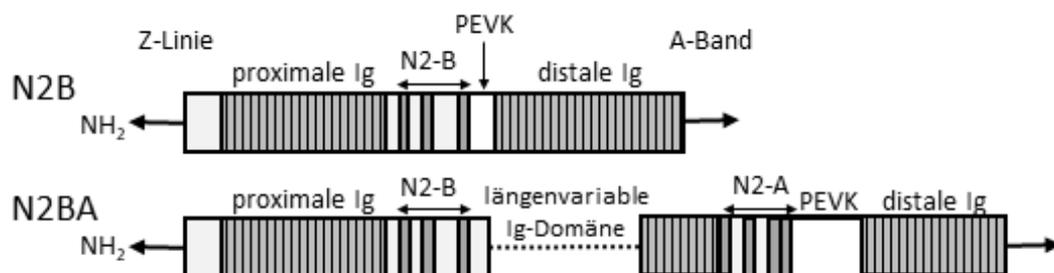


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der kardialen Titinisoformen N2B und N2BA (angelehnt an Makarenko et al. (2004)).

Die beiden Titinisoformen, die im Myokard vorkommen, bestehen, von der Z-Scheibe aus gesehen, aus den proximalen Immunglobulin-Domänen (Ig), der N2-B *unique sequence*, der PEVK-Domäne und der distalen Immunglobulin-Domäne. Die N2BA-Isoform enthält zusätzlich ein N2-A-Element und ebenso eine längere PEVK-Domäne als die N2B-Isoform. Daraus ergibt sich für die längere N2BA-Isoform eine erhöhte Flexibilität.

Die Zusammensetzung kann aus verschiedenen Gründen variieren und moduliert langfristig die Dehnbarkeit des Gewebes. Zum einen kann man Unterschiede physiologisch in verschiedenen Spezies sehen. Während kleinere Tiere eher steifere Herzen haben und somit die N2B-Isoform im Myokard dominiert, findet man in größeren Tieren und auch dem Menschen ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen den beiden Isoformen, welches das

Gewebe weniger steif macht (Cazorla et al., 2000). In dieser Arbeit wurde Titin am Großtiermodell Schwein untersucht und es wurde eine Isoformenzusammensetzung von ungefähr 50 : 50 (N2BA : N2B) festgestellt. Dies kommt dem Verhältnis im Menschen sehr nahe, welches bei 40 : 60 (N2BA : N2B) liegt (Kötter et al., 2013).

Sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch kann es allerdings auch zu einer Anpassung der Isoformenzusammensetzung kommen. In der embryologischen Entwicklung des Herzens verändert sich z.B. die Komposition der Isoformen. Während in embryonalen Rattenkardiomyozyten vermehrt die längere, flexiblere N2BA-Isoform exprimiert wird, dominiert in Rattenkardiomyozyten von adulten Tieren die kürzere und steifere N2B-Isoform (Krüger et al., 2010). Das sich entwickelnde Herz ist also elastischer, was möglicherweise eine bessere Anpassung an die diastolische Füllung in der embryonalen Entwicklung begünstigt (Granzier und Labeit, 2004).

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es ebenso zu einer veränderten Isoformenzusammensetzung kommen. In Untersuchungen an insuffizienten Herzen in Folge einer dilatativen Kardiomyopathie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Expression von N2BA kommt und das gesamte Myokard somit elastischer wird. Dieser Mechanismus könnte die im Rahmen der Erkrankung erhöhte Fibrose und erhöhte passive Steifigkeit im *remote* Myokard kompensieren (Makarenko et al., 2004).

Insgesamt führt also eine Veränderung des Isoformenverhältnis zu einer langfristigen Veränderung der Titin-basierten passiven Steifigkeit des Myokards.

Phosphorylierung des elastischen I-Bandes

Ein weitaus dynamischerer und kurzfristigerer Mechanismus, um die passive Steifigkeit zu beeinflussen, stellt die posttranslationale Modifikation des elastischen I-Bandes dar. In dieser Arbeit liegt der Fokus vor allem auf der Phosphorylierung der PEVK-Domäne (besteht vorrangig aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K)) und der N2-B *unique sequence*, wobei letztere nur im kardialen Gewebe exprimiert wird (Neagoe et al., 2003).

Insgesamt können für den I-Band-Bereich bislang 15 potentielle konservierte Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Hamdani et al., 2017). Kommt es im Bereich der PEVK-Domäne zu einer Phosphorylierung führt dies insgesamt zu einer Versteifung von Titin (Hidalgo et al., 2009). Wird hingegen die N2-Bus phosphoryliert, nimmt die passive Steifigkeit ab (Krüger et al., 2009). Verschiedene Kinasen sind an diesen Prozessen beteiligt und sollen im Folgenden näher erläutert werden (Abb. 5).

Für die Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin sind die Proteinkinase C α (PKC α) (Hidalgo et al., 2009) und die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ) (Hamdani et al., 2013) beteiligt. Die PKC α -abhängige Phosphorylierung kann durch α_1 -

adrenerge Stimulation induziert werden. Die Phosphorylierungsstellen für diese Kinase sind die Serinreste S11878 und S12022 (Hidalgo et al., 2009). Die CaMKII δ , eine kardiale Isoform, ist ebenfalls in der Lage die Stelle S12022 zu phosphorylieren (Hamdani et al., 2013). Da sich die Länge der PEVK-Region in den beiden kardialen Isoformen unterscheidet, ist es wichtig zu erwähnen, dass sich die untersuchten Phosphorylierungsstellen in dem Teil befinden, der in beiden Isoformen exprimiert wird (Freiburg et al., 2000). Mittels phosphospezifischer Antikörper gegen die Serinreste S11878 und S12022 kann die relative Titinphosphorylierung durch *Western Blot*-Analyse quantifiziert werden (Hamdani et al., 2017).

Bei der Phosphorylierung der N2-Bus sind folgende Kinasen beteiligt: die Proteinkinase A (PKA), die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), die *extracellular-signal regulated kinase 2* (ERK2) und die CaMKII δ (Kötter et al., 2013, Hamdani et al., 2013).

Die PKA wird durch β -adrenerge Stimulation über cAMP aktiviert. Die einzige Phosphorylierungsstelle, die sowohl im Menschen als auch in Mäusen und Ratten vorkommt ist der Serinrest S4010 (Krüger et al., 2006b). Die PKG ist cGMP-abhängig und wird indirekt über Stickstoffmonoxid (NO) und natriuretische Peptide aktiviert. Phosphoryliert wird hier die Stelle S4099 (Krüger et al., 2009). ERK2 ist Teil des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *pathway* und phosphoryliert bei Titin ebenfalls, wie die PKA, den Serinrest S4010 (Raskin et al., 2012). Die CaMKII δ phosphoryliert die N2-Bus an der Stelle S4209 und S3705 (Hamdani et al., 2013). Dank phosphospezifischer Antikörper kann an diesen Stellen der Phosphorylierungsstatus der N2-Bus quantifiziert werden (Hamdani et al., 2017).

Auffallend ist, dass die CaMKII δ in der Lage zu sein scheint, beide elastischen Titindomänen zu phosphorylieren. Man könnte zu dem Schluss kommen, dass sich die gegensätzlichen Effekte dann aufheben würden. Jedoch konnten Untersuchungen zeigen, dass die CaMKII δ insgesamt eher für eine verminderte Steifigkeit von Titin sorgt bzw. eher vermehrt die N2-Bus phosphoryliert (Hidalgo et al., 2013).

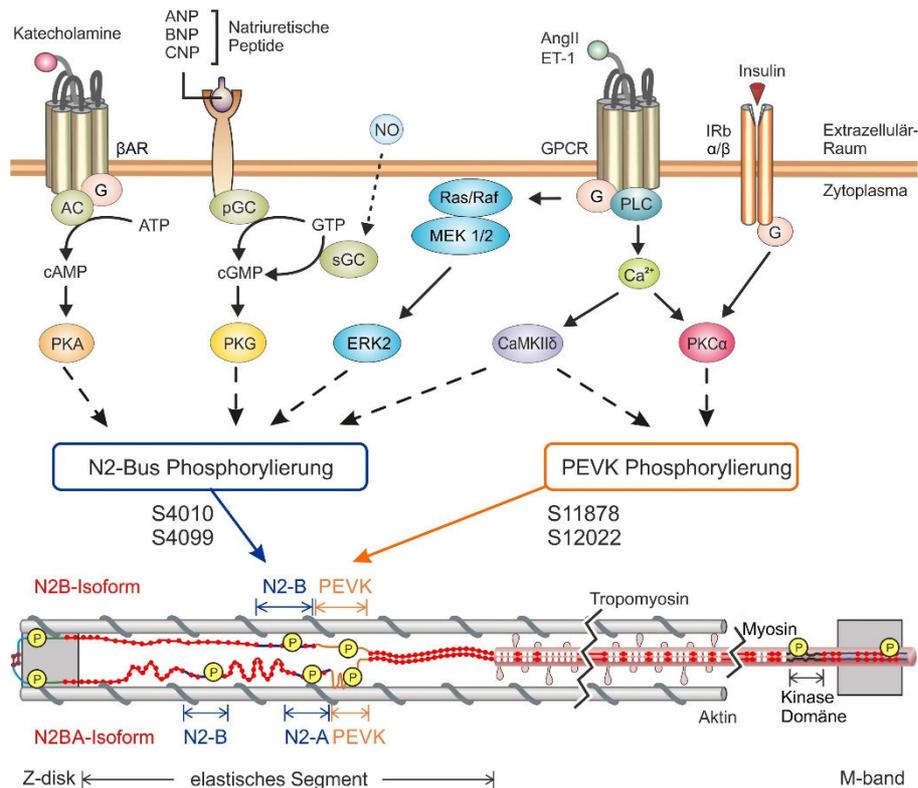


Abb. 5: Schematische Darstellung der beteiligten Signalwege, Kinasen und humanen Phosphorylierungstellen, die an der Phosphorylierung der beiden elastischen Titindomänen N2-Bus und PEVK beteiligt sind (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).

Dargestellt sind die Signalwege der für die Phosphorylierung der Titindomänen N2-Bus und PEVK relevanten Kinasen: Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG), *extracellular-signal regulated* Kinase (ERK2), Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) und Proteinkinase C α (PKCα). Wichtige Phosphorylierungsstellen im humanen Titin in der N2-Bus sind der Serinrest S4010 und S4099. Für die PEVK-Region sind vor allem die Phosphorylierungsstellen im humanen Titin S11878 und S12022 relevant.

Durch Phosphorylierung der PEVK-Region und N2-Bus werden somit zwei gegensätzliche Effekte erreicht. Die PEVK-Region wird durch die Phosphorylierung grundsätzlich steifer und weniger elastisch und die N2-Bus wird weniger steif. Nach einer aktuellen Theorie (Kötter et al., 2013) kommt dies durch die unterschiedliche Gesamtladung der beiden Domänen. PEVK besteht aus vielen basischen Aminosäuren und ist somit eher positiv geladen. Die N2-Bus allerdings besteht eher aus sauren Aminosäuren und weist eine negative Ladung auf. Die beiden unterscheiden sich deshalb auch in ihrem isoelektrischen Punkt, der bei der PEVK-Domäne höher und bei der N2-Bus niedriger ist. Werden nun negativ geladene Phosphatgruppen in die Regionen eingebracht, werden in der PEVK-Region intramolekulare elektrostatische Anziehungskräfte ausgebildet. Dies führt zu einer Verdichtung des Proteins und somit zu einer Versteifung. Bei der N2-Bus entstehen durch die Phosphatgruppen wiederum intramolekulare elektrostatische Abstoßungskräfte, wodurch es zur Auflockerung in diesem Bereich kommt, was eine erhöhte Dehnbarkeit zur Folge hat (Kötter et al., 2013).

Zusammenfassend ist bis heute mit der PKC α eine Kinase bekannt, die dynamisch die Steifigkeit von Titin erhöht und insgesamt vier Kinasen, die zu einer Senkung der Steifigkeit führen können (PKA, PKG, ERK2, CaMKII δ) (Hamdani et al., 2017).

Oxidative Modifikation der Titin-basierten Steifigkeit

Neben der Phosphorylierung hat oxidativer Stress im Rahmen posttranslationaler Modifikationen einen großen Einfluss auf die passive Steifigkeit von Titin (Beckendorf und Linke, 2015). Unter ischämischen Bedingungen, z.B. nach einem Myokardinfarkt, kommt es zur Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Canton et al., 2004). Die ROS sind dazu in der Lage, Titins Steifigkeit über Modifikationen in der I-Bande sowohl zu erhöhen als auch zu erniedrigen. Ein eindeutiger Effekt bezüglich der Steifigkeit lässt sich somit nicht beschreiben. Vier Mechanismen spielen bei den oxidativen Modifikationen eine Rolle: die Abschwächung des PKG-Signalwegs, Disulfidbrückenbildung in der N2-Bus, S-Glutathionylierung in der Ig-Domäne der I-Bande und die Aktivierung der Titin-abbauenden Proteasen (Beckendorf und Linke, 2015) (Abb. 6).

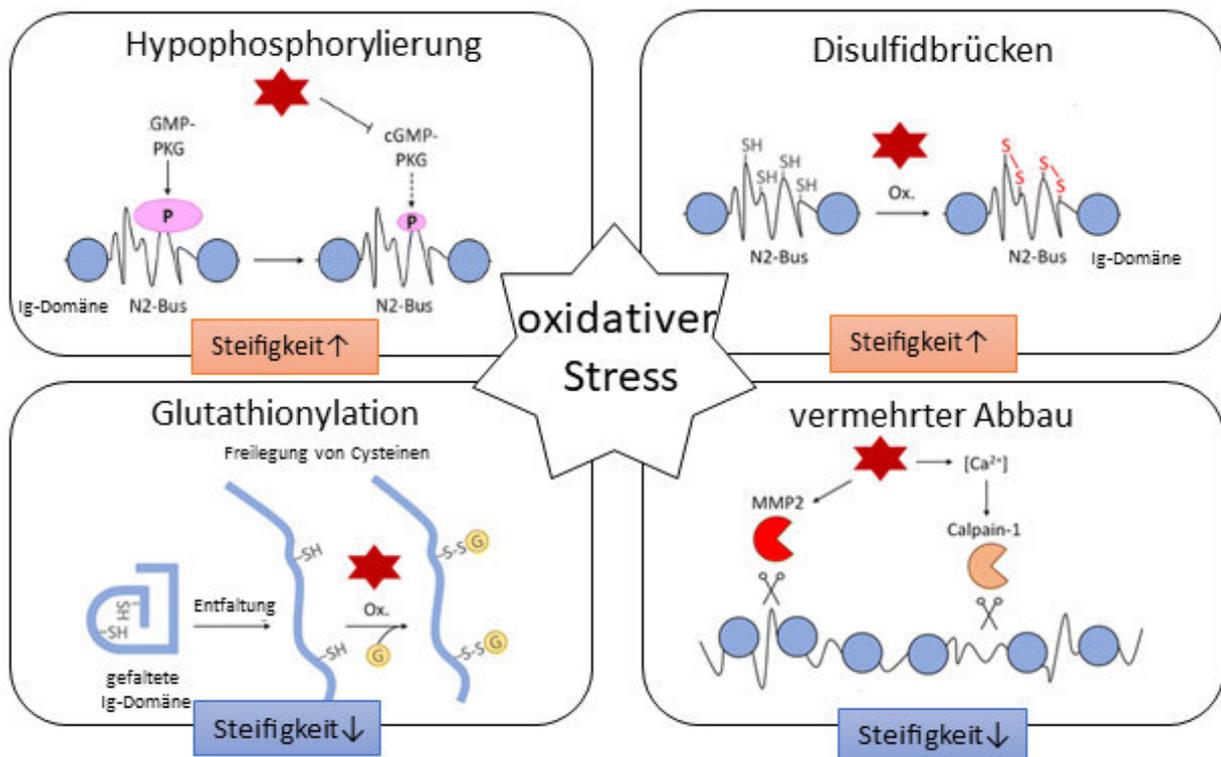


Abb. 6: Auswirkungen und Mechanismen von oxidativem Stress auf das Protein Titin und die Titin-basierte Steifigkeit (modifiziert nach Beckendorf et al. (2015)).

a) Durch oxidativen Stress kommt es zur Abschwächung des Proteinkinase G-Signalwegs, was eine Hypophosphorylierung der N2-Bus und eine erhöhte Steifigkeit zur Folge hat. b) Unter oxidativen Bedingungen kommt es zur Oxidation der Cysteine in der N2-Bus und zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Daraus folgt eine mechanische Stabilisierung und eingeschränkte Flexibilität, die Steifigkeit wird erhöht. c) Wird das Sarkomer gedehnt, liegen Cysteine der Ig-Domäne frei und es werden unter oxidativen Bedingungen, durch Glutathion vermittelt, Disulfidbrücken ausgebildet. Das Protein lässt sich nicht mehr zurückfalten und die Steifigkeit nimmt ab. d) Oxidativer Stress aktiviert indirekt die Titin-abbauenden Proteasen Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) und Calpain-1. Durch den geringeren Titingehalt wird das Sarkomer insgesamt flexibler (Beckendorf und Linke, 2015).

Durch ROS wird der Signalweg der PKG beeinträchtigt, da die Bildung von Stickstoff (NO) verringert wird. Die Aktivität der PKG wird demnach reduziert und führt zu einer Hypophosphorylierung der N2-Bus (Beckendorf und Linke, 2015). Dies resultiert in einer erhöhten Steifigkeit von Titin (Kötter et al., 2013).

Weiterhin kommt es unter oxidativen Bedingungen zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Auch dieser Prozess findet in der N2-Bus statt, wo insgesamt drei S-S-Brücken entstehen können. Durch diese Verbindungen wird die Region stabilisiert und ist in ihrer Flexibilität eingeschränkt. Für das gesamte Protein bedeutet das eine erhöhte Steifigkeit (Grützner et al., 2009).

Auch in anderen Domänen von Titin zeigt oxidativer Stress seine Wirkung. In den Ig-Domänen werden durch Dehnung des Sarkomers Cysteine freigelegt. Durch Oxidation mittels Glutathiondisulfid (GSSG), welches unter oxidativen Bedingungen vorliegt, werden auch hier Disulfidbrücken ausgebildet. Da sich das Sarkomer zuvor im gedehnten Zustand befand, ist das Protein mit den neu entstandenen Disulfidbrücken nicht mehr in der Lage, zurück in den Ursprungszustand zu kommen. Die somit instabilere Ig-Domäne trägt zu einer Abnahme der Steifigkeit bei (Alegre-Cebollada et al., 2014).

Durch oxidativen Stress werden außerdem Proteasen, die für den Titin-Abbau verantwortlich gemacht werden, aktiviert. Dazu gehören die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) (Linke, 2010) und Calpain-1 (Lim et al., 2004). Untersuchungen haben gezeigt das nach myokardialer Ischämie, also unter oxidativen Bedingungen, die Aktivität der MMP2 stark erhöht und dadurch vermehrt Titin abgebaut wird (Ali et al., 2010). Calpain-1 wird nicht direkt durch oxidativen Stress sondern vielmehr durch Kalziumüberschuss, zu dem es infolge der Ischämie durch oxidativen Stress kommen kann, aktiviert (Inserte et al., 2012). Calpain-1 baut Titin im elastischen I-Band ab und scheint durch Dehnung des Sarkomers noch besser wirken zu können (Murphy et al., 2006). Der Proteinabbau vom strukturgebenden Titin führt letztlich zu einem irreversiblen Rückgang der Steifigkeit der Myozyten. Dies beeinträchtigt auch den Kontraktionszyklus, bei dem Titin normalerweise das Sarkomer zentriert und so für eine optimale Kraftentwicklung unverzichtbar ist (Horowitz et al., 1986).

Oxidativer Stress kann auf die Titin-basierte Steifigkeit gegensätzliche Effekte haben. Durch indirekte Hypophosphorylierung und Disulfidbrückenbildung in der N2-Bus erhöht sich die Steifigkeit, während sie durch Glutathionylierung und erhöhte Proteasenaktivität abnimmt (Beckendorf und Linke, 2015).

Grundsätzlich konnte ebenso nachgewiesen werden, dass unter oxidativen Bedingungen die Proteinkinasen PKA, PKG, PKC und CaMKII in ihrer Aktivität verstärkt werden (Wright et al., 2009), die wiederum die elastischen Domänen PEVK und N2-Bus phosphorylieren und somit die Steifigkeit von Titin verändern. Bislang kann oxidativer Stress jedoch keiner definierten Auswirkung auf die passiven Myofilamenteigenschaften zugewiesen werden (Beckendorf und Linke, 2015).

1.2.3 Titin-basierte passive Steifigkeit nach Myokardischämie

Im Gegensatz zu den zellulären Umbauprozessen einige Tage nach Infarkt ist bislang noch wenig untersucht, welche Umbauprozesse in der Frühphase nach Myokardinfarkt eine Rolle spielen, um die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten. Kötter et al. konnten 2016 nachweisen, dass bereits wenige Stunden nach Infarkt, Veränderungen im Protein Titin nachweisbar sind, die erheblich zu einer erhöhten Steifigkeit der Kardiomyozyten beitragen. Die erhöhte Steifigkeit könnte helfen, die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten, noch bevor die eigentlichen Reparationsvorgänge in der Proliferations- und Maturationsphase einsetzen und es zur Ausbildung der Infarktnarbe kommt. Die Versteifung von Titin dient hierbei womöglich als stabilisierende Überbrückung zwischen Infarkt ereignis und fibrotischer Narbenbildung (Kötter et al., 2016).

Die Studie zeigte, dass in isolierten Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokard von Mäuseherzen, 3 und 10 Tage nach einer permanenten Ligatur der LAD eine erhöhte passive Steifigkeit gemessen werden konnte. Unterstützt wurde diese Erkenntnis durch die Analyse der relativen Phosphorylierung der Titindomänen PEVK und N2-Bus. Hierbei zeigte sich, dass die Phosphorylierungsstellen der PEVK-Region (S11878 und S12022) nach 3 Tagen eine signifikant höhere relative Phosphorylierung aufwiesen, was die erhöhte Steifigkeit erklären könnte. Die N2-Bus zeigte dagegen keine signifikanten Veränderungen an den Phosphorylierungsstellen S4010 und S4099. Ähnlich verhielt sich die Aktivität der verantwortlichen Kinasen. Während die Untersuchung keine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 und kardialem Troponin I zeigten, war die Aktivierung der PKC α nach 3 Tagen Ischämie deutlich erhöht (Kötter et al., 2016).

Es lässt sich also feststellen, dass es wenige Stunden nach dem Myokardinfarkt zu einem Titin-vermittelten Anstieg der Steifigkeit im nicht direkt vom Infarkt betroffenen Myokard kommt. Dies könnte einen positiven Effekt auf die kardiale Funktion haben, da die Sarkomer-zentrierende Funktion von Titin so besser zum Tragen kommt und die Kontraktion optimiert. Des Weiteren führt eine Versteifung von Titin zu einer Verbesserung des Frank-Starling-Mechanismus, welcher das Herz bei hoher Volumenbelastung durch Steigerung der Kontraktionskraft unterstützt (Helmes et al., 2003). Ein weiterer Vorteil der Versteifung des Myokards ist der Schutz vor einer Überdehnung des bereits geschwächten Myokards, was möglicherweise das Risiko für Rupturen abschwächt (Kötter et al., 2016).

Nach 10 Tagen zeigte sich in der Studie jedoch ein Abfall in der passiven Steifigkeit und auch die Aktivität der PKC α sank wieder auf Normalniveau. Dies erklärt womöglich, dass die stabilisierende Funktion, die Titin nach Infarkt übernimmt nicht mehr nötig ist, da die fibrotische Infarktnarbe nach ungefähr 10 Tagen vollständig ausgebildet ist (Prabhu und Frangogiannis, 2016, Kötter et al., 2016). Somit scheint die Versteifung von Titin im *remote* Myokard als eine

Art Überbrückung für die Zeit bis zur Ausbildung einer funktionellen Narbe im Infarktgewebe zu fungieren.

Diese Untersuchung zeigt deutlich, dass Titin an dem frühen ventrikulären *remodeling* nach einem Myokardinfarkt beteiligt ist. Zukünftige Studien werden zeigen, ob und wie sich Titin und die Titin-basierte Steifigkeit pharmakologisch beeinflussen lassen, um die bestehenden Therapieoptionen zu verbessern.

1.3 Ischämische Präkonditionierung

1.3.1 Lokale ischämische Präkonditionierung

Murry et al. beschrieben 1986 erstmals das Prinzip der ischämischen Konditionierung im Sinne einer ischämischen Präkonditionierung (*ischemic preconditioning*, IPC). Die Studie konnte nachweisen, dass kurze ischämische Episoden und Reperfusion vor einem künstlich induzierten Infarkt den entstandenen Schaden, also die Infarktgröße reduzieren konnten. Bei der lokalen IPC wird die Ischämie durch temporäres Verschließen einer Koronararterie ausgelöst und nach wenigen Minuten durch Wiedereröffnung beendet und die Reperfusion eingeleitet. Im Tiermodell und auch im Menschen trägt die IPC zur Kardioprotektion bei und dämmt den Reperfusionsschaden erheblich ein (Murry et al., 1986).

Wie die IPC den Schaden des Myokards nach Infarkt reduzieren kann und welche Signalwege daran beteiligt sind ist noch nicht vollständig geklärt. Grundsätzlich wurden bisher zwei Signalwege identifiziert (Abb. 7), die durch die Reperfusion nach der ischämischen Konditionierung aktiviert werden. Sie sind maßgeblich für die kardioprotektive Wirkung der IPC, sowie auch der anderen Formen der ischämischen Konditionierung, verantwortlich (Hausenloy et al., 2016).

Der *reperfusion injury salvage kinase pathway* (RISK-pathway), der vor allem im Kleintiermodell nachgewiesen werden kann (Hausenloy et al., 2005, Skyschally et al., 2009), und der *salvage activating factor enhancement pathway* (SAFE-pathway), der eher in größeren Säugetieren eine wichtige Rolle spielt (Lecour, 2009a, Skyschally et al., 2015). Beide Signalwege haben ein gemeinsames Endziel. Die Porenbildung in der Membran der Mitochondrien soll verhindert werden. Durch die Porenbildung wird physiologisch die Apoptose der Zelle induziert und ist deswegen ein wichtiger Angriffspunkt für Strategien zur Kardioprotektion (Hausenloy et al., 2016).

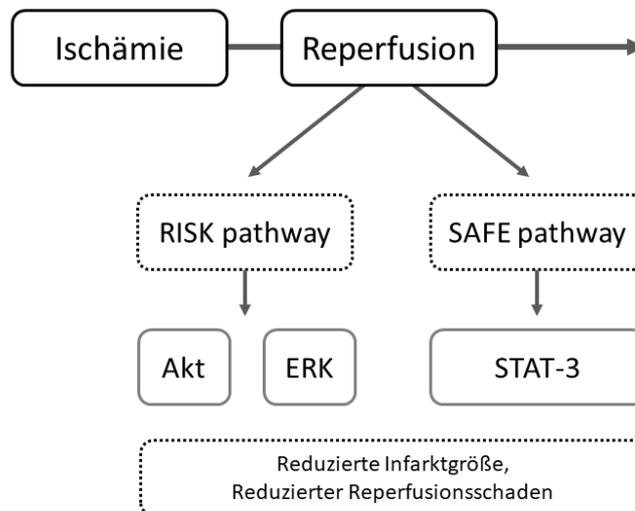


Abb. 7: Aktivierung des RISK- und SAFE-Signalwegs in Folge ischämischer Konditionierung (angelehnt an Lecour (2009b)).

Durch die Reperfusion nach Ischämie werden zwei wichtige Signalwege aktiviert, der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK *pathway*) und der *salvage activating factor enhancement pathway* (SAFE-*pathway*). Der RISK-*pathway* wird über die Proteinkinase B (Akt) und die *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) vermittelt. Der SAFE-*pathway* wirkt über den *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Beide Wege reduzieren im Myokard die Infarktgröße und verringern den Reperfusionsschaden (Hausenloy et al., 2016).

Der RISK-*pathway* wird bei Reperfusion aktiviert und vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) und über die Proteinkinase B (Akt) (Hausenloy et al., 2005). Bei Beginn der Reperfusion kommt es zu einer Öffnung von mitochondrialen Kalium-Kanälen. Daraus resultiert ein erhöhter Kaliumstrom in die Mitochondrien. Erhöhte Kaliumkonzentrationen begünstigen unter Reperfusionsbedingungen bzw. die Anwesenheit von Sauerstoff die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS aktivieren wiederum die Proteinkinase C. Diese aktiviert über G₁-Proteine letztlich den RISK-*pathway*. Dieser Ablauf findet aber nur statt, wenn die Ischämie kurz andauerte, zum Beispiel 5 min. Bei einer längeren Ischämie, wie sie beim Infarkt vorkommt, ist zunächst kein Sauerstoff vorhanden, um ROS auszubilden. Bis es zur Reperfusion und Aktivierung des RISK-*pathways* kommen kann, haben sich bereits Poren in den Mitochondrien gebildet und die Apoptose wurde eingeleitet (Dost et al., 2008). Vor allem im Kleintiermodell scheint der RISK-*pathway* wichtig zu sein und die Infarktgröße zu reduzieren (Skyschally et al., 2009).

Der SAFE-*pathway* wird über das *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) vermittelt. Auch hierbei wird die Porenbildung in den Mitochondrien verhindert. Aktiviert wird dieser Weg allerdings über den Tumornekrosefaktor α (TNF α), der bei Infarkt vermehrt im Myokard vorkommt. TNF α aktiviert die Januskinase (JAK) und darüber STAT3 (Lecour, 2009a). Es ist allerdings noch nicht vollkommen geklärt, wie die Porenbildung in den Mitochondrien über diesen Weg vermittelt wird. Der SAFE-*pathway* scheint aber vor allem im Großtiermodell und auch im Menschen eher für die kardioprotektiven Effekte verantwortlich zu sein, als der RISK-*pathway* (Skyschally et al., 2015).

Grundsätzlich ist das Prinzip der IPC zwar wirkungsvoll, aber im klinischen Alltag nicht umsetzbar. Um es als therapeutisches Konzept zu nutzen, müsste man voraussagen können, wann ein Myokardinfarkt eintritt und im Vorfeld die Zyklen der IPC durchführen. Es gibt bereits Überlegungen, wie man den IPC-Effekt pharmakologisch induzieren könnte. Durch die Schwierigkeit der Übertragung in den klinischen Alltag wurden aber auch andere Formen der ischämischen Konditionierung untersucht, die erst nach dem Infarkt ereignis eingreifen (Hausenloy et al., 2016) (Abb. 8).

1.3.2 Weitere Formen der ischämischen Konditionierung

Ischämische Postkonditionierung

Das Konzept der ischämischen Postkonditionierung (IPost) entstand auf Grund der positiven Effekte, die man bei der ischämischen Präkonditionierung nachweisen konnte. Für den klinischen Alltag ist Letzteres jedoch kaum anwendbar, weswegen eine Intervention zu Beginn der Reperfusion sinnvoller erschien. Der Angriffspunkt, der durch die IPost angegangen werden soll, ist vor allem die Eindämmung des Reperfusionsschadens. Dieser entsteht bereits in den ersten Minuten der Reperfusion und bestimmt maßgeblich das klinische *outcome* des Patienten. Ziel der IPost ist es die Reperfusion zu modifizieren, indem man bei Beginn der Reperfusion viele, kurze Zyklen von Ischämie/Reperfusion (I/R) durchführt (Hausenloy et al., 2016). Staat et al. zeigten 2005, dass während einer Ballon-Angioplastie im Rahmen einer PCI, der Ballon in vier Zyklen jeweils 1 min aufgepumpt und wieder entleert wurde. Dies konnte die Infarktgröße erheblich reduzieren. Neben der Infarktgröße konnten im Zusammenhang mit IPost weitere Faktoren reduziert werden: die Apoptose, die Ödembildung, Arrhythmien, die Inflammationsreaktion nach Infarkt und die Bildung von ROS (Hausenloy et al., 2016). Ursächlich dafür scheint unter anderem auch die Aktivierung des RISK- und des SAFE-*pathways*, ähnlich wie bei der IPC, zu sein (Tsang et al., 2004, Tamareille et al., 2011). Dadurch wird grundsätzlich die mitochondriale Porenbildung und somit die Apoptose eingedämmt (Argaud et al., 2005). Auch die dazu beitragende rasante pH-Veränderung des Gewebes wird durch IPost abgebremst. Weiterhin wird die endotheliale Dysfunktion zur Einschleusung der Immunzellen gedämpft, sowie die Immunzellaktivierung, was die Inflammationsphase deutlich abschwächt (Zhao et al., 2003).

Überraschenderweise ist die aktuelle Studienlage geteilt, da einige Arbeitsgruppen auch keine positiven Effekte durch die Anwendung der IPost nachweisen konnten (Hausenloy et al., 2016). Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kommen als mögliche Störfaktoren Komorbiditäten wie Diabetes oder Hypercholesterinämie in Frage (Pichot et al., 2015). Auch begleitende, therapeutische Maßnahmen wie der Einsatz von P2Y12-Hemmern, unterschiedliche Materialien zur Thrombektomie und die Anwendung von Hyperthermie oder

Kardioplegie können den Nutzen der IPost schmälern. Trotz dieser uneindeutigen Studienlage gibt es mittlerweile Ansätze, die versuchen die IPost durch Einsatz von pharmakologischen Substanzen zu imitieren und so den Einsatz dieses Konzepts für den klinischen Alltag zugänglicher zu machen (Hausenloy et al., 2016).

Ischämische Fernkonditionierung

Die I/R-Zyklen müssen nicht zwangsläufig lokal am Herzen stattfinden, um die kardioprotektiven Effekte zu vermitteln. Die ischämische Fernkonditionierung (*remote ischemic conditioning*, RIC) beschreibt die Durchführung der I/R-Zyklen in einem herzfernen Gewebe, wie der oberen oder unteren Extremität. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass durch RIC vor Infarkt die Infarktgröße und der Reperfusionsschaden reduziert werden können (Przyklenk et al., 1993). Über den Mechanismus ist bis heute noch nicht viel bekannt und er stellt sich sehr komplex dar. Man vermutet eine neurohumorale Komponente, die die Kardioprotektion unterstützt (Gho et al., 1996). Ähnlich wie die IPC und IPost wird die Porenbildung in den Mitochondrien verhindert (Turrell et al., 2014) und protektive Kinasen über den RISK- und SAFE-*pathway* aktiviert (Tamarelle et al., 2011). Zusätzlich werden aber auch weitere pleiotrope Effekte beschrieben, wie z.B. eine reduzierte Immunantwort und eine verringerte Plättchenaggregation. Dies schützt das Gewebe auch auf langfristiger Ebene nach dem Infarktereignis (Hausenloy et al., 2016).

Die Fernkonditionierung lässt sich wie die lokale Konditionierung vor (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) und nach Infarkt (*remote ischemic postconditioning*, RIPOst) durchführen. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit auch während des Infarkts im herzfernen Gewebe ischämische Episoden zu induzieren, was das Prinzip der *remote ischemic perconditioning* (RIPerC) beschreibt. Die RIPC weist ähnliche Effekte wie auch die lokale IPC auf, ist jedoch für den klinischen Alltag ebenso unbrauchbar. Die RIPOst vermittelt entsprechend ähnliche Effekte wie die lokale Postkonditionierung (Szijarto et al., 2012). Da bei der RIPerC Zyklen von I/R parallel zur eigentlichen Ischämie durchgeführt werden, ist dieses Konzept nicht lokal durchführbar. Bei den lokalen Verfahren werden die Ischämie und die Zyklen der Konditionierung am selben Gefäß durchgeführt, was gleichzeitig nicht möglich ist. Deswegen stellt die RIPerC hierbei einen besonderen Mechanismus dar. Während die Postkonditionierung die Operationszeit erhöht, findet die RIPerC während der Ischämie statt und führt dementsprechend zu keiner Verlängerung interventioneller Eingriffe. Außerdem kann die Methode im Gegensatz zur Präkonditionierung sowohl elektiv als auch bei Notfalleingriffen durchgeführt werden (Szijarto et al., 2012). Bisher konnten in einigen Studien vielversprechende Tendenzen in Bezug auf die Kardioprotektivität gezeigt werden (Hausenloy et al., 2016).

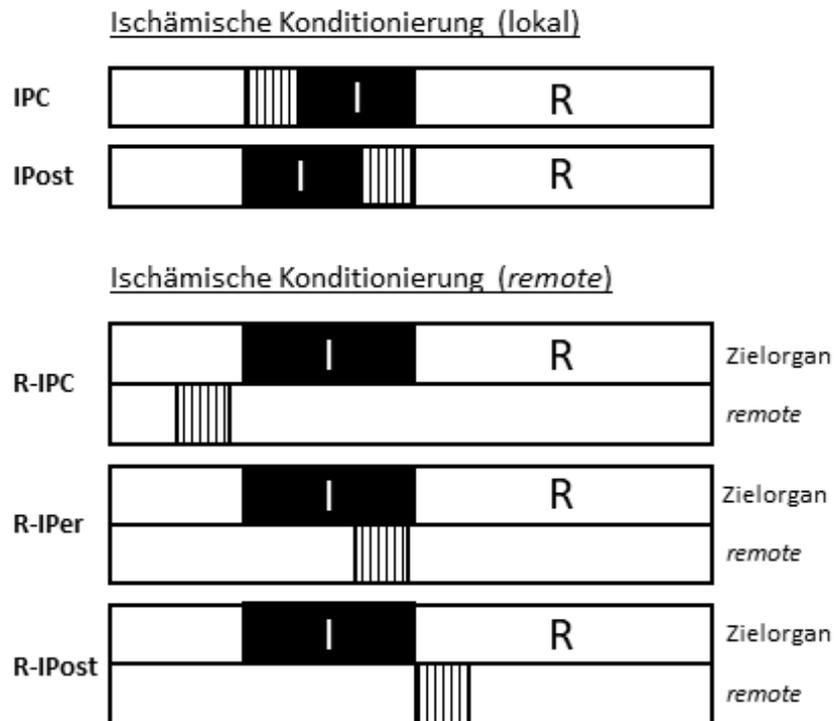


Abb. 8: Formen der ischämischen Konditionierung (angelehnt an Szijarto et al. (2012)).

Die Formen der ischämischen Konditionierung können in lokale und ferne (*remote*) Verfahren eingeteilt werden. Lokal als auch fern gibt es die ischämische Präkonditionierung (IPC bzw. RIPC), die kurze Ischämie/Reperfusionszyklen (schwarz/weiß) vor der Ischämie (I) und anschließender Reperfusion (R) darstellt. Bei der ischämischen Postkonditionierung (IPost und RIPost) folgen die Zyklen nach Infarkt zu Beginn der Reperfusion. Bei der *remote ischemic perconditioning* (RIPerC) erfolgen die Zyklen noch während der Ischämie.

2 Ziele der Arbeit

Der Myokardinfarkt ist in Deutschland eine der häufigsten Todesursachen der Welt. Besonders die Folgeerkrankungen, wie z.B. die Herzinsuffizienz, erklären die hohe Mortalität dieser Erkrankung. Es ist daher von außerordentlichem Interesse, die pathophysiologischen Abläufe und Zusammenhänge unmittelbar nach Myokardinfarkt zu verstehen. Mit diesem Wissen könnte es möglich sein, die Therapie und somit das klinische *outcome* des betroffenen Patienten zu verbessern.

Eine wichtige Rolle in den Umbauprozessen nach Herzinfarkt spielt das Myofilamentprotein Titin, da es durch Beeinflussung der passiven Dehnbarkeit einen wichtigen Beitrag zur kardialen Pumpfunktion leistet. Experimente an Ratten und Mäusen konnten aufzeigen, dass es insgesamt nach Myokardinfarkt zu einer Erhöhung der Titin-basierten Steifigkeit im Myokard kommt. Ziel dieser Arbeit war zunächst, zu untersuchen, wie sich eine Ischämie/Reperfusion auf die Myofilamentsteifigkeit in einem Großtiermodell (Schwein) auswirkt. Diese Ergebnisse sollen weitere Hinweise zur Translation auf das menschliche Herz und die pathophysiologischen Veränderungen nach einem Myokardinfarkts bringen.

Formen der ischämischen Konditionierung stellen eine vielversprechende Methode dar, um die Infarktgröße zu verringern und so möglicherweise die Lebensqualität des Patienten zu verbessern. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob speziell die ischämische Präkonditionierung einen Einfluss auf die Modulation von Titin ausübt und dies zur Kardioprotektion der ischämischen Konditionierung beiträgt.

Für die Analysen wurden Gewebebiopsien von Minischweinen untersucht, die einer Ischämie/Reperfusion und zum Teil zusätzlich einer lokalen ischämischen Präkonditionierung ausgesetzt wurden. Mittels *Western Blot*-Analyse wurden die Biopsien von unterschiedlichen Zeitpunkten (vor, während und nach Ischämie) im Hinblick auf kurz- bzw. langfristige Phosphorylierungen des Proteins Titin und der beteiligten Kinasen untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	VX-100	Systemec, Erkrath, DE
Blotting Kammer	Trans Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules, USA
Eismaschine	R 404A	Ziegra, Isernhagen, DE
Elektrophoresekammer	Mini-Twin	Biometra, Göttingen, DE
Feinwaage	AE 163	Mettler, Columbus, USA
Gefrierschrank, -20°C	Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank, -80°	UXF40086V	Thermo Scientific, Waltham, USA
Chemilumineszenz Imager	Fusion FX6	Vilber, Eberhardzell, DE
Kühlschrank, 4°C	2 6196 4	Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer	7x7 ALU Hot/Stir	VWR, Wien, AT
Mikrowelle	Micromat	AEG, Berlin, DE
Orbitalschüttler	SM-30	Edmund Bühler, Tübingen, DE
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Power Pack	Standard P25 T	Biometra, Göttingen, DE
Taumelrollenmischer	RMS-30V	CAT, Ballrechten- Dottingen, DE
Thermoblock	Compact 5350	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischwaage	572	Kern, Balingen-Frommern, DE
Tischzentrifuge	Mini Star	VWR, Wien, AT
Vortexschüttler	Reax top	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad	3043	Köttermann, Uetze, DE

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (29:1)	Bio-Rad, Hercules, USA
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, DE
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL-Reagenz	Cynagen, Bologna, IT
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (mit 1% Petrolether vergällt)	VWR Chemicals, Wien, AT
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Guanidin Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Imperial Protein-Stain	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	MERCK, Darmstadt, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molekulargewichtsmarker	Thermo Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Nonident P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Serva-Blue	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
Tetramethylethyldiamin (Temed)	AppliChem, Darmstadt, DE
Thiourea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tricine	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trisaminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Urea	AppliChem, Darmstadt, DE

3.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
10x TBST	0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,1% Tween, pH 7,4
10x Laufpuffer	250 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 2 M Glycin, SDS, pH > 8,5
2%-BSA-Lösung	2g BSA/100 ml TBST
Anodenpuffer	300 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 100 mM Tricine, pH 8,8
Blockierlösung	2 mg BSA/100 ml TBST
Kathodenpuffer	300 mM Aminocaprinsäure, 30 mM Tris, pH 8,7
Probenpuffer	8 M Urea, 2 M Thiourea, TRIS, 3% SDS, 0,035 Serva Blue, 10% Glycerol
PVDF Stain	150 mg Serva Blue, 200 ml Methanol
PVDF Destain	10% Essigsäure, 40% Ethanol (95%), 50% Aqua bidest
Sammelgelpuffer	0,5 mM TRIS/HCL pH 6,8, 0,4% SDS, pH 6,8 6M Guanidin hydrochloride, 20 mM
Strippingpuffer	Tris(hydroxymethyl)amino methan, 0,2% Nonident P40 (Igepal), 0,1 M beta-Mercaptoethanol, pH 7,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, destilliertes Wasser, pH 8,8, 0,4% SDS
Tris/HCl	50 mM Tris, Aqua dest, pH 6,8

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Material	Hersteller
Blotting Papier	Macherey-Nagel, München, DE
Pipettenspitzen	TipOne, Hamburg, DE
PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
UV-Küvetten	Brand, Wertheim, DE
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

3.1.5 Antikörper

Verwendete Primärantikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-PKC α	1:5000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PKC α (phospho T497)	1:5.000	Abcam, Cambridge, UK
p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
PEVK total	1:30.000	Eurogentec, Seraing, BE
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:2000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Phospho-PEVK S11878	1:1000	Eurogentec, Seraing, BE
Phospho-PEVK S12022	1:1000	Eurogentec, Seraing, BE
Phospho-Troponin I (Ser23/24)	1:2000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Troponin I	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

Verwendete Sekundärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP	1 : 5.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK

3.1.6 Medikamente

Tabelle 7: Verwendete Medikamente bei der Durchführung der Tierversuche

Medikament	Dosis	Hersteller
Flunitrazepam	0,4 mg/kg	Roche, Grenzach-Wyhlen, DE
Etomidat	0,3 mg/kg	Janssen-Cilag, Neuss, DE
Sufentanil	1 µg/kg	Janssen-Cilag, Neuss, DE
Isofluran	2% vol/vol	Abbvie, Ludwigshafen, DE

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelle Ischämie/Reperfusion und ischämische Präkonditionierung am Schweineherzen

Genehmigung

Die Tierversuchsprotokolle wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und genehmigt (Az. 84-02.04.2014.A098, 81-02.04.2018.A026). Die Biopsien wurden vom Institut für Pathophysiologie der Universität Essen im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Verwendete Tiere

Es wurden für die Versuche männliche, erwachsene Göttinger Minischweine (Alter ungefähr 1 Jahr) mit einem Gewicht von etwa 20 – 40 kg verwendet. Gezüchtet wurden die Schweine von der Firma Ellegaard, Dänemark. Bis zum Tag des Versuchs befanden sich die Tiere im Institut für Pathophysiologie der Universität Essen. Gehalten wurden die Tiere bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden und wurden 2x täglich gefüttert. Am Versuchstag wurden die Schweine gegen 7.30 Uhr, sediert mit Flunitrazepam (0,4 mg/kg, i.m.), in den Operationsaal gebracht.

Präparation

Das Versuchsprotokoll wird in dieser Arbeit entsprechend der Publikation Gent et al. (2017) im Folgenden zusammengefasst. Zunächst wurden die Schweine mit Etomidat (0,3 mg/kg, i.v.) und Sufentanil (1µg/kg, i.v.) anästhesiert. Aufrechterhalten wurde die Intubationsnarkose mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (2% vol/vol). Die ösophageale Temperatur wurde kontinuierlich gemessen und mit Hilfe von Decken und einer beheizbaren Tischplatte konstant gehalten. Zugänge wurden in beide *Venae jugulares* gelegt, um intravenöse Volumen- und Medikamentenzufuhr sicher zu stellen. Zunächst wurde eine laterale Thorakotomie durchgeführt, das Herz wurde freipräpariert und eine Ligatur wurde um den *Ramus interventricularis anterior* (engl. *left anterior descending* = LAD) der *Arteria coronaria sinistra* für die Induktion der Ischämie angelegt. Kam es während der Prozedur zu Kammerflimmern, wurde dies mittels elektrischer Defibrillation beendet.

Versuchsprotokoll

Für das Ischämie/Reperfusion-Modell (I/R) wurden für diese Arbeit vor der Ischämie mehrere Biopsien aus dem *remote* Myokard des linken Ventrikels entnommen (*base line*, BL). Danach wurde die LAD verschlossen und es wurden nach 55 min Ischämie erneut Biopsien

entnommen (I55). Nach 60 min wurde die Ligatur aufgehoben und weitere Biopsien wurden nach 10 bzw. 120 min Reperfusion entnommen (R10 bzw. R120). Nach 180 Minuten wurde der Versuch beendet und das Tier durch elektrische Defibrillation getötet.

Für das Modell der ischämischen Präkonditionierung (IPC) gilt dasselbe Protokoll. Lediglich vor der eigentlichen Ischämie wurde die LAD im Rahmen der IPC zwei Mal für jeweils 3 min verschlossen und dazwischen für 2 min erneut eröffnet. Am Ende des letzten Zyklus wurden zusätzliche Biopsien entnommen (IPC). Der zeitliche Ablauf beider Modelle ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.

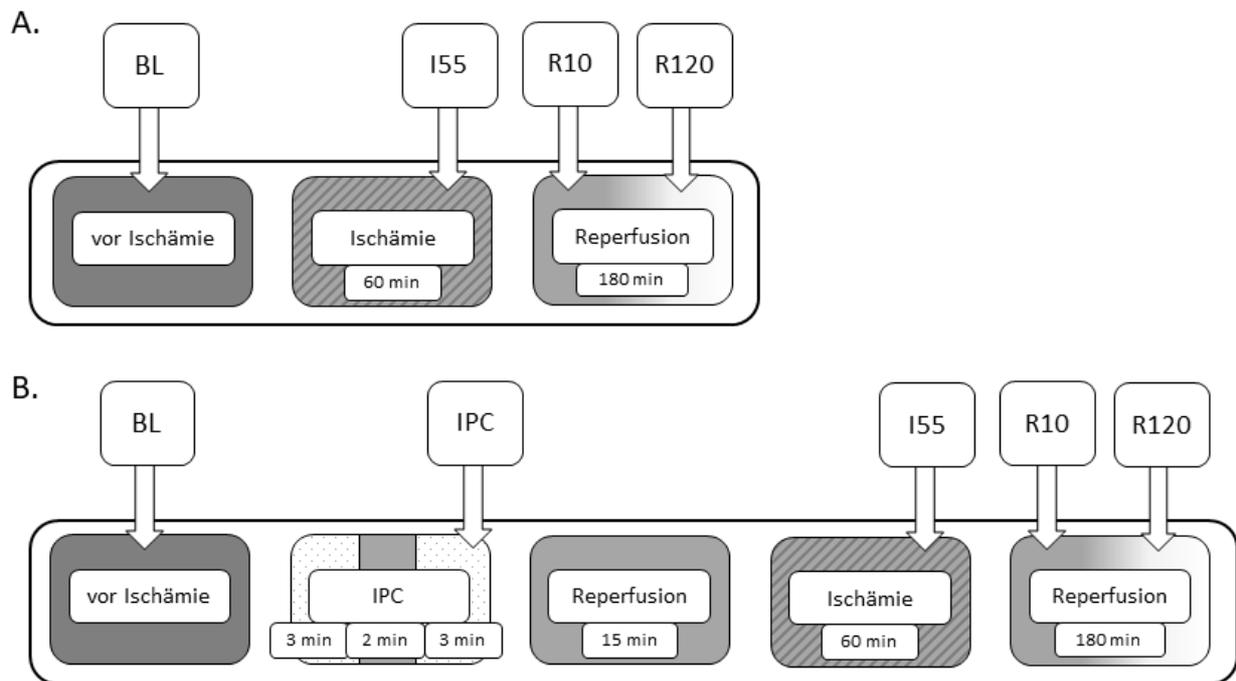


Abb. 9: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe.

Zu sehen sind die unterschiedlichen Phasen des Versuchs, die Pfeile kennzeichnen die Biopsieentnahmen im zeitlichen Verlauf. **(A)** Ischämie/Reperusions-Modell. Vor Ischämie wird eine Kontrollbiopsie entnommen, die dem Zustand eines gesunden Schweins entspricht (*base line*, BL). Durch Verschluss der LAD wird eine Ischämie induziert, die insgesamt 60 min dauert, die Biopsie wurde aber bereits nach 55 min entnommen (I55). Während der anschließenden 180-minütigen Reperfusion durch Eröffnung der Arterie wurden nach 10 (R10) bzw. 120 (R120) min erneut Biopsien entnommen. **(B)** IPC-Modell. Der Ablauf gleicht dem I/R-Modell bis auf eine vorausgehende ischämische Präkonditionierung (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie mit 2 min Reperfusion dazwischen) mit folgender 15-minütiger Reperfusion. Die entsprechende Biopsie wird am Ende des letzten ischämischen Zyklus entnommen (IPC).

Myokardbiopsien

Für jedes Modell (I/R und IPC) wurden insgesamt 5 Schweine ($n = 5$) mit jeweils vier (I/R) bzw. fünf (IPC) Gewebebiopsien entsprechend der verschiedenen Zeitpunkte untersucht (BL = *base line*, vor der Ischämie; IPC = *ischemic preconditioning*, nach der ischämischen Präkonditionierung; I55 = nach der Ischämie von 55 min; R10 bzw. R120 = Reperfusion nach 10 min bzw. 120 min). Die Biopsien wurden zu den oben genannten Zeitpunkten mit einem modifizierten Zahnarztbohrer aus dem *remote* Myokard des linken Ventrikels entnommen und

wogen ca. 2-4 mg. Sofort nach Entnahme wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

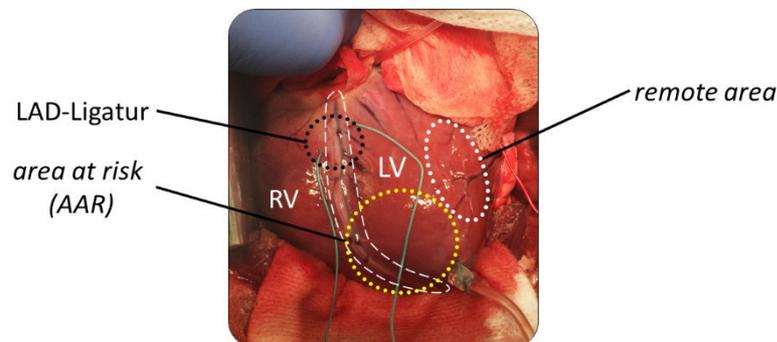


Abb. 10: Foto des freipräparierten Schweineherzens während der Operation.

Zu sehen sind der rechte (RV) sowie der linke Ventrikel (LV). Zentral verläuft der Ramus interventricularis (*left anterior descending* = LAD, weiß gestrichelte Umrandung). Durch die Ligatur der LAD (schwarz-gepunktete Umrandung) kommt es in der *area at risk* (AAR, gelb-gepunktete Umrandung) zum Infarkt. Die in diesem Projekt verwendeten Biopsien wurden aus dem remote Bereich (weiß-gepunktete Umrandung) entnommen. Das Bild wurde im Institut für Pathophysiologie der Universität Essen aufgenommen.

3.2.2 Biochemische Analyse

Proteinsolubilisierung

Um die Proteine aus den Proben des linken Ventrikels zu solubilisieren, wurde zu den einzelnen Gewebeproben jeweils 55 – 75µl Probenpuffer gegeben, dem zuvor eine Spatelspitze DTT hinzugefügt wurde. Mit Hilfe von Skalpellens wurde das Lysat mechanisch zerkleinert und vermischt. Danach wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine folgte die Erhitzung in einem Thermoblock bei 98°C für 3 min.

Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration des Lysats zu ermitteln wurde die Proteinbestimmung nach Bradford angewendet (Bradford, 1976). Hierbei wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der einzelnen Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen erstellt (Verdünnungsverhältnis 1:10). Aus diesen verdünnten Proben wurden jeweils zwei Extinktionslösungen hergestellt, die 800 µl Wasser sowie 2 µl der verdünnten Probe und 200 µl Bradford Reagenz enthielten. Parallel dazu wurde ein Reaktionsgefäß als Leerwert mit 800 µl Wasser und 200 µl Bradford Reagenz befüllt. Anschließend wurden alle Lösungen mittels Vortex-Schüttler durchgemischt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde eine Messung der Extinktion im Photometer bei 595 nm durchgeführt. Mit Kenntnis der Extinktion lässt sich die Konzentration des Lysats und damit eine Angabe zur

gewünschten Proteinmenge in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ machen. Als Referenz diente eine Eichgrade von 0 – 2 mg/ml BSA.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur weiteren Analyse und Charakterisierung, wurden die Proteine anhand ihrer molekularen Masse durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Um dies zu ermöglichen müssen die Proteine denaturiert und mit SDS behandelt werden. Durch die Denaturierung mit Hitze verlieren die Proteine ihre Tertiärstruktur, während SDS an die Aminosäuren bindet und für eine negative Ladung aller Proteine des Lysats sorgt. Es kommt zu einer Linearisierung der Proteine, sodass eine Auftrennung nach Kettenlänge möglich ist. Bei der Gelelektrophorese wird durch eine Stromquelle zwischen Kathode und Anode ein elektrisches Feld erzeugt. Die nun negativ geladenen Proteine wandern entsprechend Richtung Anode. Größere Proteine brauchen länger, um durch das Gel zu diffundieren, wohingegen kleinere Proteine schneller die Anode erreichen. Dies erzeugt die Auftrennung nach Molekülgröße innerhalb des SDS-Gels.

10% SDS-PAGE

Die hier verwendeten Polyacrylamidgele hatten einen Acrylamidanteil von 10%, was die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 5 bis 250 Kilodalton (kDa) ermöglicht. Die Gele wurden nach der üblichen Vorgehensweise hergestellt. Zunächst wurde ein Trenngel angemischt, auf welches nach einer Stunde Polymerisation das Sammelgel gegeben werden konnte. Die Beladungstaschen wurden mithilfe eines Kamms, der sich im Sammelgel befand, gebildet. Nach wiederum 20 min Aushärtung und Entfernung des Kamms waren die Gele bereit um beladen zu werden. Um die entstehenden Proteinbanden einzuordnen wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (3 μl) in jeweils die erste Tasche des Gels pipettiert. Dieser enthält ein bekanntes Proteingemisch, welches speziell angefärbt wurde, welches letztlich ein standardisiertes Muster mit 9 Referenzbanden ergibt (von 10 kDa bis 250 kDa). Hiermit lassen sich die zu untersuchenden Proteine anhand ihres Molekulargewichts identifizieren.

Tabelle 8: Rezept für verwendete SDS-PAGE-Gele (Trenn- und Sammelgel)

Trenngel für zwei Gele	10%-ige Gele
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	3,75 ml
H ₂ O (deionisiert)	7,5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
Temed	7,5 µl
APS	75 µl

Sammelgel für zwei Gele	
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	0,667 ml
H ₂ O (deionisiert)	3,025 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Temed	15 µl
APS	50 µl

Titinglele

Da Titin mit bis zu 3,7 Megadalton (MDa) ein sehr großes Protein ist, kann es mittels einer Standard-SDS-PAGE nicht dargestellt werden, weil dieses Verfahren nur Proteine bis maximal 250 kDa auftrennen kann. Aus diesem Grund wurde hierfür eine andere Gel-Zusammensetzung gewählt, die eine Stammlösung mit einer anderen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration (29:1) enthält, sodass die entstandene Netzstruktur auch größere Proteine hindurch lässt (Warren et al., 2003b). Um die Stabilität dieser Gele zu erhöhen wurde 1,5%-Agarose verwendet. Die Auspolymerisierung des SDS-Gels erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag konnte nach Entfernung des Kamms das Gel beladen werden. Ein Molekulargewichtsmarker ist bei SDS-Gelen für Titin nicht nötig, denn auf Grund der Größe von Titin sind nur die entsprechenden Titinbanden im fertigen Gel sichtbar.

Tabelle 9: Rezept für Titingele

Titingel für zwei Gele	2,1%ige -Gele
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (29:1)	1,4 ml
H ₂ O (deionisiert)	6,67 ml
Trenngelpuffer	5 ml
Temed	11,5 µl
Erwärmen auf 48°C im Wasserbad	
APS	150 µl
Agarose (1,5%)	6,67 ml

Western Blot

Die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurden anschließend zur weiteren Analyse mit Hilfe eines Semi-Dry-Blot-Systems auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) transferiert. Dazu wurden die Gele nach der Gelelektrophorese in einer entsprechenden Blotting-Kassette zwischen Blotting-Papiere, die zuvor in Anodenpuffer bzw. Kathodenpuffer getränkt wurden, platziert. Zwischen den anodenpuffergetränkten Papieren und dem Gel wurde außerdem eine PVDF-Membran gelegt, die zuvor kurz in Ethanol aktiviert wurde, um ihre hydrophoben Eigenschaften zu vermindern. Danach wurde die Kassette verschlossen und in die Blotkammer bei 1,5 Ampère und 20 Volt für jeweils 12 min (10% SDS-PAGE) bzw. 20 min (Titingele) eingelegt.

Nach Beendigung des Blotting-Prozesses wurde die PVDF-Membran für etwa 10 sec in Serva Blue Lösung geschwenkt, um die Proteinbanden anzufärben. Die Entfernung der Hintergrundfärbung erfolgte durch 5-minütiges Waschen in PVDF-Destain auf einem Orbitalschüttler.

Immundetektion

Um die Proteine auf den Blottingmembranen sichtbar zu machen, wurden Antikörper verwendet, die im Chemilumineszenzverfahren dargestellt werden können. Zunächst mussten hierfür jedoch die freien Bindungsstellen auf der Membran mittels einer Blockier-Lösung für eine Stunde blockiert werden. Danach konnte eine mit 2%igem-BSA verdünnte Primärantikörper-Lösung, die gezielt auf die zu untersuchenden Proteine der Membran gerichtet ist, auf die Blots gegeben werden. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 min, um mögliche unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu lösen, wurde der Sekundärantikörper mit einem gekoppeltem Enzym (HRP, horseradish peroxidase) in gleicher Weise dazu gegeben. Dieser richtet sich auf den Fc-Bereich des bereits gebundenen

Primärantikörpers. Es folgten weitere Waschungen mit TBST, um danach die Proteinbanden mittels Chemilumineszenzverfahren sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Membranen mit ECL-Reagenz benetzt. Durch Katalysierung der HRP wird das Luminol des Reagenz oxidiert und es kommt zu einer Lichtreaktion, die durch den Chemilumineszenzimager detektiert werden kann.

Isoformendetektion

Titin liegt in quergestreiftem Herzmuskel in zwei unterschiedlich großen Isoformen, N2A und N2BA, vor. Das Mengenverhältnis dieser beiden Formen gibt Hinweise auf Entwicklungsstadien oder Erkrankungen des Organismus und lässt sich mit der Gelelektrophorese untersuchen. Neben den beiden Titinbanden ist auf den Titingelen in der Regel auch eine spezifische Degradationsbande (T2) sichtbar, die sich unterhalb der beiden Isoformenbanden befindet. Um die Proteinbanden zu untersuchen wurde das SDS-Gel mit Imperial-Stain für eine Stunde angefärbt und der Hintergrund anschließend mit deionisiertem Wasser für 3 – 4 Stunden wieder entfärbt.

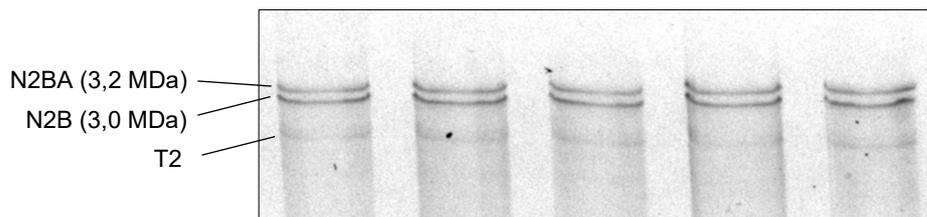


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Titinisoformen im Schwein in Form eines gefärbten Gels. Zu sehen sind die Proteinbanden der beiden Isoformen, N2BA und N2B, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Imperialfarbstoff angefärbt. Die repräsentativen Banden stammen von Gewebeprobe aus 5 verschiedenen Schweinen. Unterhalb der Isoformen befindet sich die T2-Bande, die sogenannte Degradationsbande.

3.2.3 Auswertung

Verwendete Computerprogramme

Für die Auswertung und Anfertigung dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Adobe Photoshop CS6, Image-J und Sigma Plot 13.

Densitometrische Auswertung der Isoformen

Die gefärbten Gele wurden mit einem Bio-Rad Molecular Imager gescannt. Zur weiteren Analyse wurde die Dichte der Proteinbanden mithilfe des Programms Image-J bestimmt. Dies gibt Auskunft über das prozentuale Mengenverhältnis der beiden Isoformen N2BA und N2B.

Densitometrische Auswertung der Western Blots

Die mit Antikörper beschichteten Blots konnten mittels eines Chemilumineszenz-Imagers fotografisch abgespeichert werden. Diese Bilder wurden ebenso wie die Gele der Isoformen im Programm Image-J densitometrisch ausgewertet. Verglichen wurden die Banden, die mit dem Phosphospezifischen-Antikörper behandelt wurden und die Banden, die mit dem Pan-Antikörper behandelt wurden. Hieraus ergibt sich das Verhältnis der phosphorylierten Proteine zu den nicht-phosphorylierten Proteinen.

3.2.4 Statistik

Für die Signifikanz-Testung wurde ein *one way ANOVA (one way analysis of variance)* mit Hilfe des Programms Sigma Plot 13 durchgeführt. Mit einem Wert von $p < 0,05$ galten die Ergebnisse als signifikant. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben, aus n unabhängigen Versuchen.

4 Ergebnisse

4.1 Verwendete Versuchsmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Versuchsmodelle verwendet: (1) die Schweine (n = 5) wurden einer 60-minütigen Ischämie ausgesetzt und Gewebebiopsien wurden vor (BL), während (nach 55 min, I55) und nach Wiedereröffnung des Gefäßes zu zwei Reperfusionzeitpunkten entnommen (R10 nach 10 min und R120 nach 120 min).

(2) die Schweine (n = 5) wurden zusätzlich zu der 60-minütigen Ischämie im Voraus einer ischämischen Präkonditionierung (IPC) ausgesetzt (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie mit 2 min Reperfusion dazwischen) und Gewebebiopsien wurden zusätzlich zu (1) auch nach dem letzten Zyklus der IPC entnommen (IPC). Die Ischämie wurde in beiden Versuchen durch eine Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (engl. *left anterior descending* = LAD) der *Arteria coronaria sinistra* herbeigeführt und die hier verwendeten Gewebebiopsien stammen ausschließlich aus dem nicht unmittelbar von der Ischämie betroffenen *remote* Myokard des linken Ventrikels.

4.2 Ischämie/Reperfusion

4.2.1 Titinisoformenzusammensetzung im Großtiermodell Schwein

Die Isoformenzusammensetzung von Titin kann die Titin-basierte Myozytensteifigkeit auf langfristiger Ebene beeinflussen, abhängig davon welche Isoform vermehrt exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob sich das Verhältnis der Zusammensetzung der beiden kardialen Titinisoformen N2B und N2BA durch die Ischämie/Reperfusion (I/R) verändert, wurden die Gewebebiopsien mittels SDS-PAGE (2,1%) aufgetrennt und die Gele anschließend mit dem Farbstoff Imperial Protein Stain ® angefärbt und densitometrisch analysiert. Im I/R-Modell zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Isoformenzusammensetzung. Die N2BA-Expression betrug durchschnittlich $50,7 \pm 3,3\%$, die N2B-Expression entsprechend $49,3 \pm 3,3$ (Abb. 12).

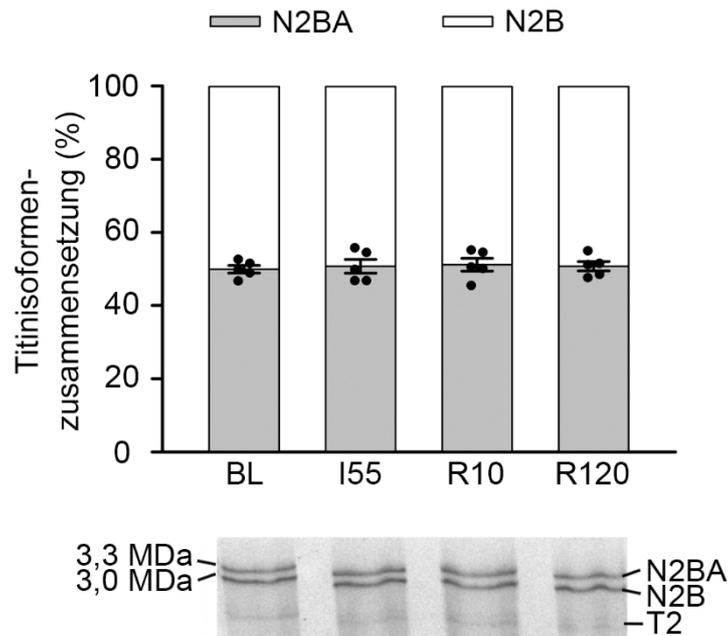


Abb. 12: Titinisoformenzusammensetzung im *remote* Myokard vom Schwein vor, während und nach Ischämie und Reperfusion (60 und 120 min).

Die Zusammensetzung der Titinisoformen wird durch die Summe von N2BA+N2B=100% wiedergegeben. Die Biopsien wurden jeweils vor (BL), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 3-4 Proteineinbindungen untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). Unter der Abbildung ist ein repräsentatives Gel dargestellt, welches zusätzlich zu den beiden intakten Isoformen N2BA und N2B auch die charakteristische Degradationsbande T2 zeigt.

4.2.2 Analyse der akuten Veränderung der PEVK-Region im *remote* Myokard nach I/R

Um die Auswirkung der I/R auf die passive Steifigkeit von Titin zu charakterisieren, wurde die elastische PEVK-Region untersucht. Hierfür wurde das Phosphorylierungslevel an den Serinresten S11878 und S12022 mittels Western Blot-Verfahren und phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Eine vermehrte Phosphorylierung der PEVK-Region wird mit einer erhöhten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten in Verbindung gebracht (Kötter et al., 2013). Am Serinrest S11878 konnte in dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung während der Ischämie sowie zu beiden Reperfusionzeitpunkten nachgewiesen werden. Im Vergleich zur *base line*-Biopsie (BL) erhöhte sich die Phosphorylierung auf $163,1 \pm 31,0$ % nach 55 min Ischämie. Während der Reperfusion war sie nach 10 min mit $142,5 \pm 24,4$ % und nach 120 min mit $149,6 \pm 12,6$ % weiterhin signifikant erhöht (Abb. 13).

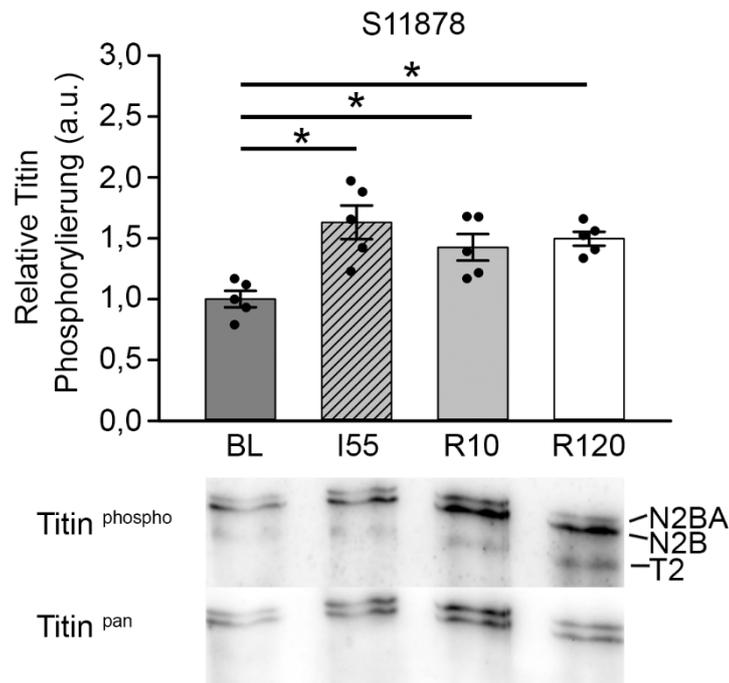


Abb. 13: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfuionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteinkinaseuntersuchen durchgeführt). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots, auf dem auch die charakteristische Degradationsbande T2 zu sehen ist.

Anschließend wurden die einzelnen Titinisoformen, N2BA und N2B, separat hinsichtlich der Phosphorylierung an S11878 ausgewertet. Die Analyse der Phosphorylierung der Isoform N2BA zeigte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung auf $174,6 \pm 83,1$ % nach 55 min Ischämie und nach 10 min Reperfusion auf $153,4 \pm 37,5$ % sowie nach 120 min Reperfusion auf $160,9 \pm 21,7$ % (Abb. 14).

Bei der Isoform N2B ergab sich ebenfalls während I/R im Vergleich zur Kontrollbiopsie eine erhöhte Phosphorylierung. Nach Ischämie stieg die Phosphorylierung auf $156,1 \pm 17,7$ %, nach 10 min Reperfusion auf $135,9 \pm 35,0$ % und nach 120 min Reperfusion auf $170,8 \pm 63,5$ % bei einem p-Wert von 0,057 (Abb. 14).

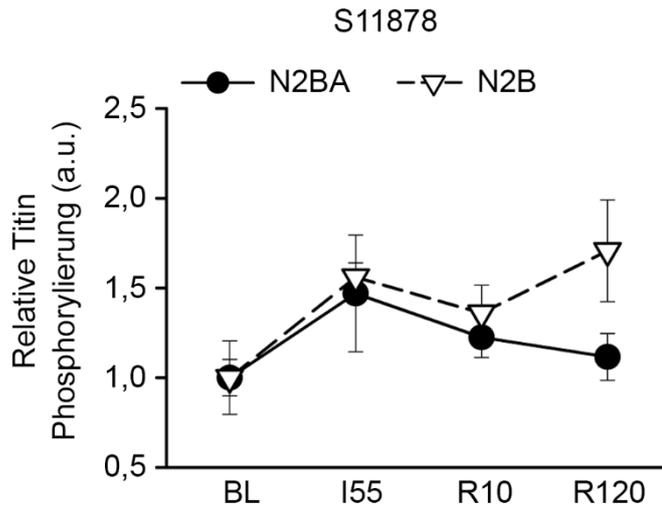


Abb. 14: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteinketten untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units.

Weiterhin wurde der Einfluss von I/R auf die zweite Phosphorylierungsstelle S12022 analysiert. Hier konnte ebenfalls ein tendenzieller Anstieg der Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die relative Phosphorylierung von S12022 war nach Ischämie auf $148,2 \pm 27,9$ % und zu den zwei Reperfusionzeitpunkten auf $128,3 \pm 39,1$ % bzw. auf $102,0 \pm 55,5$ % der *base line* Werte angestiegen (Abb. 15).

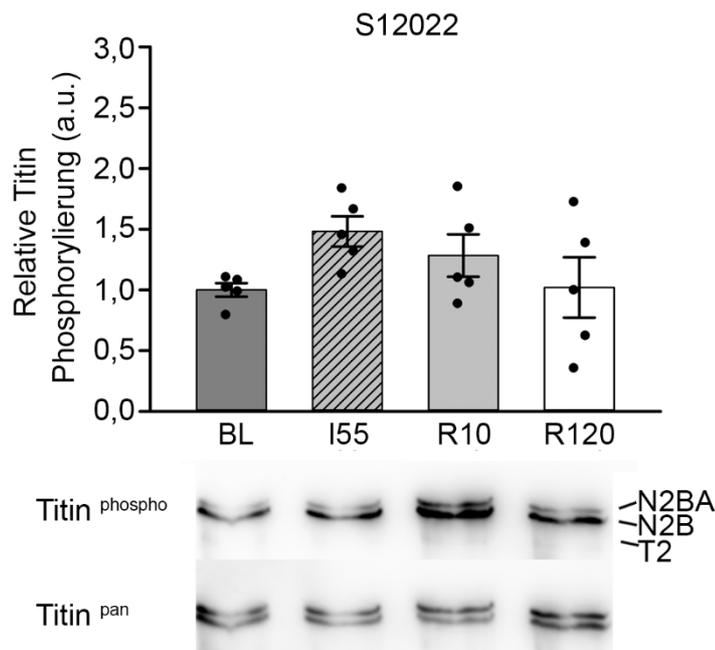


Abb. 15: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor Ischämie (BL = Kontrolle), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfuionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteibandens untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots, auf denen auch die charakteristische Degradationsbande T2 zu sehen ist.

Auch am Serinrest S12022 wurden beide Isoformen von Titin getrennt voneinander untersucht. Hierbei konnte bei der N2BA-Isoform ein Anstieg nachgewiesen werden. Während der Ischämie erhöhte sich die relative Phosphorylierung auf $156,3 \pm 21,6$ % des Ausgangswertes (*base line*). Nach 10 min Reperfusion war der Wert weiterhin mit $122,2 \pm 45,8$ % erhöht und auch nach 120 min war dies mit $119,1 \pm 80,3$ % zutreffend (Abb. 16A).

Bei der steiferen Isoform N2B zeigte sich ein ähnlicher Trend. Zunächst erhöhte sich der Wert unter ischämischen Bedingungen auf $144,0 \pm 47,5$ % und unter Reperfusion blieb der Wert nach 10 min weiterhin erhöht bei $131,5 \pm 37,9$ %. Lediglich nach 120 min sank die relative Phosphorylierung von S12022 auf durchschnittlich $93,1 \pm 44,6$ % des Ausgangswertes (Abb. 16B).

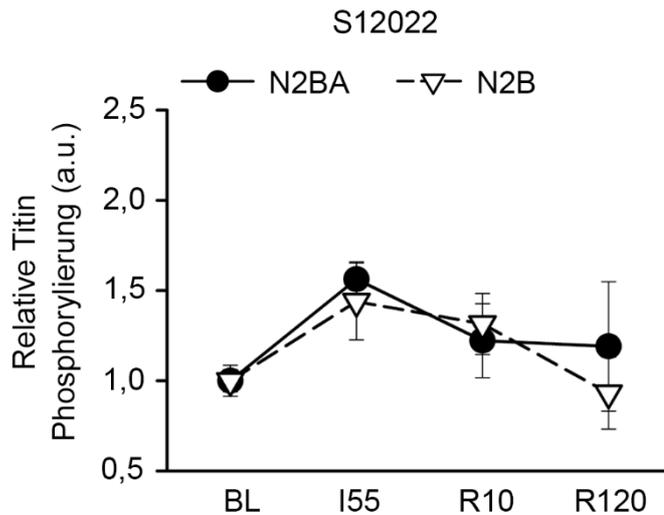


Abb. 16: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min). Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM (n = 5, pro Gewebe wurden 2-4 Proteibandens untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05 in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units.

4.2.3 Analyse der akuten Veränderung der Kinaseaktivitäten im *remote* Myokard

An der veränderten Phosphorylierung von Titin nach Myokardischämie sind mehrere Proteinkinasen beteiligt. Für die PEVK-Domäne spielt die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase Ca eine maßgebliche Rolle. Um die Aktivität der $\text{PKC}\alpha$ zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus ebenfalls mittels Western Blot-Verfahren und phosphospezifischen Antikörpern analysiert. Die untersuchte $\text{PKC}\alpha$ -Phosphorylierung liegt in der Aktivierungsregion des Enzyms, daher kann über den Phosphorylierungsstatus des Serinrestes auf den Aktivierungsstatus der $\text{PKC}\alpha$ rückgeschlossen werden. Hierbei zeigte sich passend zu den oben genannten Ergebnissen der PEVK-Region eine tendenziell erhöhte Kinaseaktivität, dargestellt durch eine vermehrte Phosphorylierung. Nach Ischämie stieg sie auf $126,7 \pm 27,5$ % an und nach 10 min Reperfusion auf $142,6 \pm 38,6$ % sowie nach 120 min Reperfusion auf $147,1 \pm 60,0$ % (Abb. 17A).

Zusätzlich wurde die Aktivität der Kinasen, die für die Phosphorylierung der N2B *unique sequence* verantwortlich sind mitbestimmt. Dazu gehört die *extracellular-signal regulated kinase* mit den Isoformen 1 und 2 (Erk 1/2) und die Proteinkinase A (PKA).

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von Erk 1/2 zeigte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung zu allen Zeitpunkten. Während der 55-minütigen Ischämie stieg diese auf $184,6 \pm$

87,1 %, während der 10 bzw. 120 min Reperfusion auf $161,7 \pm 49,9$ % bzw. $190,0 \pm 123,7$ % der Kontrollwerte (Abb. 17B).

Die Aktivität der PKA wurde indirekt über Phosphorylierung des Zielproteins Troponin I (cTnI) nachgewiesen. Die Untersuchung ergab einen unveränderten Phosphorylierungsstatus des cTnI im Verlauf der I/R. Nach Ischämie stieg die Phosphorylierung auf $112,5 \pm 70,5$ % und zum ersten Reperfusionzeitpunkt $112,6 \pm 36,1$ % und nach 120 min sank sie auf $65,4 \pm 23,2$ % des Kontrollwertes (Abb. 17C).

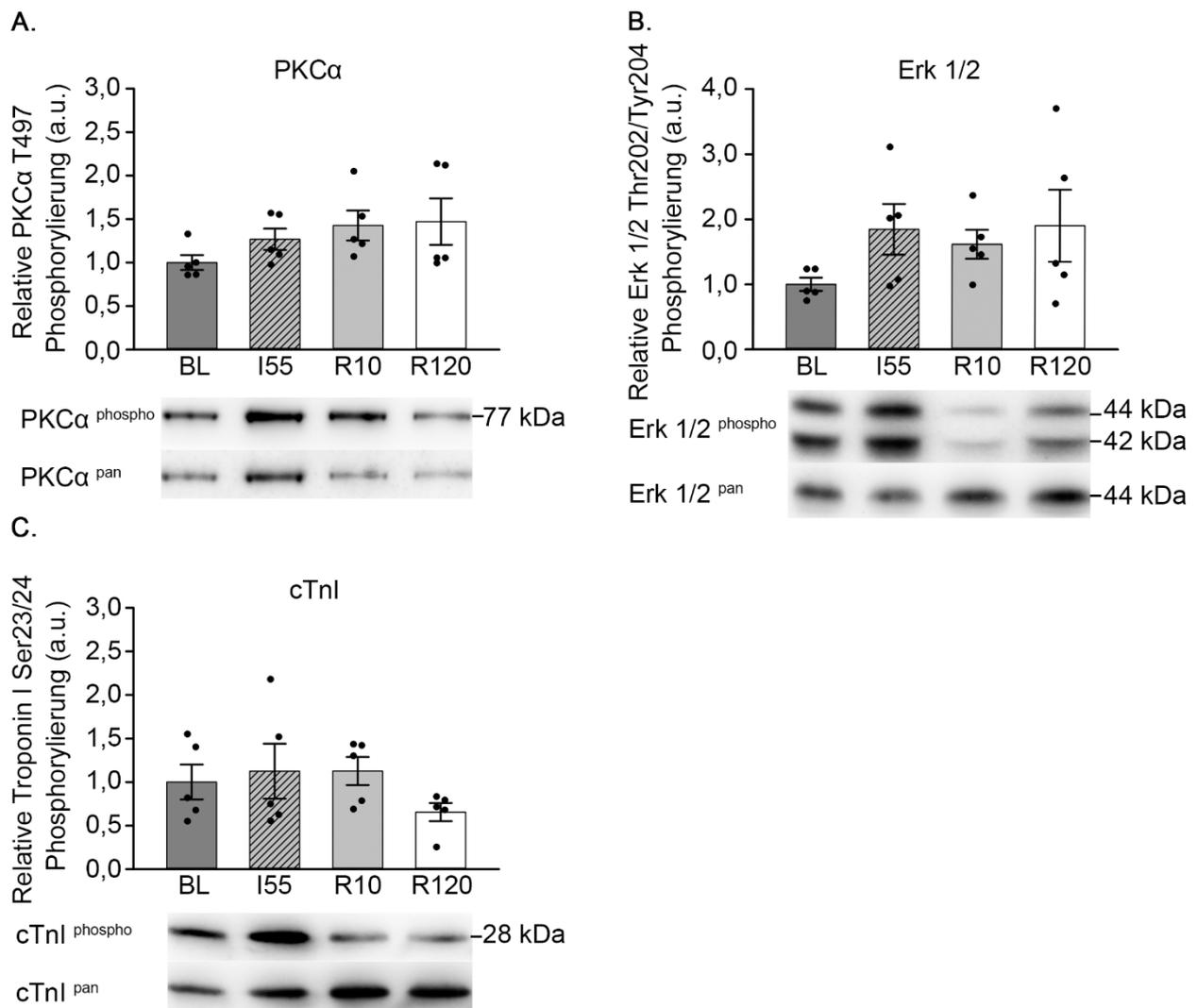


Abb. 17: Ergebnisse der Analyse der Kinaseaktivitäten im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. **(A)** Analyse des Phosphorylierungslevels der PKCα an T497 als Nachweis für die PKCα Kinaseaktivität. **(B)** Analyse der Phosphorylierung von Erk1/2 als Nachweis der Erk1/2 Kinaseaktivität. **(C)** Analyse der Phosphorylierung von kardialen Troponin I an Ser23/24 als indirekter Nachweis der PKA Kinaseaktivität. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unterhalb der Abbildungen befindet sich jeweils ein Bild eines repräsentativen Blots.

4.3 Ischämische Präkonditionierung mit anschließender Ischämie/Reperfusion

4.3.1 Titinisoformenzusammensetzung nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender I/R

Um zu untersuchen, ob sich die Titinisoformenzusammensetzung von N2B und N2BA durch zwei Zyklen einer nicht-letalen Ischämie im Rahmen der IPC vor der eigentlichen I/R verändert, wurden die Gewebebiopsien mittels SDS-PAGE (2,1%) aufgetrennt und die Gele anschließend mit dem Farbstoff Imperial Protein Stain ® angefärbt und analysiert. Im IPC-Modell zeigte die Isoformenzusammensetzung zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Veränderung. Die N2BA-Expression betrug durchschnittlich $45,7 \pm 2,8\%$, die N2B-Expression durchschnittlich $54,4 \pm 2,8\%$ (Abb. 18).

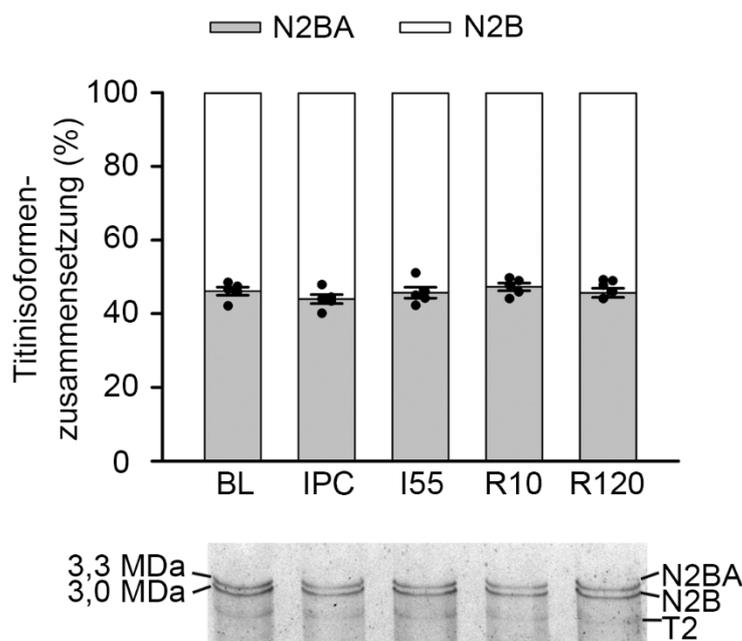


Abb. 18: Titinisoformenzusammensetzung im *remote* Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie und Reperfusion (60 und 120 min).

Die Zusammensetzung der Titinisoformen wird durch die Summe von $N2BA+N2B=100\%$ wiedergegeben. Die Biopsien wurden jeweils vor Ischämie (BL), nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC) nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfuzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 3-4 Proteineinbanden untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). Unter der Abbildung ist ein repräsentatives Gel dargestellt, welches zusätzlich zu den beiden intakten Isoformen N2BA und N2B auch die charakteristische Degradationsbande T2 aufzeigt.

4.3.2 Analyse der akuten Veränderung der PEVK-Region im *remote* Myokard nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion

Um die Auswirkungen der kurzen Zyklen ischämischer Präkonditionierung auf den Phosphorylierungsstatus der PEVK-Domäne zu untersuchen und wie sie sich auf die späteren Zeitpunkte (Ischämie und Reperfusion) auswirkt, wurde zusätzlich eine weitere Biopsie direkt nach der IPC entnommen. Alle Biopsien wurden wie im I/R-Modell mittels Western Blot-Verfahren und phosphospezifischen Antikörpern analysiert und anschließend in Bezug zur *base line*-Biopsie als Kontrolle gesetzt.

In der Analyse von S11878 zeigte sich zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg in der relativen Phosphorylierung, die im zeitlichen Verlauf erheblich zunahm. Bereits nach den Zyklen der IPC stieg das relative Phosphorylierungslevel auf $159,1 \pm 18,4$ % des Ausgangswertes an. Nach Ischämie blieb das Level weiterhin bei $159,1 \pm 18,4$ % erhöht. Anders als im I/R-Modell stieg die relative Phosphorylierung von S11878 im IPC-Modell zu beiden Reperfusionzeitpunkten sogar noch weiter an, nach 10 min auf $187,4 \pm 37,5$ % und nach 120 min auf $198,7 \pm 30,2$ % (Abb. 19).

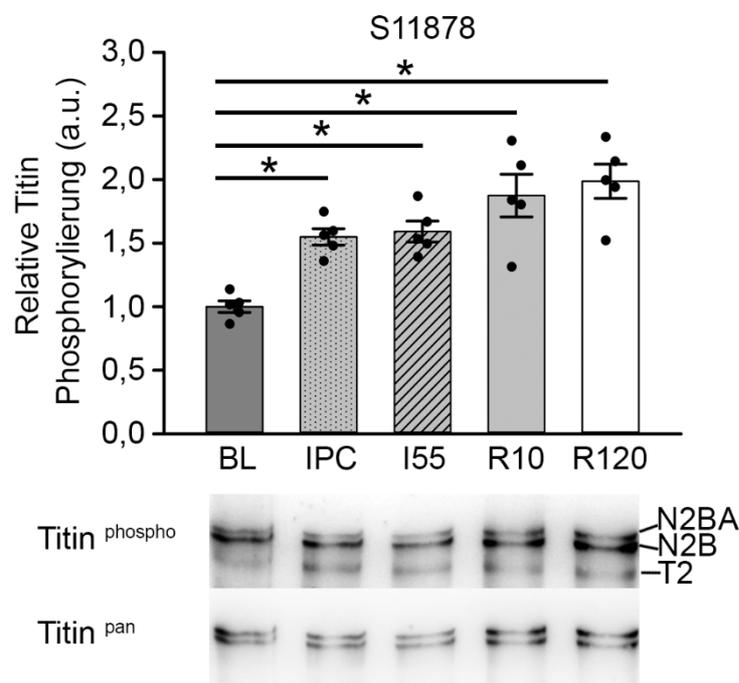


Abb. 19: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor Ischämie (BL = Kontrolle), nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionzeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteinebanden untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots, auf denen auch die charakteristische Degradationsbande T2 zu sehen ist.

Auch im IPC-Modell wurden die beiden Isoformen separat voneinander untersucht. Hieraus ergaben sich ebenfalls signifikante Steigerungen hinsichtlich der Phosphorylierung an S11878. Bei der Isoform N2BA ließ sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche Zunahme in der Phosphorylierung beobachten, nach IPC signifikant auf $154,2 \pm 7,3$ % und nach 55-minütiger Ischämie auf $156,6 \pm 14,4$ % bei einem p-Wert von 0,061. Bei Reperfusion kam es auch hier zu einer deutlichen signifikanten Zunahme auf $206,5 \pm 63,3$ % (nach 10 min) und auf $159,7 \pm 32,3$ % (nach 120 min) (Abb. 20A).

Die Isoform N2B wurde ebenfalls signifikant zu allen Zeitpunkten vermehrt phosphoryliert. Nach IPC und Ischämie konnte ein Anstieg auf $155,3 \pm 22,4$ % und auf $160,9 \pm 23,5$ % beobachtet werden. Ebenfalls während der Reperfusion kam es nach 10 min zu einer zunehmenden Phosphorylierung, die bis auf $174,8 \pm 27,5$ % anstieg und nach 120 min sogar auf $224,6 \pm 56,4$ % (Abb. 20B).

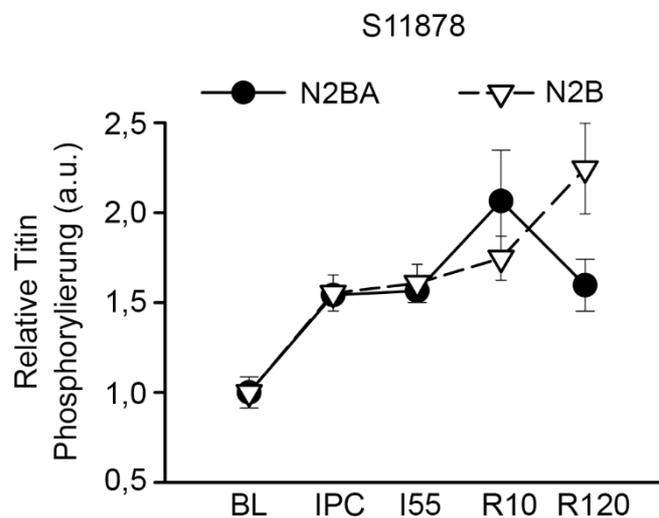


Abb. 20: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisofomen am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle) nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteibandens untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots.

Auch der Phosphorylierungsstatus vom Serinrest S12022 wurde im IPC-Modell charakterisiert. Es konnten hier zu allen Zeitpunkten signifikant erhöhte Phosphorylierungslevel dargestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollbiopsie (BL) erhöhte sich die Phosphorylierung auf $127,7 \pm 9,3$ % direkt nach den IPC-Zyklen und auch nach der eigentlichen Ischämie stieg die Phosphorylierung nachweisbar auf $141,9 \pm 22,3$ % an. Nach 10 min Reperfusion war weiterhin eine erhöhte Phosphorylierung bei $155,7 \pm 14,7$ % zu messen und nach 120 min bei $135,0 \pm$

18,1 % (Abb. 21). Anzumerken ist, dass der Anstieg der Phosphorylierung für den Rest S12022 deutlich geringer ausfiel (Maximalwert 135,0 %) als für S11878 (Maximalwert 224,6 %).

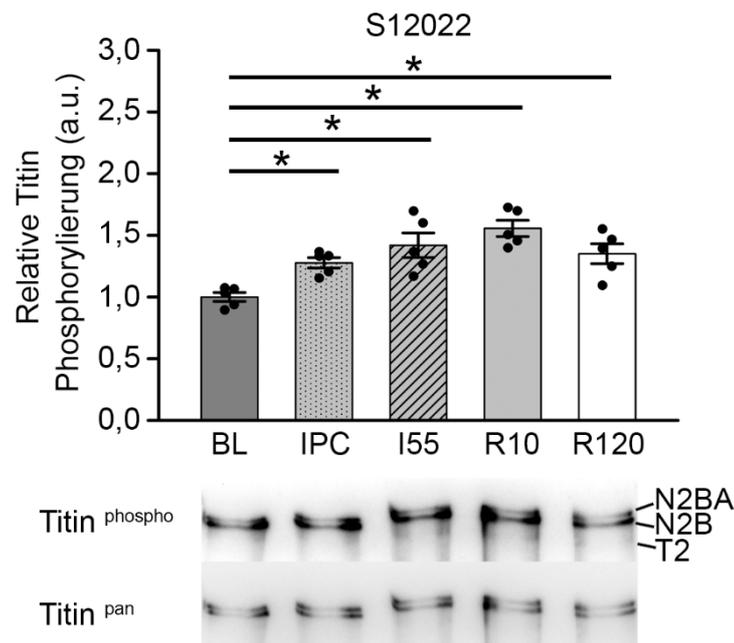


Abb. 21: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor Ischämie (BL = Kontrolle), nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteinebanden untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots, auf denen auch die charakteristische Degradationsbande T2 zu sehen ist.

Die getrennte Analyse der beiden Isoformen am Serinrest S12022 zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung auf. Die flexiblere Isoform N2BA ließ bei den Untersuchungen eine tendenzielle Erhöhung bereits nach IPC auf $125,3 \pm 21,0$ % erkennen und nach 55 min Ischämie auf $142,5 \pm 33,4$ %. Zum ersten Reperfusionszeitpunkt nach 10 min kam es zu einem signifikanten Anstieg auf $163,9 \pm 18,8$ % und nach 120 min ebenfalls zu einer tendenziellen Erhöhung auf $136,6 \pm 44,9$ % (Abb. 22A).

Bei N2B ließen sich ebenfalls erhöhte Phosphorylierungswerte feststellen. Nach IPC betrug die Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (BL) $129,1 \pm 14,0$ % und nach Ischämie konnte ein signifikanter Anstieg auf $141,6 \pm 19,0$ % demonstriert werden. Während der Reperfusion hielt die Phosphorylierung auf einem signifikanten Level bei $150,6 \pm 14,6$ % an und blieb tendenziell nach 120 min erhöht bei $134,1 \pm 34,7$ % (Abb. 22B).

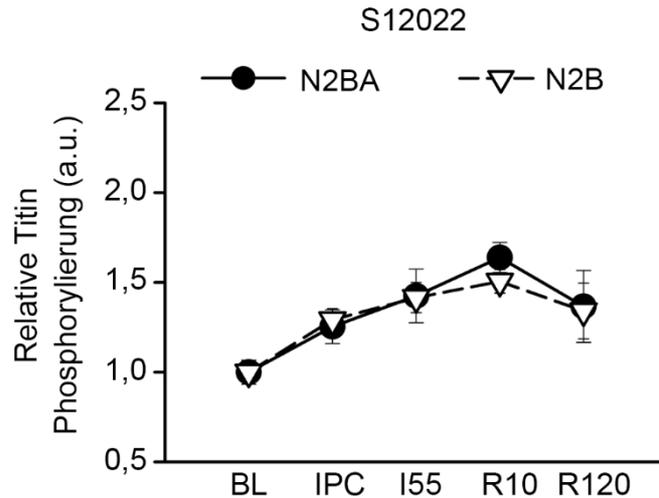


Abb. 22: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest 12022 der PEVK-Domäne im *remote* Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle) nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfusionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. Das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 5$, pro Gewebe wurden 2-4 Proteinstreifen untersucht). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unter der Abbildung befindet sich ein Bild eines repräsentativen Blots.

4.3.3 Analyse der akuten Veränderung der Kinaseaktivitäten im *remote* Myokard

Ebenso wie im I/R-Modell wurde auch im IPC-Modell die Kinaseaktivität der Kinasen, die zur Phosphorylierung der beiden elastischen Titindomänen führen, PEVK und N2B *unique sequence*, untersucht.

Zunächst wurde die PKC α mittels Western Blot-Verfahren und phosphospezifischen Antikörpern im zeitlichen Verlauf charakterisiert. Hierbei zeigte sich im Vergleich zum I/R-Modell eine vermehrt signifikante Phosphorylierung. Schon nach den kurzen Zyklen der IPC stieg die Phosphorylierung auf $169,8 \pm 37,6$ % an und blieb während der eigentlichen Ischämie gleich stark erhöht bei $168,2 \pm 32,6$ %. Unter Reperfusionsbedingungen war die Phosphorylierung weiterhin nach 10 min mit $127,1 \pm 20,5$ % und nach 120 min signifikant mit $163,9 \pm 28,8$ % erhöht (Abb. 23A). Die beiden anderen Proteine, die analysiert wurden und deren vermehrte Phosphorylierung, Erk 1/2 und cTnI, dienen als Hinweis auf die akuten Veränderungen in der Titindomäne N2B *unique sequence*.

Die Kinase Erk 1/2 ist direkt beteiligt an der Phosphorylierung der N2Bus und war auch in dieser Untersuchung nach IPC signifikant auf $190,2 \pm 41,1$ % erhöht, und diese Tendenz blieb auch unter 55-minütiger Ischämie erhalten bei $153,2 \pm 25,2$ %. Unter Reperfusion verminderte sich der Phosphorylierungsstatus auf $117,2 \pm 32,6$ % nach 10 min und war aber auch nach

120 min noch immer signifikant erhöht mit $164,5 \pm 45,5$ % im Vergleich zur *base line*-Biopsie (Abb. 23B).

Eine vermehrte Phosphorylierung des Proteinkomplex cTnI kann indirekt als Nachweis für die Aktivität der PKA gedeutet werden. In dieser Untersuchung zeigte sich, wie schon im I/R-Modell, jedoch kein signifikanter Anstieg und das Phosphorylierungslevel zeigte kaum Unterschiede. Nach IPC lag die Phosphorylierung bei $129,5 \pm 25,9$ % und nach Ischämie $131,9 \pm 34,3$ %. Unter Reperfusion lagen die Werte bei $109,4 \pm 41,2$ % nach 10 min und bei $118,1 \pm 32,3$ % (Abb. 23C).

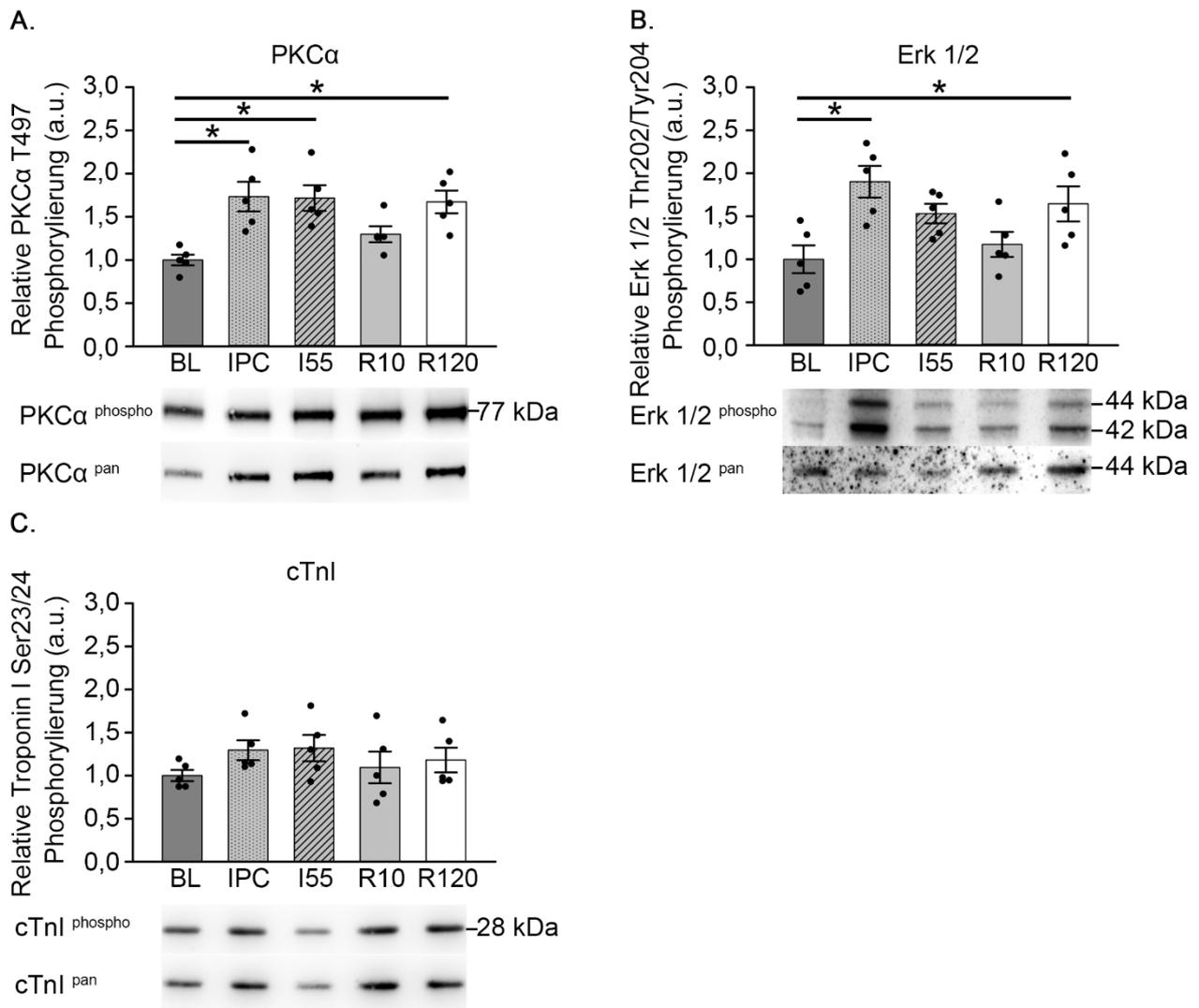


Abb. 23: Ergebnisse der Analyse der Kinaseaktivitäten im *remote* Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).

Die Biopsien wurden jeweils vor (BL = Kontrolle), nach IPC (zwei Zyklen von jeweils 3 min Ischämie und 2 min Reperfusion dazwischen, IPC), nach 55 min Ischämie (I55) und zu zwei Reperfuersionszeitpunkten (R10 nach 10 min, R120 nach 120 min) entnommen. **(A)** Analyse des Phosphorylierungslevels der PKCα an T497 als Nachweis für die PKCα Kinaseaktivität. **(B)** Analyse der Phosphorylierung von Erk1/2 als Nachweis der Erk1/2 Kinaseaktivität. **(C)** Analyse der Phosphorylierung von kardialen Troponin I an Ser23/24 als indirekter Nachweis der cGMP-abhängigen Kinaseaktivität. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in one-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unterhalb der Abbildungen befindet sich jeweils ein Bild eines repräsentativen Blots.

5 Diskussion

5.1 I/R und IPC modifizieren die Titin-basierte Steifigkeit im Großtiermodell

Der Herzinfarkt und seine Folgeerkrankungen stellen in Deutschland die häufigsten Todesursachen dar. Um die Therapie und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern, ist es wichtig die pathophysiologischen Vorgänge im Myokard nach Infarkt besser zu verstehen, um neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

Das Myofilamentprotein Titin spielt eine wichtige Rolle in den Umbauprozessen nach Infarkt, da es maßgeblich die Ausprägung der passiven Steifigkeit im Herzgewebe bestimmt. Bislang wurden die Auswirkungen der Ischämie auf die Titin-basierte passive Steifigkeit vor allem im Kleintiermodell untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Beobachtungen in Nagetieren auch im Großtiermodell Schwein nachzuweisen und somit weitere Erkenntnisse zur Translation auf das menschliche Herz zu gewinnen.

5.2 Die Titinisoformenzusammensetzung wird durch akute ischämische Ereignisse nicht beeinflusst

5.2.1 Das Titinisoformenverhältnis im Großtiermodell Schwein

Titin liegt im kardialen Gewebe in zwei verschiedenen Isoformen vor, der elastischen N2BA- und der steiferen N2B-Isoform. Je nachdem, welche Isoform stärker im Myokard exprimiert wird, desto elastischer bzw. steifer ist das Gewebe. Die Zusammensetzung kann sich im kranken Herz oder auch in der embryologischen Entwicklung verändern. Ebenso weist jede Spezies ein unterschiedliches Verhältnis der beiden Isoformen auf. Im Menschen liegt dieses Verhältnis bei ungefähr 40 % : 60 % (N2BA : N2B) (Kötter et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Isoformenverhältnis für die verwendeten Minischweine bei ungefähr 50 % : 50 % (N2BA : N2B) lag, und somit dem Verhältnis des Menschen, im Gegensatz zu Nagetieren, recht nahe kommt. Dem gegenüber zeigten Cazorla et al. für Schweine jedoch eine Isoformenzusammensetzung von etwa 60 % : 40 % (N2BA : N2B). Dieser Unterschied rührt wahrscheinlich daher, dass in der vorliegenden Arbeit Göttinger Minischweine und in der Arbeit von Cazorla et al. Yorkshire Schweine verwendet wurden. Während die Yorkshire Schweine auch in der konventionellen Fleischproduktion verwendet werden und entsprechend größer sind, sind die ausgewachsenen Göttinger Minischweine mit 100 kg viel kleiner (Rozkot et al., 2015). Frühere Studien haben gezeigt,

dass der Anteil der elastischeren N2BA-Isoform mit der Körpergröße des Tieres korreliert (Cazorla et al., 2000, Krüger et al., 2006a). Das Myokardgewebe ist entsprechend flexibler. Diese Arbeit zeigt zunächst, dass das Titinisoformenverhältnis im Göttinger Minischwein dem des Menschen sehr nah kommt und sich entsprechend als Tiermodell besser als das Kleintiermodell eignet.

5.2.2 I/R und IPC haben keinen Einfluss auf die Titinisoformen und die Titindegradation

Grundsätzlich ist bekannt, dass die Veränderung des Isoformenverhältnisses die Titin-basierte Steifigkeit verändern kann und die kardiale Funktion beeinträchtigt (Granzier und Labeit, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob im Großtiermodell Schwein eine Myokardischämie mit oder ohne vorheriger IPC Veränderungen in der Zusammensetzung der kardialen Titinisoformen induziert.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im I/R-Modell eine transiente Myokardischämie und die anschließende Reperfusion für 120 min keine Veränderungen in dem Verhältnis der Isoformen hervorrufen. Dies bestätigt die Ergebnisse einer früheren Studie, die in Mäuseherzen nach 3 Tagen mit permanenter Ligatur der *left anterior descending artery* (LAD) keine Veränderung bezüglich der Isoformenexpression feststellen konnte (Kötter et al., 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ischämische Ereignisse, die innerhalb von Stunden stattfinden, keinerlei Auswirkungen auf die Expression der Isoformen haben. Somit wird der beobachtete Anstieg der myokardialen Steifigkeit nach einer Myokardischämie nicht durch eine geänderte Isoformenexpression hervorgerufen. Dass hingegen chronische bzw. dauerhafte pathologische Veränderungen im Herzen durchaus zu einer anderen Isoformenzusammensetzung führen, zeigten 2002 Neagoe et al. Bei chronischer ischämischer Herzerkrankung verändert sich langfristig das Verhältnis der Isoformen im Herzmuskel. Die erhöhten mechanischen Anforderungen werden auf genetischer Ebene durch vermehrte Expression der elastischeren N2BA-Isoform kompensiert. In einer anderen Studie von Warren et al. (2003) konnte in Folge von erhöhtem Bluthochdruck gezeigt werden, dass sich hier das Verhältnis eher zu Gunsten der steiferen N2B-Isoform verändert, um dem höheren Druckgefälle im Körperkreislauf entgegen pumpen zu können. Sowohl die chronische ischämische Herzerkrankung als auch die arterielle Hypertonie sind jedoch die Folge von expressionsbedingten Anpassungsreaktionen des Myokards.

Im Rahmen der Untersuchung des Isoformenverhältnisses ist es sinnvoll, auch die Titindegradation nach Ischämie zu analysieren. Der Abbau von Titin kann durch die charakteristische Titindegradationsbande T2 quantifiziert werden. Ali et al. konnten zeigen, dass in isolierten, perfundierten Rattenherzen eine jeweils 30-minütige Ischämie/Reperfusion zu einer erhöhten Titindegradation führt. Die Matrix Metalloprotease 2 (MMP2) scheint hierfür

unter anderem verantwortlich zu sein (Ali et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Degradationsbande untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass es in den hier untersuchten Myokardproben nach I/R zu keinem erhöhten Auftreten der Titindegradation kam (Daten nicht dargestellt).

Für die IPC konnte in vorangegangenen Studien ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden, der die Infarktgröße und den Reperfusionsschaden reduziert (Murry et al., 1986). Die molekularen Mechanismen dieser Protektion sind noch nicht bekannt. Zu untersuchen, ob die IPC eventuell das Isoformenverhältnis des Sarkomerprotein Titins verändert, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Auch hier wurden die Schweine einer transienten Ischämie mit kurzen I/R-Zyklen und Reperfusion unterzogen, die sich insgesamt in einem Zeitraum von 4 Stunden ereigneten (60 min Ischämie, 180 min Reperfusion). Dieser Zeitraum ist analog zum I/R-Modell zu kurz, um eine expressionsbedingte Veränderung im Verhältnis der kardialen Isoformen von Titin zu induzieren. Die Ergebnisse der vorgelegten Studie zeigen, dass die kurzen Zyklen der IPC zumindest im beobachteten Zeitraum keine veränderte Expression der Isoformen verursachen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit also, dass das Verhältnis der kardialen Isoformen nach Myokardinfarkt mit und ohne vorheriger IPC unverändert bleibt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine Infarkt-induzierte Veränderung der passiven Steifigkeit im Myokard durch eine verschobene Titinisoformenzusammensetzung verursacht wird.

5.3 I/R und IPC induzieren posttranslationale Modifikationen des Proteins Titin

5.3.1 Ischämie/Reperfusion erhöht die passive Steifigkeit

Die Ischämie/Reperfusion ist ein geeignetes Infarktmodell, da es dem Myokardinfarkt und anschließender therapeutischer Reperfusion im Menschen am nächsten kommt. Hierdurch können pathophysiologische Veränderungen in der Frühphase nach Myokardinfarkt genauer untersucht werden. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, aus der diese Arbeit stammt, haben gezeigt, dass Titin ein wichtiges Strukturprotein im Prozess des *remodelings* in den ersten Stunden bis Tagen nach Myokardinfarkt und Ischämie/Reperfusion ist und die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im *remote* Myokard moduliert (Kötter et al., 2016 und unpublizierte Daten).

Ein relevanter Mechanismus für den nach Myokardischämie bzw. -infarkt beobachteten Anstieg der passiven Steifigkeit des Myokards ist die posttranslationale Phosphorylierung der elastischen Titindomänen. Der Fokus dieser Arbeit liegt vor allem auf der PEVK-Domäne im

elastischen I-Band des Proteins, welches wie eine molekulare Feder im Sarkomer fungiert. Eine Phosphorylierung der PEVK-Domäne wurde für verschiedene Serinreste bestätigt und wird mit einer veränderten Federfunktion der Domäne und einem Anstieg der passiven Steifigkeit in Verbindung gebracht (Hidalgo et al., 2009, Hamdani et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden beide Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 in der PEVK-Domäne untersucht, die von der Ca²⁺-abhängigen Proteinkinase C α (PKC α) phosphoryliert werden können.

Ischämie/Reperfusion erhöht die PKC α -abhängige Phosphorylierung der PEVK-Region

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Biopsien des Schweineherzens die relative Phosphorylierung von S11878 nach 55-minütiger Ischämie signifikant gegenüber des Ausgangswertes erhöht ist und auch während 120 min Reperfusion erhöht bleibt. Am Serinrest S12022 konnte ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der relativen Phosphorylierung beobachtet werden. Die Veränderungen der relativen Phosphorylierung konnten für beide Titinisoformen N2B und N2BA beobachtet werden. Die Ergebnisse der S11878-Phosphorylierung bestätigen frühere Untersuchungen von Kötter et al., die an Mäusen mit permanenter LAD-Ligatur gezeigt hatten, dass der resultierende Myokardinfarkt zu einer erhöhten relativen PEVK-Phosphorylierung und einem Anstieg der passiven Myozytensteifigkeit führt (Kötter et al., 2016).

Anders als in den an Schweinebiopsien durchgeführten Untersuchungen zeigte sich im Mausmodell aber auch eine signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung des Serinrests S12022. Ursächlich hierfür könnten möglicherweise die unterschiedlichen Spezies und die abweichenden Interventionen sein. Während Kötter et al. eine permanente Ligatur der LAD über einen Zeitraum von 3-5 Tagen verwendeten, wurde im vorliegenden Großtiermodell eine transiente 60-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion (120 min) durchgeführt.

Verantwortlich für die Phosphorylierung der PEVK-Domäne an den Serinresten 11878 und 12022 ist die Ca²⁺-abhängige PKC α (Hidalgo et al., 2009). Ihre relative Aktivitätsveränderungen können über die Phosphorylierung des Threoninrestes T497 mit phosphospezifischen Antikörpern quantifiziert werden. In dieser Arbeit konnte eine tendenzielle Erhöhung des Phosphorylierungslevels und somit wahrscheinlich auch der Aktivität der Kinase beobachtet werden. Dieser Anstieg könnte somit ursächlich für die hier beobachteten Phosphorylierungsunterschiede in der PEVK-Domäne sein. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass nach Myokardischämie die PKC α vermehrt aktiv ist und so die Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit durch PEVK-Phosphorylierung erhöht wird.

Grundsätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass die PKC α nach Myokardinfarkt im Mausmodell nachweislich in ihrer Aktivität im überlebenden bzw. *remote* Myokard gesteigert ist (Wang et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit am Schweinmodell wurde entsprechend ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung im *remote* Myokard nach I/R nachgewiesen. Mit diesen Ergebnissen kann die Aussage gestützt werden, dass eine vermehrte PKC α -abhängige PEVK-Phosphorylierung nach Ischämie auch im Großtiermodell stattfindet. Analog zum Kleintiermodell Maus deuten diese Befunde somit auf eine Erhöhung der passiven Steifigkeit der Schweinekardiomyozyten nach I/R hin.

Eine weitere Kinase, die in der PEVK-Domäne von Titin phosphorylieren kann, ist die Calcium-Calmodulin-abhängige-Proteinkinase II δ (CaMKII δ). Hidalgo et al. vermuteten 2013, dass die CaMKII δ sowohl Reste in der PEVK-Domäne als auch in der N2-Bus phosphoryliert. Jedoch konnte für die PEVK-Domäne nach globaler Ischämie und Reperfusion isolierter perfundierter Herzen keine erhöhten Phosphorylierungslevel beobachtet werden, die Phosphorylierung der N2-Bus wiederum waren erhöht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass durch die CaMKII δ vermehrt die N2-Bus phosphoryliert wird und Titin dadurch insgesamt elastischer wird. Hamdani et al. konnten zeigen, dass neben der N2-Bus am Serinrest S4062 auch die PEVK am Serinrest S12022 vermehrt phosphoryliert wird. Auch sie schlussfolgerten daraus, dass die CaMKII δ für eine reduzierte Titin-basierte passive Steifigkeit verantwortlich ist, obwohl prinzipiell eine Phosphorylierung der PEVK einen Anstieg der Steifigkeit vermittelt (Hidalgo et al., 2013, Hamdani et al., 2013, Perkin et al., 2015). Eine Aktivierung der CaMKII δ erfolgt in der Regel über erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel. Es ist bekannt, dass diese im Infarktareal durch einen verlangsamten Abtransport von Kalzium in den Extrazellularraum bzw. in das sarkoplasmatische Retikulum erhöht sind (Krause et al., 1989). Auch im *remote* Myokard wurde in der akuten Phase nach Ischämie/Reperfusion eine solche gestörte Ca²⁺-Homöostase beobachtet (Kronenbitter et al., 2018). Somit ist auch eine Aktivierung der CaMKII δ in den hier untersuchten Proben eher wahrscheinlich. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Aktivitätsveränderungen der CaMKII δ jedoch nicht untersucht, da die hierfür benötigten Testverfahren zum Zeitpunkt der Durchführung nicht verfügbar waren. Sollte die Aktivität der CaMKII δ erhöht sein, würde sie entsprechend der weiter oben aufgeführten Studien zu einer erniedrigten Steifigkeit führen. Dies widerspricht allerdings den im Rahmen dieser Arbeit erhöhten Daten der Kraftmessung, die einen Anstieg der Steifigkeit beweisen (s.u.). Die Rolle der CaMKII δ ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden und es bedarf weiterer Forschung, um die Auswirkungen auf die Titinphosphorylierung im elastischen I-Band abschätzen zu können.

Keine eindeutige Erhöhung der Kinasenaktivität der N2-Bus-Phosphorylierung

In dieser Arbeit lag der Fokus der Analysen auf der Phosphorylierung der Titin-PEVK-Domäne und der beteiligten Kinase. Zusätzlich wurden die Kinasen, die für die Phosphorylierung der Titin N2-Bus Domäne verantwortlich sind, untersucht. Die *extracellular regulated kinase* (ERK) phosphoryliert die N2-Bus an der Phosphorylierungsstelle S4010 (Raskin et al., 2012). Dieser Serinrest wird *in vitro* auch durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert (Krüger und Linke, 2006b). In der vorliegenden Arbeit wurde über PKA-abhängige Phosphorylierung von cTnI an den Serinresten 23/24 indirekt die Aktivität der PKA bestimmt. Für die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK ließ sich im I/R-Modell in der vorliegenden Arbeit ein tendenzieller Anstieg während der Ischämie und der Reperusionsphase nachweisen. Der Phosphorylierungsstatus von cTnI änderte sich über den gesamten Zeitraum der I/R nicht, sodass eine erhöhte Aktivität der PKA eher unwahrscheinlich ist. Analysen der N2-Bus im Rahmen der vorliegenden Studie, die im Ergebnisteil nicht dargestellt sind, geben allerdings erste Hinweise, dass die Phosphorylierung der N2-Bus trotz erhöhter ERK-Phosphorylierung auch in dem vorliegenden Schweinmodell keine Veränderung zeigt.

Frühere Untersuchungen von Kötter et al. 2016 zeigten, dass nach permanenter LAD-Ligatur im Mausmodell weder beim relativen Phosphorylierungsstatus von ERK noch von cTnI eine signifikante Erhöhung beobachtet werden konnte (Kötter et al., 2016). Auch die relative Phosphorylierung der N2-Bus war in der Studie unverändert. Die Autoren vermuteten, dass es in der N2-Bus nach LAD-Ligatur zu keiner posttranslationalen Veränderung durch ERK- oder PKA-abhängige Phosphorylierung kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen ein tendenzieller Anstieg der ERK beobachtet werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Gent et al., die ebenfalls einen Anstieg in der ERK-Phosphorylierung nach Ischämie im Schwein nachweisen konnten (Gent et al., 2017). Grundsätzlich ist bekannt, dass es nach Ischämie im hypoxischen Gewebe zu einer Aktivitätserhöhung von ERK kommt (Seko et al., 1996). Möglicherweise entscheidet aber das jeweilige Ischämie-Modell über den möglichen Anstieg der Kinase. In dieser Arbeit, ebenso wie bei Gent et al., wurde eine transiente LAD-Ligatur mit anschließender Reperfusion durchgeführt. Hingegen wurde bei Kötter et al. eine permanente LAD-Ligatur für 3 bzw. 10 Tage induziert und es erfolgte somit keine Reperfusion. Denkbar wären auch Unterschiede in den verschiedenen Spezies Maus und Schwein, die eine Erklärung für die abweichende Beobachtungen liefern könnten.

Möglicherweise spielt ERK für die N2-Bus-Phosphorylierung nach I/R im Großtier eine untergeordnete Rolle. Weitere detailliertere Untersuchungen im Schwein müssen zeigen, wie auch die Phosphorylierung der N2-Bus nach Myokardischämie im Großtiermodell induziert wird.

Erhöhte passive Steifigkeit nach I/R im Großtiermodell

Da die Biopsien in der biochemischen Analyse in der PEVK-Domäne an den Stellen S12022 und S11878 eine erhöhte Phosphorylierung aufwiesen, sollte weiterführend die tatsächliche Änderung der passiven Steifigkeit gemessen werden. Die passive Kraftmessung von einzelnen Muskelfasern aus dem *remote* Myokard wurden durch das Labormitglied Herrn Dr. Sebastian Kötter durchgeführt, die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht dargestellt. Sie konnten jedoch zeigen, dass es auch im Großtiermodell zu einem signifikanten Anstieg der passiven Steifigkeit nach Ischämie/Reperfusion im Großtiermodell kommt. Dies bekräftigt die Ergebnisse von Kötter et al., die eine ähnliche Veränderung nach I/R im Mausmodell beschreiben konnten (Kötter et al., 2016). Zusammenfassend beweisen diese Daten, dass es im Klein- sowie Großtiermodell nach Myokardischämie und anschließender Reperfusion im verbliebenen *remote* Myokard zu einer signifikanten Versteifung durch erhöhte PKC α -abhängige PEVK-Phosphorylierung kommt.

5.3.2 Ischämische Konditionierung verstärkt Titinphosphorylierung

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass die relative Titinphosphorylierung nach Myokardinfarkt im Großtiermodell Schwein ähnliche Veränderungen zeigt wie im Kleintiermodell und es auch im Schwein infolge der I/R insgesamt zu einer Versteifung des *remote* Myokards kommt. Das weitere Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der IPC auf die Titin-basierte passive Steifigkeit zu analysieren. Für die IPC konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Anwendung von kurzen Zyklen von Ischämie und Reperfusion die Infarktgröße und den Reperfusionsschaden reduzieren (Murry et al., 1986). Es galt nun zu untersuchen, ob die IPC einen Einfluss auf Titin hat und so möglicherweise einen kardioprotektiven Effekt vermittelt. Außerdem bot das Modell der IPC die Möglichkeit bereits nach insgesamt 6 min (2x 3 min) Ischämie die Titinphosphorylierung zu analysieren. Hierfür wurden Biopsien von Schweinen untersucht, an denen vor der eigentlichen Ischämie Zyklen der IPC durchgeführt wurde. Dabei wurden in derselben Weise wie auch im I/R-Modell mittels *Western Blot*-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern die Phosphorylierung analysiert. Es wurde der Phosphorylierungsstatus der PEVK-Domäne, repräsentiert durch die beiden Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022, sowie die Aktivität der verantwortlichen PKC α bestimmt. Darüber hinaus wurde ebenso die Aktivität der Kinasen gemessen, die für die Phosphorylierung der N2-Bus zuständig sind (ERK und PKA).

Verstärkte PEVK-Phosphorylierung durch vorherige IPC

Auch im IPC-Modell ließ sich ein deutlicher, signifikanter Anstieg der relativen Titinphosphorylierung an beiden Serinresten der PEVK-Region beobachten. Bei S11878 war bereits nach 2 x 3 min Ischämie ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung zu sehen.

Dieser Effekt verstärkte sich nach Reperfusion noch zusätzlich im Vergleich zum Ausgangswert. An der zweiten Phosphorylierungsstelle S12022 war auch im IPC-Modell ein signifikanter Anstieg in der Phosphorylierung zu sehen. Auch die Aktivität der PKC α war zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht und blieb auf diesem erhöhten Level während der Reperfusion.

Es lässt sich also zunächst festhalten, dass die Ergebnisse, wie bereits im I/R-Modell, Parallelen zu den erhobenen Daten von Kötter et al. (2016) aufweisen. Die IPC scheint aber zusätzlich insgesamt die PEVK-Phosphorylierung nach Myokardischämie zu verstärken und demnach auch die passive Steifigkeit noch zusätzlich zu erhöhen.

Viele Studien konnten bereits zeigen, dass die IPC eine veränderte Phosphorylierung verschiedenster Sarkomerproteine induziert. Beispielsweise wird die Phosphorylierung des *cardiac myosin binding protein c* (cMyBPc) durch IPC erniedrigt, während es bei Proteinen der Z-Scheibe zu einer verstärkten Phosphorylierung kommt (Stoian et al., 2019). Das cMyBPc ist mit Myosin assoziiert und reguliert physiologisch die Kontraktion. Eine erhöhte Phosphorylierung des Proteins nach Ischämie/Reperfusion führt insgesamt zu einer schlechteren kontraktilen Funktion. Im IPC-Modell wird diese Phosphorylierung verringert, die Sarkomerkontraktion damit verbessert (Yuan et al., 2006). Die Proteine in der Z-Scheibe sind unter anderem für das *mechanosensing* verantwortlich. Auch hier konnte durch die ischämische Konditionierung eine erhöhte Phosphorylierung verschiedener Proteine in der Z-Scheibe beobachtet werden, die möglicherweise die mechanische Funktion verbessert (Abdul-Ghani et al., 2014). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch die PKC α -vermittelte Titin-Phosphorylierung durch die IPC verstärkt wird. Bislang existieren keine Untersuchungen zur Titinmodifikation im Zusammenhang mit ischämischer Konditionierung. Die vorliegenden Ergebnisse könnten also erste Hinweise auf eine mögliche Verbindung zwischen einem kardioprotektiven Effekt der ischämischen Konditionierung und der Titin-basierten passiven Steifigkeit und im weiteren Sinne auch der Sarkomerfunktion geben.

Nun gilt es zu überlegen, ob eine erhöhte Titin-basierte passive Steifigkeit womöglich zu einer Verbesserung oder einer Verschlechterung der kardialen Funktion des geschädigten Myokards führt. Kötter et al. stellten die Hypothese auf, dass der Verlust des ischämischen Myokards zu einem Stabilitätsverlust des Ventrikels führt und dass die Zunahme der passiven Steifigkeit von Titin diesen Stabilitätsverlust teilweise kompensiert (Kötter et al., 2016). Die erhöhte Kardiomyozytensteifigkeit im *remote* Myokard könnte dazu beitragen, dass die kardiale Pumpfunktion trotz Gewebeverlust aufrechterhalten und gegebenenfalls sogar verbessert werden kann. In der aktuellen Literatur wird derzeit ebenso über eine Relevanz Titins in der aktiven Kraftentwicklung diskutiert. Demnach spielt Titin beispielsweise durch Bereitstellung einer optimalen Überlappung von Aktin und Myosin eine Rolle beim Frank-

Starling-Mechanismus (Linke, 2018). Möglicherweise werden sowohl passive als auch aktive Mechanismen durch vorgeschaltete Zyklen der IPC vor der eigentlichen Ischämie noch weiter verstärkt und vermitteln auf dieser Ebene weitere stabilisierende, kardioprotektive Effekte. Durch die IPC können also schnelle posttranslationale Veränderungen, durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, induziert werden. Diese Modifikationen könnten ihren kardioprotektiven Effekt durch eine verbesserte kontraktile Funktion vermitteln. Diese Arbeit konnte zeigen, dass Titin ebenfalls ein Angriffspunkt für die IPC darstellt und so möglicherweise durch Stabilisierung des Myokards einen Beitrag zu einem kardioprotektiven Effekt leistet, der die kontraktile Funktion des Herzens verbessert.

Welche molekularen Mechanismen die erhöhte Phosphorylierung von Titin im Rahmen der IPC vermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht. Möglich wäre aber eine Überschneidung mehrerer bekannter Signalwege. Zum einen kommen die bislang charakterisierten Signalwege der IPC (RISK und SAFE) und zum anderen die PKC α -vermittelte Phosphorylierung der PEVK-Domäne in Frage. Zu den Signalwegen der IPC zählen der *reperfusion injury salvage kinase*-Signalweg (RISK) und *surviving activating factor enhancement*-Signalweg (SAFE) (Hausenloy et al., 2005, Lecour, 2009a). Der SAFE-Signalweg ist bislang wenig erforscht und es gibt aktuell kaum eine Möglichkeit der Überschneidung mit dem Signalweg der PKC α -abhängigen Titinphosphorylierung. Der RISK-Signalweg dagegen wird zu Teilen über eine Aktivitätssteigerung einer anderen Isoform der PKC vermittelt, der PKC ϵ . Ob auch die PKC ϵ die mechanischen Eigenschaften von Titin modulieren kann, ist bislang noch nicht bekannt. Mit der PKC α und der CaMKII δ sind aktuell nur zwei Kinasen untersucht, die nachweislich die PEVK-Region von Titin phosphorylieren können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass auch weitere Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sein könnten, wie z.B. die PKC ϵ . Dies würde bedeuten, dass eine Aktivitätssteigerung des RISK-Signalwegs durch die IPC zu einer erhöhten Aktivität der PKC ϵ führt, die wiederum Titins PEVK-Domäne phosphorylieren könnte. Es gilt entsprechend in zukünftigen Untersuchungen unter anderem weitere Kinasen zu identifizieren, die in der Lage sind über die Phosphorylierung von Titin die passive Steifigkeit zu beeinflussen. Möglicherweise finden sich dann Überschneidungen in den Signalwegen der IPC und der Titinphosphorylierung.

Keine eindeutigen Veränderungen der Kinasenaktivität für die N2-Bus

Im IPC-Modell fällt eine signifikant gesteigerte Aktivierung der ERK1/2 Kinase auf, die zur Phosphorylierung der Titin N2-Bus Region beitragen könnte. Phosphoryliertes cTnI als Marker für die Aktivität der cAMP-abhängigen PKA war im I/R- und IPC-Modell unverändert.

Wie bereits im I/R-Modell lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse zu cTnI denen von Kötter et al. (2016) entsprechen und die Aussage der vorliegenden Arbeit unterstützen. Demnach ist

die PKA weder nach I/R noch nach IPC in ihrer Aktivität gesteigert und es kommt somit zu keiner vermehrten Phosphorylierung der N2-Bus. Es scheint somit bestätigt, dass die Titin-basierte passive Steifigkeit nach Myokardischämie größtenteils durch die PEVK-Phosphorylierung beeinflusst wird.

Betrachtet man jedoch die ERK-Phosphorylierung gibt es unterschiedliche Studienlagen. Kötter et al. konnten in ihrem Mausmodell mit permanenter LAD-Ligatur keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität von ERK1/2 im *remote* beobachten (Kötter et al., 2016). Eine vorangegangene Studie hat Infarktgewebe von Schweinen im selben I/R-Modell, aber auch im IPC-Modell untersucht (Gent et al., 2017). Die Autoren sahen in beiden Modellen einen signifikanten Anstieg in der ERK-Phosphorylierung verglichen zum Ausgangswert, wenn auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Modellen untereinander zu sehen war. In der vorliegenden Arbeit war der Anstieg der ERK-Phosphorylierung im I/R-Modell zunächst tendenziell, im IPC-Modell dann aber statistisch signifikant zu sehen. Für die unterschiedlichen Aussagen gibt es mehrere Gründe. Zunächst wurde im Vergleich zu Kötter et al. in der vorliegenden Arbeit keine permanente Ligatur, sondern ein Modell mit transienter Ischämie und anschließender Reperfusion gewählt. Ebenso wurde die ERK-Phosphorylierung in jeweils unterschiedlichen Spezies untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Signalwege der IPC im Groß- und Kleintiermodell unterscheiden. Während der RISK-*pathway* vor allem bei Nagetieren aktiviert wird, wird im Schwein vornehmlich der SAFE-*pathway* aktiviert (Skyschally et al., 2009, Lecour, 2009a) (s. 1.3.1). Bei Gent et al. konnte den Schweinemodellen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, ein signifikanter Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit war jedoch nur im IPC-Modell ein signifikanter Anstieg zu sehen. Weiterhin wurden in den Untersuchungen von Gent et al. Biopsien aus dem Infarktbereich analysiert, während in der vorliegenden Arbeit und auch in der Studie von Kötter et al. *remote* Myokard untersucht wurde. Entsprechend kann es hier zu Aktivitätsunterschieden der untersuchten Kinase kommen.

Weitergehende, nicht dargestellte *Western Blot*-Analysen, die von der Mitarbeiterin Sabine Bongardt durchgeführt wurden, zeigen jedoch keine vermehrte N2-Bus Phosphorylierung in dem verwendeten Großtiermodell. Möglicherweise spielt ERK in Bezug auf die N2-Bus-Phosphorylierung, wie schon im I/R-Modell eine untergeordnete Rolle. Somit ist zunächst von keiner Beeinflussung der passiven Steifigkeit durch die N2-Bus-Phosphorylierung auszugehen.

Anstieg der passiven Steifigkeit bereits nach wenigen Minuten Ischämie

Die einzelnen Muskelfasern der Schweinebiopsien im IPC-Modell aus dem *remote* Myokard wurden durch den Mitarbeiter Herrn Dr. Sebastian Kötter mittels passiver Kraftmessung untersucht. Die Daten, die in dieser Arbeit nicht dargestellt sind, zeigen ebenso wie schon

nach I/R, dass die passive Steifigkeit im Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokard tatsächlich ansteigt. Dieser Anstieg der Steifigkeit ist nach IPC noch stärker als nach I/R. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Aussage der biochemischen Analyse der PEVK-Domäne, die eine verstärkte Phosphorylierung im IPC-Modell zeigte. Die signifikante Versteifung kann schon nach den kurzen Zyklen Ischämie/Reperfusion im Rahmen der IPC beobachtet werden, was bedeutet, dass die Kardiomyozyten im *remote* Myokard bereits nach nur 6 min Ischämie signifikant steifer werden. Es wird vermutet, dass der Anstieg der Kardiomyozytensteifigkeit nach I/R die myokardiale Stabilität und Integrität fördert und dadurch die funktionelle Anpassung des überlebenden Myokards unterstützt. Ungeklärt ist noch, ob diese Veränderungen gleichzeitig auch eine Abnahme der diastolischen Funktion vermitteln. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auch andere Formen der ischämischen Konditionierung einen ähnlichen Einfluss auf die Veränderung der passiven Steifigkeit in den Kardiomyozyten des *remote* Myokards ausüben.

Translation in den klinischen Alltag

Grundsätzlich konnte diese Arbeit zeigen, dass in Folge der IPC die Titin-basierte passive Steifigkeit von Kardiomyozyten im *remote* Myokard durch eine erhöhte PEVK-Phosphorylierung ansteigt. Dies resultiert in der Frühphase nach Infarkt in einer erhöhten passiven Steifigkeit des überlebenden Myokards. Dass dies entsprechend der Hypothese von Kötter et al. (2016) positive Effekte auf die kardiale Pumpfunktion bis zur eigentlichen Ausbildung der Narbe haben kann, wurde bereits in 5.3.1 ausführlicher diskutiert.

Was bedeutet dies nun aber für die Übertragbarkeit in den klinischen Alltag und somit für den Patienten? Grundsätzlich ist die Umsetzbarkeit der IPC im Umgang mit Patienten eher begrenzt. Für den Einsatz vor einem akuten Myokardinfarkt ist die Methode gänzlich ungeeignet, da eine Vorhersage eines ischämischen Ereignisses kaum möglich ist. Auch ein präventiver operativer Eingriff am Herzen ist ethisch kaum vertretbar. Die Erforschung der Signalwege der IPC im Tiermodell ist dennoch im Rahmen der Grundlagenforschung essenziell, um neue Angriffspunkte für eine mögliche Pharmakotherapie zu identifizieren. Dadurch können die kardioprotektiven Effekte pharmakologisch induziert werden und im Sinne der ischämischen Postkonditionierung zu Beginn der Reperfusion eingeleitet werden (Hausenloy et al., 2016). Eventuell könnte so auch pharmakologisch die Titin-basierte passive Steifigkeit gesteigert werden, um die kardiale Pumpfunktion nach akutem Myokardinfarkt zu verbessern.

Grundsätzlich erscheinen also alternative Formen der ischämischen Konditionierung für Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt sinnvoller (s. 1.3.2). Auch die ischämische Fernkonditionierung bietet gute Möglichkeiten, um das Herz vor Myokardinfarkt zu schützen und lässt sich deutlich einfacher anwenden. Noch während des Infarktgeschehens können

kurze I/R-Zyklen an einer Extremität, wie z.B. eine angelegte Blutdruckmanschette am Arm, die intermittierend aufgepumpt wird, das *outcome* des Patienten verbessern. Auch hier gibt es bereits erste Ergebnisse die einen kardioprotektiven Effekt nachweisen konnten (s.1.3.2). Zukünftige Untersuchungen der Titineigenschaften in den verschiedenen Modellen der ischämischen Konditionierung müssen zeigen, inwieweit auch hier die Titin-basierte passive Steifigkeit verändert wird und welchen Effekt dies auf die Herzfunktion nach einem akuten Myokardinfarkt haben kann.

5.4 Limitationen

Um die vorliegenden Ergebnisse und deren Aussagekraft umfassend einschätzen zu können, soll in diesem Abschnitt näher auf die Einschränkungen der Arbeit eingegangen werden. Zunächst wurden in dieser Arbeit lediglich 5 Versuchstiere für jeden Ansatz untersucht. Eine höhere Anzahl würde möglicherweise noch aussagekräftigere Ergebnisse und Mittelwerte liefern. Bei Tierversuchen solcher Größenordnung muss aber stets das Kosten-Nutzen-Verhältnis berücksichtigt werden. Angesichts der relativ niedrigen Standardfehler der vorliegenden Ergebnisse, lassen sich die Daten jedoch bereits mit einer vergleichsweise niedrigen n-Zahl gut interpretieren.

Als weiterer limitierender Faktor ist die geringe Größe der untersuchten Biopsien zu nennen (2-4 μg). Entsprechend schwierig und aufwendig war die korrekte Verarbeitung und Analyse der Proben. Zudem konnte auf Grund der Größe jede Biopsie nur zweimal untersucht werden. Eine bessere Aussagekraft durch bessere Mittelwerte hätten drei Durchgänge bringen können. Größere Biopsien waren aber auf Grund der Biopsieentnahme am schlagenden Herzen nicht möglich.

Grundsätzlich ist ein direkter, quantifizierender Vergleich der I/R- und IPC-Ergebnisse nicht möglich, da die Biopsien nicht auf einem *Blot* aufgetragen wurden. Demnach kann man nur die Aussagen der beiden Modelle miteinander vergleichen. Für zukünftige Vergleiche zwischen Ischämie und Formen der ischämischen Konditionierung sollten die Proben entsprechend auf einem *Blot* aufgetragen werden.

Zusätzlich wurde die Titinphosphorylierung nur in einem Zeitraum von etwa 4 Stunden untersucht (60 min Ischämie und 180 min Reperfusion). Wichtige Hinweise für die Langzeitentwicklung der passiven Steifigkeit würden Versuche liefern, die auch die ersten Tage bzw. Wochen nach Infarkt abdecken. Die Umsetzung ist auf Grund von Kosten, organisatorischen Herausforderungen und tierschutzrechtlichen Aspekten im Großtiermodell jedoch kaum durchführbar.

Schließlich schränken auch die verwendeten Antikörper die Auswertung teilweise ein. Grundsätzlich ist die Analyse des knapp 4 MDa großen Protein Titin im *Western Blot*-Verfahren

herausfordernd. Die verwendeten phosphospezifischen Titinantikörper, sind in der Handhabung und Auswertung schwierig.

5.5 Schlussfolgerung

Der Herzinfarkt stellt in Deutschland eine der häufigsten Todesursachen dar. Besonders die Folgeerkrankungen, wie beispielsweise die Herzinsuffizienz, schränken die Lebenserwartung und -qualität der betroffenen Patienten massiv ein. Umso wichtiger ist es pathophysiologische Vorgänge zu verstehen und therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Das große Sarkomerprotein Titin beeinflusst physiologisch und pathophysiologisch maßgeblich die passive Steifigkeit des Herzens. Dazu stehen vorrangig zwei Mechanismen zur Verfügung: die langfristige Veränderung des Isoformenverhältnisses und die kurzfristige Veränderung durch posttranslationale Phosphorylierung.

In vergangenen Studien im Kleintiermodell konnte gezeigt werden, dass sich die Titin-basierte passive Steifigkeit in der Frühphase nach Ischämie/Reperfusion im *remote* Myokard signifikant erhöht. Möglicherweise stellt dies einen Schutzmechanismus dar, um den ischämiebedingten Verlust von Myokardgewebe zu kompensieren. Durch die Versteifung wird das Myokard stabilisiert und das Herz in der Pumpfunktion unterstützt bis sich eine endgültig fibrotische Infarkt Narbe ausgebildet hat. Diese Versteifung wird zu einem großen Teil durch die PKC α -vermittelte Phosphorylierung der PEVK-Domäne von Titin erreicht. Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Übertragung dieser Ergebnisse auf ein Großtiermodell, um eine bessere Translation der Erkenntnisse auf das menschliche Herz zu ermöglichen. Es zeigte sich, dass auch im Großtiermodell Schwein ein ähnlicher Anstieg in der PEVK-Phosphorylierung durch die PKC α zu beobachten ist. Daraus lässt sich ableiten, dass es auch im Großtiermodell nach Ischämie/Reperfusion zu einer erheblichen Versteifung des gesunden Myokardgewebes kommt.

Im weiteren Verlauf wurde zusätzlich zur Ischämie/Reperfusion die kardioprotektive Methode der ischämischen Präkonditionierung (IPC) im Großtiermodell analysiert. Durch kurze ischämische Zyklen, die der eigentlichen Ischämie voraus gehen, können grundsätzlich positive Effekte vermittelt werden. Beispielsweise reduziert sie nachweislich die Infarktgröße und dämmt den Reperfusionsschaden ein. Weitere Auswirkungen und die verantwortlichen Signalwege sind bislang nicht ausreichend charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IPC die PKC α -vermittelte PEVK-Phosphorylierung im Vergleich zum I/R-Modell noch verstärkt. Somit kann angenommen werden, dass die IPC die protektive Versteifung des Myokards in der Frühphase nach Myokardinfarkt unterstützt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welchen Einfluss die IPC und andere Formen der

ischämischen Konditionierung auf die Titin-basierte passive Steifigkeit und auch die kontraktile Sarkomerfunktion haben können.

Neben der Bestätigung der Titinveränderungen auch im Großtiermodell und dem Nachweis einer verstärkten Titinphosphorylierung durch die IPC sind zwei weitere Fakten dieser Arbeit besonders hervorzuheben. Zum einen konnte erstmals die Veränderung der Titinphosphorylierung in einem Individuum zu mehreren Zeitpunkten (vor, während und nach Ischämie) zusammenhängend beobachtet werden. Zum anderen ist die dynamische posttranslationale Phosphorylierung von Titin in diesem Modell bereits nach 6 min nachweisbar, was in dieser Art vorher noch nicht gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass eine Myokardischämie auch im Großtiermodell zu einer erhöhten Titin-basierten passiven Steifigkeit führt. Darüber hinaus scheint die IPC diesen Effekt zusätzlich zu verstärken. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welchen Effekt andere Formen der ischämischen Konditionierung auf die Titineigenschaften haben. Zudem gilt es den funktionellen Nutzen der myokardialen Versteifung durch Titin weiter zu erforschen und mögliche therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren, um die Therapie des Myokardinfarkts und seiner Folgeerkrankungen zu verbessern.

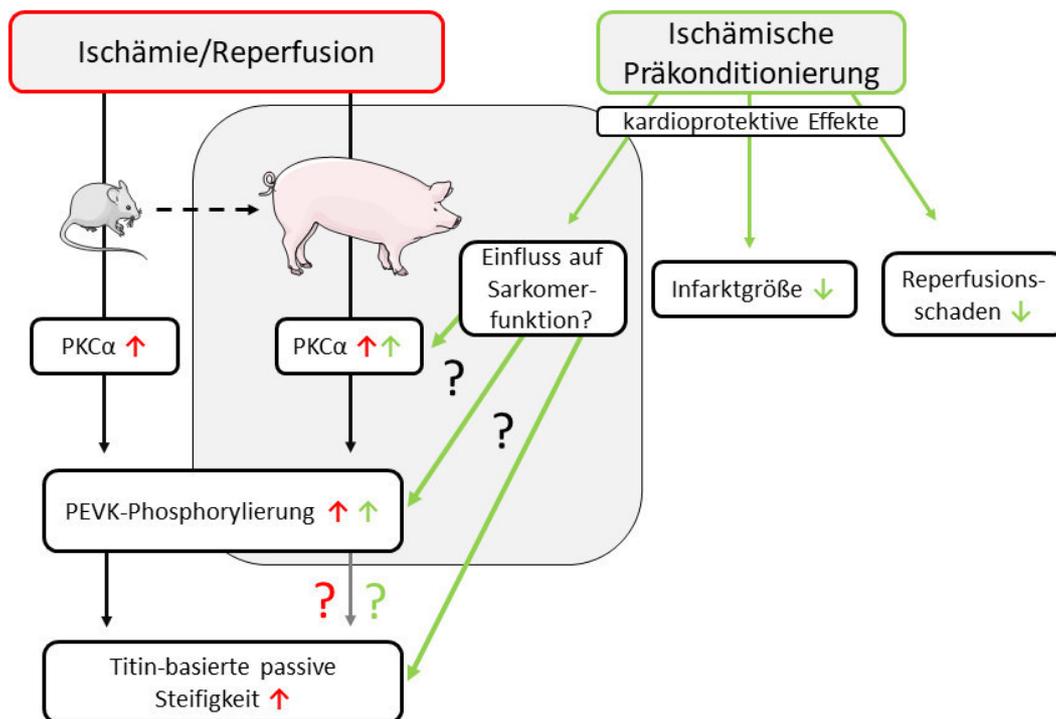


Abb. 24: Schematische Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (die Abbildung enthält modifizierte Elemente von Servier Medical Art, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0). <https://smart.servier.com>).

Nach Myokardischämie kommt es im Kleintiermodell zu einer erhöhten PKCα-vermittelten PEVK-Phosphorylierung, die in einer erhöhten Titin-basierten passiven Steifigkeit resultiert. Ein Ziel dieser Arbeit war, die Ergebnisse aus dem Kleintiermodell in einem Großtiermodell zu reproduzieren. Es konnten auch im Großtiermodell eine erhöhte PKCα-Aktivität sowie eine erhöhte PEVK-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der ischämischen Präkonditionierung auf die Titinphosphorylierung im Schweinmodell untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte PKCα-vermittelte PEVK-Phosphorylierung. Weitere Untersuchungen mittels passiver Kraftmessungen müssen zeigen, wie sich die tatsächliche Steifigkeit verändert.

6 Literaturverzeichnis

- ABDUL-GHANI, S., HEESOM, K. J., ANGELINI, G. D. & SULEIMAN, M. S. 2014. Cardiac phosphoproteomics during remote ischemic preconditioning: a role for the sarcomeric Z-disk proteins. *Biomed Res Int*, 2014, 767812.
- 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, 1235-1246.
- ALI, M. A., CHO, W. J., HUDSON, B., KASSIRI, Z., GRANZIER, H. & SCHULZ, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- ANZAI, A., ANZAI, T., NAGAI, S., MAEKAWA, Y., NAITO, K., KANEKO, H., SUGANO, Y., TAKAHASHI, T., ABE, H., MOCHIZUKI, S., SANNO, M., YOSHIKAWA, T., OKADA, Y., KOYASU, S., OGAWA, S. & FUKUDA, K. 2012. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*, 125, 1234-45.
- ARGAUD, L., GATEAU-ROESCH, O., MUNTEAN, D., CHALABREYSSE, L., LOUFOUAT, J., ROBERT, D. & OVIZE, M. 2005. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 38, 367-74.
- 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.
- BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. & FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114, 1852-66.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAUNWALD, E. & KLONER, R. A. 1982. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66, 1146-9.
- BUJAK, M., DOBACZEWSKI, M., GONZALEZ-QUESADA, C., XIA, Y., LEUCKER, T., ZYMEK, P., VEERANNA, V., TAGER, A. M., LUSTER, A. D. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2009. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ Res*, 105, 973-83.
- BURKE, A. P. & VIRMANI, R. 2007. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am*, 91, 553-72; ix.
- CANTON, M., NEVEROVA, I., MENABO, R., VAN EYK, J. & DI LISA, F. 2004. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H870-7.
- 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.
- DOBACZEWSKI, M., BUJAK, M., ZYMEK, P., REN, G., ENTMAN, M. L. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2006. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res*, 324, 475-88.

- DOST, T., COHEN, M. V. & DOWNEY, J. M. 2008. Redox signaling triggers protection during the reperfusion rather than the ischemic phase of preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 103, 378-84.
- EHLER, E. & MARSTON, S. B. 2019. The European Muscle Conference 2019 Special Issue. *J Muscle Res Cell Motil*, 40, 67.
- FRANCIS STUART, S. D., DE JESUS, N. M., LINDSEY, M. L. & RIPPLINGER, C. M. 2016. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 91, 114-22.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, 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.
- GENT, S., SKYSCHALLY, A., KLEINBONGARD, P. & HEUSCH, G. 2017. Ischemic preconditioning in pigs: a causal role for signal transducer and activator of transcription 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312, H478-H484.
- GHIGO, A., FRANCO, I., MORELLO, F. & HIRSCH, E. 2014. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*, 102, 270-80.
- GHO, B. C., SCHOEMAKER, R. G., VAN DEN DOEL, M. A., DUNCKER, D. J. & VERDOUW, P. D. 1996. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*, 94, 2193-200.
- GONZALEZ-SANTAMARIA, J., VILLALBA, M., BUSNADIEGO, O., LOPEZ-OLANETA, M. M., SANDOVAL, P., SNABEL, J., LOPEZ-CABRERA, M., ERLER, J. T., HANEMAAIJER, R., LARA-PEZZI, E. & RODRIGUEZ-PASCUAL, F. 2016. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*, 109, 67-78.
- GRANZIER, H. L. & LABEIT, S. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 94, 284-95.
- 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.
- GULATI, A., JABBOUR, A., ISMAIL, T. F., GUHA, K., KHWAJA, J., RAZA, S., MORARJI, K., BROWN, T. D., ISMAIL, N. A., DWECK, M. R., DI PIETRO, E., ROUGHTON, M., WAGE, R., DARYANI, Y., O'HANLON, R., SHEPPARD, M. N., ALPENDURADA, F., LYON, A. R., COOK, S. A., COWIE, M. R., ASSOMULL, R. G., PENNELL, D. J. & PRASAD, S. K. 2013. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA*, 309, 896-908.
- GWECHENBERGER, M., MENDOZA, L. H., YOUKER, K. A., FRANGOGIANNIS, N. G., SMITH, C. W., MICHAEL, L. H. & ENTMAN, M. L. 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99, 546-51.
- HAMDANI, N., HERWIG, M. & LINKE, W. A. 2017. Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev*, 9, 225-237.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRUGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.

- HASHMI, S. & AL-SALAM, S. 2015. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 8786-96.
- HAUSENLOY, D. J., BARRABES, J. A., BOTKER, H. E., DAVIDSON, S. M., DI LISA, F., DOWNEY, J., ENGSTROM, T., FERDINANDY, P., CARBRERA-FUENTES, H. A., HEUSCH, G., IBANEZ, B., ILIODROMITIS, E. K., INSERTE, J., JENNINGS, R., KALIA, N., KHARBANDA, R., LECOUR, S., MARBER, M., MIURA, T., OVIZE, M., PEREZ-PINZON, M. A., PIPER, H. M., PRZYKLENK, K., SCHMIDT, M. R., REDINGTON, A., RUIZ-MEANA, M., VILAHUR, G., VINTEN-JOHANSEN, J., YELLON, D. M. & GARCIA-DORADO, D. 2016. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol*, 111, 70.
- HAUSENLOY, D. J., TSANG, A., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2005. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H971-6.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, 123, 92-100.
- HEINEKE, J. & MOKKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 589-600.
- HELMES, M., LIM, C. C., LIAO, R., BHARTI, A., CUI, L. & SAWYER, D. B. 2003. Titin determines the Frank-Starling relation in early diastole. *J Gen Physiol*, 121, 97-110.
- 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., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRILIS, G., LABEIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HOROWITS, R., KEMPNER, E. S., BISHOP, M. E. & PODOLSKY, R. J. 1986. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323, 160-4.
- IBANEZ, B., JAMES, S., AGEWALL, S., ANTUNES, M. J., BUCCIARELLI-DUCCI, C., BUENO, H., CAFORIO, A. L. P., CREA, F., GOUDEVENOS, J. A., HALVORSEN, S., HINDRICKS, G., KASTRATI, A., LENZEN, M. J., PRESCOTT, E., ROFFI, M., VALGIMIGLI, M., VARENHORST, C., VRANCKX, P., WIDIMSKY, P. & GROUP, E. S. C. S. D. 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 39, 119-177.
- IMPROTA, S., POLITOU, A. S. & PASTORE, A. 1996. Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure*, 4, 323-37.
- INSERTE, J., HERNANDO, V. & GARCIA-DORADO, D. 2012. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 96, 23-31.
- JENNINGS, R. B. & GANOTE, C. E. 1974. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*, 35 Suppl 3, 156-72.
- JENNINGS, R. B., SOMMERS, H. M., SMYTH, G. A., FLACK, H. A. & LINN, H. 1960. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70, 68-78.

- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*, 286, 2240-2260.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MULLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRUGER, 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.
- KRAUSE, S. M., JACOBUS, W. E. & BECKER, L. C. 1989. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ Res*, 65, 526-30.
- KRONENBITTER, A., FUNK, F., HACKERT, K., GORRESSEN, S., GLASER, D., BOKNIK, P., POSCHMANN, G., STUHLER, K., ISIC, M., KRUGER, M. & SCHMITT, J. P. 2018. Impaired Ca(2+) cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 119, 28-39.
- KRUG, A., DU MESNIL DE, R. & KORB, G. 1966. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res*, 19, 57-62.
- KRÜGER, M., BABICZ, K., VON FRIELING-SALEWSKY, M. & LINKE, W. A. 2010. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 910-6.
- KRÜGER, M., KOHL, T. & LINKE, W. A. 2006a. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H496-506.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRUTZNER, 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. *Circulation Research*, 104, 87-U230.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006b. 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. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- LABEIT, S., KOLMERER, B. & LINKE, W. A. 1997. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res*, 80, 290-4.
- 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.
- LECOUR, S. 2009a. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*, 47, 32-40.
- LECOUR, S. 2009b. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol*, 46, 607-9.

- LIM, C. C., ZUPPINGER, C., GUO, X., KUSTER, G. M., HELMES, M., EPPENBERGER, H. M., SUTER, T. M., LIAO, R. & SAWYER, D. B. 2004. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279, 8290-9.
- LINKE, W. A. 2010. Molecular giant vulnerable to oxidative damage: titin joins the club of proteins degraded by matrix metalloproteinase-2. *Circulation*, 122, 2002-4.
- LINKE, W. A. 2018. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*, 80, 389-411.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A., POPOV, V. I. & POLLACK, G. H. 1994. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J*, 67, 782-92.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. 1984. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 497-518.
- MURPHY, R. M., VERBURG, E. & LAMB, G. D. 2006. Ca²⁺ activation of diffusible and bound pools of mu-calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 576, 595-612.
- MURRAY, C. J. & LOPEZ, A. D. 2013. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med*, 369, 448-57.
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, 1124-36.
- NAH, D. Y. & RHEE, M. Y. 2009. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean Circ J*, 39, 393-8.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204, 3037-47.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- NEAGOE, C., OPITZ, C. A., MAKARENKO, I. & LINKE, W. A. 2003. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 175-89.
- OBERMANN, W. M., GAUTEL, M., STEINER, F., VAN DER VEN, P. F., WEBER, K. & FURST, D. O. 1996. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134, 1441-53.
- 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, 2592-2601.
- PICHOT, S., MEWTON, N., BEJAN-ANGOULVANT, T., ROUBILLE, F., RIOUFOL, G., GIRAUD, C., BOUSSAHA, I., LAIREZ, O., ELBAZ, M., PIOT, C., ANGOULVANT, D. & OVIZE, M. 2015. Influence of cardiovascular risk factors

- on infarct size and interaction with mechanical ischaemic postconditioning in ST-elevation myocardial infarction. *Open Heart*, 2, e000175.
- PRABHU, S. D. & FRANGOIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.
- PRZYKLENK, K., BAUER, B., OVIZE, M., KLONER, R. A. & WHITTAKER, P. 1993. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87, 893-9.
- PUCHNER, E. M., ALEXANDROVICH, A., KHO, A. L., HENSEN, U., SCHAFFER, L. V., BRANDMEIER, B., GRATER, F., GRUBMULLER, H., GAUB, H. E. & GAUTEL, M. 2008. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13385-90.
- 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.
- REIMER, K. A., LOWE, J. E., RASMUSSEN, M. M. & JENNINGS, R. B. 1977. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56, 786-94.
- ROZKOT, M., VACLAVKOVA, E. & BELKOVA, J. 2015. Minipigs as laboratory animals - Review. *Research in Pig Breeding*, 9, 10-14.
- SEKO, Y., TOBE, K., UEKI, K., KADOWAKI, T. & YAZAKI, Y. 1996. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Raf-1, mitogen-activated protein kinase kinase, mitogen-activated protein kinases, and S6 kinase in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 78, 82-90.
- SKYSCHALLY, A., GENT, S., AMANAKIS, G., SCHULTE, C., KLEINBONGARD, P. & HEUSCH, G. 2015. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ Res*, 117, 279-88.
- SKYSCHALLY, A., VAN CASTER, P., BOENGLER, K., GRES, P., MUSIOLIK, J., SCHILAWA, D., SCHULZ, R. & HEUSCH, G. 2009. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*, 104, 15-8.
- STAAT, P., RIOUFOL, G., PIOT, C., COTTIN, Y., CUNG, T. T., L'HUILLIER, I., AUPETIT, J. F., BONNEFOY, E., FINET, G., ANDRE-FOUET, X. & OVIZE, M. 2005. Postconditioning the human heart. *Circulation*, 112, 2143-8.
- STATISTISCHES BUNDESAMT 2017. Todesursachen in Deutschland. In: DESTATIS (ed.) *Fachserie 12 Reihe 4*.
- STOIAN, L., KRUGER, M., SCHMITT, J. & KLEINBONGARD, P. 2019. Is there an effect of ischemic conditioning on myocardial contractile function following acute myocardial ischemia/reperfusion injury? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865, 822-830.
- SUTTON, M. G. & SHARPE, N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101, 2981-8.
- SZIJARTO, A., CZIGANY, Z., TUROCZI, Z. & HARSANYI, L. 2012. Remote ischemic preconditioning--a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review. *J Surg Res*, 178, 797-806.
- TALMAN, V. & RUSKOAHO, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 365, 563-81.

- TAMAREILLE, S., MATEUS, V., GHABOURA, N., JEANNETEAU, J., CROUE, A., HENRION, D., FURBER, A. & PRUNIER, F. 2011. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*, 106, 1329-39.
- TARZAMI, S. T., CHENG, R., MIAO, W., KITSIS, R. N. & BERMAN, J. W. 2002. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 34, 209-21.
- THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A., WHITE, H. D. & EXECUTIVE GROUP ON BEHALF OF THE JOINT EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY /AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY /AMERICAN HEART ASSOCIATION /WORLD HEART FEDERATION TASK FORCE FOR THE UNIVERSAL DEFINITION OF MYOCARDIAL, I. 2018. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, 138, e618-e651.
- TSANG, A., HAUSENLOY, D. J., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2004. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*, 95, 230-2.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- TURNER, N. A. & PORTER, K. E. 2013. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 6, 5.
- TURRELL, H. E., THAITIRAROT, C., CRUMBIE, H. & RODRIGO, G. 2014. Remote ischemic preconditioning of cardiomyocytes inhibits the mitochondrial permeability transition pore independently of reduced calcium-loading or sarcoKATP channel activation. *Physiol Rep*, 2.
- WANG, J., LIU, X., SENTEX, E., TAKEDA, N. & DHALLA, N. S. 2003. Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H2277-87.
- WARREN, C. M., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., KRZESINSKI, P. R. & GREASER, M. L. 2003a. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res*, 59, 86-94.
- WARREN, C. M., KRZESINSKI, P. R. & GREASER, M. L. 2003b. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis*, 24, 1695-702.
- WEBER, K. T., SUN, Y., BHATTACHARYA, S. K., AHOKAS, R. A. & GERLING, I. C. 2013. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol*, 10, 15-26.
- 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.
- WRIGHT, V. P., REISER, P. J. & CLANTON, T. L. 2009. Redox modulation of global phosphatase activity and protein phosphorylation in intact skeletal muscle. *J Physiol*, 587, 5767-81.
- YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357, 1121-35.
- YUAN, C., GUO, Y., RAVI, R., PRZYKLENK, K., SHILKOFSKI, N., DIEZ, R., COLE, R. N. & MURPHY, A. M. 2006. Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts-- evidence for novel phosphorylation sites. *Proteomics*, 6, 4176-86.

ZHAO, Z. Q., CORVERA, J. S., HALKOS, M. E., KERENDI, F., WANG, N. P., GUYTON, R. A. & VINTEN-JOHANSEN, J. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H579-88.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.....	22
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	23
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.....	25
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben.....	25
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Verdünnungs- und Herstellerangaben.....	26
Tabelle 7: Verwendete Medikamente bei der Durchführung der Tierversuche.....	26
Tabelle 8: Rezept für verwendete SDS-PAGE-Gele (Trenn- und Sammelgel).....	31
Tabelle 9: Rezept für Titingele.....	32
Abb. 1: Ätiologie des Myokardinfarkts (angelehnt an Thygesen et al. (2018)).....	1
Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der pathophysiologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt in der Infarktzone (angelehnt an Nah et al. (2009)).....	2
Abb. 3: Schematischer Aufbau des Myofilamentproteins (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).....	7
Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der kardialen Titinisoformen N2B und N2BA (angelehnt an Makarenko et al. (2004)).....	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der beteiligten Signalwege, Kinasen und humanen Phosphorylierungstellen, die an der Phosphorylierung der beiden elastischen Titindomänen N2-Bus und PEVK beteiligt sind (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).....	12
Abb. 6: Auswirkungen und Mechanismen von oxidativem Stress auf das Protein Titin und die Titin-basierte Steifigkeit (angelehnt an Beckendorf et al. (2015)).....	13
Abb. 7: Aktivierung des RISK- und SAFE-Signalwegs in Folge ischämischer Konditionierung (angelehnt an Lecour (2009b)).....	17
Abb. 8: Formen der ischämischen Konditionierung (angelehnt an Szijarto et al. (2012)).	20
Abb. 9: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe.....	28
Abb. 10: Foto des freipräparierten Schweineherzens während der Operation.....	29
Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Titinisoformen im Schwein in Form eines gefärbten Gels.....	33
Abb. 12: Titinisoformenzusammensetzung im remote Myokard vom Schwein vor, während und nach Ischämie und Reperfusion (60 und 120 min).....	36
Abb. 13: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	37

Abb. 14: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	38
Abb. 15: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).	39
Abb. 16: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	40
Abb. 17: Ergebnisse der Analyse der Kinaseaktivitäten im remote Myokard vom Schwein nach Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).	41
Abb. 18: Titinisoformenzusammensetzung im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie und Reperfusion (60 und 120 min).	42
Abb. 19: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	43
Abb. 20: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest S11878 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	44
Abb. 21: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest S12022 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	45
Abb. 22: Titin Phosphorylierung der beiden Titinisoformen am Serinrest 12022 der PEVK-Domäne im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).....	46
Abb. 23: Ergebnisse der Analyse der Kinaseaktivitäten im remote Myokard vom Schwein nach ischämischer Präkonditionierung und anschließender Ischämie/Reperfusion (60 und 120 min).	47
Abb. 24: Schematische Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	61

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Martina Krüger für die hervorragende Betreuung meiner Promotion danken. Deine Tür stand, im wahrsten Sinne des Wortes, immer für mich und alle anderen Doktorand*innen offen und ich hätte mir keine bessere Doktormutter vorstellen können. Vielen Dank für den Optimismus, die vielen wegweisenden Anregungen und mühevollen Korrekturen.

Ebenso danke ich meiner Co-Betreuerin Frau Prof. Maria Grandoch für ihre Unterstützung und Beratung während der Anfertigung meiner Dissertation.

Ein großes Dankeschön an die gesamte AG Krüger. Gerne erinnere ich mich an all die „Lab-Mettings“ und Abende, die im Zeichen der rheinischen Abendkultur standen, zurück. Ein ganz besonderer Dank gilt Sabine Bongardt, die mich nicht nur geduldig und wertschätzend eingearbeitet hat, sondern auch Ergebnisse zu dieser Arbeit beigetragen hat. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich und warst mir die gesamte Zeit eine große Hilfe. Zusammen mit Dr. David Monteiro Barbosa wart ihr beiden vor allem im Schreibprozess unterhaltende und aufbauende Büropartner. Ein weiterer Dank gilt Dr. Sebastian Kötter, der stets sämtliche Fragen hilfsbereit und geduldig beantwortet hat und mir wichtige Anregungen für die Ausarbeitung der Arbeit an die Hand gegeben hat. An dieser Stelle auch vielen Dank für die Kraftmessungen meiner Proben, die meiner Arbeit noch mehr Relevanz verleihen konnten. Vielen Dank auch an all meine Doktorandenkollegen*innen für die schöne Zeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nikolaj Klöcker für die Mitbenutzung des Chemilumineszenz Imagers.

Des Weiteren bedanke ich mich beim Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikum Essen für die Bereitstellung der Gewebeproben und für die interessanten Einblicke, die mir ermöglicht wurden.

Dem Sonderforschungsbereich 1116 und der Deutschen Forschungsgesellschaft bin ich sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Danke, dass ihr mir immer zugehört und mich unterstützt habt. Ihr habt mich so angespornt und motiviert - Danke dafür. Speziell meinen Eltern möchte ich für die mentale und auch finanzielle Hilfe während meines gesamten Studiums danken, die für mich nie selbstverständlich war.

Abschließend möchte ich mich bei meiner wichtigsten Stütze, meinem Freund Sebastian bedanken. Ohne dich wäre ich wahrscheinlich schon nach einer Woche verrückt geworden. Danke für die vielen aufbauenden Worte und deine bedingungslose Unterstützung.