

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

**Analyse der Titinmodifikationen im rechten Ventrikel diabetischer Mäuse
nach kardialer Ischämie-Reperfusion**

Dissertation

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

vorgelegt von
Julia Leonie Röhrig
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Maria Grandoch

Zusammenfassung

Ein weltweites Gesundheitsproblem stellen die durch Diabetes mellitus (DM) vermittelten Folgeerkrankungen dar. An der Kombination aus DM und folgendem Myokardinfarkt erkranken weltweit unzählige Menschen und weisen ein schlechteres Outcome als Nicht-Diabetiker auf. Zum vollständigen Verständnis der durch DM bedingten mangelnden Kompensationsmechanismen ist ergänzende Forschung notwendig. Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Titinmodulationen in rechtsventrikulären diabetischen Gewebeproben nach akuter Ischämie und Reperfusion (*Remote*) zu detektieren. Titin, als drittes Filament im Sarkomer, vermittelt aufgrund seiner elastischen Eigenschaften im Myokard eine passive Spannung und kann somit Einfluss auf die Pumpkraft des Herzens nehmen. Auch die Protein-Qualitäts-Kontrolle (PQK) spielt nach Myokardinfarkt sowohl im ischämischen als auch im Remote Bereich eine wichtige Rolle. Die PQK wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls näher untersucht. Nachzuweisen waren deutliche basale Unterschiede der diabetischen Kardiomyozyten. Es zeigte sich eine signifikante Hyperphosphorylierung der PEVK-Region Titins, was eine gesteigerte basale passive-Spannung vermuten lässt. Auch der Autophagiemarker LC3 II war in diabetischen rechtsventrikulären Geweben signifikant erhöht. In Kombination mit einem tendenziellen Anstieg von p62 lässt sich die Vermutung einer inhibierten Autophagie aufstellen. Ebenfalls war eine Akkumulation von K48-polyubiquitinierten Titin detektierbar, welches eine mögliche Inhibition der Proteasom-Aktivität vermuten lässt. Durch Ischämie/Reperfusion (I/R) kam es kaum zu Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe, weder im diabetischen noch im nicht-diabetischen Myokard. Es waren kaum veränderte Titinphosphorylierungen zu den basal gemessenen Werten detektierbar, was dafürspräche, dass nach I/R eine unveränderte rechtsventrikuläre Titin-basierte Steifigkeit vorherrschen würde. Auch die untersuchten Autophagiemarker und die Titin-Polyubiquitinierung zeigten sich nur gering beeinflusst durch I/R. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass nach akuter I/R (24h) rechtsventrikulär unabhängig des Glukosestoffwechsels kaum molekulare Veränderungen im Remote-Myokard folgen. Im diabetischen Myokard sind basale Modulationen allerdings deutlich nachweisbar, die möglicherweise einen Anteil zum erhöhten Entstehungsrisiko kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen sowie das schlechtere Outcome und die erhöhte Mortalitätsrate nach Myokardinfarkt partiell erklären können.

Abstract

Diabetes mellitus (DM)-mediated secondary diseases represent a global health problem. The combination of diabetes mellitus and subsequent myocardial infarction affects countless people worldwide and has a worse outcome than myocardial infarction in non-diabetics. Complementary research is needed to fully understand the lack of compensatory mechanisms caused by DM. Therefore, the aim of this work was to detect possible titin modulations in right ventricular diabetic tissue samples after acute ischemia and reperfusion (Remote). Titin, as the third filament in the sarcomere, mediates passive tension in the myocardium due to its elastic properties and thus can influence the pumping capacity of the heart. Protein quality control (PQK) also plays an important role after myocardial infarction in both ischemic and remote settings. PQK was also examined in more detail in the present study.

Significant basal differences in diabetic cardiomyocytes were detected. There was significant hyperphosphorylation of the titin PEVK region, suggesting increased basal passive tension. I/R did not affect titin phosphorylation in right ventricles of db/+ and db/db animals, suggesting that right ventricular titin-based stiffness remains unaltered. The autophagy marker LC3 II was also significantly increased in diabetic right ventricular tissues. Combined with a trend toward increased p62, this indicates inhibited autophagy. Also an accumulation of K48-polyubiquitinated titin was detectable in diabetic tissues, suggesting an inhibition of proteasome activity. K48-polyubiquitination was not altered by ischemia/reperfusion (I/R) in diabetic and nondiabetic tissues compared to the respective control group. Examined Autophagy markers and titin polyubiquitination also appeared unaffected by I/R. In conclusion, acute I/R (24h) is followed by minor molecular changes in the right ventricular remote myocardium independent of glucose metabolism. However, basal modulations are clearly detectable in diabetic myocardium, which probably contribute to the increased risk of cardiovascular disease and may partially explain the poorer outcome and the increased mortality rate after myocardial infarction.

Abkürzungsverzeichnis

III PI3K-Komplex	Klasse-III-Phosphoinositid-3-Kinase-Komplex
A	Amper
A-Bande	anisotrope Bande
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	akuter Myokardinfarkt
AMPKα	Adenosintriphosphat-abhängige Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
APS	Autophagolysosomales-System
ATG13	Autophagy-related-protein 13
ATG101	Autophagy-related-protein 101
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Grad Celsius
CaMKIIδ	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta
C Terminus	Ende eines Moleküls, das die freie Carboxylgruppe (-COOH) enthält
d	dezi
Da	Dalton
db/+	Leptinrezeptor-defiziente heterozygote Maus
db/db	Leptinrezeptor-defiziente homozygote Maus
DM1	Diabetes mellitus Typ 1
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DTT	Dithiothreitol

ECL	Western blotting detection reagent
EKG	Elektrokardiogramm
ERK2	extrazellulär regulierte Kinase 2
et al.	et alii (lat. und andere)
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
FIP200	Family kinase-interacting protein of 200 kDa
Gly-	Glycin
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Meerrettichperoxidase
H₂O	Wasser
I-Bande	isotrope Bande
Ig	Immunoglobulin
i.p.	Intraperitoneal
K	Kontrolle
K48	Lys-48
K63	Lys-63
k	Kilo
KHK	Koronare Herzerkrankung
IR	Ischämie/ Reperfusion
l	Liter
LAD	Ramus interventricularis anterior, left anterior descending artery
LC3	Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1 leichte Kette 3
Lys-	Lysin

μ	mikro
m	mili
M	Molar/Mol
M	Mega
M-Band	Mittlere Bande
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MI	Myokardinfarkt
Nbr1	Next to BRCA1 Gene 1 Protein
N-Terminus	Ende eines Moleküls, das die freie Aminogruppe (-NH ₂) enthält
N2BA	Titinisoform
N2B	Titinisoform
N2-Bus	N2-B unique sequence
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier
O₂	Sauerstoffdioxid
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKCα	Proteinkinase C α
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PQK	Protein-Qualitäts-Kontrolle
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p62/SQSTM1	Sequestosom 1

RBM20	RNA-bindendes Protein 20
S	Serin
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sham	Schein-
ST	Echokardiographische Strecke zwischen S-Zacke und T-Welle
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ub	Ubiquitinierung
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Diabetes Mellitus	1
1.1.1	Kardiovaskuläre Folgen des Diabetes mellitus	1
1.2	Akuter Myokardinfarkt	3
1.3	Quergestreifte Muskulatur	6
1.4	Das Sarkomer	6
1.5	Titin	8
1.5.1	Struktur und Funktion.....	8
1.5.2	Modulation der passiven Steifigkeit durch Veränderungen der Titinphosphorylierung	10
1.6	Intrazellulärer proteolytischer Abbau.....	13
1.6.1	Polyubiquitinierung	13
1.6.2	Das Autophagolysosomale-System (APS).....	14
1.6.3	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	17
1.6.4	Titin innerhalb der Protein-Qualitäts-Kontrolle	19
2.	Zielsetzung	21
3.	Material und Methoden	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	23
3.1.3	Laborgeräte.....	24
3.1.4	Antikörper	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Probenherkunft	26
3.2.2	Verwendetes Tiermodell	26
3.2.3	Biochemische Methoden.....	29
3.2.4	Software.....	32
3.2.5	Statistik	32
4.	Ergebnisse.....	33
4.1	Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion (I/R) auf Titin-Phosphorylierungen	33
4.1.1	Signifikante Zunahme der PEVK-Phosphorylierungen in db/db Sham Gewebe.....	33
4.1.2	Phosphorylierungen der N2-Bus.....	33

4.2	Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion auf das Autophagolysosomale-System	35
4.2.1	Die Autophagieregulatoren mTOR und AMPK α	35
4.2.2	LC3 II und p62/SQSTM Level	36
4.3	Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion auf die Polyubiquitinierung von Titin	37
4.3.1	K63-Polyubiquitinierung	37
4.3.2	K48-Polyubiquitinierung	38
5.	Diskussion	40
5.1	Basale Phosphorylierungsmodulationen der elastischen I-Bandenregion durch Diabetes mellitus	40
5.2	Remote-Gebiet zeigt kaum akute Phosphorylierungsmodulationen durch Ischämie/Reperfusion	41
5.2.1	Titinphosphorylierungen der db/+ Gewebe nach I/R	43
5.2.2	Titinphosphorylierungen der db/db Gewebe nach I/R	44
5.3	Effekte auf das Autophagolysosomale-System	45
5.3.1	Tendenzielle Diabetes mellitus-bedingte Autophagie Inhibition	45
5.3.2	Ischämie/Reperfusion hat im rechtsventrikulären Remote-Gebiet keine eindeutigen Auswirkungen auf die Autophagie	47
5.4	Einflüsse auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle von Titin	48
5.4.1	Tendenziell verminderte proteasomale Titin-Degradation durch Diabetes mellitus	48
5.4.2	Unveränderte Polyubiquitinierung durch Ischämie /Reperfusion	49
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	51
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Anhang	63
7.1	Abbildungsverzeichnis	63
7.2	Tabellenverzeichnis	63

1. Einleitung

1.1 Diabetes Mellitus

Eine der häufigsten chronischen Erkrankungen unserer Gesellschaft ist Diabetes Mellitus. Mehr als 8 Millionen Menschen sind aktuell in Deutschland erkrankt (Tönnies and Rathmann, 2021). Diabetes mellitus lässt sich in Typ 1 und 2 (DM1/DM2) einteilen: Während DM1 eine durch Autoimmun-Prozesse bedingte Zerstörung der β -Zellen und damit verbundene Unfähigkeit zur Produktion von Insulin definiert (Graf and Schumm-Draeger, 2011), ist DM2 durch Insulinresistenz der Körperzellen gekennzeichnet. Es folgt hier die resultierende Überproduktion von Insulin sowie eine sekundäre Insuffizienz durch die β -Zellen des Pankreas (Kahn, Cooper and Del Prato, 2014).

Für die wesentlich häufigere Variante Diabetes mellitus Typ 2 ist die weltweit zunehmende Adipositas ein großer Risikofaktor. Das Zielgewebe mit seinen Insulinrezeptoren ist bei an DM2 Erkrankten weniger sensitiv bis hin zu resistent gegen das Hormon Insulin. Durch die geringere intrazelluläre Glukoseaufnahme kommt es zu einem Kompensationsmechanismus, um Hyperglykämien zu vermeiden. Es resultiert ein Anstieg der Insulinausschüttung aus den β -Zellen, welcher die Glukoseaufnahme in die Zellen steigern soll. Dies kompensiert die verminderte Insulinsensitivität für eine gewisse Zeit, dennoch folgt im Laufe der Erkrankung oft eine Erschöpfung der β -Zellen und eine resultierende zelluläre Dysfunktion. Ebenfalls kann die kompensatorische Insulin-Überproduktion zu einer Abnahme der Rezeptordichte der Zielzellen führen. Es folgen Hyperglykämien durch unzureichende bzw. fehlende Insulinproduktion als auch -bindung. (Kahn, Cooper and Del Prato, 2014).

1.1.1 Kardiovaskuläre Folgen des Diabetes mellitus

Folgeerkrankungen prägen das Bild des Diabetes mellitus. Zu diesen gehören die Mikro- sowie Makrovaskulären. Die Retinopathie, Nephropathie als auch Neuropathie prägen das Bild der Mikrovaskulären Erkrankungen. Zu den Makrovaskulären Erkrankungen gehören der Myokardinfarkt, die periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie der Ischämische Insult (Resl and Clodi, 2010; Dal Canto *et al.*, 2019). Der Zusammenhang zwischen Diabetes und den vaskulären Folgeerkrankungen unterliegt verschiedenen pathophysiologische Mechanismen: Durch permanente Hyperglykämien kommt es zu Endothelschädigungen,

Hyperinsulinämie führt zu Aktivierung inflammatorischer Entzündungsreaktionen sowie entstehende mitochondriale Störungen und damit verbundene Einleitung des Zelltodes durch Dyslipidämie. Diese Mechanismen führen zur Entstehung von Arteriosklerose und sind Grundlage mikro- als auch makrovaskulärer Folgeerkrankungen. (Dal Canto *et al.*, 2019).

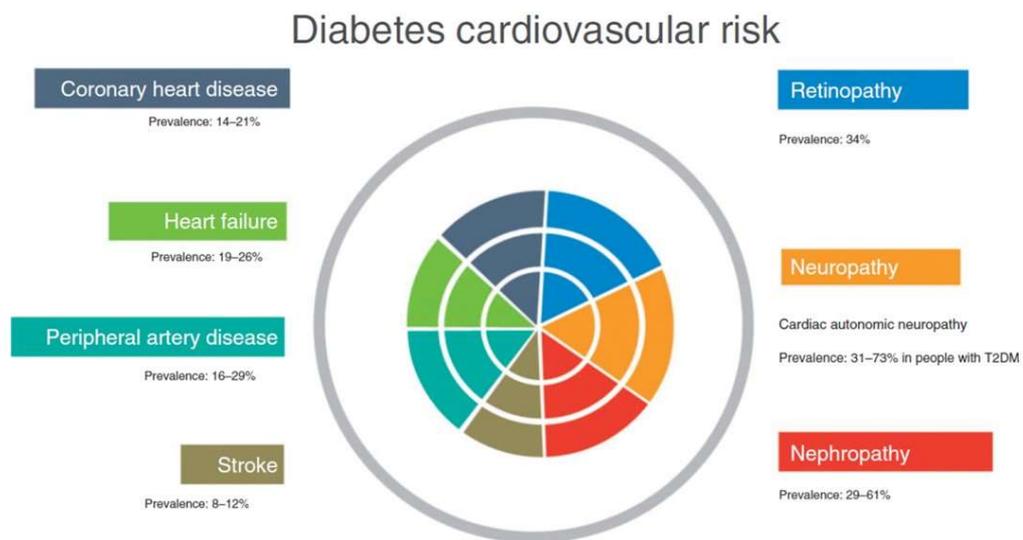


Abb. 1 Kardiovaskuläre Risiken des Diabetes mellitus. Die Grafik zeigt die mikro- und makrovaskulären Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus sowie deren Prävalenz. Makrovaskulär: Koronare-Herz-Erkrankung sowie folgende Herzinsuffizienz, Periphere arterielle Verschluss Krankheit, Schlaganfall; Mikrovaskulär: Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie (Dal Canto *et al.*, 2019, modifiziert).

Eine weitere Folgeerkrankung des Diabetes mellitus ist die diabetische Kardiomyopathie. Bedingt durch die Hyperglykämie, -lipidämie und -insulinämie als auch Metabolismusstörungen des Myokards kann es zu einer myokardialen Hypertrophie, Apoptose sowie Nekrose und daraus resultierende verstärkte, interstitielle fibrotische Gewebeveränderung kommen (Stratmann, Stork and Tschoepe, 2008). Es folgt häufig die systolische Dysfunktion mit reduzierter Ejektionsfraktion, was die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz erhöht (Hayat *et al.*, 2004; Stratmann, Stork and Tschoepe, 2008).

Nach akutem Myokardinfarkt (AMI) ist eine erhöhte Komplikations- als auch Mortalitätsrate im Vergleich zu Nichtdiabetikern zu beobachten. Trotz gleicher Infarktgröße leiden Diabetiker unter einem höheren Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln (Jaffe *et al.*, 1984). Faktoren wie eine stärker ausgeprägte koronare

Herzerkrankung oder erhöhte myokardiale Dysfunktion könnten hierfür ursächlich sein. (Jaffe *et al.*, 1984; Mak *et al.*, 1997). Sogar außerhalb des Infarkt-Gebietes, dem sogenannten Remote-Myokard, ist bei Diabetikern nach einem akuten Infarkt eine verringerte regionale Ejektionsfraktion im Vergleich zu Nichtdiabetikern zu beobachten (Iwasaka *et al.*, 1992).

Ursächlich für chronische Herzscheiden sind zum Großteil Vorgänge auf intrazellulärer Ebene. Durch Hyperglykämien folgen Veränderungen der Protein-Qualitäts-Kontrolle. Vorangegangene Studien haben Veränderungen des proteasomalen Abbaus in Endothelzellen von Herzen diabetischer Mäuse feststellen können (Queisser *et al.*, 2010). Insbesondere die durch Diabetes mellitus gehemmte Autophagie in Kardiomyozyten ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie (Ouyang, You and Xie, 2014).

1.2 Akuter Myokardinfarkt

Aus einem Verschluss einer Koronar-Arterie kann ein akuter Myokardinfarkt (AMI) resultieren. Durch die Verlegung des Lumens kommt es zu einem geringeren bis hin zu fehlendem Blutfluss und damit resultierender Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, der Ischämie. Es kommt zu einer Schädigung der Herzmuskelzellen. Typische Symptome sind Brustschmerz und Engegefühl, hoher Blutdruck, Kurzatmigkeit, Schmerzen im linken Arm, generelle Unruhe und auch Übelkeit oder Erbrechen (Lu *et al.*, 2015). Der AMI gehört zu den makrovaskulären Erkrankungen und ist damit ebenfalls Teil des Symptomkomplexes der Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus (Dal Canto *et al.*, 2019).

Definiert wird ein akuter Myokardinfarkt durch das gemeinsame Vorliegen mehrerer Kriterien: Kardiales Troponin, ein Bestandteil des kardialen Sarkomers, muss erhöht sein, als auch muss sich eine Dynamik des Wertes zeigen, um eine chronische myokardiale Schädigung auszuschließen. Ebenfalls müssen sich Zeichen einer myokardialen Ischämie zeigen. Hierzu zählen die oben genannten Symptome, typische echokardiographische Zeichen wie eine ST-Streckenveränderungen oder eine typische Q-Zacke sowie bildgebende Befunde einer Ischämie (Giannitsis *et al.*, 2019). Über die Hälfte der AMI werden durch einen Verschluss des Ramus interventricularis anterior (RIVA, LAD) der linken Koronararterie verursacht. Aus einem solchen Verschluss kann ein

Vorderwandinfarkt resultieren, der eine deutlich höhere Letalität als der Hinterwandinfarkt aufweist (Schneider and Parr, 1961).

Risikofaktoren für einen AMI sind u.a. arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, hohe Cholesterin-Spiegel, Adipositas, Bewegungsmangel sowie Diabetes mellitus. Diese Faktoren können zur Entwicklung einer Arteriosklerose, speziell zur koronaren Herzerkrankung (KHK) führen, die durch eine weitere Gefäßverlegung in einem akuten Myokardinfarkt resultieren kann (Lu *et al.*, 2015).

Die Pathologie der koronaren Herzerkrankung unterliegt einer endothelialen Dysfunktion. Auf Boden der Dysfunktion kommt es zur Bildung von Adhäsionsmolekülen und folgender Haftung von Makrophagen an den Endothelläsionen. Durch eine transendotheliale Migration gelangen die Makrophagen in die Endothel-Zellen und verzehren Lipoproteine bis zu ihrem Absterben. Dies bildet eine arteriosklerotische Läsion. Mit der Zeit kommt es zu fibroproliferativen Prozessen, die der Reparatur der Läsion dienen sollen, dadurch aber ein Anwachsen eines Plaques fördern. Dieser ist meist durch eine fibröse Schutzkappe gesichert (Falk, 2006). Kommt es zu einer Verletzung der fibrösen Kappe, wird prothrombotisches Material wie Kollagen frei, welches sowohl eine Thrombozytenaggregation als auch Aktivierung der Gerinnungskaskade nach sich zieht. Ein Thrombus entsteht und kann durch Verlegung einer Koronararterie eine Ischämie des distalen Gewebes und damit verbundenen Kardiomyozytenuntergang auslösen, ein akuter Myokardinfarkt (Maisch, Steliwaag and Simon, 1994; Nah and Rhee, 2009).

Im Versorgungsgebiet der okkludierten Koronararterie und auch im nicht-ischämischen Remote-Myokard kommt es folgend zu adaptiven Prozessen und Mechanismen, die der Kompensation des Myokardsterbens und dem Funktionserhalt der Pumpleistung dienen (Frangogiannis, 2012; Carrick *et al.*, 2015; Dastidar *et al.*, 2016). Es kommt zu einem kardialen Remodeling, welches (längerfristig) zu einer Verdünnung der Ventrikelwand und einer Dilatation des Ventrikels führt. Hierbei ist es wichtig, dass der Heilungsprozess nach einem AMI planmäßig abläuft, ansonsten kann dieser zu einer Herzruptur, einer Herzinsuffizienz oder sogar zum Tod führen, welches maladaptives Remodeling genannt wird (Matsui, 2010).

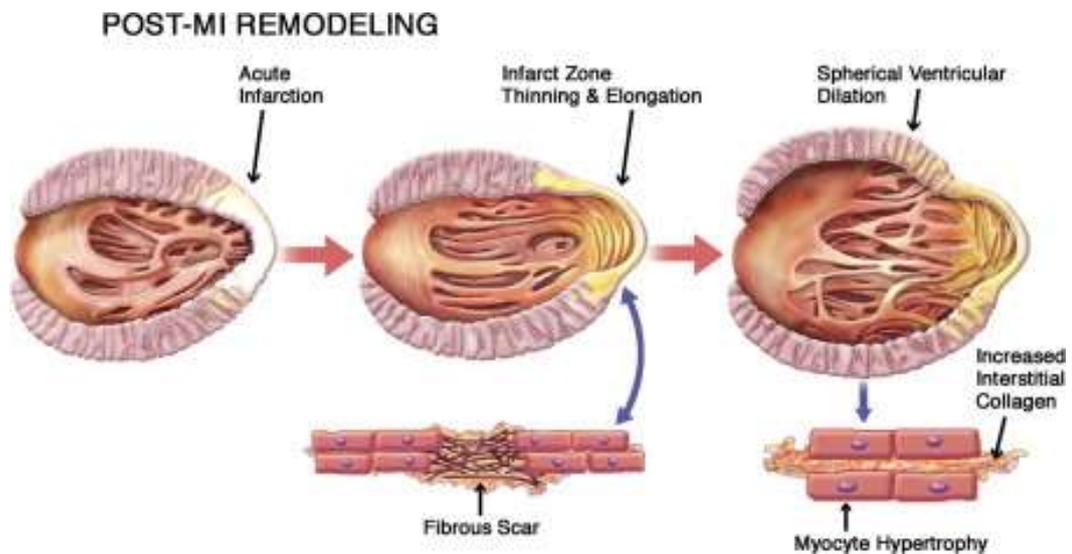


Abb. 2 Remodeling nach Myokardinfarkt. Die Grafik zeigt eine schematische Darstellung der ventrikulären Prozesse nach Myokardinfarkt. Nach dem akuten Infarkt kommt es in der frühen Phase zur Bildung einer Narbe im nekrotischen Gebiet sowie zur Ausdünnung des Infarktgebietes. Die elliptische Form des Ventrikels verändert sich im Verlauf hin zu einer sphärischen Form durch eine Kardiomyozyten-Hypertrophie sowie durch einen Anstieg des interstitiellen Kollagens (Konstam *et al.*, 2011).

Der Heilungsverlauf nach Myokardinfarkt lässt sich in drei Phasen einteilen: Die Inflammations-, die Proliferation- und die Reifungsphase. Durch den Kardiomyozyten-Untergang wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, welche den Verdau und die Beseitigung von beschädigten und toten Zellen sowie extrazellulären Matrixbestandteilen einleitet. Die proliferative Phase beginnt mit dem Einwandern von Monozyten und Makrophagen, die wiederum Fibroblastenvorläuferzellen aktivieren, welche in Myofibroblasten differenzieren. Diese sezernieren Kollagen und sorgen so für die extrazelluläre Strukturhaltung des Herzens (Frangogiannis, 2014). In der Reifungsphase folgt eine Deaktivierung der reparativen Zellen (Prabhu and Frangogiannis, 2016) und es kommt zu einer Quervernetzung der extrazellulären Matrix (Talman and Ruskoaho, 2016), wodurch die Infarktnarbe reift.

Aber auch außerhalb des ischämischen Infarktgebietes, im benachbarten Remote-Gebiet, kommt es zu Myokardschäden (Dastidar *et al.*, 2016). Oftmals ist nicht der Verlust von nekrotischen Kardiomyozyten während eines Myokardinfarktes ursächlich für die Entstehung einer Herzinsuffizienz, sondern das Remodeling der nicht-infarzierten linksventrikulären Wand. Die übertriebenen fibroreparativen Prozesse, die eigentlich der Verhinderung der Herzruptur dienen sollen, tragen zur progressiven Verschlechterung der Herzfunktion bei (Talman and Ruskoaho, 2016).

1.3 Quergestreifte Muskulatur

Zur quergestreiften Muskulatur gehören zwei verschiedene Formen des Muskelgewebes, die Skelett- sowie die Herzmuskulatur. Durch die Myofilament-Anordnung weist sie ein sich wiederholendes Muster von Querstreifen auf, welches sich im Lichtmikroskop erkennen lässt. Die Skelettmuskulatur ist im weiteren Sinne für die willkürliche aktive Körperbewegung zuständig, wohingegen die Herzmuskulatur unwillkürlich gesteuert die Pumpfunktion des Herzens garantiert und somit die Regulation des Blutkreislaufes übernimmt (Fürst and Schröder, 2014).

1.4 Das Sarkomer

Die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften Muskulatur nennt sich Sarkomer. Die Muskulatur setzt sich aus einzelnen Muskelfasern zusammen, die wiederum aus Muskelfibrillen bestehen. Hunderte Sarkomere befinden sich in einer einzigen Muskelfibrille und geben ihr die mikroskopisch charakteristische Querstreifung. Ihre Kontraktilität gewinnen die Muskelfibrillen durch den Querbrückenzyklus, indem eine Verkürzung der Sarkomere zu einer mechanischen Kontraktion der Muskelfaser führt und somit eine gezielte Längenvariation ermöglicht wird (Craig and Woodhead, 2006). Ein Sarkomer ist im Wesentlichen aus drei verschiedenen Myofilamenten aufgebaut: den dicken Myosinfilamenten, den dünnen Aktinfilamenten und den elastischen Titinfilamenten (Tskhovrebova and Trinick, 2003). Durch eine überlappende Anordnung wird ein Ineinandergleiten der Filamente ermöglicht, die sogenannte Gleitfilamenttheorie (Huxley and Hanson, 1954).

Ein Sarkomer wird beidseits von jeweils einer Z-Scheibe begrenzt. In der Mitte zwischen diesen befindet sich das M-Band. Z-Scheiben fungieren als Halteapparat für die dünnen Aktinfilamente. Ebenfalls an den Z-Scheiben befestigt befinden sich die Titinfilamente, die mit den dicken Myosinfilamenten bis zum M-Band verbunden sind (Pyle and Solaro, 2004). Mit Hilfe ihrer Rückstellkräfte führen die Titinfilamente zur optimalen Zentrierung der Myosinfilamente und haben so eine große Bedeutung für die aktive Kraftentwicklung (Fürst *et al.*, 1988; Agarkova and Perriard, 2005).

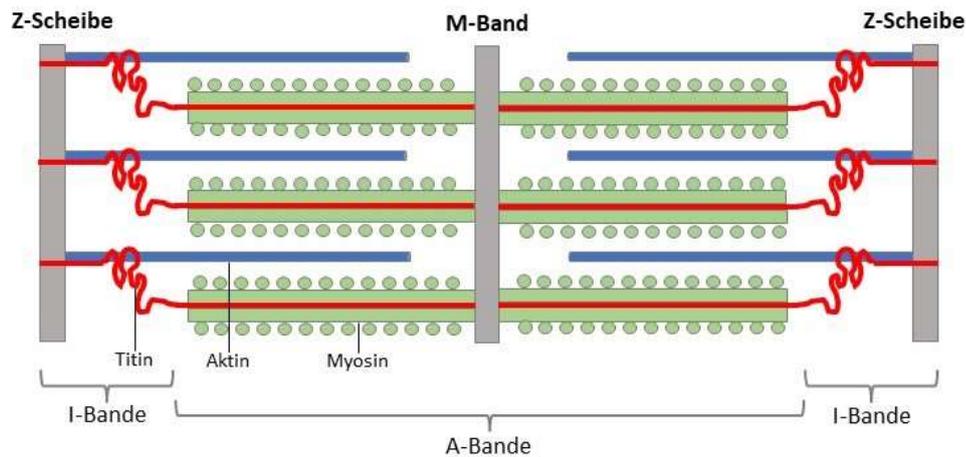


Abb. 3 Schematischer Aufbau eines Sarkomers. Die laterale Begrenzung bilden die beiden Z-Scheiben. Ein Halbsarkomer reicht von Z-Scheibe bis M-Band. Zwischen Z-Scheibe und M-Band befinden sich die Myofilamente Myosin, Aktin und Titin, wobei Titin das Halbsarkomer durchspannt. A-Bande (anisotrope Bande), I-Bande (isotrope Bande).

Die Lichtbrechung der Sarkomerabschnitte, die im Polarisationsmikroskop beobachtet werden kann, ist begründend für die Banden Einteilung in I- und A-Bande. Hell zeigt sich der Bereich von der Z-Scheibe bis zum Beginn der Myosinköpfchen. Hier befinden sich Teile der Aktin- sowie Titinfilamente. Durch ihr einfach lichtbrechendes Verhalten, nennt man sie I-Bande (isotrop). Im Gegensatz dazu steht die dunkel scheinende A-Bande (anisotrop). Sie reicht über die volle Länge der beidseits befindlichen Myosinfilamente bis zum M-Band. Durch eine mediane Quervernetzung der Myosinfilamente untereinander wird das M-Band gebildet. Die regelmäßige Anordnung von Aktin- zu Myosinfilamenten ist ursächlich für das mikroskopische Lichtbrechungsverhalten, die sogenannte Querstreifung, die namensgebend für die quergestreifte Muskulatur ist, zu der Skelett- und Herzmuskelgewebe gehören (Knappes and Carlsen, 1968; Agarkova and Perriard, 2005).

Der Querbrückenzyklus, der zur mechanischen Kontraktion der Muskelfaser führt, entsteht durch ein ATP-abhängiges Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten. An den beweglichen Myosinköpfen befindet sich die Myosin-ATPase, welche durch Bindung von ATP seine Verbindung zu Aktin löst. Die Spaltung von ATP zu ADP und anorganischen Phosphat führt zu einer Konformationsänderung des Myosinkopfes: Der Myosinkopf wird gespannt. Durch Einströmen von Calcium in die Zelle wird die Bindungsstelle des Aktinfilaments für den Myosinkopf frei, sodass dieser an Aktin bindet.

Die Freisetzung des Phosphatrestes durch Myosin gibt Energie frei, die zu einem Abscheren des Myosinkopfes führt, dem sogenannten Kraftschlag. An Aktin gebunden wird diese Bewegung auf das Filament übertragen und vermittelt ein Ineinandergleiten des Aktins und Myosins. Durch die ADP-Freisetzung wird ein Querbrückenzyklus beendet. Myosin bleibt bis zur erneuten ATP-Aufnahme fest an Aktin gebunden (Sheetz and Spudich, 1983; Löffler *et al.*, 2014). Die I-Bande verbreitert bzw. verschmälert sich so je nach Kontraktionsstatus der Sarkomere. Kontraktionsbedingt verändert Titin seine Länge ebenfalls, überwiegend im elastischen I-Bandenbereich, und vermittelt damit passive Spannung durch seine elastischen Rückstellkräfte (Linke *et al.*, 1996; LeWinter *et al.*, 2007).

1.5 Titin

1.5.1 Struktur und Funktion

Mit bis zu 3700 kDa ist Titin das größte bisher bekannte Protein. Es befindet sich sowohl im Skelett- als auch im Herzmuskelgewebe und ist Teil des Sarkomers (LeWinter *et al.*, 2007). Sein N-terminales Ende ist in der Z-Scheibe verankert. In der I-Bandenregion enthält Titin mehrere elastische Elemente, die als „molekulare Feder“ die passive Spannung der Muskelfasern beeinflussen. Diese elastischen Elemente unterscheiden sich in den verschiedenen Isoformen. Das C-terminale Ende ist an die Myosinfilamente im Bereich der M-Linie gebunden, sodass Titin ein Halbsarkomer durchspannt (Granzier *et al.*, 1997; Bang *et al.*, 2001). Ein einziges Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 kodiert mit seinen 363 Exons für Titin (Bang *et al.*, 2001). In Herzmuskelgewebe lassen sich bedingt durch unterschiedliches Spleißen zwei verschiedene Isoformen finden: die kürzere und damit steifere N2B-Isoform (ca. 3000 kDa), sowie die längere elastischere N2BA-Isoform (ca. 3200-3700 kDa). Während der embryonalen Herzentwicklung lässt sich eine fetale N2BA-Version im embryonalen Herzen finden, die nach der Geburt durch eine kleinere N2BA- und die N2B-Isoform ersetzt wird (Opitz *et al.*, 2004). Spezies-abhängig gibt es eine unterschiedliche Verteilung von N2B zu N2BA. In adulten Rattenherzen wird beispielsweise zu 90 Prozent die N2B-Isoform exprimiert, wohingegen adulte Menschenherzen nur zu 65 % N2B aufweisen, zu 35 % wird hier die N2BA-Isoform exprimiert (Neagoe *et al.*, 2002).

In beiden Isoformen befindet sich vom N-Terminus ausgehend eine proximale Immunoglobulin-ähnliche Ig-Region sowie darauffolgend das herzspezifische N2-B Element, eine sogenannte *unique sequence*, auch N2-Bus genannt. Vom C-Terminus ausgehend weisen beide Formen eine Titin-Kinase auf, worauf eine distale Ig-Region sowie die sogenannte PEVK-Domäne folgen, ebenfalls eine *unique sequence*. Namensgebend für die PEVK-Domäne ist der hohe Anteil an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) sowie Lysin (K). In der längeren N2BA-Isoform befindet sich zusätzlich zwischen der N2-B- und der PEVK-Region eine dritte variable Ig-Region sowie die charakteristische N2-A Domäne, ebenfalls als *unique sequence* betitelt (Linke *et al.*, 1996; Neagoe *et al.*, 2002). In Verbindung mit einer längeren PEVK-Domäne weist die N2BA-Isoform daher zusätzlich zu ihrer größeren Dimension eine erhöhte Elastizität auf (Freiburg *et al.*, 2000; Greaser, 2002). In Abbildung 3 sind der schematische Aufbau sowie die Unterschiede der Titin-Isoformen zu sehen.

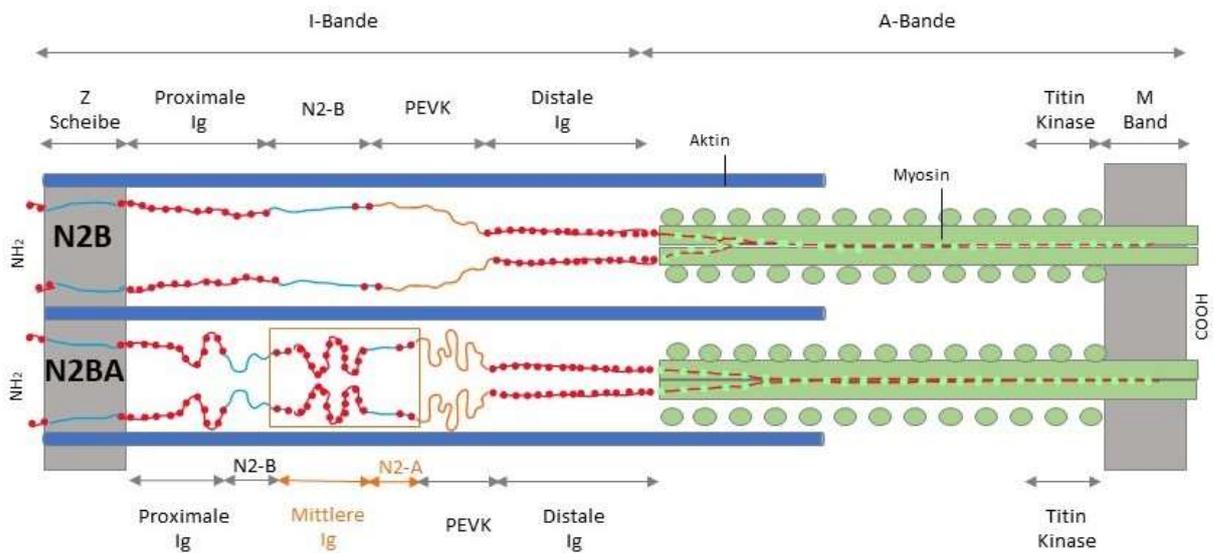


Abb. 4 Aufbau der Titin-Isoformen N2B und N2BA. Dargestellt ist ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band. Die zwei Isoformen setzen sich aus proximaler sowie distaler Ig-Domäne, PEVK-Region und N2-Bus zusammen. Zusätzlich befindet sich in der N2BA-Isoform noch eine mittlere Ig-Sequenz sowie das typische N2A-Segment.

Der I-Bandenbereich wird auch als molekulare Feder bezeichnet. Dies basiert auf seriell gekoppelten elastischen Segmenten im I-Band (Linke *et al.*, 1996). Diese besitzen unterschiedliche Rigiditäten und sorgen so für eine sequentielle Entfaltung (Krüger and Linke, 2011). Während der Sarkomer-Dehnung werden zuerst die Ig-Domänen extendiert. Die PEVK-Domäne sowie die N2-Bus Region folgen bei weiterer Dehnung. Die passive

Spannung erhöht sich und ähnlich einer Sprungfeder entstehen elastische Rückstellkräfte (Granzier *et al.*, 1997; Linke *et al.*, 1999). Die myokardiale Steifigkeit wird so bis zu einer physiologischen Sarkomerlänge von etwa 2,2 μm hauptsächlich durch die elastischen Rückstellkräfte des Titins vermittelt (Linke, Popov and Pollack, 1994; Granzier and Irving, 1995).

Die passive Steifigkeit des Herzmuskelgewebes kann durch das Expressionsverhältnis der Isoformen von N2BA zu N2B beeinflusst werden (Krüger and Linke, 2011). So zeigt sich bei Erhöhung der N2BA-Expression eine reduzierte passive Spannung und Steifigkeit der Herzmuskelzellen (Opitz *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2004). Mehrere Studien zeigen, dass im Rahmen von schweren dilatativen Kardiomyopathien sowie kardialen Ischämien ein erhöhtes N2BA-Vorkommen zu einer erniedrigten passiven Steifigkeit führt (Neagoe *et al.*, 2002; Makarenko *et al.*, 2004).

1.5.2 Modulation der passiven Steifigkeit durch Veränderungen der Titinphosphorylierung

Im Gegensatz zu den längerfristigen Veränderungen der passiven Spannung, bedingt durch den Titin-Isoformen-Switch, kann durch eine posttranslationale Modifikation eine kurzfristige Variation der Titin-Rigidität erreicht werden. Zu den Ursachen dieser posttranslationalen Veränderungen auf die I-Banden Region gehören Phosphorylierungsmodulationen sowie oxidativer Stress (Krüger and Kötter, 2016). Die passiven mechanischen Eigenschaften des Sarkomers können durch Phosphorylierungen in der N2-Bus und der PEVK-Region moduliert werden (Krüger, 2015). Phosphorylierungen in der Herz-spezifischen N2-Bus reduzieren die Titin-basierte Steifigkeit, wohingegen Phosphorylierungen in der PEVK-Region diese erhöhen. Mittels Massenspektrometrie und Autoradiographie konnten Serin (S)-Reste in den Domänen identifiziert werden, die durch spezielle Kinasen phosphoryliert werden (Krüger *et al.*, 2009; Kötter *et al.*, 2013).

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), die extrazellulär regulierte Kinase 2 (ERK2) sowie die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta (CaMKII δ) können die N2-B-Region des elastischen Titinsegments phosphorylieren. Unter anderem führen die Kinasen zu einer Phosphorylierung an Serinrest 4010 der N2-Bus (Yamasaki *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2009; Hamdani, Krysiak, *et al.*, 2013; Hidalgo *et al.*, 2013; Perkin *et al.*, 2015). Dies hat eine Zunahme der

Persistenzlänge (physikalisches Maß der Steifigkeit einer Polymerkette) zur Folge und führt folglich zu einer Reduktion der passiven Steifigkeit (Yamasaki *et al.*, 2002; Krüger and Linke, 2006; Krüger *et al.*, 2009). Die Titin-abhängige passive Spannung kann somit um bis zu 20 % reduziert werden (Krüger *et al.*, 2009).

Die PEVK-Region wird vornehmlich von der Proteinkinase C α (PKC α) phosphoryliert. Diese nutzt die Serinreste S11878 sowie S12022. Hierdurch folgt eine Verringerung der Persistenzlänge und somit eine Erhöhung der Titin-basierten Steifigkeit (Hidalgo *et al.*, 2009).

Zwar kann CaMKII δ -Titin ebenfalls im Bereich der PEVK-Domäne phosphorylieren, letztlich führt eine Aktivitätssteigerung von CaMKII δ allerdings zu einer Reduktion der passiven Steifigkeit, was sich durch ein Überwiegen der Phosphorylierung der N2-Bus erklären lässt (Hamdani, Krysiak, *et al.*, 2013).

Eine mögliche Erklärung für die phosphorylierungsabhängige Modulation der passiven Steifigkeit könnten die unterschiedlichen elektrostatischen Eigenschaften der N2-Bus und der PEVK-Region geben. Während die N2-Bus ein hohes Vorkommen an sauren und damit negativ geladenen Aminosäuren aufweist, setzt sich die PEVK-Region aus vermehrt basischen und damit positiv geladenen Aminosäuren zusammen. Durch eine hinzukommende negative Ladung der Phosphatgruppe könnte in der bereits negativ geladenen N2-Bus eine vermehrte intramolekulare Abstoßung entstehen und somit eine Erhöhung der Dehnbarkeit bzw. Reduktion der Steifigkeit folgern. Umgekehrt könnte die positiv geladene PEVK-Region durch eine weitere negative Ladung zusätzliche ionische Interaktionen erzeugen, was die elektrostatische Anziehung erhöhen würde und folglich die Dehnbarkeit vermindern würde. Dies würde in einer erhöhten Steifigkeit resultieren (Kötter *et al.*, 2013).

Mittels phospho-spezifischer Antikörper kann Phosphorylierung an den oben genannten Serinresten (S) nachgewiesen werden. Dies ermöglicht den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Titin-basierte Steifigkeit zu untersuchen. In Mäuseherzen beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass es in den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt zu einer Hyperphosphorylierung der PEVK-Region an S12022 und S11878, sowie zu einer Hypophosphorylierung der N2-Bus an S4010 kommt, welche eine Zunahme der passiven Steifigkeit bedingen (Kötter *et al.*, 2016).

Auch Diabetes Mellitus hat einen Einfluss auf Phosphorylierungsmodulationen und die damit bedingte Titin-basierte Steifigkeit von Kardiomyozyten. In diabetischen atrialen Proben menschlicher Herzen konnten signifikante Phosphorylierungsvermindierungen der N2-Bus, sowie signifikante Zunahmen in der PEVK-Region gemessen werden. Hierzu passend messbar war, dass die passive Steifigkeit humaner diabetischer Kardiomyozyten signifikant erhöht war. Versuche mit embryonalen Ratten Kardiomyozyten zeigten ebenfalls, dass nach 30-minütiger Insulinapplikation die Phosphorylierung von S11878 in der PEVK-Region deutlich anstieg (Hopf *et al.*, 2018). In einem Tiermodell mit ZSF1-Ratten, welches auf die Erkrankung mit Diabetes mellitus Typ 2 übertragbar ist, konnte ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung in der N2-Bus nachgewiesen werden. Diese Ratten entwickeln innerhalb von 20 Wochen zusätzlich zur diabetischen Stoffwechsellage eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Hypophosphorylierung der N2B-Region und die damit verbundene erhöhte passive Steifigkeit einen Beitrag zur myokardialen diastolischen Dysfunktion geleistet haben (Hamdani, Franssen, *et al.*, 2013).

Die basal erhöhte Steifigkeit in Herzen diabetischer Patienten scheint die postmyokardiale Umbau- und Anpassungsprozesse zu beeinflussen. Nach einem Myokardinfarkt entwickeln Diabetiker nachweislich häufiger eine diastolische Herzinsuffizienz (Stone *et al.*, 1989; Solomon *et al.*, 2002).

Nicht nur ischämische Bereiche sind von solchen Anpassungsprozessen betroffen. In Versuchen an Mäuseherzen konnte gezeigt werden, dass im Remote-Gebiet nach 60-minütiger linksventrikulärer Ischämie die passive Spannung signifikant erhöht war. Passend dazu war eine signifikante Hyperphosphorylierung der PEVK-Region messbar. Dies zeigt, dass Myokardischämie nicht nur Einfluss auf die Titin-Phosphorylierung ischämischer Kardiomyozyten nimmt, sondern auch der Remote-Bereich Anpassungsprozesse in der Titin-basierten Steifigkeit durchläuft (Isić, 2018).

Unzureichend untersucht ist bisher aber weiterhin, ob es auch zu möglichen Phosphorylierungsmodulationen des rechten Ventrikels nach linksventrikulärer Ischämie kommen kann.

1.6 Intrazellulärer proteolytischer Abbau

1.6.1 Polyubiquitinierung

Zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase werden alternde oder missgebildete Zellbestandteile einer Qualitätskontrolle unterzogen. Bevor Proteine einem jeweiligen Protein-Qualitäts-Kontroll-System zugeordnet und anschließend degradiert werden können, muss zuvor zur korrekten Zuordnung die sogenannte Ubiquitinierung erfolgen. Ubiquitin selbst ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein. Es wird kovalent über eine Carboxylgruppe seines Glycinrestes-76 (Gly-76) mittels Isopeptidbindung an einen Lysinrest des abzubauenen Proteins gebunden (Myung, Kim and Crews, 2001; Nandi *et al.*, 2006). Ubiquitinmoleküle können auch untereinander verknüpft werden und bilden so Polyubiquitinketten (Finley, 2009). Hierbei ist es wichtig, über welchen Lysinrest (Lys) der Ubiquitinmoleküle die Kette untereinander verknüpft wird. Wird die Kette über Lys-48 verknüpft, wird das an die Polyubiquitinkette gebundene Substrat an das Proteasom weitergeleitet. Geschieht eine Verknüpfung über Lys-63, erfolgt eine Markierung zum autophagosomalen Abbau (Nandi *et al.*, 2006; Nathan *et al.*, 2013). Diese beiden Protein-Qualitäts-Kontroll-Systeme werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert. Weitere mögliche Verknüpfungen können über Lys-6, Lys-11, Lys-27, Lys-29 und Lys-33 erfolgen (Lutz *et al.*, 2020).

Die Bildung der Polyubiquitinketten erfordert drei verschiedene Enzyme (E1, E2 und E3), die die Bindungen katalysieren (Nathan *et al.*, 2013). Zunächst erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin mittels des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) (Myung, Kim and Crews, 2001). Anschließend überträgt E1 das aktivierte Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2). Zuletzt folgt die Interaktion des beladenen E2 mit einer spezifischen Ubiquitin-Proteinligase (E3). E2 überträgt hierbei Ubiquitin auf E3. Die Proteinligase (E3) rekrutiert selektiv Substrate und katalysiert schließlich die Bindung zwischen diesen und den Ubiquitinmolekülen (Finley, 2009; Calise and Powell, 2013).

Sobald das Proteinsubstrat monoubiquitiniert ist, können neue Ubiquitinmoleküle mit ihrer Carboxylgruppe des Gly-76 an die Lysinreste 48 (K48) und 63 (K63) des bereits konjugierten Ubiquitin binden und somit eine Polyubiquitinkette bilden (Myung, Kim and Crews, 2001).

1.6.2 Das Autophagolysosomale-System (APS)

1.6.2.1 Definition und Ablauf der Autophagie

Autophagie bezeichnet einen intrazellulären Abbauprozess, bei dem zytoplasmatische Komponenten innerhalb von Autolysosomen degradiert und deren makromolekularen Bestandteile anschließend recycelt werden (Mizushima, 2007; Feng *et al.*, 2014). Dieser katabole Prozess findet in allen eukaryotischen Zellen statt und sorgt so mittels Protein- und Organellendegradation sowie anschließendem Recycling dafür, die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Verschiedene Einflüsse wie beispielsweise ein hoher energetischer Bedarf oder Nährstoffmangel führen adaptiv zu einer Hochregulierung autophagolysosomaler Prozesse (Levine and Kroemer, 2008). Die Autophagie dient nicht nur dem Zweck der Nährstoffbeschaffung, sondern auch dem der Zytoprotektion. Indem beschädigte Organellen, fehlgefaltete bzw. toxische Proteine sowie eindringende Mikroorganismen eliminiert und degradiert werden, wird eine Entsorgung von schädlichen Komponenten gewährleistet (Levine and Kroemer, 2008; Feng *et al.*, 2014).

Es lassen sich drei Formen der Autophagie unterscheiden: Makroautophagie, Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie – wobei die Makroautophagie die häufigste Form ist (Mizushima, 2007; Feng *et al.*, 2014). Daher wird sich diese Übersicht auf die Makroautophagie (hier: Autophagie) beschränken.

Zu den ersten Schritten gehört die Bildung der sogenannten Phagophore. Diese besteht aus einer C-förmigen Doppelmembranstruktur, die durch Verlängerung und Fusion der Enden Teile des Zytoplasmas umschließt und das Autophagosom bildet. Durch Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom kommt es zur Bildung des Autolysosoms, in dem die zelluläre Fracht sowie die innere Membran mittels Hydrolasen sequestriert und abgebaut wird (Levine and Kroemer, 2008; Hale *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014). Die hierbei frei werdenden Aminosäuren und Makromoleküle können so zur Herstellung neuer Proteine wiederverwendet werden (Hale *et al.*, 2013).

1.6.2.2 Regulation und Induktion der Autophagie mittels mTOR und AMPK α

Verschiedene Einflüsse können eine Adaption der Autophagie bewirken. Beispielsweise beteiligen sich Ernährungszustand, Infektionen, oxidativer Stress oder auch hormonelle Faktoren an der Regulation (Levine and Kroemer, 2008). Wichtige Schlüsselregulatoren sind hierbei die Proteinkinasen mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) und AMPK α

(AMP-aktivierte Proteinkinase α), die als Reaktion auf zellphysiologische Konditionen die Ausgewogenheit zwischen Autophagie und Zellwachstum steuern (Jung *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Die Serin/Threonin-Kinasen phosphorylieren ULK1 (*Unc-51 like autophagy activating kinase*) an unterschiedlichen Serin-Resten. ULK1 bildet mit ATG13 (*Autophagy-related-protein 13*), FIP200 (*family kinase-interacting protein of 200 kDa*) und ATG101 (*Autophagy-related-protein 101*) den sogenannten ULK1-Komplex. Nährstoffreiche Bedingungen führen zu einer Phosphorylierung von ULK1 durch mTOR und somit zur Hemmung der Autophagie. Im Gegensatz dazu führt Nährstoffdeprivation zu einer Hochregulierung der Autophagie durch Phosphorylierung von ULK1 durch AMPK α (Kim *et al.*, 2011; Bento *et al.*, 2016).

Durch die Nährstoffmangel-regulierte Autophagie-Induktion mittels AMPK α kann der aktivierte ULK1-Komplex nun selbst als Proteinkinase fungieren und Beclin 1 phosphorylieren. Beclin 1 ist Bestandteil des nachgeschalteten III PI3K-Komplexes (*Klasse-III-Phosphoinositid-3-Kinase-Komplex*), der unter anderem auch die namensgebende PI3-Kinase (*Phosphoinositid-3-Kinase; PI3K*) umfasst, welche für die Produktion von PI3P (*Phosphatidylinositol-3-Phosphat*) verantwortlich ist (Russell *et al.*, 2013; Bento *et al.*, 2016). PI3P ist ein wichtiger Bestandteil der Phagophorenbildung und auch elementar für die Rekrutierung weiterer Membranproteine und -lipide, sodass die Entstehung eines Autophagosoms ermöglicht werden kann (Shibutani and Yoshimori, 2014; Bento *et al.*, 2016).

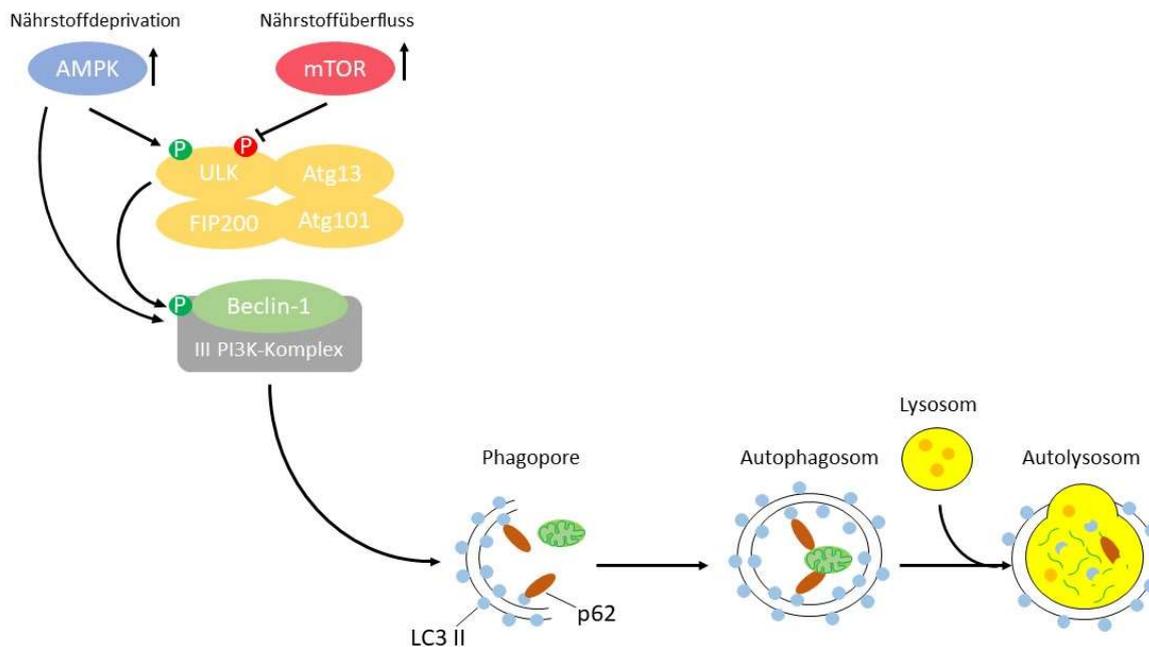


Abb. 5 Schematische Regulation der Autophagie und Autophagosombildung. Die Proteinkinasen AMPK α und mTOR bewirken durch die Phosphorylierung von ULK1 an verschiedenen Serinresten eine Induktion bzw. eine Inhibition der Autophagie. Bei Phosphorylierung durch AMPK α kann der ULK1-Komplex seinerseits den III PI3K-Komplex phosphorylieren und damit aktivieren. Dieser führt zu einer Rekrutierung von Doppellipidmembran-Bestandteilen (LC3 II, p62/SQSTM1) sowie zur Bildung und Beladung des Autophagosoms. Beclin-1 kann zusätzlich direkt durch AMPK α phosphoryliert werden.

Ein solches Protein ist LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), welches in seiner aktiven Form LC3 II an autophagosomale Membranen bindet. Aktiviert wird LC3 indem die zytoplasmatische Form LC3 I mit Phosphatidylethanolamin konjugiert wird, sodass die lipidierte Form LC3 II entsteht (Kabeya, 2000; Tanida, Ueno and Kominami, 2008; Runwal *et al.*, 2019). An die Doppellipidmembran gebunden fungiert LC3 II als Bindepotein für Autophagie-Rezeptoren wie p62/SQSTM1 (*p62/Sequestosom-1*). Autophagie-Rezeptoren wie p62/SQSTM1 können K63-ubiquitinierte Substrate erkennen und binden. Durch anderseitige Bindung an LC3 II ist p62/SQSTM1 so bei der selektiven Beladung des Autophagosoms unabdingbar (Stolz, Ernst and Dikic, 2014). Die sich im Inneren des Autophagosoms befindlichen Bestandteile werden durch die Fusionierung mit dem Lysosom degradiert, darunter das an der inneren Membran gebundene LC3 II sowie p62/SQSTM1 (Hale *et al.*, 2013; Lamark, Svenning and Johansen, 2017). Das an der äußeren Membranseite befindliche LC3 II allerdings kann durch die Bildung des

Autolysosoms dissoziieren und wird recycelt (Hale *et al.*, 2013; Shibutani and Yoshimori, 2014).

1.6.2.3 Einfluss von Pathologien auf die Autophagie

Nicht nur maligne Erkrankungen, bei denen es zu ungehindertem Tumorwachstum kommt, weisen Störungen im Signalweg der Autophagie auf (Mathew, Karantza-Wadsworth and White, 2007). Auch in diabetischen Kardiomyozyten konnten Veränderungen in Bezug auf die Autophagie wahrgenommen werden. Viele Studien konnten eine gehemmte Autophagie in diabetischen Herzen nachweisen. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass eine Verminderung der Autophagie einen Einfluss auf die Entstehung einer diabetischen Kardiomyopathie hat (Ouyang, You and Xie, 2014; Kobayashi and Liang, 2015). Auch kardialer Stress, wie er bei einer koronaren Herzerkrankung, arterieller Hypertonie oder auch Herzinsuffizienz auftritt, führt zu Fehlregulationen der Autophagie. In Herzbiopsien von Patienten mit diesen Erkrankungen konnte eine Akkumulation von Autophagosomen nachgewiesen werden (Terman and Brunk, 2005). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Autophagie bei Ischämie, aber auch in der Reperfusionphase, während einer kardialen Ischämie-Reperfusion-Verletzung, sprich einem Myokardinfarkt, vorliegt (Ma *et al.*, 2015). Bei der Entwicklung von kardialen Pathologien, u.a. Erkrankungen wie Myokardhypertrophie, Kardiomyopathien und ischämischer Herzkrankheit, ist eine fehlregulierte Autophagie nachweislich beteiligt (Terman and Brunk, 2005).

1.6.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

1.6.3.1 Definition und Aufbau

Ein weiterer intrazellulärer proteolytischer Abbauweg erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Hier können im Gegensatz zur Autophagie ausschließlich Proteine endoproteolytisch aufgespalten werden (Nandi *et al.*, 2006; Gallastegui and Groll, 2010). Das UPS spielt eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle veralteter und fehlgefalteter Proteine und übernimmt deren Degradation (Finley, 2009).

Durch Ubiquitin-Ketten markiert, erkennt das 26S-Proteasom gekennzeichnete Proteine und baut diese zu definierten Oligopeptiden ab. Das 26S-Proteasom lässt sich in zwei Untereinheiten einteilen: der 19S-Regulatorpartikel-Komplex (RP), der die ubiquitinierten

Substrate erkennt und entfaltet, und der 20S-Proteasom Kernpartikel (CP), der für die weitere Proteolyse zuständig ist (Gallastegui and Groll, 2010).

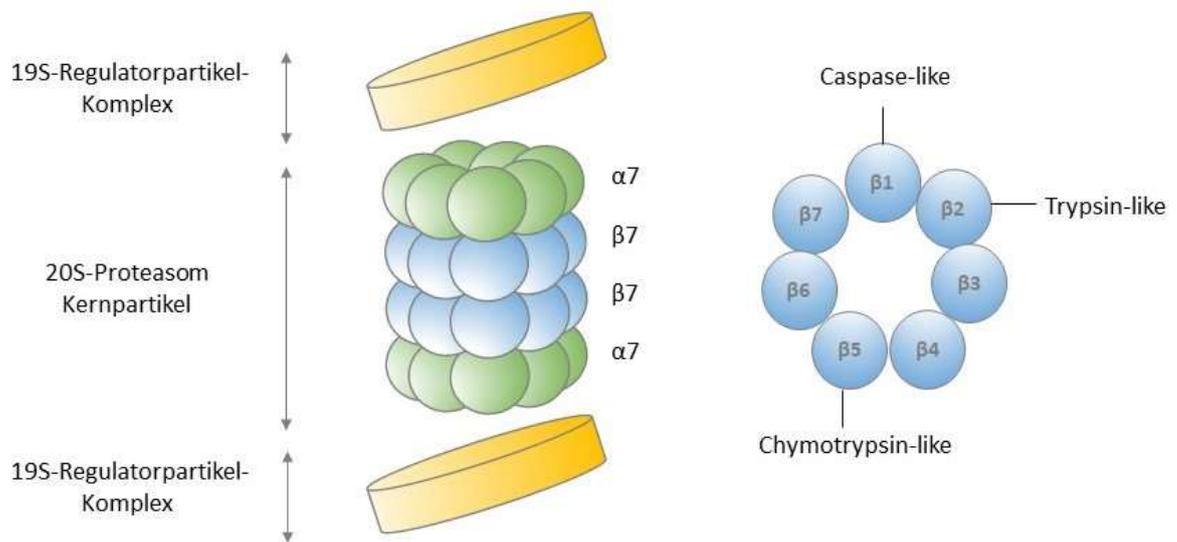


Abb. 6 Darstellung des 26S-Proteasoms. Der 20S-Proteasom-Kernpartikel bildet mit einem oder zwei 19S-Regulatorpartikel-Komplexen das 26S-Proteasom. Das 20S-Proteasom besteht aus vier heptameren Ringen. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus α -Untereinheiten, wohingegen die beiden inneren aus β -Untereinheiten zusammengesetzt sind. β_1 , β_2 - und β_5 -Untereinheit besitzen Protease-Aktivitäten zur Spaltung der Proteine.

Der 19S-Regulatorpartikel-Komplex bindet in Gegenwart von ATP an eines der Enden des 20S-Kernpartikels. Erkannte ubiquitinierte Proteine werden nun entfaltet und deubiquitiniert (Nandi *et al.*, 2006). Von hier aus werden sie weiter zur 20S-Einheit geschleust. Das 20S-Proteasom setzt sich aus vier gestapelten, heptameren Ringen aus α - und β -Untereinheiten zusammen. Jeder Ring besteht aus sieben Untereinheiten. Die inneren beiden Ringe bestehen aus β -Untereinheiten, die äußeren beiden setzen sich aus α -Untereinheiten zusammen (Myung, Kim and Crews, 2001). Die α -Ringe betreiben die Substratkontrolle beim Eintritt der Proteine und bilden eine Barriere zwischen Zytoplasma und katalytischem Zentrum (Nandi *et al.*, 2006). Das katalytische Zentrum selbst wird durch die β -Ringe gebildet. Drei der sieben β -Untereinheiten werden als katalytisch aktive Proteasen bezeichnet: β_1 -Caspase-like, β_2 -Trypsin-like und β_5 -Chymotrypsin-like. Dies bedeutet, dass sie über eine proteolytische Aktivität wie Caspase, Trypsin oder Chymotrypsin verfügen und somit die Proteine in wiederverwendbare Oligopeptide spalten (Gallastegui and Groll, 2010).

1.6.3.2 Einfluss von Pathologien auf das Proteasom

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist eine ungestörte Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems essentiell (Gallastegui and Groll, 2010). Verschiedene Pathologien allerdings können die Proteasom-Aktivität beeinflussen. Studien konnten nachweisen, dass durch den Einfluss von Diabetes mellitus Herzmuskelzellen eine verringerte proteasomale Aktivität aufwiesen. Es wird angenommen, dass dies einen Anteil an der Entstehung der diabetischen Kardiomyopathie trägt (Li *et al.*, 2017).

Versuche an Endothelzellen wiesen allerdings eine durch Hyperglykämie induzierte Erhöhung der 26S-Proteasomfunktionalität nach, die sich so auch übertragbar bei Diabetes mellitus manifestieren soll (Liu *et al.*, 2012). Der genaue Einfluss durch Diabetes mellitus auf das UPS von Kardiomyozyten muss weiterhin geklärt werden. Eindeutig allerdings ist, dass die Hyperglykämie ein entscheidender Modulator ist (Aghdam *et al.*, 2013).

Auch durch Myokardiale Ischämie wird in vielen Studien eine bedingte Dysfunktionalität der Proteasom-Aktivität beobachtet (Calise and Powell, 2013). Mittels 30-minütigen Verschlusses der LAD (*left anterior descending artery*) konnte in einem In-vivo Rattenmodell nachgewiesen werden, dass es in Kardiomyozyten zu einer Abnahme der proteasomalen *Trypsinlike*-Aktivität der β 2-Untereinheit kommt, gekoppelt mit einem Anstieg ubiquitinerter Proteine (Bulteau *et al.*, 2001). Dies führt zur Annahme, dass durch Myokardischämie eine proteasomale Insuffizienz folgt, die zu einer erhöhten Anzahl ubiquitinerter myokardialer Proteine führen könnte (Calise and Powell, 2013). Kötter *et al.* wiesen 2016 allerdings nach, dass die proteasomale Aktivität nach 3 Tagen permanenter Ligatur von Mäuseherzen erhöht war, was zu einer Anhäufung ubiquitinerter Proteine führte. Um hier den vollständigen Einfluss myokardialer Ischämie auf Herzmuskelgewebe und seine proteasomale Aktivität definieren zu können, müssen weiterhin fortführende Untersuchungen durchgeführt werden.

1.6.4 Titin innerhalb der Protein-Qualitäts-Kontrolle

Titinmoleküle werden über verschiedene Prozesse ab- und umgebaut. Durch seine enorme Größe von bis zu 3700 kDa wird angenommen, dass Titin zunächst durch Proteasen wie Calpain aus dem Sarkomerverband gelöst wird (Linke and Krüger, 2010;

Kötter, Andresen and Krüger, 2014). Es gibt Hinweise, dass unterschiedliche Regionen Titins über verschiedene Protein-Qualitäts-Kontroll-Systeme abgebaut werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Titin mit mehreren Mitgliedern der Proteinqualitätskontrollmaschinerie interagiert. MuRF Proteine (*muscle specific ring finger*), welche zu den E3-Ubiquitin-Ligasen gehören, binden an unterschiedliche Titin-Abschnitte und sorgen so für seine Ubiquitinierung und den gezielten Abbau (Müller *et al.*, 2021). Die Interaktion mit E3-Ubiquitin-Ligasen ermöglicht je nach Ubiquitinierung den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System oder die Degradation via Autophagolysosomalen-System (Müller *et al.*, 2021). Weitere interagierende Proteine, die Titins Protein-Qualitäts-Kontrolle beeinflussen, sind die Autophagierezeptoren Nbr1 (*Next to BRCA1 Gene 1 Protein*) und p62/SQSTM1. Diese binden im Bereich der Titin-Kinase-Domäne und ermöglichen so eine Degradation mittels APS (Lange, 2005; Bogomolovas *et al.*, 2021). Die vollständigen Ab- und Umbauprozesse von Titin sind allerdings noch nicht restlos ergründet und bedürfen weiterer Untersuchungen.

2. Zielsetzung

An Diabetes mellitus erkrankte Patienten zeigen nach einem Myokardinfarkt ein drastisch verschlechtertes Outcome. Auch außerhalb des ischämischen Infarktbereichs, im benachbarten Remote-Gebiet, zeigen sich fibroreperative Prozesse, die ursächlich für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sein können und somit zur progressiven Verschlechterung der Herzfunktion beitragen. Um neue Behandlungskonzepte zu entwickeln, ist es nötig das maladaptive Remodeling im Remote-Bereich zu verstehen. Hierzu wurden rechtsventrikuläre Proben von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen unter der Simulierung eines Myokard-Infarktes, mittels LAD-Ligatur untersucht. Grundsätzlich geht Diabetes mellitus mit gravierenden Störungen im Muskelproteinstoffwechsel einher, sodass es wichtig ist zu verstehen, ob Kardiomyozyten sowohl Veränderungen in der Protein-Qualitäts-Kontrolle aufweisen als auch zusätzliche Modifikationen nach Myokardinfarkt entstehen. Hierzu wurden Autophagiemarker und Regulationsproteine in den verschiedenen Versuchsgruppen analysiert. Darüber hinaus wurden anhand von Polyubiquitinierungsmarkern speziell Veränderungen in der Titin-Degradation untersucht.

Anhand von Titinphosphorylierungen im elastischen I-Bandenbereich konnten bereits in mehreren Studien Modulationen der mechanischen Eigenschaften des Myokards, der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit, nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Dissertation soll darüber hinaus untersucht werden, welchen Einfluss die diabetische Stoffwechsellage auf Titinmodifikationen während der postischämischen frühen Anpassungsreaktion des Remote-Myokards hat.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

In den durchgeführten Experimenten wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien, falls nicht anders angegeben, laut den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid /Bisacrylamid	Roth
Acrylamid /Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bradford-Reagenz	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent)	Millipore
Essigsäure	Roth
Ethanol vergällt	VWR
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Isopropanol	Merck
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nonident P40	Sigma
Salzsäure 32%	VWR

Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

3.1.2 Puffer und Lösungen

In den durchgeführten Experimenten wurden die Puffer und Lösungen aus Tabelle 2, falls nicht anders angegeben, laut den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2: Puffer/Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS – Laufpuffer (pH >8.3)	250mM Tris 2M Glycin 1% (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x TBST (pH 7,4)	0,2M Tris 1,5M NaCl 1% Tween-20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris/ HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris/ HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300mM Tris/ HCl 100mM Tricine
Blockierlösung	2% BSA in 1x -TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300mM Aminocaprinsäure 30mM Tris/HCl
PVDF <i>destain</i>	10% (v/v) Essigsäure

	40% (v/v) Ethanol
PVDF stain	0,075% Serva Blue in Methanol
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea 2M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05M Tris/HCl
Stripping Buffer (pH 7,5)	6M Guanidinhydrochlorid 20mM Tris 0,2% Nonident P40 0,1M β -Mercaptoethanol

3.1.3 Laborgeräte

In den durchgeführten Experimenten wurden die Laborgeräte aus Tabelle 3 verwendet.

Tabelle 3: Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemieluminescent Imager	Fusion FX	Thermo Scientific
Chemieluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Feinwaage	ADB 200-4	KERN ADB
Feinwaage	AE163	AE163 Mettler
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR

Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
PC	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Power Blotter Station	Invotrogen	Thermo Fisher Scientific
Vortexer	444-1372	VWR
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
UV/Visible Spectromphotometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech
Waage	KERN 572	KERN
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

3.1.4 Antikörper

In den durchgeführten Experimenten wurden primäre und sekundäre Antikörper aus Tabelle 4 verwendet.

Tabelle 4: Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
α -Actinin	1:5000	Kaninchen	Cell Signalling
Phospho-S11878	1:2000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-S12022	1:2000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-S4010	1:2000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-AMPK α (Thr172)	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
AMPK α	1:2000	Kaninchen	Abcam
LC3B	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling

P62/SQSTM1	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
Phospho-mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
K48-Polyubiquitin	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
K63-Polyubiquitin	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling
PEVK total	1:30 000	Kaninchen	Eurogentec

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
Anti-rabbit IgG, Horseradishperoxidase (HRP)-linked	1:10000	Kaninchen	Cell Signalling

3.2 Methoden

3.2.1 Probenherkunft

Die Tierversuchsgenehmigung für die verwendeten Proben liegt vor (Az.84-02.04.2013.A122). Eine Genehmigung zur Tiertötung zwecks Organentnahme liegt vor (Projektnummer O 29/11). Die Tierversuche, Tiertötung und Probengewinnung wurden durch Dominik Semmler, Prof. Joachim Schmitt, Dr. Annette Kronenbitter sowie Małgorzata Isić durchgeführt.

3.2.2 Verwendetes Tiermodell

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 12- bis 14-wöchige männliche db/+ und db/db Mäuse, mit jeweils mindestens 5 Tieren pro Versuchsgruppe. Die db/db Mäuse weisen eine diabetische Stoffwechsellage durch eine Punktmutation im Rezeptor des Sättigungshormons Leptin auf. Hierdurch kann Leptin nicht an seinen zugehörigen Rezeptor binden und kein Sättigungsgefühl vermitteln. Es kommt folglich zu einem erhöhten Nahrungsverzehr, einer Gewichtszunahme, einer Hyperglykämie, einer Hyperinsulinämie und zu einer Insulinresistenz. Dies ähnelt der diabetischen Stoffwechsellage des Diabetes Mellitus Typ 2 bei Menschen. Die Heterozygoten db/+ Mäuse weisen eine physiologische Stoffwechsellage auf (Tartaglia, 1997).

Die Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt: db/+ Sham, db/+ Ischämie/Reperfusion (IR), db/db Sham, db/db IR. Es wurden nur db/db Mäuse der Versuchsgruppe zugeordnet, die >35g wogen, und eine Blutglukosekonzentration >300 mg/dl aufwiesen.

Bei allen Versuchstieren (Versuchs- und Kontrollgruppe) wurde operativ eine Ligatur unterhalb des Ramus interventricularis anterior der linken A. coronaria (LAD - left anterior descending artery) angebracht. Hierzu wurden die Tiere mit 100 mg/kg Ketamin sowie 10 mg/kg Xylazin intraperitoneal (i.p) anästhesiert. Zusätzlich erfolgte die Gabe von 0,05mg/kg Buprenorphin subcutan (s.c.). Mittels Braunüle wurden die Tiere intubiert und an einem Kleintier-Respirator mittels einem Luftgasgemisch (40% O₂ sowie 2-3% Isofluran) mit einer Atemfrequenz von 150/min und einem Tidalvolumen von 250 ml beatmet. Während der gesamten Operation sowie des Erwachens befanden sich die Tiere auf einer Wärmeplatte. Nach Erreichen einer ausreichenden Analgesie erfolgte die Eröffnung des Thoraxes zwischen der 3. und 4. Rippe linksthorakal sowie die Eröffnung des Perikardes. Es erfolgte das Einsetzen von Retraktoren zur besseren Übersicht. Nach Auffinden der LAD wurde ein Prolenefaden der Stärke 7-0 unterhalb der Arterie geführt. Die Enden wurden durch einen Okkluder gefädelt und ca. 15 cm je Seite belassen. Der Thorax wurde mittels 5-0 Naht verschlossen. Die Enden der Fäden wurden s.c. belassen und anschließend erfolgte ein cutaner Verschluss. Perioperativ wurden die Tiere mit 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. weiter analgesiert. Dieses Mittel erhielten sie alle 6-8 h weiter bis einschließlich zum dritten postoperativen Tag.

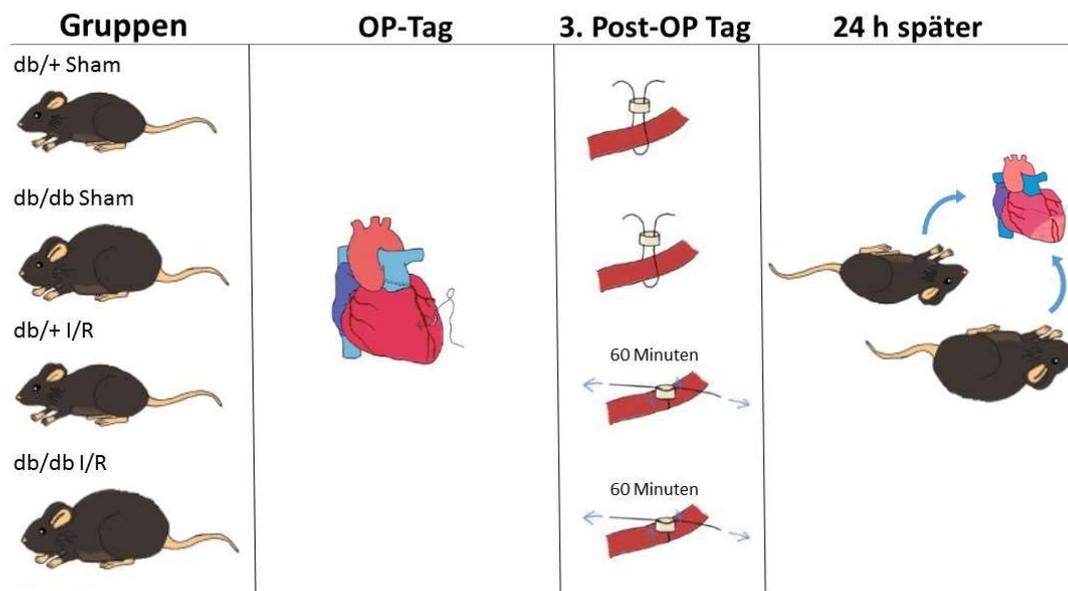


Abb. 7 Ablauf des Versuchsaufbaus. Die Ligaturhilfen wurden in allen vier Gruppen am OP-Tag angebracht. Am 3. Post-OP Tag wurde eine *closed-chest* Ischämie bzw. simulierte 'Sham' Ischämie durchgeführt. 24h später wurden die Herzen aller Versuchstiere entnommen (Isić, 2018, modifiziert).

Am dritten postoperativen Tag erfolgte das Auslösen der Ischämie/Reperfusion in den zwei Versuchsgruppen (db/+ IR, db/db IR) sowie die Sham Operation (kein Auslösen einer IR) in den zwei Kontrollgruppen (db/+ sham, db/db sham).

Hierzu erfolgte eine Narkose mit 2% Isofluran sowie eine Lagerung peri- als auch postoperativ auf einer Wärmeplatte. Durch Aufnahme eines Echokardiogramms (EKG) konnte die Herzaktivität verfolgt werden. Es wurde die Cutannaht eröffnet und die Fadenenden extrathorakal herausgeführt. Echokardiographisch ließ sich eine normale Herzaktivität beobachten. Anschließend wurde in der Gruppe der IR-Tiere eine 60-minütige Okklusion der LAD durch Ziehen der Fadenenden verursacht, die sich echokardiographisch durch eine ST-Streckenhebung zeigte. Durch Lösen der Fäden wurde eine ebenfalls echokardiographisch beobachtete Reperfusions-Phase eingeleitet. In der Kontrollgruppe (Sham) kam es zu keiner Okklusion der Fäden, sodass keine ST-Streckenhebung echokardiographisch nachweisbar war. 60 Minuten später wurden die Fadenenden abgeschnitten sowie die Haut erneut mit 5-0 Faden verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere weiterhin mit 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. alle 6-8 h analgesiert. 24h nach der Reperfusion bzw. Sham-Operation wurden die Tiere mittels Isofluran Überdosierung getötet und es erfolgte die Organentnahme. Nach der

Herzentnahme wurden Proben des rechten Ventrikels abgetrennt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Probenaufbereitung

Zur Analyse der unterschiedlichen Proteinstrukturen wurden die rechtsventrikulären Proben der Kontroll- und Versuchsgruppen bei Raumtemperatur solubilisiert. Dies erfolgte durch Hinzugabe von SDS-Probenpuffer (siehe Tabelle 2) und DTT sowie anschließender mechanischer Zerteilung. Das Gemisch wurde in einem Mikroreaktionsgefäß zentrifugiert und 30 min auf Eis gestellt. Es folgte die drei-minütige Erhitzung der Proben auf 98 Grad Celsius zur Auffaltung der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Je 2µl/Probe wurde mit 18 µl destilliertem Wasser vermischt. Hieraus wurden erneut 2 µl entnommen und mit 800 µl destilliertem Wasser sowie 200 µl Bradford Reagenz aufgefüllt. Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach den Herstellerangaben der Firma SIGMA. Hierzu wurde die Extinktion der Proben bei $\lambda=595$ nm gemessen und durch Verwendung einer Eichgeraden die Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proteinauftrennung nach Größe erfolgte durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurden Standardgele mit 7,5%-12,5% Acrylamidgehalt verwendet. Das obere Sammelgel wurde ebenfalls gemäß Tabelle 5 hergestellt. Mittels SDS (Natriumdodecylsulfat)-Zugabe erhielten die Proteine eine gleichmäßig negative Ladung, sodass die Molekülmasse entscheidend für die Auftrennung im Gel war. Je nach Polyacrylamid-Konzentration konnten Proteine in verschiedenen Größenbereichen dargestellt werden.

Tabelle 5: Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele

Lösung	Trenngel 7,5%	Trenngel 12,5%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	3,75ml	6,25ml	0,667ml
H ₂ O _{bidest}	7,5ml	5ml	3,025ml

4 x-SDS- Trenngelpuffer	3,75ml	3,75ml	-
4 x-SDS- Sammelgelpuffer	-	-	1,25ml
TEMED	7,5ul	7,5ul	15ul
APS	75ul	75ul	50ul
Gesamtvolumen	15ml	15ml	5ml

Zur Darstellung des über 3 MDa großen Proteins Titin wurden mit Agarose-stabilisierte 2,1%ige Polyacrylamid-Gele verwendet (Tabelle 6). Diese wurden mittels 1,5%iger Argarose stabilisiert.

Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingele

Lösung	Titingele 2,1%
30% Acrylamidlösung	1,40ml
H ₂ O _{bidest}	6,67ml
4 x-SDS-Trenngelpuffer	5ml
SDS 20%	100ul
TEMED	11,5ul
APS	150ul
Agarose 1,5%	6,67ml
Gesamtvolumen	20ml

Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Größe. Hierzu wurden die Kammern Mini-Twin (Biometra) und Mini-PROTEAN (Biorad) genutzt und mittels 30mA/Standardgel und 2 mA/Titingel erfolgte eine Auftrennung der in den Proben befindlichen Proteine nach Größe. Standardgele wurden zusätzlich zu den verschiedenen Proben mit einem Marker zur Feststellung des Molekulargößenbereich versehen. Die Auftrennung mittels Stroms erfolgte, bis die Bromphenolblaufront des Laufpuffers den unteren Gelrand verließ.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde in Anodenpuffer getränktes Whatman-Papier auf die Anode der Apparatur gelegt, es folgte die PVDF-Membran sowie das Gel mit den zuvor aufgetrennten Proteinen. Um eine Übertragung auf die Membran zu ermöglichen, wurde ebenfalls in Kathodenpuffer getränktes Papier auf das Gel gelegt, sodass mittels 1.5A Stromstärke unter 20V ein Proteintransfer erfolgte. Anschließend erfolgte eine Färbung mittels PVDF-Stain zur Kontrolle des Proteintransfers, eine Entfärbung mit PVDF-Destain sowie drei 10-minütige Waschungen mit TBST.

3.2.3.3 *Immundetektion*

Im Anschluss erfolgte eine 2-stündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in TBST + 2% Rinderserumalbumin (BSA). Die Membran wurde folgend mit dem jeweiligen primären Antikörper in Tabelle 4 in genannter Konzentration inkubiert. Nach einer 15-stündigen Inkubationszeit erfolgten drei 10-minütige Waschungen, um Reste des primären Antikörpers zu entfernen. Der sekundäre Antikörper, welcher die Fc-Region des primären Antikörpers bindet, wurde ebenfalls wie in Tabelle 4 beschriebener Konzentration verwendet und es erfolgte eine erneute Inkubationszeit von 2 Stunden sowie die anschließenden drei Durchgänge 10-minütiger Waschung.

Der Sekundär-Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase assoziiert, welche bei Verwendung eines Chemilumineszenzreagenzes ein detektierbares Lichtsignal erzeugt. Dieses Signal ist äquivalent zur Menge des gebundenen Antikörpers und lässt daher auf die Menge des Proteins bzw. den Phosphorylierungsstatus des Proteins schließen. p62/SQSTM1 und LC3 II wurden zur Normierung hier mit dem Protein Aktinin der jeweiligen Probe in Relation gesetzt. Um die Phosphorylierung bestimmter Proteinstrukturen unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, musste ein Zweit-Antikörper, der pan-Antikörper, auf die jeweilige Membran gegeben werden, der dann als Beladungskontrolle in Bezug zum Phospho-Antikörper gesetzt werden konnte. Hierzu wurde die PVDF-Membran in Stripping Buffer, welcher β -Mercaptoethanol enthält, inkubiert und folglich die gebundenen Phospho-Antikörper gelöst. Es erfolgte wie oben bereits beschrieben die Bindung des primären und sekundären Antikörpers. Das hier ebenfalls gemessene Lichtsignal des pan-Antikörpers wurde mit dem Lichtsignal des Phospho-Antikörpers in Relation gesetzt und war somit vergleichbar.

Die Pixeldichte wurde mit dem Programm Image J gemessen und Phospo- mit pan-Werten sowie p62/SQSTM1 und LC3 II mit Aktinin in Relation gesetzt. Die quantifizierten Werte wurden zur Normierung durch den Mittelwert aller Kontrollen eines Blots dividiert und sind daher als relative Werte angegeben.

3.2.4 Software

Für die Ergebnisauswertung sowie Erstellung und Ausarbeitung der Dissertation wurden zusätzlich zu im Text aufgeführten Programmen folgende Software verwendet: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, Image J und GraphPad Prism 9.2.0.

3.2.5 Statistik

Die relativen Werte der Proteinbanden, je Versuchsgruppe $N \geq 4$, werden mit Hilfe der Mittelwert-Bestimmung sowie Ermittlung des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) in den folgenden Diagrammbalken präsentiert. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 9.2.0 mittels Two-Way ANOVA. P-Werte $< 0,05$ wurden hier als statistisch signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion (I/R) auf Titin-Phosphorylierungen

4.1.1 Signifikante Zunahme der PEVK-Phosphorylierungen in db/db Sham Gewebe

Zur Messung des Phosphorylierungsniveau der elastischen I-Bandenregion, hier speziell der PEVK-Region, wurden zwei phospho-spezifische Antikörper angewendet, die an den phosphorylierten Serinresten (S11878, S12022) binden. Eine Phosphorylierungs-Zunahme in der PEVK-Region bedingt eine Zunahme der passiven Steifigkeit (Hidalgo *et al.*, 2009). Mittels Titin(pan)-Antikörper erfolgte eine Normierung aller Gruppen auf die gesamte Titinmenge in der Probe. Im nicht-diabetischen db/+ Myokard zeigte sich nach Ischämie/Reperfusion ein Anstieg der relativen Phosphorylierung an S11878 um $11,57 \pm 11,65\%$ verglichen mit der Sham-operierten Kontrollgruppe (Abb. 8A). Im diabetischen db/db Sham Myokard konnte eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S11878 um $30,10 \pm 3,75\%$ nachgewiesen werden (Abb. 8A). Nach Ischämie/Reperfusion (I/R) zeigte sich in der db/db Gruppe keine weitere Phosphorylierungs-Zunahme an S11878 (Abb. 8A).

Bezüglich der S12022 Phosphorylierung zeigten die diabetischen db/db Gewebe höhere Phosphorylierungslevel als die nicht diabetischen Proben (Sham und I/R). In den db/+ Geweben nach I/R ließ sich verglichen mit der Kontrollgruppe sogar eine Abnahme um $17,81 \pm 3,20\%$ messen (Abb. 8B). Das diabetische db/db Sham Myokard zeigte gleich der S11878-Phosphorylierung eine signifikante Phosphorylierungs-Zunahme an S12022 um hier $108,74 \pm 41,10\%$ (Abb. 8B). Auch im db/db Myokard ließ sich durch Ischämie/Reperfusion an S12022 keine weitere Zunahme messen, sondern ein geringeres Phosphorylierungslevel, verglichen mit der Kontrollgruppe um $52,02 \pm 24,64\%$ gesteigert (Abb.8B).

4.1.2 Phosphorylierungen der N2-Bus

In der *unique sequence* N2-Bus wurden Phosphorylierungsmodulationen am Serinrest S4010 gemessen (Abb. 8C). Eine erhöhte Phosphorylierung in dieser Region vermindert

die passive Steifigkeit von Kardiomyozyten (Krüger *et al.*, 2009). Auch hier erfolgte die Normierung des Phosphosignals auf das Titin(pan)-Signal.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe db/+ Sham konnten in den drei weiteren Gruppen nur geringe Phosphorylierungszunahmen um ca. 3-6% gemessen werden (Abb. 8C). Hier ließen sich durch Diabetes mellitus und I/R keine statistisch signifikanten Phosphorylierungsmodulationen feststellen.

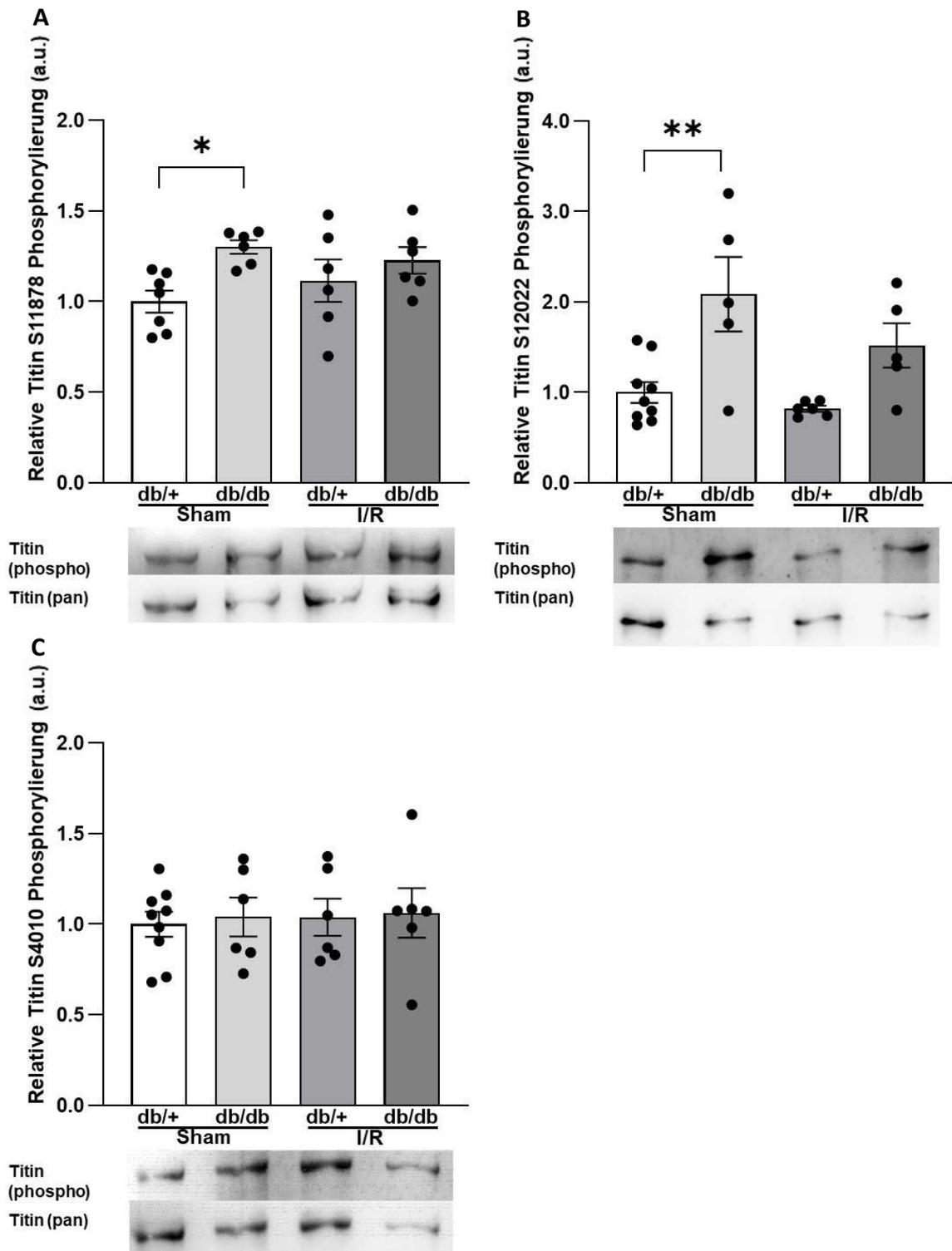


Abb. 8 Phosphorylierungsmodulationen an S11878, S12022, S4010. Western blot Analysen der Phosphorylierung an den jeweiligen Serinresten S11878 (A), S12022 (B) und S4010 (C) in der I-Bandenregion Titins. Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normiert. Es wird der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit */** gekennzeichnet (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; in *two-way* ANOVA). Hierbei wurden mindestens $n=5$ Gewebe pro Versuchsgruppe analysiert. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Blots zu finden.

4.2 Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion auf das Autophagolysosomale-System

4.2.1 Die Autophagieregulatoren mTOR und AMPK α

Die beiden Regulator-Kinasen mTOR und AMPK α spielen eine zentrale Rolle im Autophagolysosomalen-System. Durch Phosphorylierung aktiviert führt mTOR zu einer Inhibition der Autophagie. AMPK α hingegen induziert die Autophagie, sobald die Kinase phosphoryliert ist (Kim *et al.*, 2011).

Phospho-spezifische Antikörper wurden genutzt, um die jeweilige Menge der aktiven Kinasen zu bestimmen und diese wurde auf die Gesamtzahl der Kinasen, gemessen durch einen pan-Antikörper, normiert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (db/+ Sham) zeigten sowohl die db/db Sham als auch die db/+ I/R Gewebe tendenziell eine Aktivitätsverringering beider Kinasen (Abb. 9A/9B). Die db/db Sham Gewebe wiesen hier eine Verringerung für die mTOR-Phosphorylierung um $10,36 \pm 4,44\%$, für die von AMPK α um $20,04 \pm 8,98\%$ auf (Abb. 9A/9B). Nach Ischämie/Reperfusion war die phosphorylierungsbedingte mTOR-Aktivität der db/+ Gewebe um $10,26 \pm 11,08\%$ verringert und die der AMP-Kinase α um $6,88 \pm 7,46\%$ (Abb. 9A/9B).

In den diabetischen db/db Geweben nach Ischämie/Reperfusion zeigte sich ebenfalls eine Verminderung der phosphorylierten AMP-abhängigen Kinase α um $4,83 \pm 14,93\%$ (Abb. 9B). Die phospho-mTOR-Level dieser Gewebe hingegen zeigten nach Ischämie/Reperfusion eine Steigerung um $23,91 \pm 13,88\%$ verglichen mit der db/+ Kontrollgruppe (Abb. 9A). Vergleicht man die diabetischen Proben hingegen miteinander (db/db Sham vs. db/db I/R), zeigte sich sogar eine signifikante Steigerung ($p=0,031$) der mTOR-Phosphorylierung im Remote-Gebiet der diabetischen Gewebe. Diese Signifikanz zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der nicht diabetischen zu den diabetischen Geweben nach Ischämie/Reperfusion ($p=0,046$) (Abb. 9A).

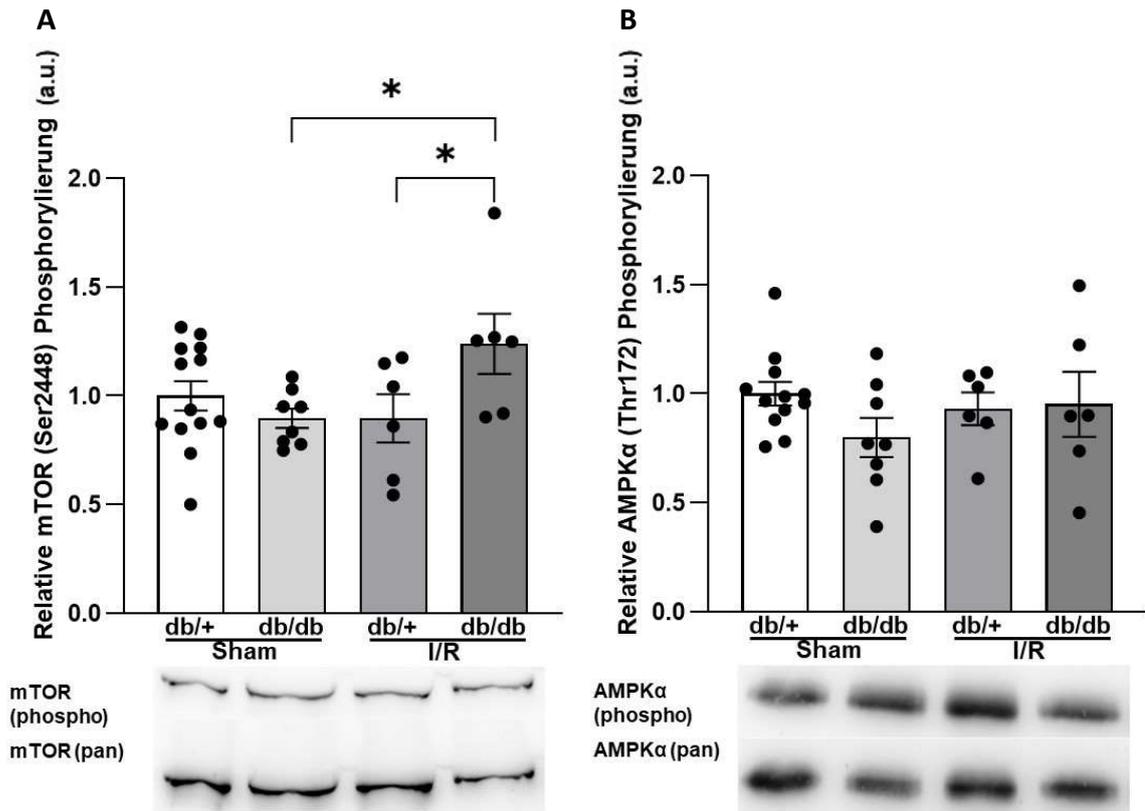


Abb. 9 Veränderungen der mTOR und AMPKα Phosphorylierung. Phosphorylierungsbedingte Aktivität der Proteinkinase mTOR: mTOR(phospho) in Relation zu mTOR(pan) (A). Phosphorylierungsbedingte Aktivität der Proteinkinase AMPKα: AMPKα(phospho) in Relation zu AMPKα(pan) (B). Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normiert. Es wird der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit */** gekennzeichnet (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; in *two-way* ANOVA). Hierbei wurden mindestens $n=5$ Gewebe pro Versuchsgruppe analysiert. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Blots zu finden.

4.2.2 LC3 II und p62/SQSTM Level

Das lipidierte Membranprotein LC3 II sowie der Autophagierezeptor p62/SQSTM (p62) sind wichtige Bestandteile des Phagosoms und durch Bindung von abzubauenen-Molekülen elementar an der Autophagie beteiligt (Tanida, Ueno and Kominami, 2008; Bjørkøy *et al.*, 2009). Bei der Degradation von Zellsubstraten werden die innenbefindlichen LC3 II sowie p62 Moleküle ebenfalls zersetzt. Die hier ermittelte Proteinmenge der jeweiligen Gewebe wurde zur Quantifizierung auf α -Aktinin normiert. Bei der Betrachtung der LC3 II-Level war in den db/db Sham Geweben ein signifikanter Anstieg um $67,02 \pm 15,14\%$ zu sehen (Abb. 10A). Auch die db/+ und db/db Gewebe nach I/R zeigten einen tendenziellen Anstieg der LC3 II-Level, wiesen aber eine breite Streuung auf (Abb. 10A).

Das db/db Sham p62-Level war im Vergleich mit der Kontrollgruppe um $34,56 \pm 13,80\%$ gestiegen, bei einem p-Wert von 0,18 ließ sich allerdings keine Signifikanz feststellen (Abb. 10 B). Ebenfalls zeigten die db/+ und die db/db Gewebe nach Ischämie/Reperfusion einen tendenziellen Anstieg der p62-Level (Abb. 10B). Die db/+ Gewebe zeigten nach I/R eine Zunahme um $15,86 \pm 16,24\%$, die db/db Gewebe nach I/R um $29,08 \pm 19,98\%$ (Abb. 10B).

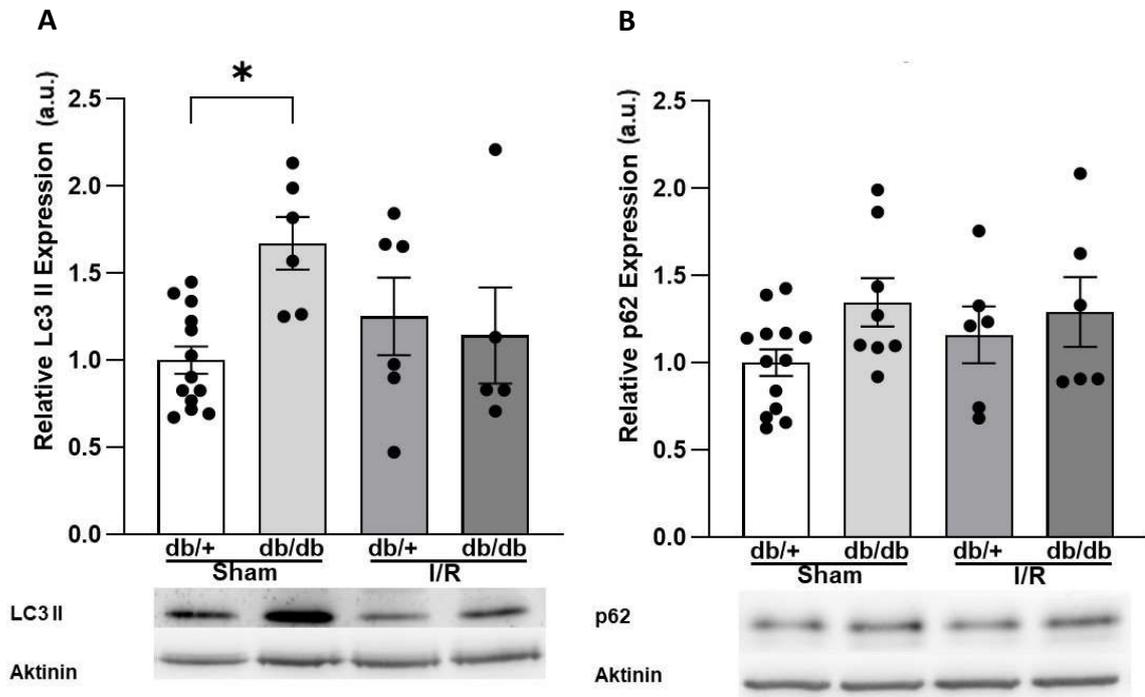


Abb. 10 LC3 II und p62/SQSTM1 Level. Western blot Analysen zur Expressions-Bestimmung von LC3 II (A) und p62/SQSTM1 (B). Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normiert. Es wird der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit */** gekennzeichnet (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; in two-way ANOVA). Hierbei wurden mindestens $n=5$ Gewebe pro Versuchsgruppe analysiert. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Blots zu finden.

4.3 Auswirkungen von Diabetes mellitus und Ischämie/Reperfusion auf die Polyubiquitinierung von Titin

4.3.1 K63-Polyubiquitinierung

E3-Ubiquitin-Ligasen ermöglichen je nach Ubiquitinierung die Degradation über das Ubiquitin-Proteasom-System oder den Abbau mittels Autophagie (Müller *et al.*, 2021). Um eine potenzielle Veränderung der Protein-Qualitäts-Kontrolle zu detektieren, wurde zunächst die K63-abhängige Ubiquitinierung von Titin untersucht. Eine über den Lysinrest 63 (K63) erfolgte Ubiquitinbindung, markiert Titinmoleküle zur Degradation mittels

Autophagolysosomalen-System (Nathan *et al.*, 2013). Diese K63-abhängige Ubiquitinierung wurde mithilfe von Western blot Analysen auf das Gesamt-Titin normiert. In beiden diabetischen db/db Gruppen (Sham und nach I/R) wurde eine praktisch unveränderte K63-Polyubiquitinierung im Vergleich zur Kontrollgruppe db/+ sham detektiert (db/db Sham $-0,89 \pm 3,87\%$; db/db I/R $+0,44 \pm 5,14\%$) (Abb. 11A). In den db/+ Geweben allerdings zeigte sich nach I/R die K63-abhängige Ubiquitinierung um $11,48 \pm 9,50\%$ tendenziell vermindert (Abb. 11A).

4.3.2 K48-Polyubiquitinierung

Über den Lysinrest 48 (K48) verlinkte Polyubiquitinketten markieren Moleküle für den proteasomalen Abbauprozess (Nandi *et al.*, 2006). Mittels K48-spezifischen Antikörpern konnte das jeweilige Ausmaß der K48-abhängigen Ubiquitinierung von Titin erfasst werden. Auch die K48-abhängige Ubiquitinierung wurde mithilfe von Western blot Analysen auf das Gesamt-Titin normiert.

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten die db/db Sham Gewebe einen Anstieg der K48-Polyubiquitinierung um $44,10 \pm 6,14\%$ (Abb. 11B). Die db/db Gewebe nach I/R wiesen ähnliche Werte für die K48-Polyubiquitinierung auf wie die nicht ischämischen diabetischen Proben. Hier handelte es sich um eine Zunahme um $50,29 \pm 20,23\%$ verglichen mit der Kontrollgruppe (db/+ Sham). Vergleicht man die ischämischen db/+ Gewebe mit den db/db Geweben, zeigte sich hier sogar eine signifikante Steigerung der K48-Polyubiquitinierung ($p=0,033$) (Abb. 11B).

Durch I/R ließ sich in den nicht-diabetischen Geweben ein messbarer Abfall der K48-Polyubiquitinierung um $10,68 \pm 20,87\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (Abb. 11B).

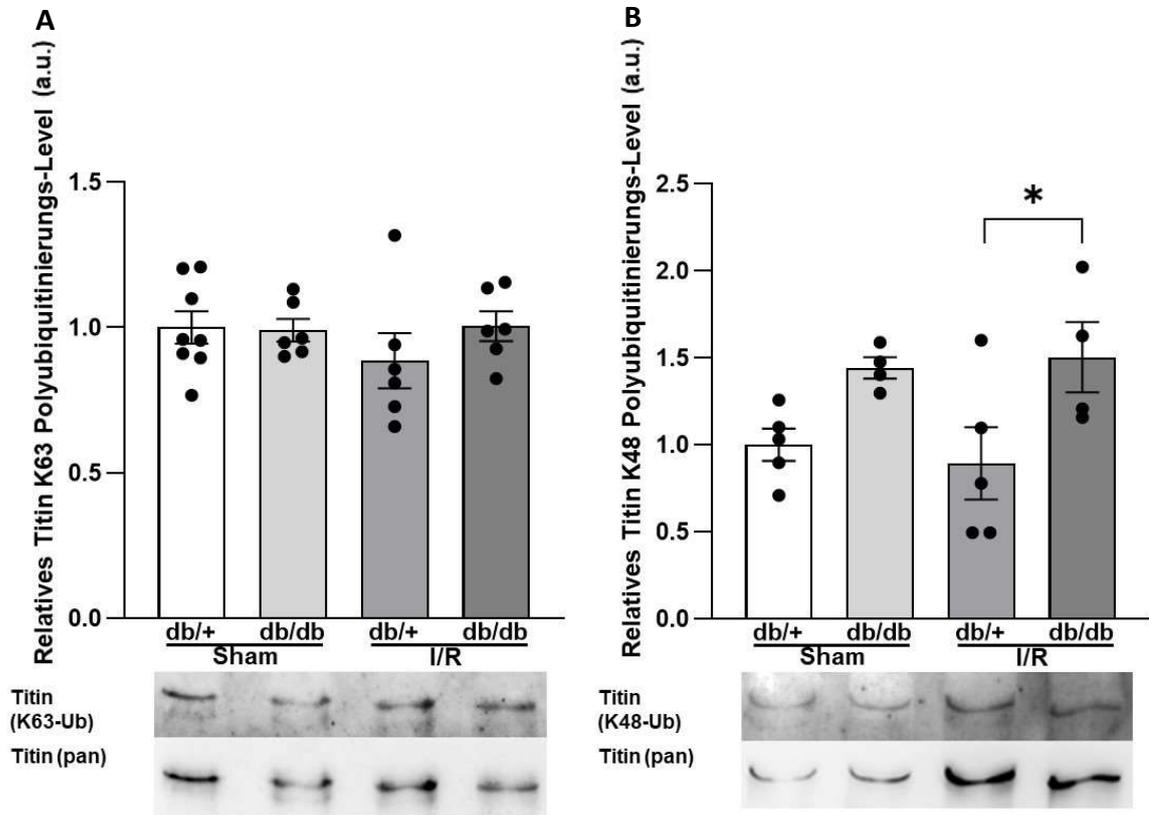


Abb. 11 K48-/K63-Polyubiquitinierungslevel von Titin. Relative K63-Polyubiquitinierung von Titin durch die Relation von Titin(K63-Ub) zu Titin (pan) (A). Relative K48-Polyubiquitinierung von Titin durch die Relation von Titin(K48-Ub) zu Titin (pan) (B). Die Daten wurden auf Kontrollherzen (db/+ Sham) normiert. Es wird der Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit */** gekennzeichnet (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; in *two-way* ANOVA). Hierbei wurden mindestens $n=5$ Gewebe pro Versuchsgruppe analysiert. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Blots zu finden.

5. Diskussion

5.1 Basale Phosphorylierungsmodulationen der elastischen I-Bandenregion durch Diabetes mellitus

Die Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus betreffen zum großen Teil das kardiovaskuläre System. Generell haben Diabetiker ein doppelt so hohes Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden wie Nicht-Diabetiker (Sattar, 2013). Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen von an Diabetes mellitus erkrankten Patienten (Stratmann, Stork and Tschoepe, 2008). Naheliegend ist daher eine krankheitsbedingte Beeinflussung von Kardiomyozyten auf zellulärer und molekularer Ebene, die eine gestörte Signaltransduktion mit sich bringt. Nachweislich konnten hier sogar bei fehlender koronarer Herzerkrankung oder Bluthochdruck, allein durch Diabetes mellitus vermittelte funktionelle und strukturelle Veränderungen im Myokard wie myokardiale Hypertrophie, Nekrose sowie eine verstärkten Bildung von interstitiellem Gewebe festgestellt werden (Stratmann, Stork and Tschoepe, 2008).

Mithilfe phospho-spezifischer Antikörper konnten in den Versuchen signifikant erhöhte Phosphorylierungs-Level in der PEVK-Region der db/db Sham Gewebe gemessen werden. Die diabetischen rechtsventrikulären Gewebe zeigten hier basal an S11878 und S12022 eine Hyperphosphorylierung. Diese basale Zunahme der Titin PEVK-Phosphorylierung diabetischer Kardiomyozyten konnten Hopf et al. ebenfalls bereits 2018 in Biopsien des rechten Atriums diabetischer Patienten nachweisen. Darauf basierend konnten sie eine signifikante Zunahme der passiven Kardiomyozyten-Steifigkeit messen. Ein Zusammenhang zwischen Titin PEVK-Hyperphosphorylierung und zunehmender passiver Steifigkeit wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen (Hidalgo *et al.*, 2009; Kötter *et al.*, 2016).

Ursächlich für Phosphorylierungen der Titin PEVK-Region ist nach bisherigen Kenntnissen vornehmlich die PKC α . Diese phosphoryliert die Serinreste S11878 sowie S12022, wodurch eine Verringerung der Persistenzlänge (physikalisches Maß der Steifigkeit einer Polymerkette) der PEVK-Region und somit eine Erhöhung der Titin-basierten Steifigkeit erfolgt (Hidalgo *et al.*, 2009). Unter Einfluss von hyperglykämische Bedingungen konnte die Induktion der PKC α Aktivität beobachtet werden (Geraldés and King, 2010). Auch Hopf et al. postulierten 2018 übereinstimmend, dass eine diabetische Stoffwechsellage direkt

zu chronischer Aktivierung der PKC α führen kann. Dies kann auch in der vorliegenden Arbeit eine Erklärung für die messbare basal erhöhte Phosphorylierung der PEVK-Region in den diabetischen Geweben bieten. Aufgrund der Hyperphosphorylierung an S11878 und S12022 kann von einer folglich basal erhöhten Titin-basierten Steifigkeit der diabetischen Gewebe dieser Studie ausgegangen werden.

In der N2-Bus konnten keine signifikanten Phosphorylierungsunterschiede in diabetischen (db/db) und nicht-diabetischen (db/+) Sham Geweben detektiert werden. Dies führt zur Annahme, dass Diabetes mellitus Typ 2 zu keinen basalen Veränderungen an S4010 der N2-Bus führt. Übereinstimmend sind hierzu Messungen von Isić (2018) zu nennen, welche ebenfalls keine nennenswerte Unterschiede der S4010 Phosphorylierung im Myokard diabetischer- und nicht diabetischer Mäuse detektieren konnte. Auch in anderen Studien, in denen diabetische und nicht-diabetische humane Kardiomyozyten untersucht wurden, konnten an S4010 keine Phosphorylierungsmodulationen festgestellt werden (Hopf *et al.*, 2018).

Zusammenfassend ist in den diabetischen Geweben eine basale Hyperphosphorylierung der PEVK-Region zu beobachten, die mutmaßlich zu einer erhöhten passiven Kardiomyozyten-Steifigkeit führt.

5.2 Remote-Gebiet zeigt kaum akute Phosphorylierungsmodulationen durch Ischämie/Reperfusion

Durch eine Ligatur der LAD (Left anterior descending artery) erfolgt eine Ischämie des linksventrikulären Myokards. Remote-Myokard bezeichnet man hierbei als den Bereich der Kardiomyozyten, der nicht von der akuten Ischämie betroffen ist und weiterhin vaskularisiert wird. Dennoch reagieren diese nicht ischämischen Bereiche ebenfalls auf nachfolgende Stimuli des Ischämieereizes und es können adaptive Prozesse und Mechanismen beobachtet werden, die der Kompensation des Myokardsterbens und dem Funktionserhalt der Pumpleistung dienen (Carrick *et al.*, 2015; Dastidar *et al.*, 2016). Die rechtsventrikulären Gewebeproben lassen sich hier ebenfalls als Remote-Gebiet bezeichnen.

Das Remote-Myokard übernimmt eine wesentliche Rolle zur Aufrechterhaltung der normgerechten globalen Herzfunktion. Bereits Kötter *et al.* konnten 2016

Titinmodifikationen nachweisen, die als frühe Adaption im linksventrikulären Remote-Myokard wesentlich dazu beitragen, die mechanischen Anforderungen infolge eines Infarktes zu bewältigen. Im Modell eines permanenten Myokardinfarktes zeigte sich hier eine erhöhte Titin-basierte Kardiomyozytensteifigkeit, die durch eine PKC α -induzierte Hyperphosphorylierung der PEVK Region vermittelt wurde. Durch eine versteifte Titinfeder im Remote-Gebiet kann die strukturelle Stabilität der Sarkomere in Situationen mit schnellen Kontraktionsabfolgen unterstützt werden. Die erhöhte Titin-basierte Steifigkeit ermöglicht eine beschleunigte Rückführung des Myosinfilaments an die zentrale Position (Kötter *et al.*, 2016). Darüber hinaus fördert steiferes Titin die längenabhängige Aktivierung des Sarkomers (Cazorla *et al.*, 2001). Diese Mechanismen unterstützen folglich die Aufrechterhaltung der ventrikulären Funktion sowie die Bewältigung des anfallenden Blutvolumens (Kötter *et al.*, 2016).

Eine wirksame Notfall-Therapie des Myokardinfarktes ist die perkutane translumiale Angioplastie (PTA), durch die ein Beheben der Koronarenges bezweckt werden kann, und eine Reperfusion des ischämischen Gebietes erfolgt. Dies ist notwendig, um den Infarktschaden durch Rettung des noch vitalen Myokards zu minimieren, sodass die Pumpfunktion aufrechterhalten werden kann, und gilt daher bei einem STEMI (ST-Hebungsinfarkt) meist als unverzüglich einzuleitende Therapie (Ibanez *et al.*, 2018). Die Mortalitätsrate kann hierdurch deutlich gesenkt werden (Keeley, Boura and Grines, 2003). Um die Pathomechanismen eines Myokardinfarktes bestmöglich auf das Mausmodell übertragen zu können, ist es daher sinnvoll, die Reperfusion nach Ischämie (I/R) ebenfalls zu simulieren. Es erfolgte daher nach einer einstündigen echokardiographisch beobachteten Ischämie die Reperfusion der LAD und 24h später folgte die Herzentnahme. Trotz gesteigertem Kardiomyozyten Überleben durch Reperfusion, führt die Wiederherstellung der Perfusion mit folgender Reoxygenierung dennoch ebenfalls zu einer Verschlimmerung der Gewebeschädigung und Entzündungsreaktion, dem sogenannten Reperfusionsschaden (Eltzschig and Eckle, 2011). Um mögliche identische Adaptionsprozesse im rechtsventrikulären Remote-Myokard nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Ischämie/Reperfusion Modell umgesetzt.

5.2.1 Titinphosphorylierungen der db/+ Gewebe nach I/R

In vorangegangenen Studien hat bereits Isić (2018) linksventrikuläre Proben des Remote-Gebiets nach Ischämie/Reperfusion analysieren können und konnte hier in Übereinstimmung mit Kötter et al. (2016) (permanenter Myokardinfarkt) feststellen, dass als akuter Anpassungsmechanismus nach Ischämie eine Zunahme der Titin-basierten Steifigkeit folgte. Eine deutliche Hyperphosphorylierung war in beiden Studien an der PEVK-Region zu beobachten, die die passive Spannungszunahme der Kardiomyozyten erklärte.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden rechtsventrikuläre Remote-Gewebeproben des gleichen Tiermodells untersucht, mit dem Ziel, eine mögliche akute Anpassungsreaktion nach Ischämie ebenfalls zu detektieren. Während an S11878 ein leichter Trend zur Hyperphosphorylierung nach I/R in db/+ Geweben passend zu den vorangegangenen Studien nachweisbar war, konnte hingegen an S12022 eine geringe Hypophosphorylierung durch I/R gemessen werden. Die beiden konträren Effekte der geringen Hypo- und Hyperphosphorylierung der PEVK-Region haben durch ihre aufhebenden Effekte mutmaßlich keinen Einfluss auf die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien konnten keine nennenswerten Phosphorylierungsmodulationen in der N2-Bus ermittelt werden (Isić, 2018).

Zusammenfassend zeigten sich in den rechtsventrikulären db/+ Remote-Proben nach I/R keine signifikanten Titinmodulationen, welche Einfluss auf die passive Steifigkeit haben könnten. Dies lässt sich am ehesten herleiten durch die getrennte links- und rechtsventrikuläre Herzfunktion. Durch die septale Kammertrennung ist das Blut in der jeweiligen Kammer separiert, sodass die jeweilige Kammer allein die Aufrechterhaltung des Blutflusses vermittelt. Kompensationsmechanismen der rechtsventrikulären Kardiomyozyten würden so mutmaßlich keinen entscheidenden Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion haben, sodass kaum akute Titin-Adaptionsprozesse nach I/R in den db/+ Geweben zu beobachten sind. Es lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der I/R-bedingten akuten Anpassung der Titinsteifigkeit um einen eher regionalen Prozess handelt, der hauptsächlich den linken Ventrikel betrifft. Dem gegenüber steht die Diabetes-induzierte chronische Veränderung des Titins, welche offenbar alle Regionen des Herzens betrifft.

5.2.2 Titinphosphorylierungen der db/db Gewebe nach I/R

Die basale Hyperphosphorylierung der diabetischen Kardiomyozyten (db/db Sham) wurde bereits in den vorigen Absätzen erörtert. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Ischämie/Reperfusion einen Einfluss auf weitere Titinmodulationen im diabetischen Remotegebiet besitzt. In der PEVK-Region zeigt sich nach I/R in den db/db Geweben eine Hyperphosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (db/+ Sham). Diese ist allerdings geringer als die basal erhöhte Phosphorylierung der db/db Sham operierten Tieren. Durch Ischämie/Reperfusion konnte folglich eine leichte Verringerung der basalen Hyperphosphorylierung detektiert werden.

In vorangegangenen Studien konnte ebenfalls beobachtet werden, dass diabetische Kardiomyozyten im Remote Gebiet durch I/R keine weitere Hyperphosphorylierung der Titin PEVK Region sowie Zunahme der passiven Steifigkeit erfuhren (Isić, 2018). Hier wurde bei den nicht-diabetischen Geweben allerdings eine starke akute Zunahme der passiven Steifigkeit detektiert, sodass die fehlende Zunahme in diabetischen Proben als „mangelnder Anpassungsmechanismus“ durch Diabetes-bedingte zelluläre Fehlregulation gewertet wurde (Isić, 2018). Generell ist bekannt, dass Diabetes mellitus zu gestörter zellulärer Signaltransduktion und Fehlregulation führen kann. Eine Folgeerkrankung des Diabetes mellitus ist die diabetische Kardiomyopathie, bei der stoffwechselbedingte Störungen letztlich zu fibrotischer Gewebeveränderung führen und eine Herzinsuffizienz bedingen können (Stratmann, Stork and Tschoepe, 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich in den rechtsventrikulären db/+ Geweben ebenfalls keine eindeutigen akuten Anpassungsprozesse der PEVK-Phosphorylierung. Fraglich ist daher, ob die abnehmende Phosphorylierungs-Tendenz der db/db Gewebe nach I/R als mangelnde Anpassungsreaktion aufgrund von Diabetes-bedingten fehlregulierten Prozessen zu werten ist oder ebenfalls die Theorie der getrennten Kammern und der fehlenden Notwendigkeit der Phosphorylierungsmodulationen für rechtsventrikuläre Kardiomyozyten besteht. Ebenfalls ursächlich für eine fehlende Anpassung des rechtsventrikulären Myokards im Vergleich zu den linksventrikulär gemessenen Werten (Isić, 2018), könnten die unterschiedlichen Druckmaxima der Ventrikel sein. Während der Systole werden im rechten Ventrikel Drücke bis circa 25 mmHg aufgebaut, wohingegen das Myokard des linken Ventrikels Druckverhältnisse von

bis zu 120-150 mmHg tolerieren muss. Das linke Myokard muss demnach circa das 5-Fache des rechtsventrikulären Drucks aufbauen (Lapp and Krakau, 2010).

In der N2-B-Region konnte in den diabetischen Geweben nach Ischämie/Reperfusion gleich den db/+ I/R Geweben keine nennenswerte Veränderung der Phosphorylierung ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigt sich in den hier rechtsventrikulären diabetischen Remote-Kardiomyozyten eine tendenzielle Hyperphosphorylierung der PEVK-Region verglichen mit der db/+ Sham Gruppe. Diese Hyperphosphorylierung ist allerdings geringer als die basal gemessenen Werte der db/db Sham Gewebe. Dies ließe keine zunehmende Hyperphosphorylierung sowie passive Steifigkeit des diabetischen Remote-Myokards durch Ischämie/Reperfusion folgern. Um diese Daten zu stützen, müsste eine Messung der tatsächlichen passiven Kardiomyozytensteifigkeit noch ergänzt werden.

5.3 Effekte auf das Autophagolysosomale-System

5.3.1 Tendenzuelle Diabetes mellitus-bedingte Autophagie Inhibition

Zellsubstrate können mittels Autophagolysosomen recycelt und wiederverwertet werden. Dieser Vorgang ist elementar, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten (Levine and Kroemer, 2008). Bereits nachgewiesen ist, dass Diabetes mellitus den Ablauf der Autophagie beeinträchtigen kann. In Studien zeigte sich, dass in diabetischen Ratten-Kardiomyozyten eine Hemmung des autophagolysosomalen Ablaufs vorliegt und dieser zur Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie beiträgt (Ouyang, You and Xie, 2014). In dieser Arbeit konnte eine signifikante basale Akkumulation von LC3 II im diabetischen Myokard gemessen werden. LC3 II, welches eine wichtige Rolle bei der Bildung der Phagosomen spielt, bindet sowohl innen, als auch außen an der Doppellipidmembran. Durch Fusion mit einem Lysosom kommt es zur Degradation der innen liegenden LC3 II Moleküle. Die an der äußeren Membranseite befindlichen Moleküle können allerdings dissoziieren und werden recycelt (Hale *et al.*, 2013; Shibutani and Yoshimori, 2014). Eine Akkumulation könnte daher im Sinne einer Induktion, bei der es zu vermehrt akkumulierenden außen befindlichen LC3 II Molekülen käme, als auch als im Sinne einer Inhibition, die eine verminderte Degradation innen befindlicher Moleküle nach sich ziehen

würde, interpretiert werden. Um eine genauere Einschätzung vornehmen zu können, sollten weitere Autophagie-Parameter wie z.B. p62 hinzugezogen werden.

P62 (p62/SQSTM1) fungiert als Ankerprotein und dient der selektiven Phagosom-Beladung. Durch seine LC3 II-Bindedomäne kann es an der inneren Phagosommembran binden. Mittels Ubiquitinbindedomäne erkennt es die abzubauenen ubiquitinierten Substrate (Stolz, Ernst and Dikic, 2014). Die sich im Inneren befindlichen Bestandteile werden durch die Fusionierung mit dem Lysosom degradiert, darunter das an der inneren Membran gebundene LC3 II sowie p62/SQSTM1 (Hale *et al.*, 2013; Lamark, Svenning and Johansen, 2017). Ein zellulärer Anstieg von p62/SQSTM1 würde daher für eine gehemmte Autophagie und damit verbundene Akkumulation des Moleküls sprechen (Bjørkøy *et al.*, 2009; Hale *et al.*, 2013).

In den diabetischen Geweben ist hier keine signifikante Zunahme von p62/SQSTM1 im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe zu beobachten. Dennoch ist ein tendenzieller Anstieg sichtbar, der nahe legen würde, dass durch den signifikanten Anstieg von LC3 II eine mutmaßliche Inhibition der Autophagie, passend zu den Studien von Ouyang *et al.* (2014), vorliegen könnte.

In den Messungen der Kinasen AMPK α und mTOR ließen sich keine eindeutigen basalen Unterschiede in den diabetischen Geweben feststellen. Da AMPK α und mTOR gegensätzlich die Autophagie beeinflussen, würde man ein antiproportionales Verhalten erwarten; die phosphorylierten Anteile der Kinasen sanken aber beide gering. Hier lässt sich keine klare Beeinflussung der Autophagie belegen. Grundsätzlich könnte eine tendenzielle Aktivitätsverminderung beider Kinasen für eine leicht verringerte Autophagie der diabetischen Gewebe sprechen, da folglich weniger Autophagie-Aktivierung durch AMPK α erfolgt und somit auch weniger Hemmung durch mTOR notwendig sein könnte. Zusammenfassend ist keine eindeutige Beeinflussung der Autophagie beobachten, dennoch lässt sich durch den signifikanten LC3 II Anstieg und die tendenziell verstärkte p62 Expression eine Autophagie-Inhibition mutmaßen. Dieser Trend, der basalen Autophagie Beeinträchtigung durch Diabetes mellitus, wurde ebenfalls durch Isić (2018) in linksventrikulären diabetischen Myokardzellen beobachtet.

5.3.2 Ischämie/Reperfusion hat im rechtsventrikulären Remote-Gebiet keine eindeutigen Auswirkungen auf die Autophagie

Diabetes mellitus birgt nach akutem Myokardinfarkt eine erhöhte Komplikations- sowie Mortalitätsrate. Das Risiko der Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist deutlich gesteigert (Stone *et al.*, 1989). Ursächlich dafür ist mutmaßlich eine fehlgeleitete Signaltransduktion. Durch Hyperglykämie sowie Hyperinsulinämie kommt es unter anderem zu einer Thrombozyten-Hyperaktivität, gesteigertem oxidativen Stress sowie erhöhter zellulärer Apoptose (Zarich and Nesto, 2007). Han *et al.* (2014) konnten nachweisen, dass in nicht-diabetischem Remote-Myokard nach I/R eine Autophagie-Steigerung zu beobachten war, die zu einer Kardioprotektion führte. Hingegen war in diabetischem Remote-Myokard keine Zunahme der Autophagie und damit folglich keine Kardioprotektion nachweisbar. Wie bereits erwähnt konnten Ouyang *et al.* (2014) eine gestörte Autophagie in diabetischen Kardiomyozyten nachweisen, welche zu myokardialen Fehlfunktionen führt. In weiteren Studien, konnte in nicht-diabetischen Proben der kardioprotektive Effekt erhöhter Autophagie nach Ischämie/Reperfusion ebenfalls bestätigt werden (Hamacher-Brady, Brady and Gottlieb, 2006).

In den hier durchgeführten Versuchen ließen sich in den diabetischen- sowie in den nicht-diabetischen Remote-Proben durch Ischämie/Reperfusion zum Teil lediglich geringe Level-Schwankungen der Autophagie Marker detektieren. Die AMP-Kinase α zeigte in beiden Gruppen nahezu keine Phosphorylierungsveränderungen durch I/R. Auch phosphoryliertes mTOR war im nicht-diabetischen Myokard kaum verändert messbar. In den diabetischen Proben hingegen ließ sich nach I/R im Vergleich der diabetischen Sham Gewebe mit denen nach I/R ein signifikanter mTOR-Anstieg messen. Dieser signifikante Anstieg zeigte sich ebenfalls im Vergleich der db/+ und der db/db Gewebe nach I/R. Somit ließ sich in den diabetischen Remote-Proben ein Anstieg von phosphoryliertem mTOR nachweisen.

Die Proteinlevel von LC3 II und p62 zeigten nach I/R in den diabetischen und nicht diabetischen Geweben verglichen mit der Kontrollgruppe db/+ Sham einen leichten, nicht signifikanten Anstieg, der aber bei breiter Streuung nicht eindeutig zu bewerten war. Zusammenfassen lässt sich, dass die Autophagie im nicht-diabetischen Gewebe des rechten Ventrikels durch I/R kaum beeinflusst zu sein schien. Die Autophagie der

diabetischen Gewebe hingegen ließ sich in Zusammenschau der Befunde als vermutlich gering inhibiert bewerten. Dies könnte als geringe Zunahme der tendenziell fehlregulierten Autophagie in diabetischen Kardiomyozyten gewertet werden und somit zur weiteren Abnahme der Kardioprotektion führen. Diese mangelnde Kardioprotektion konnten auch andere Studien im diabetischen Remote-Gebiet nachweisen (Han *et al.*, 2014).

Weiter zu untersuchen wäre, ob es nach einer späteren Herzentnahme zu weiteren messbaren Autophagie-Veränderungen im rechtsventrikulären Remote-Gebiet käme. Dies würde Aufschluss über die späteren Folgen des I/R Einflusses auf die Kardiomyozyten geben und nicht nur die akuten Folgen zeigen, da in diesem Modell ausschließlich Herzgewebe 24h nach MI untersucht wurde. Somit könnten weitere Auswirkungen speziell auf das diabetische Remote-Myokard gezeigt werden und die Hypothese der fehlregulierten Autophagie und somit verminderter Kardioprotektion in diabetischem Gewebe ließe sich weiter untersuchen.

5.4 Einflüsse auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle von Titin

5.4.1 Tendenzuell verminderte proteasomale Titin-Degradation durch Diabetes mellitus

Einen großen Anteil an der Protein-Qualitäts-Kontrolle trägt ebenfalls das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Mittels K48-Polyubiquitinierung werden Substrate für den proteasomalen Abbau markiert. Titin, als größtes bekanntes Protein, wird ebenfalls zum Teil über das UPS degradiert und recycelt. Durch proteasomale Inhibition in embryonalen Rattenkardiomyozyten konnte der Anstieg einer K48-abhängigen Polyubiquitinierung von Titin nachgewiesen werden (Kötter *et al.*, 2016).

Auch bezüglich der Ubiquitinierung zeigten die diabetischen Proben (db/db Sham) basal eine tendenzielle Veränderung gegenüber den nicht-diabetischen Kontrollen (db/+ Sham). Die K48-Polyubiquitinierung von Titin war in diabetischen Proben leicht erhöht, allerdings zeigte sich keine statistische Signifikanz. Dieser Trend lässt auf eine beginnende Akkumulation von K48-markierten Titin vermuten und könnte auf einer inhibierten Proteasomaktivität in diabetischen Kardiomyozyten basieren.

Diese Beobachtungen sind im Einklang mit früheren Ergebnissen von Li et al. (2017), die in Rattenkardiomyozyten 8 Wochen nach STZ (Streptozocin) Behandlung, die zu einer Stoffwechsellage vergleichbar mit Diabetes mellitus Typ 1 führt, eine verminderte Proteasomaktivität nachwies. Die proteasomale Aktivitätsabnahme korrelierte mit Fortschreiten der Erkrankung. Ebenfalls kam es zu einer Anreicherung ubiquitinerter Substrate (Li et al., 2017).

Im Gegensatz dazu konnten Kötter et al. (2016) nachweisen, dass auch bei erhöhter Proteasomaktivität (Messung mittels Proteasom assay) eine erhöhte K48-abhängige Titinubiquitinierung messbar war. Übereinstimmend dazu zeigte sich in den Untersuchungen von Isić an linksventrikulären diabetischen Sham-Geweben eine signifikante basale Erhöhung der Proteasom-Untereinheit alpha (PSMA). Auch die basale Chymotrypsin-Aktivität zeigte sich tendenziell in diesen Geweben erhöht. Das legt die Vermutung nahe, dass auch in den rechtsventrikulären Proben des diabetischen Modells basal eine erhöhte Proteasomaktivität vorliegt und dies zu gesteigertem K48-gebundenem Titin führe.

Zur genaueren Klärung dieser Frage wäre es weiterführend notwendig, auch in den rechtsventrikulären Geweben eine proteasomale Aktivitätsbestimmung mittels Proteasom assay durchzuführen.

Bezüglich der K63-abhängigen Polyubiquitinierung von Titin waren nahezu keine basalen Veränderungen in den diabetischen Geweben messbar. Die Markierung mittels K63-vernetzten Ubiquitins kennzeichnet Titin zum autophagosomalen Abbau. Hier ließen sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe detektieren, sodass davon auszugehen ist, dass Diabetes mellitus die K63-abhängige Polyubiquitinierung von Titin im rechten Ventrikel scheinbar nicht beeinflusst.

5.4.2 Unveränderte Polyubiquitinierung durch Ischämie /Reperfusion

Die Polyubiquitinierungslevel zeigten sich ebenfalls praktisch unverändert nach Ischämie/Reperfusion in den rechtsventrikulären Remote-Kardiomyozyten.

Die K48-Polyubiquitinierung Titins war sowohl in den diabetischen- als auch nicht diabetischen Proben ähnlich der Sham Werte der jeweiligen Gewebe messbar. Die tendenzielle Erhöhung des K48-polyubiquitinierten Titins der diabetischen Sham Gewebe ließ sich in den db/db Proben nach I/R weiterhin nachweisen und zeigte sich als

signifikanter Anstieg im Vergleich zu den db/+ Messwerten nach I/R. Um die Akkumulation von K48-polyubiquitiniertem Titin zu bewerten ist wie bereits erwähnt ein Messung der proteasomalen Aktivität von Nöten. Durch Ischämie und Reperfusion allerdings konnte keine weitere Veränderung der Titin-Polyubiquitinierung im rechtsventrikulären Remote Gebiet gezeigt werden. Isić konnte in den linksventrikulären db/+ Remote-Gebieten eine tendenzielle Aktivitätssteigerung des Proteasoms 24h nach I/R nachweisen. Kötter *et al.* (2016) postulierten auf Basis ihrer Ergebnisse, dass erhöhter hämodynamischer Stress einen gesteigerten sarkomerischen Abbau im Remote-Myokard fördere und dies zu einer Induktion des proteasomalen Abbaus sowie zur Akkumulation ubiquitinerter Proteine führe. Es lässt sich daher vermuten, dass die I/R in dieser Arbeit keine ausreichend hämodynamische Stresssituation für das rechtsventrikuläre Remote-Myokard darstellte. Um eine abschließende Aussage über die Proteasomaktivität treffen zu können, sollten weiterführende Studien die generelle proteasomale Aktivität und K48-abhängige Polyubiquitinierung anderer Proteine nach I/R sowie Veränderungen unter dem Einfluss von Diabetes mellitus eingehender untersuchen.

Die K63-abhängige Polyubiquitinierung von Titin erwies sich in den db/+ sowie db/db Geweben nach I/R gleichermaßen unverändert.

Zusammenfassend scheinen in den hier verwendeten db/+ und db/db Tieren 24h nach Ischämie und Reperfusion keine signifikanten Veränderungen der Polyubiquitinierung von Titin im rechtsventrikulären Remote-Myokard aufzutreten. Eine Studie an wild-typ Mäusen konnte hingegen nach 3 Tagen mit permanenter (!) LAD-Ligatur massive Ubiquitinierungsanstiege im Remote-Myokard an Titin nachweisen (Kötter *et al.*, 2016). Da die Herzentnahme in der vorliegenden Arbeit bereits nach 24h erfolgte, könnte man in weiterführenden Studien untersuchen, ob die Ubiquitinierung nach längerer Reperfusionszeit in rechtsventrikulären Remote-Proben verändert ist.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In etwa jeder 5. Sterbefall in Deutschland ist Diabetes mellitus assoziiert (Jacobs *et al.*, 2017). Gut drei Viertel aller Diabetiker sterben an vaskulären Folgeerkrankungen wie dem Myokardinfarkt oder dem ischämischen Schlaganfall (Ehringer, Koppensteiner and Maca, 1993). Die Kombination aus Diabetes mellitus und Myokardinfarkt ist daher eine sehr häufig vorkommende Kombination und bedarf aufmerksamer Beobachtung und Forschung. Die vaskuläre Beeinträchtigung unterliegt verschiedenen Pathomechanismen. Durch permanente Hyperglykämie und Hyperinsulinämie folgen Endothelschädigungen sowie inflammatorische Reaktionen, die zum Zelltod führen und zur Entstehung von Arteriosklerose beitragen (Dal Canto *et al.*, 2019). Nach akutem Myokardinfarkt ist ebenfalls eine erhöhte Komplikations- und auch Mortalitätsrate für an Diabetes mellitus Erkrankte zu beobachten. Das Risiko der Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit myokardialen Veränderungen ist deutlich erhöht (Jaffe *et al.*, 1984).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche Titinveränderungen in rechtsventrikulären diabetischen Gewebeproben (*Remote*) basal sowie nach akuter Ischämie und Reperfusion zu detektieren. Ebenso wurde die Protein-Qualitäts-Kontrolle dieser Zellen näher untersucht.

Basale Unterschiede waren in den diabetischen Kardiomyozyten deutlich nachweisbar. Eine signifikante Hyperphosphorylierung an der PEVK-Region Titins innerhalb der elastischen I-Bandenregion war mittels phosphospezifischer Antikörper detektierbar. Dies lässt vermuten, dass die diabetischen Kardiomyozyten aus dem rechten Ventrikel analog zu denen des linken Ventrikels ebenfalls eine erhöhte passive Steifigkeit gegenüber nicht-diabetischen Kardiomyozyten aufweisen.

Auch der Autophagiemarker LC3 II war in diabetischen rechtsventrikulären Geweben signifikant erhöht. In Kombination mit einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg von p62 lässt sich die Vermutung einer geringfügig inhibierten Autophagie und somit akkumulierten Ankerproteinen in diabetischem Myokard aufstellen. Definitive Aussagen lassen sich hier aufgrund der vorliegenden Daten nicht treffen, da keine basalen Phosphorylierungsunterschiede der Regulatorkinasen mTOR oder AMPK α nachzuweisen waren. Im diabetischen Remote-Gebiet zeigte sich allerdings eine Zunahme von phosphoryliertem mTOR, welches die These der inhibierten Autophagie in diabetischem Myokard stützen könnte und eine verminderte Kardioprotektion mutmaßen ließe.

Ebenfalls zeigte sich in den diabetischen Proben eine erhöhte Titin K48-Polyubiquitinierung. Diese könnte einen gehemmten proteasomalen Abbau in diabetischem Myokardgewebe schlussfolgern lassen. Isić (2018) konnte basal in den linksventrikulären diabetischen Geweben allerdings einen signifikanten Anstieg von PSMA sowie eine tendenzielle Aktivitätssteigerung der proteasomalen Aktivität nachweisen. Ergänzende Untersuchungen zur proteasomalen Aktivität der rechtsventrikulären diabetischen Gewebe könnten weiteren Aufschluss bieten, die Akkumulation von K48-polyubiquitiniertem Titin zu bewerten.

Die Titin-Phosphorylierung wurde im rechtsventrikulären Remote-Myokard, unabhängig von der diabetischen oder nicht-diabetischen Stoffwechsellage nicht eindeutig beeinflusst. Durch die I/R kam es zu kaum veränderten Titinphosphorylierungen, was dafürspräche, dass Ischämie rechtsventrikulär nicht zu einer veränderten passiven Steifigkeit führt. Die basale signifikante PEVK-Hyperphosphorylierung der diabetischen Proben wurde durch eine I/R ebenfalls nicht weiter gesteigert.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass Ischämie/Reperfusion kaum zu molekularen Veränderungen in rechtsventrikulärem Remote-Myokard führt. Basal zeigen sich allerdings eindeutig messbare Veränderungen in diabetischen Kardiomyozyten, die möglicherweise in Form von mangelnder Kardioprotektion Anteil an dem erhöhten Entstehungsrisiko kardiovaskulärer Erkrankungen in Assoziation mit Diabetes mellitus tragen.

Grundsätzlich erfolgte die Herzentnahme der Versuchstiere 24h nach Reperfusion. Der Nachweis möglicher längerfristiger Adaptionen des rechten Myokards bedarf einer späteren Tierpräparation. Möglicherweise könnte so in späteren post-ischämischen Stadien Veränderungen der passiven Spannung sowie der Protein-Qualitäts-Kontrolle detektiert werden. Fortführend könnten daher ergänzende Messungen an rechtsventrikulärem diabetischem sowie nicht-diabetischem Myokard mit längerer Reperfusionszeit durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

Agarkova, I. and Perriard, J.-C. (2005) 'The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere', *Trends in Cell Biology*, 15(9), pp. 477–485. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.001.

Aghdam, S.Y. *et al.* (2013) 'High glucose and diabetes modulate cellular proteasome function: Implications in the pathogenesis of diabetes complications', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2), pp. 339–344. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.101.

Bang, M.-L. *et al.* (2001) 'The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual \approx 700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System', *Circulation Research*, 89(11), pp. 1065–1072. doi:10.1161/hh2301.100981.

Bento, C.F. *et al.* (2016) 'Mammalian Autophagy: How Does It Work?', *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp. 685–713. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556.

Bjørkøy, G. *et al.* (2009) 'Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 181–197. doi:10.1016/S0076-6879(08)03612-4.

Bogomolovas, J. *et al.* (2021) 'Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere', *EMBO reports* [Preprint]. doi:10.15252/embr.201948018.

Bulteau, A.-L. *et al.* (2001) 'Oxidative Modification and Inactivation of the Proteasome during Coronary Occlusion/Reperfusion', *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), pp. 30057–30063. doi:10.1074/jbc.M100142200.

Calise, J. and Powell, S.R. (2013) 'The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(3), pp. H337–H349. doi:10.1152/ajpheart.00604.2012.

Carrick, D. *et al.* (2015) 'Pathophysiology of LV Remodeling in Survivors of STEMI', *JACC: Cardiovascular Imaging*, 8(7), pp. 779–789. doi:10.1016/j.jcmg.2015.03.007.

Cazorla, O. *et al.* (2001) 'Titin-Based Modulation of Calcium Sensitivity of Active Tension in Mouse Skinned Cardiac Myocytes', *Circulation Research*, 88(10), pp. 1028–1035. doi:10.1161/hh1001.090876.

Craig, R. and Woodhead, J.L. (2006) 'Structure and function of myosin filaments', *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), pp. 204–212. doi:10.1016/j.sbi.2006.03.006.

Dal Canto, E. *et al.* (2019) 'Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications', *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2_suppl), pp. 25–32. doi:10.1177/2047487319878371.

- Dastidar, A.G. *et al.* (2016) 'Remote myocardium is also affected in acute myocardial infarction: evidence from advanced CMR relaxometry', *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 18(S1), pp. P219, 1532-429X-18-S1-P219. doi:10.1186/1532-429X-18-S1-P219.
- Ehringer, H., Koppensteiner, R. and Maca, T. (1993) 'Arterielle Verschlusskrankheit bei Diabetes mellitus', in Waldhäusl, W. and Gries, F.A. (eds) *Diabetes in der Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 370–393. doi:10.1007/978-3-642-97435-9_31.
- Eltzschig, H.K. and Eckle, T. (2011) 'Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation', *Nature Medicine*, 17(11), pp. 1391–1401. doi:10.1038/nm.2507.
- Falk, E. (2006) 'Pathogenesis of Atherosclerosis', *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), pp. C7–C12. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.068.
- Feng, Y. *et al.* (2014) 'The machinery of macroautophagy', *Cell Research*, 24(1), pp. 24–41. doi:10.1038/cr.2013.168.
- Finley, D. (2009) 'Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome', *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp. 477–513. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.
- Frangogiannis, N.G. (2012) 'Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair', *Circulation Research*. Edited by A. Rosenzweig, 110(1), pp. 159–173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.
- Frangogiannis, N.G. (2014) 'The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling', *Nature Reviews Cardiology*, 11(5), pp. 255–265. doi:10.1038/nrcardio.2014.28.
- Freiburg, A. *et al.* (2000) 'Series of Exon-Skipping Events in the Elastic Spring Region of Titin as the Structural Basis for Myofibrillar Elastic Diversity', *Circulation Research*, 86(11), pp. 1114–1121. doi:10.1161/01.RES.86.11.1114.
- Fürst, D.O. *et al.* (1988) 'The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line.', *Journal of Cell Biology*, 106(5), pp. 1563–1572. doi:10.1083/jcb.106.5.1563.
- Fürst, D.O. and Schröder, R. (2014) 'Quergestreifte Muskulatur', in Heinrich, P.C., Müller, M., and Graeve, L. (eds) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), pp. 787–804. doi:10.1007/978-3-642-17972-3_63.
- Gallastegui, N. and Groll, M. (2010) 'The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine', *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), pp. 634–642. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.005.

Geraldes, P. and King, G.L. (2010) 'Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications', *Circulation Research*, 106(8), pp. 1319–1331. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.

Giannitsis, E. *et al.* (2019) 'Kommentar zur vierten Universellen Definition des Myokardinfarkts der gemeinschaftlichen ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force', *Der Kardiologe*, 13(6), pp. 337–345. doi:10.1007/s12181-019-00343-6.

Graf, S. and Schumm-Draeger, P.-M. (2011) 'Diabetes und Rheuma: Ist Diabetes mellitus auch eine inflammatorische Erkrankung?', *Zeitschrift für Rheumatologie*, 70(9), pp. 747–751. doi:10.1007/s00393-011-0795-5.

Granzier, H. *et al.* (1997) 'Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction', *Biophysical Journal*, 73(4), pp. 2043–2053. doi:10.1016/S0006-3495(97)78234-1.

Granzier, H.L. and Irving, T.C. (1995) 'Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments', *Biophysical Journal*, 68(3), pp. 1027–1044. doi:10.1016/S0006-3495(95)80278-X.

Greaser, M.L. (2002) 'Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(5/6), pp. 473–482. doi:10.1023/A:1023410523184.

Hale, A.N. *et al.* (2013) 'Autophagy: Regulation and role in development', *Autophagy*, 9(7), pp. 951–972. doi:10.4161/auto.24273.

Hamacher-Brady, A., Brady, N.R. and Gottlieb, R.A. (2006) 'Enhancing Macroautophagy Protects against Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiac Myocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp. 29776–29787. doi:10.1074/jbc.M603783200.

Hamdani, N., Krysiak, J., *et al.* (2013) 'Crucial Role for Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II in Regulating Diastolic Stress of Normal and Failing Hearts via Titin Phosphorylation', *Circulation Research*, 112(4), pp. 664–674. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300105.

Hamdani, N., Franssen, C., *et al.* (2013) 'Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model', *Circulation: Heart Failure*, 6(6), pp. 1239–1249. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539.

Han, Z. *et al.* (2014) 'Autophagy Is Involved in the Cardioprotection Effect of Remote Limb Ischemic Postconditioning on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Normal Mice, but Not Diabetic Mice', *PLoS ONE*. Edited by R. Mohanraj, 9(1), p. e86838. doi:10.1371/journal.pone.0086838.

Hayat, S.A. *et al.* (2004) 'Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment', *Clinical Science*, 107(6), pp. 539–557. doi:10.1042/CS20040057.

Hidalgo, C. *et al.* (2009) 'PKC Phosphorylation of Titin's PEVK Element: A Novel and Conserved Pathway for Modulating Myocardial Stiffness', *Circulation Research*, 105(7), pp. 631–638. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.198465.

Hidalgo, C.G. *et al.* (2013) 'The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 54, pp. 90–97. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.012.

Hopf, A.-E. *et al.* (2018) 'Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1', *Circulation Research*, 123(3), pp. 342–355. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312166.

Huxley, H. and Hanson, J. (1954) 'Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation', *Nature*, 173(4412), pp. 973–976. doi:10.1038/173973a0.

Ibanez, B. *et al.* (2018) '2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation', *European Heart Journal*, 39(2), pp. 119–177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393.

Isić, M. (2018) *Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf adaptive Titin Modifikationen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion*. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Available at: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=48042>.

Iwasaka, T. *et al.* (1992) 'Residual Left Ventricular Pump Function After Acute Myocardial Infarction in NIDDM Patients', *Diabetes Care*, 15(11), pp. 1522–1526. doi:10.2337/diacare.15.11.1522.

Jacobs, E. *et al.* (2017) 'Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data From 65 Million People in Germany', *Diabetes Care*, 40(12), pp. 1703–1709. doi:10.2337/dc17-0954.

Jaffe, A.S. *et al.* (1984) 'Increased congestive heart failure after myocardial infarction of modest extent in patients with diabetes mellitus', *American Heart Journal*, 108(1), pp. 31–37. doi:10.1016/0002-8703(84)90541-6.

Jung, C.H. *et al.* (2010) 'mTOR regulation of autophagy', *FEBS Letters*, 584(7), pp. 1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.

Kabeya, Y. (2000) 'LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing', *The EMBO Journal*, 19(21), pp. 5720–5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720.

Kahn, S.E., Cooper, M.E. and Del Prato, S. (2014) 'Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future', *The Lancet*, 383(9922), pp. 1068–1083. doi:10.1016/S0140-6736(13)62154-6.

Keeley, E.C., Boura, J.A. and Grines, C.L. (2003) 'Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23

randomised trials', *The Lancet*, 361(9351), pp. 13–20. doi:10.1016/S0140-6736(03)12113-7.

Kim, J. *et al.* (2011) 'AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1', *Nature Cell Biology*, 13(2), pp. 132–141. doi:10.1038/ncb2152.

Knappeis, G.G. and Carlsen, F. (1968) 'THE ULTRASTRUCTURE OF THE M LINE IN SKELETAL MUSCLE', *Journal of Cell Biology*, 38(1), pp. 202–211. doi:10.1083/jcb.38.1.202.

Kobayashi, S. and Liang, Q. (2015) 'Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(2), pp. 252–261. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.020.

Konstam, M.A. *et al.* (2011) 'Left Ventricular Remodeling in Heart Failure', *JACC: Cardiovascular Imaging*, 4(1), pp. 98–108. doi:10.1016/j.jcmg.2010.10.008.

Kötter, S. *et al.* (2013) 'Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts', *Cardiovascular Research*, 99(4), pp. 648–656. doi:10.1093/cvr/cvt144.

Kötter, S. *et al.* (2016) 'Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction', *Circulation Research*, 119(9), pp. 1017–1029. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309685.

Kötter, S., Andresen, C. and Krüger, M. (2014) 'Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control', *Biological Chemistry*, 395(11), pp. 1341–1352. doi:10.1515/hsz-2014-0178.

Krüger, M. *et al.* (2009) 'Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs', *Circulation Research*, 104(1), pp. 87–94. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184408.

Krüger, M. (2015) 'Posttranslational Modification of the Titin Springs: Dynamic Adaptation of Passive Sarcomere Stiffness', in Ehler, E. (ed.) *Cardiac Cytoarchitecture*. Cham: Springer International Publishing, pp. 109–124. doi:10.1007/978-3-319-15263-9_6.

Krüger, M. and Kötter, S. (2016) 'Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling', *Frontiers in Physiology*, 7. doi:10.3389/fphys.2016.00076.

Krüger, M. and Linke, W.A. (2006) 'Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 27(5–7), pp. 435–444. doi:10.1007/s10974-006-9090-5.

Krüger, M. and Linke, W.A. (2011) 'The Giant Protein Titin: A Regulatory Node That Integrates Myocyte Signaling Pathways', *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), pp. 9905–9912. doi:10.1074/jbc.R110.173260.

- Lamarck, T., Svenning, S. and Johansen, T. (2017) 'Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm', *Essays in Biochemistry*. Edited by J.D. Lane, V.I. Korolchuk, and J.T. Murray, 61(6), pp. 609–624. doi:10.1042/EBC20170035.
- Lange, S. (2005) 'The Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover', *Science*, 308(5728), pp. 1599–1603. doi:10.1126/science.1110463.
- Lapp, H. and Krakau, I. (2010) *Das Herzkatheterbuch: diagnostische und interventionelle Kathetertechniken ; 87 Tabellen ; [inklusive DVD]*. 3., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008) 'Autophagy in the Pathogenesis of Disease', *Cell*, 132(1), pp. 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- LeWinter, M.M. *et al.* (2007) 'Cardiac titin: Structure, functions and role in disease', *Clinica Chimica Acta*, 375(1–2), pp. 1–9. doi:10.1016/j.cca.2006.06.035.
- Li, J. *et al.* (2017) 'Cardiac proteasome functional insufficiency plays a pathogenic role in diabetic cardiomyopathy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 102, pp. 53–60. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.11.013.
- Linke, W.A. *et al.* (1996) 'Towards a Molecular Understanding of the Elasticity of Titin', *Journal of Molecular Biology*, 261(1), pp. 62–71. doi:10.1006/jmbi.1996.0441.
- Linke, W.A. *et al.* (1999) 'I-Band Titin in Cardiac Muscle Is a Three-Element Molecular Spring and Is Critical for Maintaining Thin Filament Structure', *Journal of Cell Biology*, 146(3), pp. 631–644. doi:10.1083/jcb.146.3.631.
- Linke, W.A. and Krüger, M. (2010) 'The Giant Protein Titin as an Integrator of Myocyte Signaling Pathways', *Physiology*, 25(3), pp. 186–198. doi:10.1152/physiol.00005.2010.
- Linke, W.A., Popov, V.I. and Pollack, G.H. (1994) 'Passive and active tension in single cardiac myofibrils', *Biophysical Journal*, 67(2), pp. 782–792. doi:10.1016/S0006-3495(94)80538-7.
- Liu, H. *et al.* (2012) 'Enhancement of 26S Proteasome Functionality Connects Oxidative Stress and Vascular Endothelial Inflammatory Response in Diabetes Mellitus', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), pp. 2131–2140. doi:10.1161/ATVBAHA.112.253385.
- Löffler, G. *et al.* (eds) (2014) *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- Lu, L. *et al.* (2015) 'Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments', *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(3), pp. 865–867. doi:10.1007/s12013-015-0553-4.
- Lutz, J. *et al.* (2020) 'Die Länge spezifischer Ubiquitin-ketten beeinflusst ihre Erkennung', *BIOspektrum*, 26(5), pp. 471–474. doi:10.1007/s12268-020-1421-3.

Ma, S. *et al.* (2015) 'The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(2), pp. 271–276. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.010.

Maisch, B., Steliwaag, M. and Simon, B.C. (1994) 'Koronare Herzerkrankung und akuter Herzinfarkt — Aktuelle Aspekte der Pathogenese, Symptomatologie und des klinischen Verlaufs', in Greiling, H. and Neumann, S. (eds) *Pathobiochemie, Molekularbiologie und moderne Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Zusammenarbeit von Klinik und Klinischer Chemie), pp. 48–98. doi:10.1007/978-3-642-52362-5_6.

Mak, K.-H. *et al.* (1997) 'Influence of Diabetes Mellitus on Clinical Outcome in the Thrombolytic Era of Acute Myocardial Infarction fn1fn1The GUSTO-I study was supported by a combined grant from Bayer, New York, New York; CIBA-Corning, Medfield, Massachusetts; Genetech, South San Francisco, California; ICI Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware; and Sanofi Pharmaceuticals, Paris, France.', *Journal of the American College of Cardiology*, 30(1), pp. 171–179. doi:10.1016/S0735-1097(97)00118-6.

Makarenko, I. *et al.* (2004) 'Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts', *Circulation Research*, 95(7), pp. 708–716. doi:10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2007) 'Role of autophagy in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 7(12), pp. 961–967. doi:10.1038/nrc2254.

Matsui, Y. (2010) 'Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction', *World Journal of Biological Chemistry*, 1(5), p. 69. doi:10.4331/wjbc.v1.i5.69.

Mizushima, N. (2007) 'Autophagy: process and function', *Genes & Development*, 21(22), pp. 2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207.

Müller, E. *et al.* (2021) 'E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system', *Scientific Reports*, 11(1), p. 21134. doi:10.1038/s41598-021-00618-7.

Myung, J., Kim, K.B. and Crews, C.M. (2001) 'The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors', *Medicinal Research Reviews*, 21(4), pp. 245–273. doi:10.1002/med.1009.

Nah, D.-Y. and Rhee, M.-Y. (2009) 'The Inflammatory Response and Cardiac Repair After Myocardial Infarction', *Korean Circulation Journal*, 39(10), p. 393. doi:10.4070/kcj.2009.39.10.393.

Nandi, D. *et al.* (2006) 'The ubiquitin-proteasome system', *Journal of Biosciences*, 31(1), pp. 137–155. doi:10.1007/BF02705243.

- Nathan, J.A. *et al.* (2013) 'Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes?', *The EMBO Journal*, 32(4), pp. 552–565. doi:10.1038/emboj.2012.354.
- Neagoe, C. *et al.* (2002) 'Titin Isoform Switch in Ischemic Human Heart Disease', *Circulation*, 106(11), pp. 1333–1341. doi:10.1161/01.CIR.0000029803.93022.93.
- Opitz, C.A. *et al.* (2004) 'Developmentally Regulated Switching of Titin Size Alters Myofibrillar Stiffness in the Perinatal Heart', *Circulation Research*, 94(7), pp. 967–975. doi:10.1161/01.RES.0000124301.48193.E1.
- Ouyang, C., You, J. and Xie, Z. (2014) 'The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 71, pp. 71–80. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.10.014.
- Perkin, J. *et al.* (2015) 'Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force', *Biophysical Journal*, 109(12), pp. 2592–2601. doi:10.1016/j.bpj.2015.11.002.
- Prabhu, S.D. and Frangogiannis, N.G. (2016) 'The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis', *Circulation Research*, 119(1), pp. 91–112. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
- Pyle, W.G. and Solaro, R.J. (2004) 'At the Crossroads of Myocardial Signaling: The Role of Z-Discs in Intracellular Signaling and Cardiac Function', *Circulation Research*, 94(3), pp. 296–305. doi:10.1161/01.RES.0000116143.74830.A9.
- Queisser, M.A. *et al.* (2010) 'Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal', *Diabetes*, 59(3), pp. 670–678. doi:10.2337/db08-1565.
- Resl, M. and Clodi, M. (2010) 'Diabetes und kardiovaskuläre Komplikationen: Epidemiologie zur Morbidität und Mortalität', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 160(1–2), pp. 3–7. doi:10.1007/s10354-010-0744-y.
- Runwal, G. *et al.* (2019) 'LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells', *Scientific Reports*, 9(1), p. 10147. doi:10.1038/s41598-019-46657-z.
- Russell, R.C. *et al.* (2013) 'ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase', *Nature Cell Biology*, 15(7), pp. 741–750. doi:10.1038/ncb2757.
- Sattar, N. (2013) 'Revisiting the links between glycaemia, diabetes and cardiovascular disease', *Diabetologia*, 56(4), pp. 686–695. doi:10.1007/s00125-012-2817-5.
- Schneider, K.W. and Parr, F. (1961) 'Über die Beziehungen zwischen elektrokardiographischen, pathologisch-anatomischen und haemodynamischen Befunden beim Herzinfarkt', *Archiv für Kreislaufforschung*, 36(3–4), pp. 296–311. doi:10.1007/BF02119579.

- Sheetz, M.P. and Spudich, J.A. (1983) 'Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro', *Nature*, 303(5912), pp. 31–35. doi:10.1038/303031a0.
- Shibutani, S.T. and Yoshimori, T. (2014) 'A current perspective of autophagosome biogenesis', *Cell Research*, 24(1), pp. 58–68. doi:10.1038/cr.2013.159.
- Solomon, S.D. *et al.* (2002) 'Ventricular Remodeling Does Not Accompany the Development of Heart Failure in Diabetic Patients After Myocardial Infarction', *Circulation*, 106(10), pp. 1251–1255. doi:10.1161/01.CIR.0000032313.82552.E3.
- Stolz, A., Ernst, A. and Dikic, I. (2014) 'Cargo recognition and trafficking in selective autophagy', *Nature Cell Biology*, 16(6), pp. 495–501. doi:10.1038/ncb2979.
- Stone, P.H. *et al.* (1989) 'The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: Contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis', *Journal of the American College of Cardiology*, 14(1), pp. 49–57. doi:10.1016/0735-1097(89)90053-3.
- Stratmann, B., Stork, I. and Tschoepe, D. (2008) 'Diabetische Kardiomyopathie: Eine Variante der koronaren Herzkrankheit?', *Der Internist*, 49(4), pp. 436–440. doi:10.1007/s00108-008-2047-6.
- Talman, V. and Ruskoaho, H. (2016) 'Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration', *Cell and Tissue Research*, 365(3), pp. 563–581. doi:10.1007/s00441-016-2431-9.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2008) 'LC3 and Autophagy', in Deretic, V. (ed.) *Autophagosome and Phagosome*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology™), pp. 77–88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Tartaglia, L.A. (1997) 'The Leptin Receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), pp. 6093–6096. doi:10.1074/jbc.272.10.6093.
- Terman, A. and Brunk, U. (2005) 'Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology', *Cardiovascular Research*, 68(3), pp. 355–365. doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.014.
- Tönnies, T. and Rathmann, W. (2021) *Deutscher Gesundheitsbericht, Diabetes 2021, Die Bestandsaufnahme*. Verlag Kirchheim + Co GmbH.
- Tskhovrebova, L. and Trinick, J. (2003) 'Titin: properties and family relationships', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(9), pp. 679–689. doi:10.1038/nrm1198.
- Warren, C.M. *et al.* (2004) 'Titin isoform changes in rat myocardium during development', *Mechanisms of Development*, 121(11), pp. 1301–1312. doi:10.1016/j.mod.2004.07.003.
- Yamasaki, R. *et al.* (2002) 'Protein Kinase A Phosphorylates Titin's Cardiac-Specific N2B Domain and Reduces Passive Tension in Rat Cardiac Myocytes', *Circulation Research*, 90(11), pp. 1181–1188. doi:10.1161/01.RES.0000021115.24712.99.

Zarich, S.W. and Nesto, R.W. (2007) 'Implications and Treatment of Acute Hyperglycemia in the Setting of Acute Myocardial Infarction', *Circulation*, 115(18). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535732.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Kardiovaskuläre Risiken des Diabetes mellitus	2
Abb. 2	Remodeling nach Myokardinfarkt.....	5
Abb. 3	Schematischer Aufbau eines Sarkomers..	7
Abb. 4	Aufbau der Titin-Isoformen N2B und N2BA.	9
Abb. 5	Schematische Regulation der Autophagie und Autophagosombildung.	16
Abb. 6	Darstellung des 26S-Protesoms.....	18
Abb. 7	Ablauf des Versuchsaufbaus.....	28
Abb. 8	Phosphorylierungsmodulationen an S11878, S12022, S4010.....	34
Abb. 9	Veränderungen der mTOR und AMPK α Phosphorylierung.....	36
Abb. 10	LC3 II und p62/SQSTM Level.	37
Abb. 11	K48-/K63-Polyubiquitinierungslevel von Titin.....	39

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Chemikalien.....	22
Tab. 2	Puffer/Lösungen.....	23
Tab. 3	Laborgeräte	24
Tab. 4	Antikörper	25
Tab. 5	Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele	29
Tab. 6	Pipettierschema für 2 Titingele.....	30

Danksagung

Für die große und vielfältige Unterstützung möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Martina Krüger für die jahrelange Hilfe, Umsicht und Unterstützung. Ebenfalls möchte ich meinem Betreuer Dr. Sebastian Kötter außerordentlich danken, der stets mit Antworten auf jedwede Frage zur Verfügung stand. Ohne die ausgezeichnete Betreuung durch diese beiden Personen hätte diese Arbeit nicht entstehen können. Ebenfalls möchte ich Prof. Maria Grandoch sehr für ihre Co-Betreuung danken.

Die AG Krüger hat mich auch über mein Freisemester hinaus über Jahre begleitet, sodass ich mich in ihrem Umfeld stets außerordentlich wohl und geschätzt gefühlt habe. Ich möchte mich besonders bei Sabine Bongardt für die technische und methodische Anleitung, aber noch viel mehr für die lieben Worte bedanken. Ebenfalls danke ich Gosia, Dr. Małgorzata Isić, sehr für die Probengewinnung sowie für die großartige Analyse des linken Ventrikels.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich beim SFB 1116 des Graduiertenkollegs sowie bei Dr. Sandra Berger bedanken.

Einen großen Dank möchte ich meiner Tante Tina aussprechen, die in allen Lebenslagen mit ihrer über die Grenzen hinausreichenden Unterstützung und Fürsorge immer für mich da war und ist. Ich danke ebenfalls meinem Vater sehr, der mein Studium überhaupt erst ermöglicht hat. Außerdem gilt ein großer Dank meiner Tante Elke für ihre Hilfe und ihr vorzügliches Rechtschreibtalent. Für die Begleitung, den Zusammenhalt und die Liebe möchte ich besonders Passi danken. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freundinnen Verena, Debbie und Linda für die gemeinsame und außergewöhnliche Laborzeit bedanken.