

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität

Leiter: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Auswirkung einer herzfernen ischämischen Perconditionierung auf den
Phosphorylierungsstatus und die Myofilamentsteifigkeit des Sarkomerproteins Titin

Dissertation

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

Vorgelegt von

Assil Taleh

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Ich widme diese Arbeit denjenigen, die ihre Heimat verließen, auf der Suche nach Grundrechten, Sicherheit und Bildung für sich und die eigenen Kinder.

Zusammenfassung

Die gewebeferne ischämische Konditionierung (*remote ischemic conditioning*; RIC) ist ein Phänomen, welche durch kurze Zyklen reversibler Ischämie und Reperfusion in einem Kapillarbett, Gewebe oder Organ einen protektiven Effekt auslöst, welcher Stimulus ferne Gewebe und Organe vor Ischämie-/Reperfusionsschäden schützt (Heusch, 2015; Candilio, Malik and Hausenloy, 2013). Die RIC führt zu einer reduzierten Infarktgröße bei Ischämie im Herzen (Heusch and Gersh, 2017). Bei der Konditionierung wird zwischen einer Prä-, Per-, oder Postkonditionierung unterschieden, je nachdem, zu welchem Zeitpunkt des kardialen Ischämie-Geschehens die Konditionierungszyklen eingesetzt werden. Eine klinische Studie konnte bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI), bei denen eine herzferne ischämische Perkonditionierung (RPER) noch im Rettungswagen durchgeführt worden war, in der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) eine reduzierte Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe ohne eine solche Perkonditionierung zeigen (Botker *et al.*, 2010).

Die hier vorliegende Arbeit setzt sich mit einem Großtiermodell der herzfernen ischämischen Perkonditionierung auseinander und deren Auswirkung auf das Herzmuskelprotein Titin. Titin ist bedeutend für die Gewährleistung der strukturellen Funktion der Relaxations- und Kontraktionszyklen des Herzens (Kruger and Kotter, 2016). Im akuten Stadium des Myokardinfarkts konnte ein Anstieg der Steifigkeit des Herzmuskelproteins Titin durch posttranslationale Modifikationen der N2-Bus und PEVK-Region des Titins detektiert werden (Kotter *et al.*, 2016). Es wird vermutet, dass die erhöhte Steifigkeit eine Anpassungsreaktion auf den erhöhten mechanischen Stress im überlebenden Myokard darstellt. Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob sich RPER ebenfalls auf die mechanischen Eigenschaften von Titin auswirkt.

Hierzu wurden myokardiale Gewebeproben aus Göttinger Minipigs nach RPER entnommen. Den narkotisierten Schweinen wurde 60 Min. lang die Koronararterie okkludiert und anschließend 180 min reperfundiert. Die RPER wurde 20 Min. nach Beginn der Ischämie am hinteren Schenkel induziert. Es wurden Proben entnommen nach 55-minütiger Ischämie, 10-minütiger Reperfusion und 120-minütiger Reperfusion und per SDS-Gelelektrophorese und *Western Blotting* analysiert. Mithilfe von phosphospezifischen PKC α -, 11878- und 12022- Antikörpern wurde der Phosphorylierungsstatus an der PEVK-Region der beiden Isoformen des Titins ermittelt.

Durch die RPER Behandlung blieb die Phosphorylierung der Serinreste S11878 in beiden Titin Isoformen, der Serinrest S12022 an der N2BA Isoform und der Phosphorylierungsstatus der PKC α während und nach der Ischämie unverändert. Für die N2B-Isoform des Titins konnte nach 120-minütiger Reperfusion eine signifikante Erniedrigung des Phosphorylierungsstatus an Position Ser12022 gezeigt werden. Diese Erniedrigung könnte funktionell mit einer erniedrigten Steifigkeit der Titinfilamente einhergehen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass RPER die Ischämie-bedingte Zunahme der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit verhindert und die Titinsteifigkeit möglicherweise sogar leicht reduziert.

Abstract

Remote ischemic conditioning (RIC) is a phenomenon which, through short cycles of reversible ischemia and reperfusion in a capillary bed, tissue or organ, triggers a protective effect that protects tissues and organs distant from the stimulus from ischemia / reperfusion damage (Heusch, 2015; Candilio, Malik and Hausenloy, 2013). The RIC leads to a reduced infarction size in ischemia in the heart (Heusch and Gersh, 2017; Skyschally *et al.*, 2018). The conditioning is divided into pre-, per- or post-conditioning, depending on when the cycles are used. A clinical study was able to show a reduced size of the infarction in single-photon-emission-computer-tomography (SPECT) in patients with acute ST-elevated myocardial infarction (STEMI), in whom an ischemic preconditioning distant from the heart (RPER) was carried out in the ambulance (Botker *et al.*, 2010).

My work deals with ischemic preconditioning distant from the heart and its effects on the heart muscle protein titin. In acute stage of myocardial infarction, an increase stiffness of the myocardial protein Titin could be detected by post-translational modifications at the N2-bus and PEVK-region of titin (Kotter *et al.*, 2016). The increased stiffness is thought to represent an adaptive response to the increased mechanical stress in the surviving myocardium. The present work investigated whether RPER also affects the mechanical properties of titin.

To investigate how the RPER affects titin, myocardial tissue samples were taken from Goettingen minipigs. The anesthetized pigs had their coronary artery occluded for 60 minutes and then reperfused for 180 minutes. The RPER was induced in the hind limb 20 minutes after the onset of ischemia. Samples were taken during 55-minute ischemia, ten-minute reperfusion and 120-minute reperfusion and analyzed by SDS gel electrophoresis and Western blotting. An increased titin phosphorylation at the Ser11878 and Ser12022 sites leads to an increased stiffness of the PEVK-region and thus of titin (Kotter *et al.*, 2013). Antibodies for PKC α , S11878 and S12022 were used to determine the phosphorylation status of the PEVK-region of the two isoforms of Titin.

By RPER treatment, the relative phosphorylation of serine residues S11878 in both titin isoforms, S12022 at the N2BA isoform, and threonine 497 in the PKC α remained unchanged during and after ischemia. For the N2B isoform of titin, a significant decrease in relative phosphorylation of Ser12022 was shown in biopsies taken after 120 minutes of reperfusion. This decrease could be functionally associated with a decreased stiffness of titin filaments. The results suggest that RPER prevents the ischemia-induced increase in titin-mediated passive stiffness and may even slightly reduce titin stiffness.

Abkürzungsverzeichnis:

I55	55-minütige Ischämie	I-Band	Isotropes Band
R10	10-minütige Reperfusion	Ig	Immunglobulin
R120	120-minütige Reperfusion	IL-6	Interleukin-6
A-Band	Anisotropes Band	IPC	Ischämische Präkonditionierung
ACS	Akutes Koronarsyndrom	JAK	Januskinase
ACE	Angiotensin-Converting -Enzym	K	Lysin
ADP	Adenosindiphosphat	LDL	Low density lipid
AMI	Akuter Myokardinfarkt	m	Milli
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
BSA	Bovines Albuminserum	MACCE	Schwere kardiale und zerebrovaskuläre Komplikationen
COX	Cyclooxygenase	M-Band	Mittel Band
DTT	Dithiothreitol	MDa	Megadalton
E	Glutamat	MI	Myokardinfarkt
ECL	Signalverstärkende Immunlumineszenz	Min	Minute
ERK	Extracellular-signal regulated kinase	MLP	Muscle LIM Protein
FNIII	Fibronectin Typ 3-ähnliche Domäne	NaCl	Natriumchlorid
HCl	Salzsäure	NO	Stickstoffmonoxid
HFpEF	heart failure with preserved ejection fraction	NSTEMI	Myokardinfarkt ohne ST-Hebung
		P	Prolin
		PCI	Perkutane Koronarintervention
		PKA	Proteinkinase A
		PKC α	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase C alpha

PKG	Proteinkinase G	SDS	Natriumdodecylsulfat
POC	Lokale Postkonditionierung	SDS-	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid
PP5	Serin/Threonin Protein Phosphatase	PAGE	Gelelektrophorese
PVDF	Polyvinylidenfluorid	sGC	lösliche Guanylylcyclase
RIC	Gewebeferne ischämische Konditionierung	STEMI	Myokardinfarkt mit ST-Hebung
RIPC	Gewebeferne ischämische Präkonditionierung	T	Threonin
RIVA	Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie	TBST	Tris gepufferte Saline mit Tween
ROS	Radikale Sauerstoffspezies	TK	Titinkinase
RPER	Gewebeferne ischämische Perkonditionierung	TNF	Tumornekrosefaktor
RPOST	Gewebeferne ischämische Postkonditionierung	TNFR-3	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-3
S	Serin	V	Valin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokardinfarkt:	1
1.1.1	Myokardinfarkt Epidemiologie/ Relevanz	1
1.1.2	Myokardinfarkt Entstehung und Pathophysiologie	1
1.1.3	Myokardinfarkt Therapie.....	3
1.1.4	Reperfusionsschäden	4
1.2	Herzmuskulatur.....	5
1.2.1	Sarkomer-Aufbau	5
1.2.2	Titin	7
1.2.2.1	Domänen und Struktur des Titins	7
1.2.2.2	Funktionen des Titins/ die molekulare Feder Titin.....	10
1.2.2.3	Posttranslationale Modifikation	11
1.2.2.4	Bedeutung des Titins beim Myokardinfarkt	14
1.3	Konditionierung	15
1.3.1	Das Konditionierungsphänomen	15
1.3.2	Vorteile einer RPER.....	18
1.3.3	RIC induzierte Signalkaskaden.....	19
1.3.3.1	Allgemeines.....	19
1.3.3.2	Die RISK-Signalkaskade	20
1.3.3.3	Die SAFE-Signalkaskade	21
1.3.3.4	Einfluss von PKG und PKC bei Konditionierung	22
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden	24

2.1	Material.....	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Puffer und Lösungen	25
2.1.3	Laborgeräte	26
2.1.4	Antikörper.....	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Verwendete Tiere	28
2.2.2	Präparation der Schweinekardiomyozyten	28
2.2.3	Proteinbiochemie	29
2.2.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 29	
2.2.3.2	Western Blot	30
2.2.4	Software	32
2.2.5	Datenanalytische Statistik	32
3	Ergebnisse:.....	32
3.1	Änderungen der Aktivitäten von Kinasen.....	32
3.1.1	Indirekter Nachweis einer Aktivierung der Proteinkinase A nach herzferner ischämischer Perkonditionierung	32
3.1.2	Änderung der Aktivität von Proteinkinase Ca nach herzferner ischämischer Perkonditionierung	33
3.1.3	Änderung der Aktivität von <i>Extracellular-signal regulated kinases</i> (ERK) nach herzferner ischämischer Perkonditionierung	34
3.2	Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Titin.....	36
3.2.1	Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Serinrest S11878 in der PEVK-Region.....	36
3.2.2	Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Serinrest S12022 in der PEVK-Region.....	38

3.2.3	Änderungen des Phosphorylierungsstatus der N2B und N2BA im zeitlichen Verlauf	40
3.2.4	Änderung der PKC α Aktivität im jeweiligen Tier	42
4	Diskussion	44
4.1	Die Titin-basierte Steifigkeit kann durch Interventionen modifiziert werden	44
4.2	Keine Veränderung der Titin Isoformenzusammensetzung bei akutem Infarkt	44
4.3	I/R und RIPC induzieren posttranslationale Modifikationen am Titin	45
4.4	Veränderungen an der Titin PEVK-Region (bei I/R mit RPER)	47
4.5	Veränderungen der Kardiomyozytensteifigkeit sind dynamisch	50
4.6	Untersuchung der N2-Bus	51
4.7	Oxidativer Stress	53
4.8	Die Perkonditionierung ist ein geeignetes Verfahren im klinischen Alltag ...	55
4.9	Limitationen	55
5	Abbildungsverzeichnis	57
6	Tabellenverzeichnis	58
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt:

1.1.1 Myokardinfarkt Epidemiologie/ Relevanz

Weltweit gehört die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen zur häufigsten Todesursache (Ritchie, 14.02.2018). Im Jahr 2017 lag die weltweite Anzahl der Toten durch eine kardiovaskuläre Erkrankung bei etwa 17,8 Millionen (Roth et al., 2018, Yusuf et al., 2019). Allerdings nimmt in Deutschland die Anzahl der Sterbefälle durch den AMI seit 1998 stetig ab, dank neuerer therapeutischer Erkenntnisse (Gbe-Bund, 19.05.2020). Patienten, welche einen Myokardinfarkt überleben, bilden jedoch häufig eine Herzinsuffizienz aus, was die steigende Prävalenz der Herzinsuffizienz erklärt (Moran et al., 2014, Heusch et al., 2014). In Deutschland gilt die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen weiterhin als häufigste Todesursache (DESTATIS, 08/2023b) und erzeugt einen hohen Anteil der Kosten im Gesundheitswesen. Am akuten Koronarsyndrom (ACS) versterben 6,3 % der Patienten in Deutschland im Krankenhaus. Die höchste hospitalere Mortalität liegt bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) vor (12 %) (Neumann et al., 2020). Unter den kardiovaskulären Erkrankungen wurde die chronisch ischämische Herzkrankheit (mit 74485 Toten) als häufigste und der akute Myokardinfarkt (mit 45181 Toten) als zweithäufigste Todesursache in Deutschland verzeichnet (2021) (DESTATIS, 08/2023a). Die Infarktgröße, einen Monat nach perkutaner Koronarintervention, gilt als Prognosefaktor sowohl für die Einweisung in ein Krankenhaus (Hospitalisierung) aufgrund von Herzinsuffizienz, als auch für die Gesamtmortalität nach einem Jahr (Stone et al., 2016). Daher sollte das Ziel aktueller Forschung sein, Möglichkeiten zu finden, den anbahnenden Myokardinfarkt rechtzeitig zu erkennen, möglichst kostengünstig und wirksam zu behandeln, sodass die Infarktgröße minimiert werden kann.

1.1.2 Myokardinfarkt Entstehung und Pathophysiologie

Das akute Koronarsyndrom umfasst die folgenden Krankheitsbilder: Instabile Angina Pectoris, den Myokardinfarkt ohne ST-Hebung (NSTEMI) und den Myokardinfarkt mit

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

ST-Hebung (STEMI). Aufgrund der ähnlichen Symptomatik kann zwischen diesen Krankheiten nicht sicher unterschieden werden, weswegen der Sammelbegriff des ACS zunächst als Arbeitsdiagnose verwendet wird. Die Erkrankungen des ACS umfassen thorakale Beschwerden, welche ätiologisch einer Koronarinsuffizienz und der daraus resultierenden kardialen Ischämie zugrunde liegen. Grundsätzlich entsteht eine Koronarinsuffizienz bei einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot und wird häufig durch Verengung der Koronararterien verursacht. Bei einer stabilen Angina Pectoris reicht der Blutfluss in Ruhe für eine ausreichende Perfusion aus. Eine Angina Pectoris wird als instabil bezeichnet, wenn sie neu auftritt, an Häufigkeit oder Intensität zunimmt, wenn sie in Ruhe (>20 min) oder in Form eines Postinfarktes innerhalb von vier Wochen nach Auftreten eines Myokardinfarktes. Wenn eine Erhöhung des Labormarkers Troponin im Serum besteht, handelt es sich diagnostisch um einen Myokardinfarkt, welcher je nach EKG-Befund, als NSTEMI oder STEMI bewertet wird (Collet et al., 2020).

Pathologisch beruht die Verengung des Gefäßlumens auf einer arteriosklerotischen Gefäßschädigung. Die Gefäßschädigung entsteht über einen Zeitraum von Jahre bis Jahrzehnte und ist bedingt durch Risikofaktoren, welche zur Bildung und Progression der arteriosklerotischen Läsionen beitragen. Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren sind: arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes Mellitus, Rauchen, Übergewicht und eine genetische Disposition (Mahmood et al., 2014, Yusuf et al., 2004). Die Ursache der Arteriosklerose ist ein multifaktoriell bedingter chronisch-inflammatorischer Prozess, an dem eine Reihe von Zellen (Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen) miteinander interagieren (Libby and Theroux, 2005, Ridker et al., 2011). Kardiale Ischämien führen zu Nekrosen innerhalb des Myokards und dadurch zum Funktionsverlust der Myokardzellen. Durch den Zelluntergang werden Herzenzyme (z.B. Kreatin-Kinase-MB) und Zellbestandteile (z.B. Myoglobin, Troponin I, Troponin T) in die Blutbahn freigesetzt, welche als diagnostische Marker verwendet werden.

Die Prozesse im Anschluss eines Myokardinfarktes (MI) lassen sich in drei Phasen einordnen: Die inflammatorische Phase, die proliferative/adaptive Phase und die

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Reifungsphase. In der inflammatorischen Phase (3 bis 72 Stunden nach MI) werden Chemokine und Zytokine aktiviert, wie das Interleukin-6 (IL-6), welche wiederum weitere neutrophile Granulozyten in der Infarktregion rekrutieren. In der proliferativen/adaptiven Phase (72 Stunden bis 7 Tage nach MI) produzieren aktivierte Myofibroblasten Kollagen 1 und 3, um das untergegangene Gewebe zu ersetzen (Frangogiannis, 2006). In der Reifungsphase (7 bis 14 Tage nach MI) ist die Fibrosierung mit bindegewebigem Umbau der Extrazellulärmatrix abgeschlossen. Auch im nicht-ischämischen Areal kommt es zu einer vermehrten Bildung von Kollagen 1 und 3. (Ma et al., 2012). Es gibt zwei grundlegende Faktoren, die die passiven mechanischen Eigenschaften des Myokardgewebes beeinflussen. Zum einen das Kollagen in der Extrazellulärmatrix und zum Anderen die Steifigkeit der Myozyten (Kötter et al., 2013). Der Myokardinfarkt, welcher durch den Untergang der Herzmuskelzellen bedingt ist, spielt eine enorme Rolle im klinischen Alltag und in vielen Fachdisziplinen der Medizin.

1.1.3 Myokardinfarkt Therapie

Die Therapie des akuten Myokardinfarktes ist abhängig vom EKG- Befund (STEMI, NSTEMI oder Herzstillstand). Frühe und vollständige Reperfusion durch mechanische oder pharmakologische Hilfsmittel und zusätzliche Antithrombotischer Behandlung zeigen eine erwiesene niedrigere Sterblichkeit (Keeley et al., 2003, De Luca et al., 2005). Die perkutane Koronarintervention (PCI) ist Mittel der Wahl beim STEMI. Ist die PCI nicht innerhalb von 120 Minuten nach Stellung der STEMI Diagnose verfügbar, ist eine medikamentöse Fibrinolyse indiziert. Bei schweren koronaren Herzerkrankungen oder PCI ungeeigneter Anatomie spielt die aortokoronare Bypass Operation eine bedeutende Rolle. Auch beim NSTEMI kann abhängig von den Befunden eine PCI oder eine aortokoronare Bypass Operation empfohlen sein (Collet et al., 2020). Außerdem senken allgemeine Maßnahmen wie die duale antithrombotische Therapie, Beta-Blocker, Statine und Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) die Morbidität und Mortalität bei Myokardinfarkt. (Freemantle et al., 1999, Yusuf et al., 2001, Baigent et al., 2005).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.1.4 Reperfusionsschäden

Eine frühe und vollständige Reperfusion ist weiterhin die effektivste Intervention, die Infarktgröße und ventrikuläre Umbauprozesse zu limitieren (Heusch et al., 2014). Sie ist jedoch auch für irreversible Reperfusionsschäden am Myokard und an der koronaren Mikrozirkulation mitverantwortlich, und wirkt sich somit auf die finale Infarktgröße aus (Heusch, 2004, Yellon and Hausenloy, 2007). Dabei gehen Kardiomyozyten zugrunde, welche vor der Reperfusion funktionsfähig waren (Piper et al., 1998). Dies erklärt teilweise, weshalb die Sterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt bei etwa 10%, trotz adäquater myokardialer Reperfusion liegt, (Keeley et al., 2003). Die Reperfusionsschäden können in vier Mechanismen eingeteilt werden: dem *no-reflow* Phänomen, das myokardiale *Stunning*, die Reperfusionarrythmien und der letale Reperfusionsschaden (Yellon and Hausenloy, 2007). Beim *no-reflow* Phänomen findet keine adäquate Reperfusion statt, weil sich der Widerstand des Gefäßlumen durch Schwellen des Endothels erhöht (Kloner et al., 2018). Beim myokardialen *Stunning* findet nach Reperfusion, unabhängig vom infarktbedingten Schaden, keine adäquate mechanische Pumpleistung statt. Dieser Effekt ist reversibel und hält Tage bis Wochen an (Braunwald and Kloner, 1982). Die Reperfusionarrythmien werden durch elektrophysiologische Veränderungen nach Reperfusion charakterisiert und sind gut zu therapieren (Manning and Hearse, 1984). Der letale Reperfusionsschaden ist die bedeutendste Form, da diese scheinbar die Infarktgröße sogar vergrößert und somit eine wesentliche Limitation in der Therapie darstellt. Vorbeugende mechanische und pharmakologische Interventionen, vor Beginn der Reperfusion, konnten eine Reduktion des Schadens zeigen (Yellon and Hausenloy, 2007). Die in dieser Arbeit untersuchte Perkonditionierung ist ebenfalls eine dieser Interventionen, welche die beschriebenen letalem Reperfusionsschäden reduzieren kann (Zhao et al., 2003, McLeod et al., 2017). Die beteiligten pathophysiologischen Mechanismen werden in 1.3.3 beschrieben.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.2 Herzmuskulatur

1.2.1 Sarkomer-Aufbau

Eine Muskelfaser (Synonym: Muskelzelle) besteht aus mehreren Myofibrillen, welche wiederum aus mehreren hintereinander und parallel angeordneten Sarkomeren bestehen. Ein Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit der Skelett- und Herzmuskulatur und besteht jeweils aus drei Myofilamentsysteme: Das dicke Myosin-Filament, das dünne Aktin-Filament und dem Titin-Filament. Durch Längenvariation gewährleisten Sarkomere die Kontraktionsfähigkeit eines Muskels. Ein Sarkomer lässt sich unterteilen in eine Z-Scheibe, das isotrope Band (I-Band), das anisotrope Band (A-Band) und das Mittel-Band (M-Band; auch M-Linie), wie in Abbildung 1 dargestellt. Ein Sarkomer wird an beiden lateralen Enden von Z-Scheiben begrenzt. Z-Scheiben sind somit auch das Verbindungsstück zum nächsten Sarkomer. Die Aktin- und Titinfilamente sind in den Z-Scheiben verankert und bilden dadurch eine Verknüpfung zwischen kontraktilem Apparat und Zytoskelett (Pyle and Solaro, 2004). In der Mitte zwischen den beiden Z-Scheiben liegt das M-Band, an dem das Myosinfilament und Titin über Myomesin verankert sind. Ein Titinmolekül durchspannt die Hälfte des Sarkomers, von der Z-Scheibe bis zur M-Bande, und ist dadurch an einer optimalen Zentrierung der Myosinfilamente bei der Kraftentwicklung beteiligt (Furst et al., 1988, Horowitz et al., 1989, Linke and Hamdani, 2014).

Eine Muskelkontraktion entsteht durch Verkürzung des Sarkomers, indem Aktinfilamente und Myosinfilamente ineinander gleiten. Dies geschieht bei konstanter Filamentlänge und wird als Gleitfilamenttheorie beschrieben (Huxley and Hanson, 1954). Das Ineinandergleiten beruht auf dem Mechanismus des Querbrückenzyklus. Durch seine ATPasefunktion kann der Myosinkopf unter Spaltung eines Adenosintriphosphats (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat an das Aktinfilament binden. Die Abspaltung des ADP-Moleküls und des Phosphatrestes vom Myosinkopf wird als Kraftschlag bezeichnet, wodurch sich beide Filamente ineinander verschieben. Durch Bindung eines neuen ATP-Moleküls kann sich der Myosinkopf vom Aktin lösen und der Querbrückenzyklus kann erneut beginnen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Das I-Band ist der Bereich, an dem das Aktinfilament an die Z-Scheibe grenzt und nicht mit dem Myosinfilament überlappt. Die Namensgebung des I-Bandes beruht auf der nicht doppelt lichtbrechenden (isotropen) Eigenschaft in der Polarisationsmikroskopie. Es erscheint im Lichtmikroskop hell mit der dunklen Z-Scheibe in der Mitte.

Das A-Band ist der myosinhaltige Bereich im Sarkomer. Es bricht das polarisierte Licht doppelt (anisotrop) und erscheint im Mikroskop dunkel. Die mediane Verdichtung in der Mitte des A-Bandes wird als M-Band bezeichnet (Knappes and Carlsen, 1968, Agarkova and Perriard, 2005).

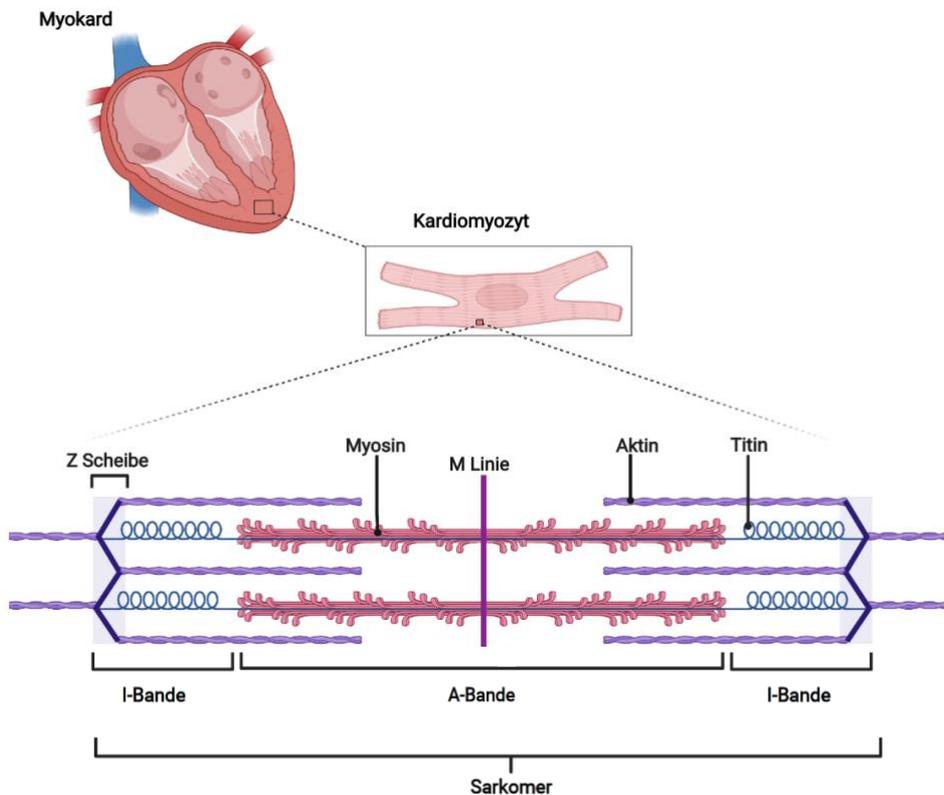


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers. Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit der quergestreiften Muskulatur und besteht aus drei Filamenten: Dem dünnen Aktinfilament, dem dicken Myosinfilament und dem Titinfilament. Aus dem Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente resultiert eine Verkürzung des Sarkomers. Das Titinmolekül durchspannt ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe aus bis zur M-Linie. A-Band (anisotropes Band), I-Band (isotropes Band), M-Linie (mediane Verdichtung der Myosinfilamente; Synonym: M-Band), Z-Scheiben (laterale Begrenzung des Sarkomers und Aufhängeapparat für Aktin- und Titinfilamente). Die Abbildung wurde erstellt über Biorender.com.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.2.2 Titin

1.2.2.1 Domänen und Struktur des Titins

Das Gen für Titin ist im quergestreiften Muskel kodiert für ein Protein mit einer potenziellen Größe von 4,2 MDa (4200 kDa) und ist damit das größte bekannte monomere Protein im menschlichen Organismus (Bang et al., 2001). Es erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und hat somit die Spannweite eines halben Sarkomers (Furst et al., 1988). Es ist das einzige der drei Filamente, welches über die gesamte Länge des Sarkomers auftritt. Titin setzt sich aus einer Vielzahl von Proteindomänen zusammen, unter anderem aus sequenziell aneinandergereihten Immunglobulin (Ig)- und Fibronectin Typ 3-ähnlichen Domänen (FNIII), individuellen Sequenzabschnitten (*Unique sequences*) und der Titinkinase-Domäne nahe der M-Bande (siehe Abb. 2) (Labeit et al., 1992, Labeit and Kolmerer, 1995, Bang et al., 2001). Das humane Titinprotein wird auf Chromosom 2 durch ein einzelnes Gen aus 363 Exons kodiert und exprimiert, durch alternatives Spleißen entstehen viele muskelspezifische Isoformen (Bang et al., 2001). Die Zusammensetzung der verschiedenen Bauelemente ermöglicht eine Bandbreite von unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften und Reaktionsmöglichkeiten, welche die Konfiguration des Titins verändern und dadurch die myokardiale Elastizität beeinflussen. Dies ermöglicht Titin vielseitige Eigenschaften und Funktionen als molekulare Feder, Mechanosensor und in der Protein-Qualitätskontrolle (Linke et al., 1994, Makarenko et al., 2004, Prado et al., 2005) (siehe Funktion und Posttranslationale Modifikation).

Das NH₂-terminale Ende des Titins ist an der Z- Scheibe befestigt. Diese Verankerung wird durch Nebulin (im Herzen das spezifische Nebulette) (Witt et al., 2006), Alpha-Actinin (Labeit et al., 2006) und Telethonin (Granzier and Labeit, 2004, Miller et al., 2004, Lange et al., 2006) ermöglicht. Die gesamte Z-Scheiben-Region des Titins besteht aus 28 Exons und neun Ig-Domänen (Z1-Z9), welche voneinander durch *unique sequences* getrennt sind. Bis zur Z4 sind die Ig-Domänen fest in der Z-Scheibe integriert. Der restliche Teil ist dennoch eng mit der Z-Scheibe verknüpft (Linke et al., 1997, Trombitas and Granzier, 1997). Das NH₂-terminale Ende des Titins besteht aus den Ig-Domänen Z1

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

und Z2, welche auch als *Z-Repeats* bezeichnet werden. Alpha-Actinin verbindet Titin mit dem Aktinfilament im Bereich der Ig-Domäne Z9 und der ersten Ig-Domäne in der I-Band-Region (I1). Dadurch wird die Anlagerung des Titinfilaments an das dünne Aktinfilament ermöglicht (Linke, 2008, Trombitas and Granzier, 1997). Anders als die festen integrierten Bestandteile des Titins in der Z-Scheibe und im A-Band, ist der I-Bandbereich weitgehend freiliegend und elastisch verformbar. (Trombitas et al., 1998, Linke et al., 1996, Linke et al., 1999).

Funktionell spielt die I-Band-Region die Rolle einer molekularen Feder und ist zusammen mit der extrazellulären Matrix eine Determinante für die passive Steifigkeit der Muskulatur (Linke et al., 1994). Der Vorgang des alternativen Spleißens findet vor allem im Bereich der I-Band-Region statt (Krüger and Linke, 2011). Daher unterscheiden sich die zwei im Herz vorkommenden Isoformen hauptsächlich in ihrer I-Banden-Komposition. Titin liegt im Säugetierherzen als kurze und steife N2B-Isoform (ca. 3,0 MDa) und als längere und elastischere N2BA-Isoform (3,2-3,3 MDa) vor (Freiburg et al., 2000, Bang et al., 2001). Das Verhältnis dieser beiden Isoformen bestimmt maßgeblich die Myofilamentsteifigkeit. So kann eine Erhöhung des Anteils der elastischeren N2BA-Isoformen zu einer verringerten Myofilamentsteifigkeit führen (Cazorla et al., 2000). Je nach Spezies, ist das Verhältnis der beiden Isoformen verschieden ausgeprägt (Krüger et al., 2006). Im adulten menschlichen Herzen findet man üblicherweise eine Verteilung von etwa 60% N2B und 40% N2BA (Kötter et al., 2013).

Der I-Bandbereich ist durch proximale Ig-Domänen (Ig 10-20), die herzspezifische N2B-Domäne (mit ihrer N2B-Unique Sequenz; N2-Bus), eine mittlere Ig-Domäne (Ig24- Ig76), die N2A-Domäne, eine PEVK-Domäne (Ig80 – Ig95) und zuletzt die distale Ig-Domäne (Ig80 - Ig95) aufgebaut. Die mittlere Domäne und die N2A-Domäne treten nur bei der N2BA-Isoform auf (Bang et al., 2001, Lahmers et al., 2004, Krüger and Kötter, 2016).

Die PEVK-Domäne ist eine *unique-sequence* im I-Bandbereich des Titins, bestehend aus einer Vielzahl von Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K)-Resten (Labeit and Kolmerer, 1995) (siehe Abb. 2).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Vor allem in der I-Band-Region des Titins unterscheiden sich die beiden Isoformen N2BA und N2B hinsichtlich ihrer Länge und der daraus resultierenden Elastizität. Eine höhere Elastizität der N2BA-Isoform liegt vor aufgrund einer längeren PEVK-Domäne, der zusätzlichen mittleren Domäne sowie der N2A-Domäne. (Freiburg et al., 2000, Bang et al., 2001, Greaser et al., 2002).

Die A-Band-Region ist mit einer ungefähren Größe von 2 MDa, der größte Bereich des Titins (Bang et al., 2001). Diese Region besteht aus mehreren seriell angeordneten Ig-Domänen und Fibronectin-Typ-3 Domänen. Die A-Bande ist eng mit Myosin und dem Myosin-Bindungsprotein C verbunden. Durch die Bindung der Fibronectin-Typ-3 Domäne an das Myosin ist das A-Band nicht elastisch. Aufgrund dieser Bindung und der repetitiven Anordnung der Domänen wird das A-Band als Gerüst für den Aufbau des Sarkomers gedeutet (Labeit et al., 1992, Tskhovrebova and Trinick, 2004).

Das COOH-terminale Ende des Titins am M-Band besteht aus zehn Ig-Domänen (M1-M10) und der Titin-Kinase Domäne, welche sich am Übergang des A-Bandes befinden (Gautel, 2011). Zwischen den Ig-Domänen befinden sich sieben *unique sequences*, welche alternativ gespleißt werden. Die M-Band-Region des Titins ist über Myomesin mit dem Myosinfilament verbunden und sorgt für mechanische Stabilität (Fukuzawa et al., 2008).

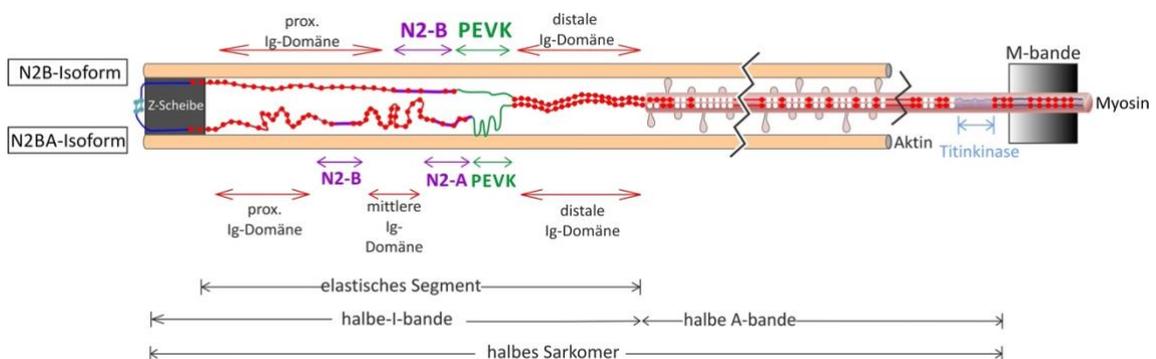


Abb 2: Schematische Darstellung der kardialen Titin-Isoformen N2B und N2BA in einem Halbsarkomer von Z-Scheibe bis zum M-Band. In beiden Isoformen kommen die proximalen und distalen Ig-Domänen, sowie die PEVK-Region und das herzspezifische N2B Element vor. Die N2BA enthält eine zusätzliche mittlere Ig-Domäne und ein N2-A Segment. PEVK, Titinregion bestehend aus Prolin, Glutamat, Valin und Lysin. Ig-ähnliche-Domänen sind als rote Kreise dargestellt und Fn-ähnlichen-Domänen sind als weiße Kreise dargestellt.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.2.2.2 Funktionen des Titins/ die molekulare Feder Titin

Das Titin spielt eine wichtige Rolle in der Gewährleistung der strukturellen Funktion bei Relaxation- und Kontraktionszyklen durch die zentrale Lage im Sarkomer und der Verbindung zum Myosin (Krüger and Kötter, 2016). Das Titin kann das Myosin in zentraler Position halten, um so eine optimale Kraftentwicklung zu ermöglichen (Horowitz et al., 1989, Linke and Hamdani, 2014). Die I-Band-Region ist das elastischste Segment im Titin und wird bei Dehnung des Sarkomers gestreckt (Linke et al., 1996, Linke et al., 1999, Trombitas et al., 1998, Li et al., 2002). Bei zunehmender Dehnung des Sarkomers in der Diastole und gleichzeitigem Anstieg der Spannung, dient Titin durch die entstehende Rückstellkraft als molekulare Feder und beeinflusst die Elastizität der Herzmuskelzellen (Linke et al., 1999, Granzier and Wang, 1993). Dadurch ist Titin ein entscheidender Faktor für die Ventrikelfüllung und der längenabhängigen Kraftentwicklung im Myokard. Bei niedriger Sarkomerlänge sind die Domänen der I-Bande in einem sogenannten „*random coil*“ Zustand hoher Entropie (Li et al., 2002, Granzier and Labeit, 2004). Zunächst werden bei Dehnung die Ig-Domänen gestreckt, bei weiterer Dehnung entfalten sich die Sekundärstrukturen der PEVK-Domäne und der N2-Bus (Linke et al., 1999). Bei Abklingen der Zugkraft kehren die Domänen wieder in ihre Ausgangsposition zurück, ähnlich einer „molekularen“ Feder (Granzier and Wang, 1993, Linke et al., 1999, Li et al., 2002, Linke and Hamdani, 2014). Die durch Titin generierten Rückstellkräfte beeinflussen schon bei einem physiologischen Sarkomerlängenbereich von bis zu 2,2 μm den Großteil der passiven Kardiomyozytensteifigkeit, während die durch Kollagen vermittelte Steifigkeit in der Extrazellulärmatrix verortet ist und erst bei einer Sarkomerlänge von über 2,2 μm eine größere Rolle spielt (Linke et al., 1994, Prado et al., 2005). Dies wird in der folgenden Abbildung illustriert.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

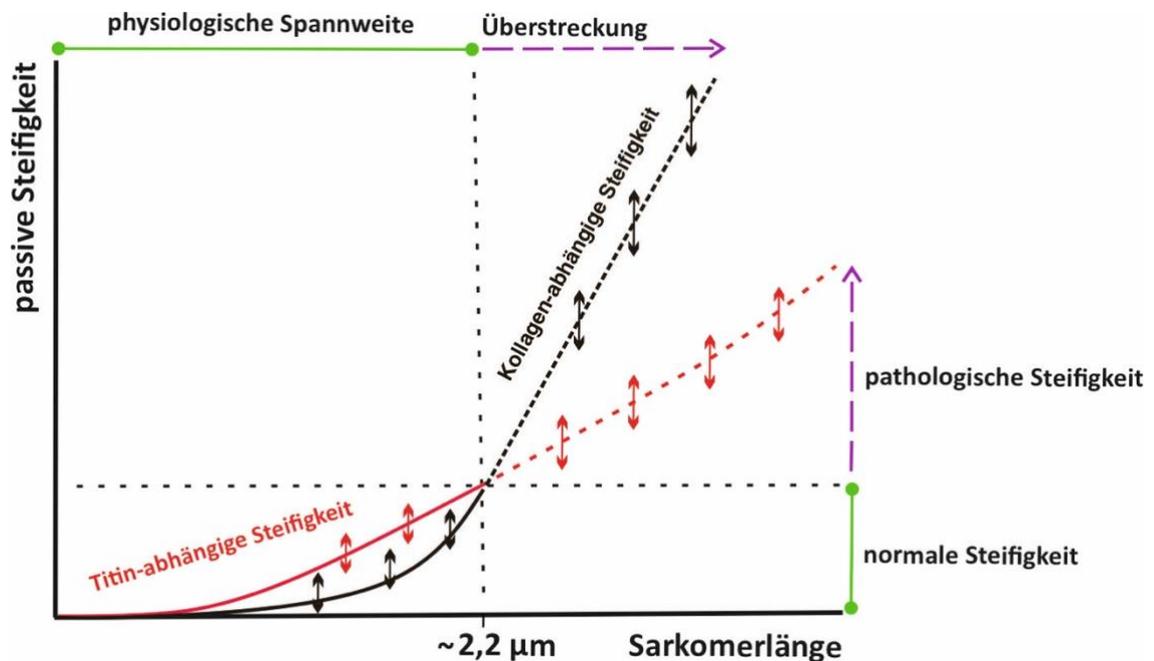


Abb 3: Beitrag von Titin und Kollagen zur passiven Steifigkeit im Myokard bei steigender Sarkomerlänge. Angelehnt an Linke und Hamdani (Linke and Hamdani, 2014). Die Doppelpfeile stellen die Variabilität der Kollagen- und Titinsteifigkeit dar. Überdehnung der Sarkomere kann bei Herzinsuffizienz auftreten und durch remodelling Prozesse eine erhöhte pathologische Steifigkeit verursachen. Im physiologischen Bereich beeinflusst Titin den Großteil der passiven Steifigkeit des Myokards.

1.2.2.3 Posttranslationale Modifikation

Bei Herzerkrankungen kann die Myofilamentsteifigkeit über zwei Möglichkeiten angepasst werden. Zum einen über das Verhältnis der N2B- und N2BA- Isoform des Titins. Zum anderen kann die Myofilamentsteifigkeit über die Phosphorylierung der elastischen I-Band Domäne des Titins angepasst werden. Die meisten Modifikationen sind im stärkerem Ausmaß an der steiferen N2B-Isoform detektiert worden (Borbely et al., 2009, Kötter et al., 2013).

Vorangegangene Studien zeigten, dass bei terminaler Herzinsuffizienz das Verhältnis von N2BA zu N2B erhöht ist und dies zu einer reduzierten passiven Steifigkeit führt (Neagoe et al., 2002, Makarenko et al., 2004, Nagueh et al., 2004). Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus adaptiv die bereits erhöhte Steifigkeit durch den fibrotischen Umbau ausgleichen soll. Andererseits wurde auch gezeigt, dass bei einigen hypertrophen Kardiomyopathien in dilatativer Endstufe das N2BA/N2B-Verhältnis

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

unverändert ist, aber dennoch eine erhöhte passive Steifigkeit durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus des Titins auftrat (Kötter et al., 2016).

Sowohl in menschlichen Herzbiopsien als auch in verschiedenen tierexperimentellen Modellen zeigten sich Veränderungen der Titin Phosphorylierung unter pathophysiologischen Bedingungen. Diese Analysen wurden mithilfe phosphospezifischer Antikörper an den Serin- oder Threoninresten der N2-Bus- und der PEVK-Region durchgeführt (Linke and Hamdani, 2014).

Phosphorylierung der PEVK-Domäne durch die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C alpha (PKC α) und Calmodulin-abhängigen Proteinkinase 2 Delta (CaMKII δ) führt zur funktionellen Verkürzung der Domäne und dadurch zu einer höheren passiven Steifigkeit des Titins (Hidalgo et al., 2009, Hidalgo et al., 2013, Hamdani et al., 2013).

Phosphorylierung der N2-Bus-Domäne durch die Proteinkinase A (PKA; (Yamasaki et al., 2002, Krüger and Linke, 2006)), Proteinkinase G (PKG; (Krüger and Linke, 2009)), *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK; (Raskin et al., 2012, Perkin et al., 2015) und auch der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase 2 Delta (Hidalgo et al., 2013, Hamdani et al., 2013) führt dagegen zu einer funktionellen Verlängerung der elastischen Region und dadurch zu einer niedrigeren passiven Steifigkeit des Titins (Yamasaki et al., 2002, Krüger et al., 2009, Hamdani et al., 2013). Die passive Spannung kann bis zu 20% erniedrigt werden (Krüger and Linke, 2006, Krüger et al., 2009, Fukuda et al., 2005). Der gegensätzliche Effekt der verschiedenen Phosphorylierungen auf die Steifigkeit des Titins ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Titin N2-Bus besteht aus vielen sauren Aminosäuren und ist daher negativ geladen. Das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten in die bereits negative N2-Bus hat daher vermutlich eine destabilisierende Wirkung und führt zu einer reduzierten Steifigkeit. Die PEVK-Region besteht hingegen aus überwiegend basischen Aminosäuren, wodurch das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten einen stabilisierenden Effekt hat. Die dabei entstehende elektrostatische Anziehung könnte zu einer erhöhten Steifigkeit führen (Kötter et al., 2013).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Mit Hilfe von Massenspektrometrie und Autoradiographie wurden Serin (S)- Threonin (T)-Reste in der N2-Bus und der PEVK-Region identifiziert, welche durch die bisher genannten Kinasen phosphoryliert werden (Kötter et al., 2013, Krüger et al., 2009). Die Reste wurden nummeriert in Bezug auf die gesamte humane Titinsequenz (UniProtKBaccessionQ8WZ42-1). Die bislang am besten charakterisierten Signalkaskaden mit den jeweiligen Phosphorylierungsstellen am Titin sind in der nachfolgenden Abbildung aufgeführt (Couchonnal and Anderson, 2008, Hidalgo et al., 2009, Krüger et al., 2009, Raskin et al., 2012, Hidalgo et al., 2013, Kötter et al., 2013, Hamdani et al., 2013, Perkin et al., 2015).

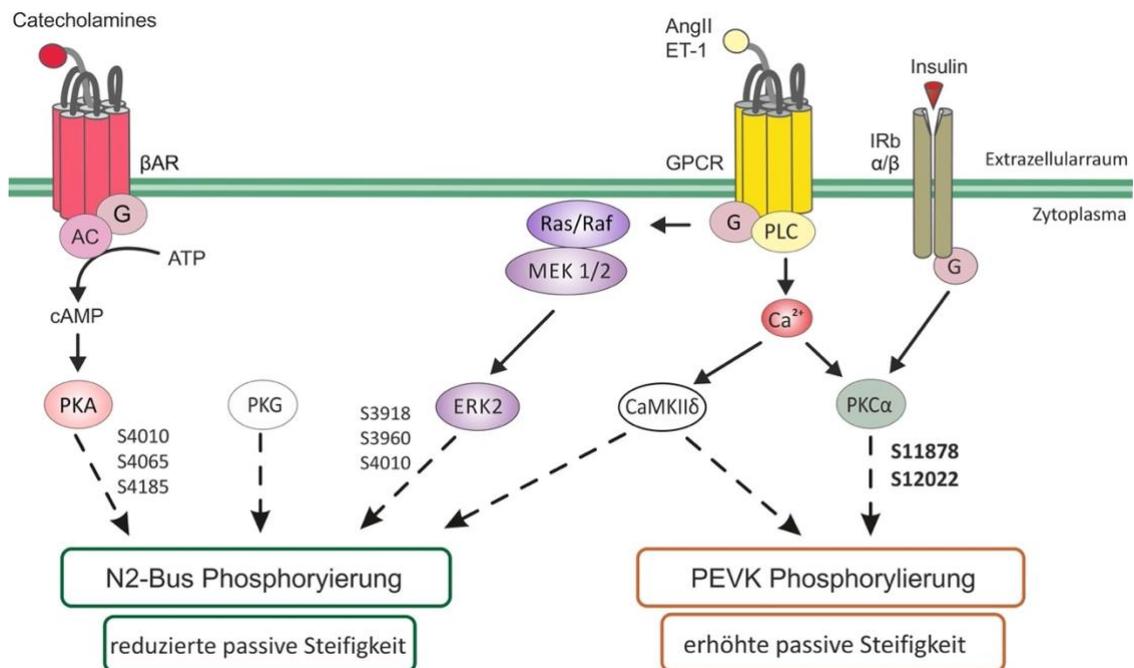


Abb 4: Schematische Darstellung der Titin Phosphorylierung an der N2-B unique sequence (N2-Bus) und die prolin, glutamat, valin und lysinreichen Titinregion (PEVK). Angelehnt an Linke und Hamdani (Linke and Hamdani, 2014). Es sind die klassischen Signalwege der Kinasen dargestellt. Die Phosphorylierungsstellen innerhalb der N2-Bus und der PEVK-Region sind nach der humanen Titinsequenz nummeriert (UniProtKB accessionnummer Q8WZ42-1). β AR, β -Adrenorezeptor; AC, Adenylatcyclase; AngII, Angiotensin II; CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent proteinkinase-II; ERK2, extracellular signal-regulated kinase-2; ET-1, Endothelin-1; G, kleines G-Protein; GPCR, G-Protein-gekoppelter-Rezeptor; MEK1/2, MAPK/ERK Kinase-1 und -2; PEVK, Titinregion reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin; PKA, Proteinkinase A; PKC α , Proteinkinase α ; PKG, cGMP-abhängige Proteinkinase G; PLC, Phospholipase C; Raf, ratbrosarcoma protein; Ras, rat sarcoma protein; sGC, lösliche (soluble) Guanylylcyclase; und us, unique sequence. Die fettgedruckten Serinreste wurden mit spezifischen Antikörpern auf ihren Phosphorylierungsstatus untersucht.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1.2.2.4 Bedeutung des Titins beim Myokardinfarkt

Die Steifheit des linken Ventrikels ist ein wichtiger Faktor für die diastolische Herzfunktion. Bei chronischen Herzerkrankungen kann als Folge von myokardialen Umbauprozessen die diastolische Füllungsphase beeinträchtigt und dadurch das gesamte Herzzeitvolumen reduziert sein (Katz and Zile, 2006). Durch Modulation der Steifigkeit, kann die Ventrikelfüllung variiert werden. So ermöglicht eine niedrige Steifigkeit des Myokards eine raschere und erleichterte Ventrikelfüllung. Dadurch werden höhere enddiastolische Volumina bei konstantem Füllungsdruck möglich. (Cazorla et al., 2000).

Sowohl in menschlichen Herzbiopsien als auch in verschiedenen tierexperimentellen Modellen zeigten sich Veränderungen der Titinphosphorylierung unter pathophysiologischen Bedingungen. Diese Analysen wurden mithilfe phosphospezifischer Antikörper an den Serin- oder Threoninresten der N2-Bus und der PEVK-Region durchgeführt (Linke and Hamdani, 2014). Wie bereits erklärt kann die Myofilamentsteifigkeit bei Herzerkrankungen über zwei Möglichkeiten angepasst werden. Zum einen über das Verhältnis der N2B- und N2BA-Isoform des Titins. Zum anderen kann die Myofilamentsteifigkeit über die Phosphorylierung der elastischen I-Band-Domäne des Titins angepasst werden. (Borbely et al., 2009, Kötter et al., 2013).

Weniger ist bislang über akute und dynamische Veränderungen der Myozytensteifigkeit und der Bedeutung für die Ventrikelfunktion bekannt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass Titin durch rasche Erhöhung der passiven Steifigkeit an der ventrikulären Stabilität in der Akutphase nach Myokardinfarkt beteiligt ist, (Kötter et al., 2016). In einem Herzinfarktmodell der Maus wurde über den Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie (RIVA) eine Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Im nicht-ischämischen Areal konnte nach drei Tagen permanenter Ischämie eine erhöhte passive Steifigkeit mit verminderter Phosphorylierung an S4010 (N2-Bus) sowie einer vermehrten Phosphorylierung an S11878 und S12022 (PEVK) nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der N2-Bus wurde durch ERK1/cGMP-abhängiger-Protein-Kinase vermittelt und die Phosphorylierung an der PEVK-Region durch PKC α . Es konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus an der PEVK-Region nach

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

zehn Tagen Ischämie wieder nahezu in den Ausgangswert zurückkehrte, die MI-induzierten Veränderungen also vermutlich transient sind. Zudem wurde gezeigt, dass IL-6 zum Teil an der durch Myokardinfarkt induzierten rasch steigenden Steifigkeit beteiligt ist, da ein Blockieren des IL-6 zur Inhibition dieses Effektes führte. IL-6 steigerte auch die PKC α -abhängige Phosphorylierung an der PEVK-Domäne und folglich die Steifigkeit im Myofilament (Kötter et al., 2016). Die rapide Erhöhung der passiven Spannung des Titins kann in den ersten Stunden bis Tagen mehrere Vorteile haben. Zum einen beschleunigt ein steiferes Titin die Rückführung des Myosins in die zentrale Position und gewährleistet somit strukturelle Stabilität in Situationen mit steigenden Kontraktions-/Relaxationszyklen (Kötter et al., 2016). Außerdem führt steiferes Titin zu einer längenabhängigen Aktivierung des Sarkomers und unterstützt somit den linken Ventrikel bei steigender Volumenlast (Cazorla et al., 2001). Angesichts des Funktionsverlusts im Infarktgewebe scheint der rapide Zuwachs an Titinsteifigkeit im nicht-ischämischen Areal eine Überdehnung und Störung der Myozyten vorzubeugen oder zu mindern. Dies reduziert den zellulären Schaden in den ersten Stunden nach Myokardinfarkt (Kötter et al., 2016). Diese Hypothese wird durch die annähernde Wiederherstellung der Titinsteifigkeit zehn Tage nach AMI gestärkt. In dieser Phase ist die fibrotische Narbenbildung abgeschlossen und die Extrazellulärmatrix trägt zur Ventrikelsteifigkeit bei, sodass die Funktion des Titins für die strukturelle Stabilität entbehrlich scheint.

1.3 Konditionierung

1.3.1 Das Konditionierungsphänomen

Die gewebeferne ischämische Konditionierung (*remote ischemic conditioning*; RIC) ist ein Phänomen, welche durch kurze Zyklen reversibler Ischämie und Reperfusion in einem Kapillarbett, Gewebe oder Organ einen protektiven Effekt auslöst, welcher Stimulus ferne Gewebe und Organe vor Ischämie-/Reperfusionsschäden schützt. (Heusch et al., 2015). Bei den Zyklen handelt es sich meist um eine abwechselnde fünfminütige Ischämie und eine fünfminütige Reperfusion, welche durch die jeweilige Okklusion der Arterie am Organ ausgelöst wird. Allerdings wurde bislang kein optimaler

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Algorithmus zur Durchführung einer Konditionierung gefunden (Heusch et al., 2015). Grundsätzlich wird zwischen der gewebefernen (*remote*) ischämischen Konditionierung und einer lokalen ischämischen Konditionierung unterschieden, abhängig davon, ob die Zyklen direkt am Infarktort durchgeführt werden oder an einem entfernten Gewebe. Die Konditionierung wird in eine Prä-, Per-, oder Postkonditionierung unterschieden, je nachdem wann die Zyklen eingesetzt werden. Alle drei Arten reduzieren die Infarktgröße und bieten somit drei verschiedene therapeutische Zeitfenster an (Vinten-Johansen and Shi, 2011). In Abbildung 5 werden die drei Arten schematisch dargestellt. Die RIC führt zu protektiven Effekten in vielen verschiedenen Organen (Candilio et al., 2013). RIC führt zu einer reduzierten Infarktgröße und schützt vor endothelialer Dysfunktion bei Ischämie (Heusch and Gersh, 2017, Skyschally et al., 2018, Kharbanda et al., 2002, Loukogeorgakis et al., 2005). Bei der Präkonditionierung werden die Zyklen vor Eintreten des Infarktereignisses eingesetzt und bei der Postkonditionierung erst nach dem Infarktereignis bei wieder beginnender Reperfusion. Bei der Perkonditionierung finden die Zyklen während des Infarktereignisses statt (Vinten-Johansen and Shi, 2011). Der Meilenstein für die Forschung am Phänomen der Konditionierung wurde im Jahr 1986 gesetzt. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass vier Zyklen von fünfminütiger koronarer Okklusion und fünf-minütiger Reperfusion, vor einem 40-minütigen Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion, mit einer reduzierten lokalen Infarktgröße einhergehen (Murry et al., 1986). Przyklenk et al. zeigten erstmals das Phänomen einer gewebefernen ischämischen Konditionierung. Bei betäubten Hunden führten sie vier Zyklen von fünfminütiger Okklusion und fünfminütiger Reperfusion des *Ramus circumflexus* der linken Koronararterie (RCX) durch, was zu einer reduzierten Infarktgröße in dem Perfusionsbereich der RIVA, nach dessen einstündiger Okklusion, führte (Przyklenk et al., 1993). Somit zeigte Przyklenk einen Zusammenhang zwischen Konditionierung und einem kardioprotektiven Effekt in einem "fernen" Gewebe (Heusch, 2018). Zwar wurde der Effekt lediglich an zwei voneinander fernen Perfusionsbereichen des Herzens gezeigt, allerdings resultierten daraus mehrere Studien, welche einen protektiven Effekt einer RIC in Bezug auf Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Haut und weiteren Organen zeigten (Candilio et al., 2013).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Kharbanda konnte einen klinisch relevanten Effekt zeigen, bei dem mittels eines Tourniquets im Schweinmodell und einer Blutdruckmanschette am Menschen, eine RIPC durchgeführt wurde. Bei den Schweinen zeigte sich dadurch eine Reduzierung einer Infarktgröße um 50% und beim Versuch am Menschen konnte durch die Präkonditionierung einer endothelialen Dysfunktion, sowohl am ipsilateralen als auch am kontralateralen Arm (in vivo), vorgebeugt werden (Kharbanda et al., 2002). Die Reduktion der Infarktgröße durch gewebeferner ischämischer Postkonditionierung (Rpost) konnte das erste Mal im Rattenmodell durch kurze renale Ischämie und Reperfusion, bei gleichzeitiger fünfminütiger koronarer Okklusion, gezeigt werden (Kerendi et al., 2005). Die Rpost konnte im Schweinmodell nachgewiesen werden (Andreka et al., 2007) und anschließend im Hasenmodell (Gritsopoulos et al., 2009) und im Rattenmodell (Breivik et al., 2011) bestätigt werden. Im Schweinmodell konnte durch vier Zyklen fünfminütiger Ischämie am unteren Schenkel, bei gleichzeitiger 40-minütiger Okklusion der RIVA, eine RPER gezeigt werden, die sich durch verringerte Infarktgröße, erhaltener systolischer und diastolischer Funktion und weniger Arrhythmien auszeichnete (Schmidt et al., 2007).

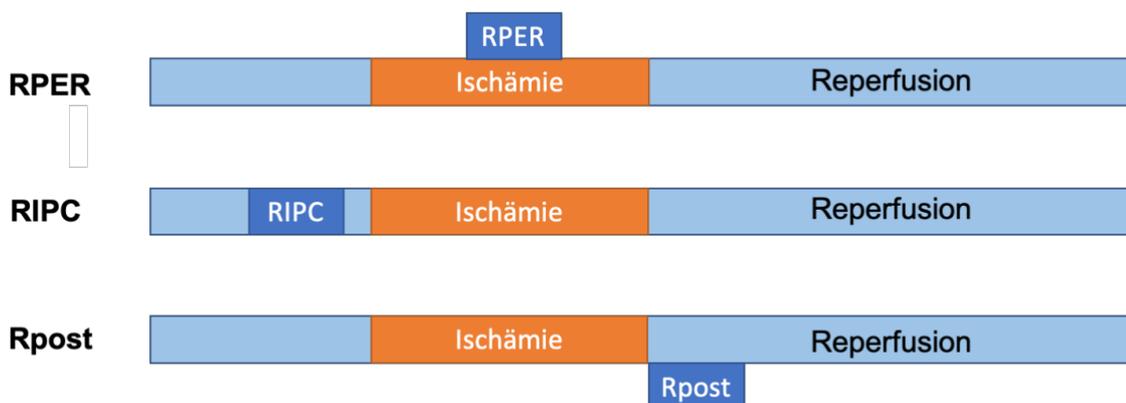


Abb 5: Modelle der Konditionierungsarten. RPER, gewebeferne ischämische Perkonditionierung; RIPC, gewebeferne ischämische Präkonditionierung; Rpost, gewebeferne ischämische Postkonditionierung. In der Abbildung sind die Zeitpunkte der Ischämie-/Reperfuzyklen dargestellt (vor-, während- und nach induzierter Ischämie). Ein einheitlicher optimaler Algorithmus wurde bisher nicht bestimmt (Heusch, 2015).

1.3.2 Vorteile einer RPER

In tierischen Experimenten sind die Konditionierungsphänomene die effektivste kardioprotektive Intervention bezüglich der Reduktion von Infarktgröße (Murry et al., 1986, Jennings, 2013). Eine Wiederherstellung des Blutflusses in einer Infarktsituation reduziert zwar die Infarktgröße, kann aber auch zu Reperfusionsschäden am Myokard und der koronaren Mikrozirkulation führen. (Piper et al., 1998, Heusch, 2004, Yellon and Hausenloy, 2007, Ovize et al., 2010). Hier spielt die generelle RIC eine bedeutende Rolle, da sie das Myokard und die koronare Mikrozirkulation vor Reperfusionsschäden schützt und die Infarktgröße reduzieren kann (Przyklenk et al., 1993, Gho et al., 1996, Heusch et al., 2015). Die lokale Konditionierung stellt einige klinische Hindernisse dar, weil sie nur durch elektiver Intervention durchgeführt werden kann und dies eine praktische und zeitliche Hürde im akuten Notfall darstellt (Skyschally et al., 2018). Das Auftreten eines Myokardinfarktes ist meist nicht prognostizierbar und bei dessen Beginn ist eine Präkonditionierung häufig nicht mehr möglich (Heusch and Gersh, 2017). Daher ist eine herzferne ischämische Perkonditionierung im klinischen Alltag relevanter, weil sie auch im akuten Notfall, d.h. während des Myokardinfarktes angewendet werden kann (Skyschally et al., 2018). Auch ihre Ausführung ist simpel, da lediglich ein Tourniquet oder eine Blutdruckmanschette benötigt wird (Heusch et al., 2015).

Unter Anwendung der RPER, bei bereits laufender Okklusion, konnte eine Infarktreduktion im Schweinmodell anhand einer Abflachung der ST-Hebung im EKG gezeigt werden (Kleinbongard et al., 2018). Es konnten aber auch bereits positive Effekte bei klinischer Anwendung gezeigt werden. Botker et al publizierte im Jahre 2010 eine klinische Studie über den Effekt der herzfernen ischämischen Perkonditionierung bei Patienten mit STEMI. Während der Fahrt im Rettungswagen wurden mithilfe einer Blutdruckmanschette am Oberarm, Zyklen von Ischämie und Reperfusion ausgelöst. Es zeigte sich eine Reduzierung der Infarktgröße in der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) (Botker et al., 2010). Passend hierzu konnte bei der CONDI Studie randomisiert und kontrolliert gezeigt werden, dass eine zusätzliche Durchführung einer RPER zur PCI den schädlichen Effekt von Verzögerungen im Gesundheitssystem senken konnte (Pryds et al., 2016). Sie beugt außerdem als

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Zusatztherapie zur PCI Reperfusionsschäden vor (McLeod et al., 2017). Sloth et al. konnte zudem retrospektiv einen positiven langfristigen Effekt der RPER auf das klinische Outcome von STEMI-Patienten zeigen. Als primärer Endpunkt wurden schwere kardiale und zerebrovaskuläre Komplikationen festgelegt (allgemeine Sterblichkeit, Myokardinfarkt, wiederauftretende Herzinsuffizienz und ischämischer Schlaganfall) (Sloth et al., 2014). Die RIC-STEMI Studie konnte einen positiven Effekt einer RPER auf das klinische Outcome bei STEMI randomisiert und kontrolliert nachweisen. Im Vergleich zur PCI zeigte die RIC eine reduzierte kardiale Sterblichkeit und reduzierte Einweisungen aufgrund von Herzinsuffizienz in den folgenden 12 Monaten. Auch die Ejektionsfraktion in der Echokardiographie zeigte eine Erholung und der Gebrauch von Diuretika und Inotropika war niedriger, die Troponin I *Area under the curve* nach 48 Stunden allerdings nicht (Gaspar et al., 2018). Die zusätzliche Therapie mit RPER bei STEMI Patienten beugt den durch PCI ausgelösten Reperfusionsschaden vor und reduziert myokardiale Schäden akut und langfristig (McLeod et al., 2017, Sloth et al., 2014, Botker et al., 2010). Die RPER zeichnet sich aus durch ihren positiven Therapieeffekt bei kostengünstiger und einfach durchführbarer Anwendung. Es gilt die genauen Mechanismen der RPER und RIC-Wirkung zu erforschen, um die beschriebenen Endpunkte auch physiologisch zu untermauern.

1.3.3 RIC induzierte Signalkaskaden

1.3.3.1 Allgemeines

Bislang wurden bereits über 100 verschiedene Signalmoleküle und Mechanismen der Konditionierung in verschiedenen Modellen beschrieben (Heusch, 2015). Die meisten bekannten Signalkaskaden wurden im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung erforscht. Die genauen Signalkaskaden der Prä-, Per-, und Postkonditionierung und deren molekularen Mechanismen der Kardioprotektion sind noch nicht vollständig entschlüsselt.

Das Mitochondrium ist eindeutig der wichtigste Effektor des Konditionierungsphänomens, da es mit den meisten Signalkaskaden konvergiert. Mitochondrien gewährleisten die Aufrechterhaltung von ionischen Gradienten und so

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

die Kopplung von Erregung und Kontraktion der Kardiomyozyten. Bei Ischämie und dem Fehlen von Sauerstoff als ein Elektronenakzeptor wird der Elektronenfluss der Atmungskette unterbrochen und induziert eine Depolarisation an der inneren Mitochondrien Membran, wodurch die ATP-Bildung limitiert wird (Heusch, 2015).

Die *Mitochondrial permeability transition Pore* (mPTP) ist ein Megakanal in der inneren Mitochondrienmembran, welcher bei längerer Öffnung das Potenzial der inneren mitochondrialen Membran verändert. Dadurch werden proteolytische Prozesse aktiviert, welche zur zellulären Desintegration führen. Dies führt zur Matrixschwellung und Ruptur der äußeren Membran und folglich zur Freisetzung von Cytochrome C ins Zytosol. Depolarisation der inneren Membran, hohe Konzentrationen von Phosphaten, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffmonoxid Spezies (NOS) sind bei myokardialer Ischämie gegeben und führen zu einer mPTP-Öffnung und somit zur zellulären Apoptose (Heusch, 2015).

Bisher wurden drei wesentliche Signalkaskaden identifiziert, welche nach ischämischer Konditionierung bei Reperfusion aktiviert werden: die *reperfusion injury salvage kinase* (RISK), der *survivor factor enhancement pathway* (SAFE), und die NO/PKG-Signalkaskade (siehe Abb. 6). Dabei scheinen die RISK- und die SAFE-Signalkaskade im *cross-talk* zueinander zu stehen, da durch die Hemmung des einen Signalweges, die Aktivierung des anderen Signalweges fehlschlug (Heusch, 2015). Diese beiden Signalkaskaden scheinen außerdem die Porenbildung in den Mitochondrien und die damit einhergehende Apoptose der Kardiomyozyten zu verhindern, weswegen sie als wichtige Angriffspunkte der Kardioprotektion zählen (Hausenloy and Yellon, 2016).

1.3.3.2 Die RISK-Signalkaskade

Die RISK ist eine Kombination aus zwei parallelen Kaskaden, welche über PI3K-Akt und MEK1-ERK1/2 wirkt. Sie erzielt nur bei akuter Aktivierung einen kardioprotektiven Effekt, da eine chronische Aktivierung zu einem schädlichen wachstumsinduzierten Effekt führt, welcher in kardialer Hypertrophie resultieren kann (Liu et al., 1994, Maulik et al., 1996). Bei ischämischer Präkonditionierung konnte das Einsetzen der RISK an zwei Zeitpunkten festgestellt werden. Zum einen vor ischämischem Ereignis und zum

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

anderen bei Einsetzen der Reperfusion. Es wird angenommen, dass die Zielstruktur des Mechanismus gegen Reperfusionsschäden am MPTP liegt, welches sich kurzfristig nach Reperfusion öffnet (Gray et al., 2004). Die meisten Erkenntnisse der RISK-Signalkaskaden wurden jedoch an kleinen Nagetiermodellen durchgeführt und die Bedeutung an größeren Tieren und am Menschen bleibt bislang ungeklärt. ERK phosphoryliert zudem die N2-Bus des Titins, könnte also in Verbindungen zwischen Konditionierung und Veränderung der Titinsteifigkeit stehen (Raskin et al., 2012).

1.3.3.3 Die SAFE-Signalkaskade

Es konnte gezeigt werden, dass der Tumornekrosefaktor (TNF) in der Prä- und Postkonditionierung am Schutz beteiligt ist (Smith et al., 2002, Lacerda et al., 2009). TNF ist abhängig von der p38 MAPK-Aktivierung und triggert über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR-2) die Phosphorylierung der Januskinase (JAK), welche wiederum das STAT3 phosphoryliert und aktiviert (Tanno et al., 2003, Lecour et al., 2005, Lacerda et al., 2009). Diese TNF/TNFR2/JAK/STAT3- Signalkaskade wird als SAFE-Signalkaskade bezeichnet und inhibiert, ähnlich wie die RISK-Signalkaskade, die mPTP-Öffnung. Hierdurch wird das Überleben der Kardiomyozyten begünstigt. Eine chronische Aktivierung der SAFE-Signalkaskade scheint jedoch keinen protektiven Effekt zu vermitteln (Hadebe et al., 2018).

Während I/R zeigt sich phosphoryliertes STAT3 im Nukleus und Mitochondrium (Wegrzyn et al., 2009, Szczepanek et al., 2011, Szczepanek et al., 2015). Durch Phosphorylierung am Serinrest des mitochondrialen STAT3 und dessen Stabilisierung durch Cyclophilin D, kann das Niveau an reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivität von MPTP und der Elektronentransportketten reguliert werden (Boengler et al., 2010, Boengler et al., 2013, Meier et al., 2017). In Schweinen konnte durch Postkonditionierung eine Kardioprotektion gezeigt werden, vermittelt durch Phosphorylierung am Tyrosinrest des mitochondrialen STAT3 (Heusch et al., 2011). In nach RIPC-Intervention entnommenen kardialen Biopsien des Menschen konnte dagegen eine erhöhte STAT5-Aktivierung gezeigt werden, weshalb beim Menschen STAT5 als bedeutender Faktor für die Konditionierung gewertet wird (Heusch et al., 2012).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

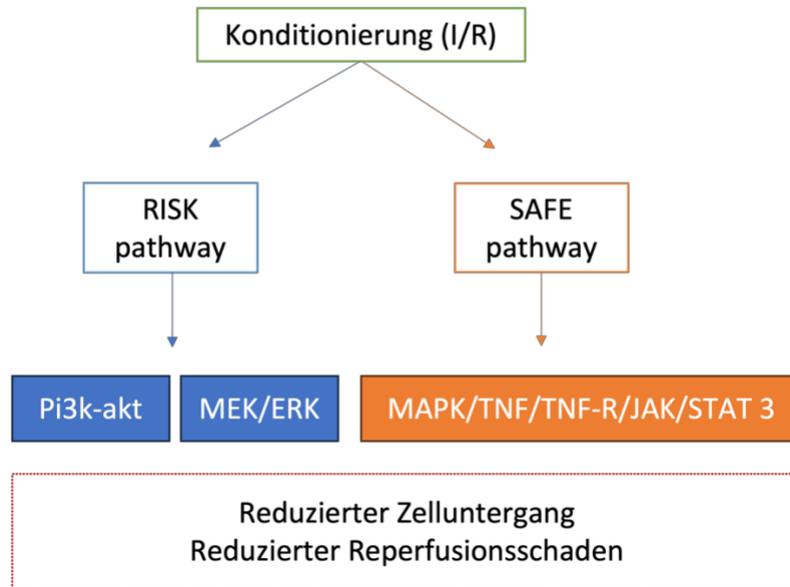


Abbildung 6: Aktivierung der RISK- und SAFE-Signalkaskaden nach ischämischer Konditionierung. Angelehnt an (Lecour, 2009):

Die reperfusion injury salvage kinase (RISK) und der salvage activating factor enhancement pathway (SAFE) sind zwei Signalkaskaden, welche nach ischämischer Konditionierung aktiviert werden. Die RISK-Signalkaskade wird über Proteinkinase B (Akt) und die Extracellulär-signal regulierte Kinase (ERK) vermittelt. Die SAFE-Signalkaskade aktiviert über Zwischenproteine den signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Beide Signalkaskaden führen zu einem reduzierten Untergang von Kardiomyozyten und reduzieren die letalen Reperfusionsschäden (Hausenloy and Yellon, 2016). Pi3k, Phosphoinositid-3-Kinasen; MEK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase; MAPK, Mitogen aktivierte Proteinkinase; TNF, Tumornekrosefaktor; TNF-R, Tumornekrosefaktor-Rezeptor; JAK, Januskinase.

1.3.3.4 Einfluss von PKG und PKC bei Konditionierung

Es gibt Erkenntnisse über weitere Komponenten, welche mit der RIPK im Zusammenhang stehen und als kardioprotektiv bekannt sind.

Oxidative Bedingungen führen zur Bildung von NO, welches wiederum die Guanylatzyklase aktiviert. Die Guanylatzyklase bildet cGMP und aktiviert so die PKG, welche im IPC und POC involviert ist. PKG wirkt am K_{ATP} -Kanal des Mitochondriums und führt zur ROS-Bildung (Oldenburg et al., 2004, Burley et al., 2007, Heusch, 2015). Durch die ROS wird PKC aktiviert, welche wiederum über G-Proteine den RISK-Signalweg aktiviert. Dies findet nur bei kurzer Ischämie statt, wie sie bei der Konditionierung abläuft. Bei längerer Ischämie unter Infarktbedingungen ist zunächst kein Sauerstoff vorhanden, sodass der RISK-Signalweg nicht aktiviert wird und es zur Apoptose durch Porenbildung den Mitochondrien kommt (Dost et al., 2008).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

PKC und PKG führen beide zu einer Phosphorylierung am Titin und modulieren somit die Myofilamentsteifigkeit, wodurch eine durch Konditionierung verursachte Veränderung am Titin in Betracht gezogen werden kann.

PKC konnte als zytosolischer Mediator bei der Protektion durch IPC identifiziert werden. Die Aktivierung von Pertussis-sensitiven G-Protein-gekoppelten-Rezeptor führt zur weiteren Aktivierung von Phospholipase C, welche wiederum die Bildung von Inositoltriphosphate und Diacylglycerol anregt. Letzteres agiert als *second-messenger* und aktiviert durch Phosphorylierung die Translokation des PKC (Lecour et al., 2005). Auch über Aktivierung der PI3K kann PKC aktiviert werden (Oudit and Penninger, 2009, Tong et al., 2000). PKC α scheint in größeren Säugetieren eine bedeutende Rolle für die IPC zu spielen, wohingegen bei Nagetieren das PKC ϵ bedeutender ist (Gray et al., 1997, Ping et al., 2002).

Adenosin wird von Kardiomyozyten ausgeschüttet und verstärkt die Kardioprotektion bei erhöhter Konzentration (Schulz et al., 1995). Kardiomyozyten exprimieren Adenosin A2A Rezeptoren, welche gekoppelt sind an Gs Proteinen, die wiederum durch die Adenylatzyklase zu der Erhöhung von PKA führen. Die Adenosin A1 und A3 Rezeptoren sind dahingegen gekoppelt zu Gi und Gq Rezeptoren, welche die Adenylatzyklase inhibieren (Cohen et al., 2001). Adenosin kann die PKC direkt aktivieren (Downey et al., 2007). Die A2A und A2B Rezeptoren sind essenziell für die POC, da sie in den ersten Minuten der Reperfusion aktiviert werden müssen, um eine Protektion zu erreichen (Methner et al., 2010).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang der RPER und der Steifigkeit des Titins bei Myokardinfarkt zu untersuchen. Dabei sollte untersucht werden, ob sich der für die Steifigkeit verantwortliche Phosphorylierungsstatus von Titin während der kardialen Ischämie und anschließender Reperfusion korrelativ verändert. Hierfür wurde das Schweinmodell verwendet, welches während der kardialen Ischämie zusätzlich Zyklen von Ischämie und Reperfusion am oberen Schenkel ausgesetzt war. Mittels SDS-Gelelektrophorese und *Western Blotting* sollte an den Kardiomyozyten der Schweine

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

der Phosphorylierungsstatus am Titin, vor und während induzierter Ischämie und nach anschließender Reperfusion ermittelt werden. Hierfür wurden spezifische Antikörper verwendet, die an den Phosphorylierungsstellen des Titins binden, welche die Steifigkeit beeinflussen. Durch besseres Verständnis des Perikonditionierungsphänomens und der Funktion des Titins könnte die Therapie des Myokardinfarktes in der Zukunft weiter optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid /Bisacrylamid	Roth
Acrylamid /Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent)	Cyanagen
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Isofluran	Piramal Healthcare
Isopropanol	Merck

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Chemikalie	Hersteller
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Nonident P40	Sigma
Salzsäure 32 %	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

Tabelle 1: Chemikalien

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die Tabelle 2 zeigt die in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösung und ihre Zusammensetzung.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x SDS - Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x -TBST (pH 7,4)	0,2 M Tris / HCl 1,5 M NaCl 1% Tween - 20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris / HCl 100 mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x -TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris / HCl
PVDF destain	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
PVDF stain	0,075% Serva Blue in Methanol

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea 2M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05 M Tris / HCl
Stripping Buffer	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

2.1.3 Laborgeräte

Die in den Experimenten verwendeten Laborgeräte sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Feinwaage	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
Mikroskop	AE 2000	Motic
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
PC/Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Reagentenschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Laborgerät	Typ	Hersteller
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	PF-5500	Grant
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

Tabelle 3: Laborgeräte

2.1.4 Antikörper

In der Tabelle 4 sind die käuflich zu erwerbenden Antikörper aufgeführt, welche im Western Blot verwendet wurden.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling,#4370
p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #9102
α -Phospho-PKC α T497	1:5000	Kaninchen	Abcam, ab76016
α -PKC α	1:30000	Kaninchen	Abcam, ab32376
α -Phospho-Troponin I (Ser23/24)	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling, #4004
α -Troponin I (Ser23/24)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #4002
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:10000	Ziege	Cell Signaling, #7074

Tabelle 4: Antikörper

Tabelle 5 zeigt die von Eurogentec hergestellten Titinantikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen produziert wurden. Die für die Immunisierung verwendeten Antigene und die daraus hergestellten Titinantikörper sind im Folgenden aufgeführt. Die Nummerierung beschreibt die Aminosäuresequenz des gesamten humanen Titinantigens (UniProtKB accession number Q8WZ42).

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
α -pPEVK S11878	1:2000	Kaninchen	Eurogentec
α -pPEVK S12022	1:1000	Kaninchen	Eurogentec
α -PEVK-pan	1:2000	Kaninchen	Eurogentec

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Tabelle 5: Titinantikörper

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Tiere

Die Gewebebiopsien der Schweinemodelle sind vom Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden (Prof. Dr. Petra Kleinbongard, Prof. Dr. Gerd Heusch). Alle hier beschriebenen Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und genehmigt (Az. 84-02.04.2014.A098, 81-02.04.2018.A026). Es wurden sechs erwachsene männliche Göttinger Minipigs mit einem Gewicht von etwa 20-40 kg und einem Alter von einem Jahr verwendet. Die Schweine wurden von der Firma Ellegaard (Dänemark) gezüchtet. Gehalten wurden die Schweine im Institut für Pathophysiologie der Universität Essen bei einer Räumlichkeit von 2m², einem Schlafrhythmus von 12/12 Stunden, einer zweimal täglichen Fütterung und freiem Zugang zu Wasser. Vor der Präparation wurden die Schweine mit Flunitrazepam (0,4mg/kg, i.m.) sediert.

2.2.2 Präparation der Schweinekardiomyozyten

Die Göttinger Minipigs wurden mit Etomidat (0,3 mg/kgKG i.v.) und Sufentanil (0,1 µg/kgKG i.v.) narkotisiert. Die Narkose wurde mittels Intubation mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (2% vol/vol) aufrechterhalten. Das Herz wurde mittels lateraler Thorakotomie freigelegt. Um den *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie (RIVA) wurde distal des zweiten Asts, eine Seidennaht für die spätere Okklusion gewickelt. Die RIVA wurde für 60 Minuten okkludiert und anschließend durch Lösen der Seidennaht reperfundiert. Die Reperfusion wurde für drei Stunden fortgeführt. Die RPER wurde 20 Minuten nach koronarer Okklusion induziert durch vier Zyklen fünfminütiger Ischämie und fünfminütiger Reperfusion. Hierfür wurde ein Tourniquet am hinteren linken Schenkel der Schweine verwendet. Myokardiale Proben wurden vor induzierter Ischämie (Kontrollgruppe), nach 55-minütiger Ischämie und bei 10- und 120-minütiger Reperfusion aus dem nicht-ischämischen Areal entnommen, in

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert (siehe Abb. 7).

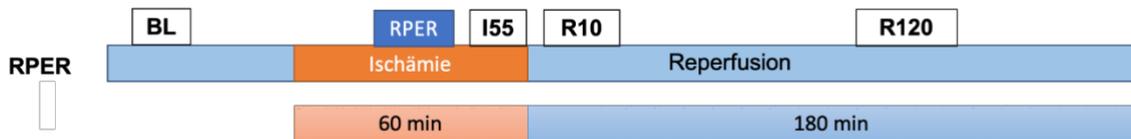


Abb. 7: Schematische Darstellung der jeweiligen Zeitpunkte der entnommenen Proben bei gewebeferner ischämischer Perkonditionierung. RPER, gewebeferne ischämische Perkonditionierung; BL, Kontrolle (baseline); I55, Probenentnahme bei 55-minütiger Ischämie; R10, Probeentnahme nach 10-minütiger Ischämie; R120, Probeentnahme bei 120-minütiger Ischämie.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinanalyse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Mittels SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Bevor die im Probenpuffer solubilisierten Zellen auf die entsprechenden Gele aufgetragen wurden, wurden sie zur Auffaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen für etwa drei Minuten auf 98°C erhitzt. Agarose-stabilisierte Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamidanteil von 2,10% wurden zur Größenauftrennung des Titins und seinen Isoformen verwendet. Für die Herstellung der Gele wurden, die in Tabelle 6 aufgelisteten Komponenten, verwendet. Bis auf APS und Agarose wurden die Komponenten in einem 50 mL-Falcongefäß vermischt und im Wasserbad auf 48°C erwärmt. Bei Erreichen der Temperatur wurde der Radikalstarter APS und die zuvor in der Mikrowelle verflüssigte Agarose beigemischt. Das Gemisch wurde zügig auf- und abpipettiert, bevor es anschließend zwischen zwei Glasplatten für mindestens drei Stunden auspolymerisierte. Für die Titingele wurden die Gelelektrophoresesysteme Mini-PROTEAN der Firma Biorad und Mini-Twin des Herstellers Biometra verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x-Laufpuffer bei Stromstärken von 2-4 mA pro Gel.

Lösung	Titingel 2,1 %
30% Acrylamidlösung	1,40 ml
H2Obidest	6,67 ml

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Lösung	Titingel 2,1 %
4x SDS – Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 µl
TEMED	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5%	6,67 ml
Gesamtvolumen	20 ml

Tabelle 6: Pipettierschema für die Herstellung zweier Titingele

Für kleinere Proteine wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurde zunächst ein Trenngel mit 10% Acrylamidgehalt hergestellt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die dafür verwendeten Komponenten wurden gemäß Tabelle 7 gemischt. Durch Zugabe von TEMED und APS wurde die Polymerisation gestartet, welche circa 45 Minuten andauerte und unter Abschluss von Sauerstoff durch Isopropanol erfolgte. Anschließend wurde das Sammelgel angefertigt (siehe Tabelle 7) und über das Trenngel gegossen. Die Proteintrennung wurde ebenfalls mit den oben genannten Elektrophoreseapparaturen Mini-Twin und Mini-PROTEAN durchgeführt und lief in 1x-Laufpuffer bei Stromstärken von 15-30 mA pro Gel ab.

Lösung	Trenngel 10%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	5 mL	0,667 mL
H ₂ O bidest	6,25 mL	3,025 mL
4x SDS – Trenngelpuffer	3,75 mL	-
4x-SDS-Sammelgelpuffer	-	1,25 mL
TEMED	7,5 µL	15 µL
APS	75 µL	50 µL
Gesamtvolumen	15 mL	5 mL

Tabelle 7: Pipettierschema für je die Herstellung zweier SDS-Standardgele/ Sammelgele

2.2.3.2 Western Blot

Semidry-Westernblot ist eine Methode, womit durch Anlage eines elektrischen Feldes, die zuvor durch SDS-Page aufgetrennten Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylendifluorid-Membran) übertragen werden. Hierfür werden *Whatman*-Papiere verwendet, wovon jeweils fünf Stück in Anoden- und Kathodenpuffer

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

getränkt wurden. Die in Anodenpuffer getränkten *Whatman*-Papiere wurden auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur gelegt. Eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde anschließend auf die *Whatman*-Papiere platziert. Das Polyacrylamidgel wurde wiederum auf die PVDF-Membran zentriert und durch die fünf in Kathodenpuffer getränkten *Whatman*-Papiere bedeckt. Luftblasen zwischen den Schichten wurden entfernt, um einen artefaktfreien Transfer zu ermöglichen. Anschließend wurde mit der Kathodenplatte die Blotting-Kassette verschlossen. Für die Titingle wurde für 40 Minuten eine Stromstärke von 1 A bei einer maximalen Spannung von 20 V angelegt. Die Gele mit 10% Acrylamidanteil liefen für 12 Minuten bei einer Stromstärke von 1,5 A und einer maximalen Spannung von 25 V. Der erfolgte Proteintransfer auf der PVDF-Membran wurde kontrolliert durch 30-sekündige PVDF-*Stain* Färbung und anschließender Entfärbung durch PVDF-*Destain*. Die in der PVDF-*Destain* enthaltene Essigsäure wurde mit 1x – TBST ausgewaschen. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membranen blockiert, durch Inkubation in 2%iger BSA-Lösung für mindestens eine Stunde. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membran mit einem primären Antikörper aus Tabelle 4 und 5 mit der jeweiligen Verdünnung in 0,5% BSA. Anschließend wurden die PVDF-Membranen dreimal für mindestens 10 Minuten in 1x- TBST gewaschen und anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und wurde für mindestens eine Stunde in 0,5% BSA inkubiert. Danach wurden die PVDF-Membrane erneut dreimal für mindestens 10 Minuten in 1x-TBST gewaschen. Die PVDF-Membrane wurden mit dem zuvor im Verhältnis 1:1 gemischten Chemilumineszenzreagenz 1 und 2 (*ECL reagent*) gleichmäßig bedeckt und die Signale der gebundenen Antikörper anschließend mit dem Fusion XL *Imager (Vilber and Lourmat)* detektiert. Die Phosphorylierungsanalysen wurden auf den jeweiligen Blot durch Verwendung phosphospezifischer- und Gesamt-Antikörper durchgeführt (siehe Tabelle 4 und 5). Zunächst wurde der primäre Phospho-Antikörper untersucht und anschließend mit 50-minütiger Stripping-Puffer Inkubation von der Membran gelöst. Dem Stripping-Puffer wurde vor Anwendung β -Mercaptoethanol zugefügt. Nach gründlichem sechsmaligen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Waschvorgang für jeweils 10 Minuten und anschließender Blockierung für mindestens einer Stunde mit 2 % BSA wurde der primäre Gesamt-Antikörper eingesetzt und untersucht. Für den primären Gesamt-Antikörper wurde der oben genannte Sekundärantikörper nach der oben beschriebenen Durchführung verwendet. Mit dem Programm Image J wurden, die durch Chemilumineszenz sichtbar gemachten Banden ausgewertet, indem das Phosphosignal mit dem jeweiligen Gesamtsignal eines Blots ins Verhältnis gesetzt wurde. Die ermittelten Signale wurden auf die, auf jedem Blot vorhandene Kontrolle normiert. Sie sind somit als relative Werte angegeben.

2.2.4 Software

Zusätzlich zu den im Text erwähnten Programme wurden folgende Software für die Auswertung und Ausarbeitung dieser Arbeit benutzt: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, Sigma Plot 13 und Adobe Photoshop CS6.

2.2.5 Datenanalytische Statistik

Die Daten wurden statistisch ausgewertet durch den Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und über die jeweils angegebene Anzahl an unabhängigen Experimenten (n) bestimmt. Diese Analyse wurde mithilfe des Programms *Sigma Plot* durch *ANOVA one-way* und dem *Dunnett's multiple comparisons test* durchgeführt. Eine statistische Signifikanz lag vor bei Ablehnen der Nullhypothese und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse:

3.1 Änderungen der Aktivitäten von Kinasen

3.1.1 Indirekter Nachweis einer Aktivierung der Proteinkinase A nach herzferner ischämischer Perikonditionierung

PKA führt über Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S4010 in der N2-Bus zu einer erniedrigten Myofilamentsteifigkeit des Titins. Um zu testen, inwiefern RPER einen Einfluss auf die PKA-vermittelte Titinphosphorylierung haben kann wurde der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Phosphorylierungsstatus des PKA-Substrats Troponin I (cTnI) an Position S23/S24 in konditionierten Schweinekardiomyozyten mit spezifischen Antikörpern ermittelt (Noland et al., 1995). Es zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung im Vergleich von Ausgangsbedingungen (BL) zu den Kardiomyozyten nach 55-minütiger Ischämie (I55; $0,79 \pm 0,1$), 10-minütiger Reperfusion (R10; $0,73 \pm 0,16$) und 120-minütiger Reperfusion (R120; $0,73 \pm 0,13$) (siehe Abb. 8).

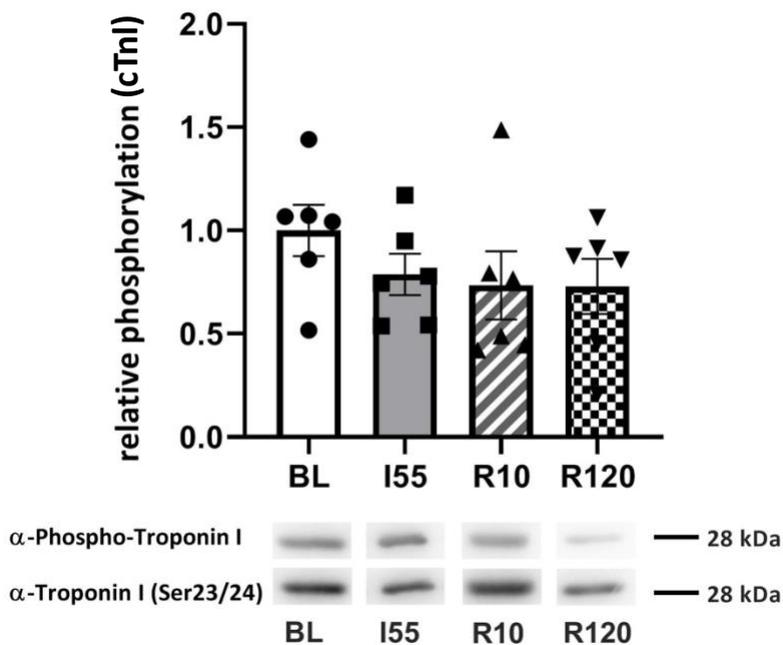


Abb. 8: Analyse der Troponin I (S23/S24) Phosphorylierung im Western Blot. Die Proben wurden nach Herz ferner ischämischer Perikonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und die Ergebnisse auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot mit Phospho-cTnI S23/S24 und dem dazugehörigen cTnI total Signal dargestellt. Die Molekülmasse des detektierten Troponins beträgt 28 kDa.

3.1.2 Änderung der Aktivität von Proteinkinase C α nach herzferner ischämischer Perikonditionierung

Eine Aktivierung von PKC α führt an der PEVK-Domäne des Titins zu einer Phosphorylierung und zu einer erhöhten Myofilamentsteifigkeit. Die Aktivität von PKC α in Schweinekardiomyozyten wurde über den Phosphorylierungsstatus von PKC α T487 analysiert. Auch bei PKC α zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

relativen Phosphorylierung an T497 im Vergleich der Kontrollgruppe zu den Kardiomyozyten nach I55 ($1,03 \pm 0,06$), R10 ($0,95 \pm 0,09$ %) und R120 ($0,89 \pm 0,09$) (Dargestellt in Abb. 9).

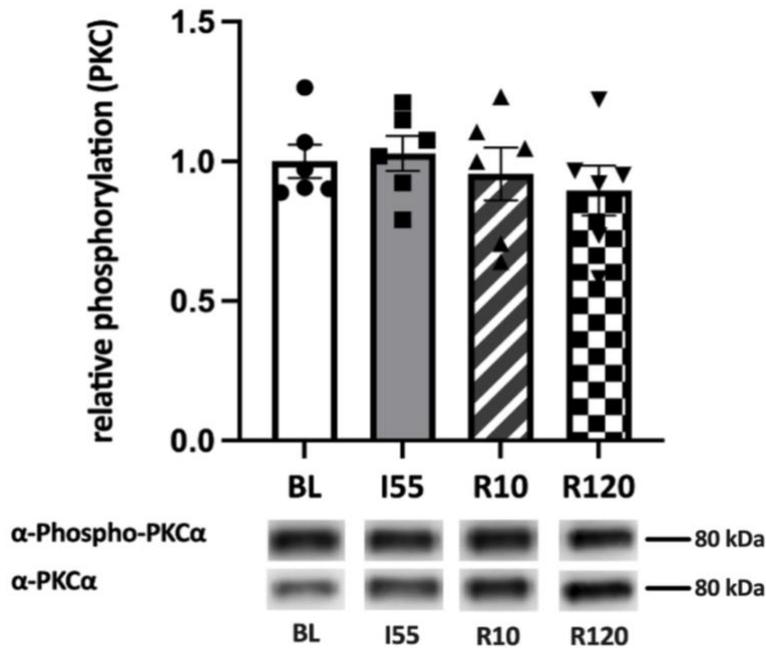


Abb. 9: Analyse der Proteinkinase Ca (PKCα) Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger (R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe). Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und die Ergebnisse auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot mit α -Phospho-PKCα und dem dazugehörigen α -PKCα total Signal dargestellt. Die Molekülmasse der detektierten Bande beträgt 80 kDa.

3.1.3 Änderung der Aktivität von *Extracellular-signal regulated kinases* (ERK) nach herzferner ischämischer Perkonditionierung

Eine Phosphorylierung der N2-Bus des Titins durch erhöhte ERK-Aktivität führt zu einer erniedrigten Myofilamentsteifigkeit. Daher wurde die Aktivität des MAPK/ERKs in konditionierten Schweinekardiomyozyten durch einen spezifischen ERK-Antikörper bei 42 kDa und 44kDa ermittelt. Auch hier zeigte sich keine statistische signifikante Veränderung im Vergleich der Kontrolle zu den konditionierten Kardiomyozyten nach I55 (Gesamt-Erk: $2,05 \pm 0,8$, Erk44: $3,87 \pm 2,09$, Erk42: $0,6 \pm 0,23$), bei R10 (Gesamt-Erk:

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

1,83 ± 0,53; Erk44: 8,75 ± 0,27, Erk42: 1,52 ± 0,66) und bei R120 (Gesamt-Erk: 0,97 ± 0,11, Erk44: 1,58 ± 0,63, Erk42 7,9 ± 0,22) (siehe Abb. 10).

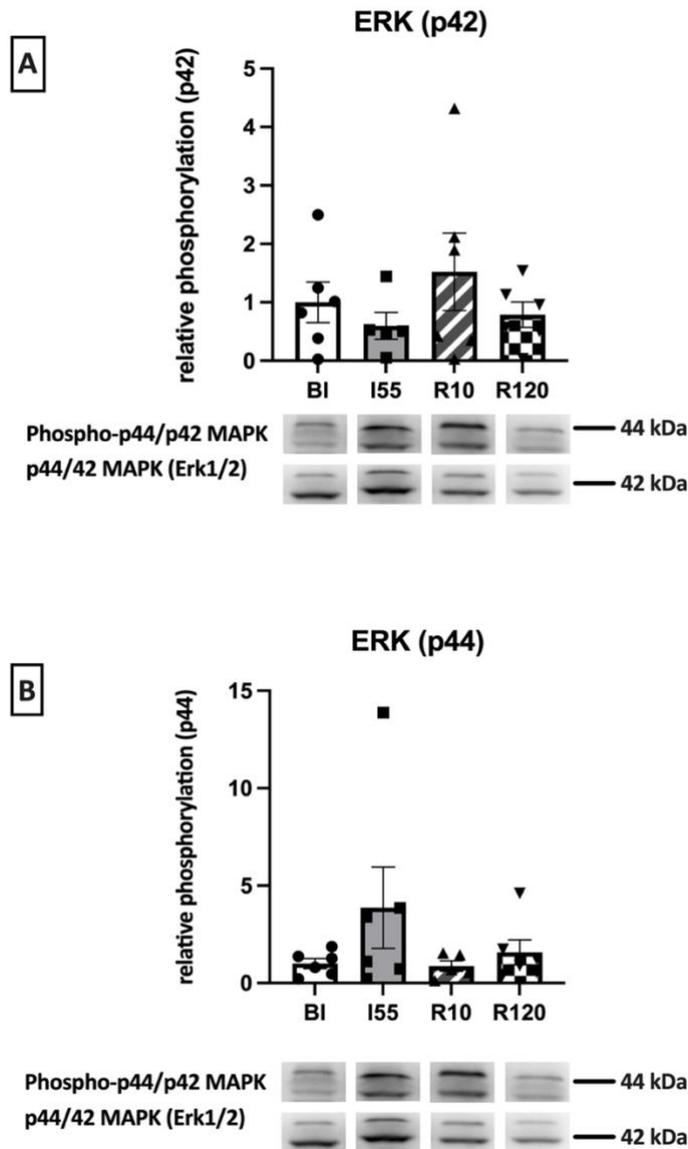


Abb. 10: Analyse der ERK42 (p42) und ERK44 Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkkonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. (A) Oben: Densitometrische Auswertung der Blotsignale. Die relative Phosphorylierung der ERK42-Bande ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte ± SEM (n = 6 Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). (A) Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide ERK-Banden mit Phospho-p44/42 MAPK und dem dazugehörigen p44/42 MAPK total Signal dargestellt. Die Molekülmasse für die ERK42-Bande beträgt 42 kDa. (B) Oben: Densitometrie (s.o.). Die relative Phosphorylierung der ERK44-Bande ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte ± SEM (n = 6 Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). (B) Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide ERK-Banden mit Phospho-p44/42 MAPK und dem dazugehörigen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

p44/42 MAPK total-Signal dargestellt. Die Molekülmassen für die ERK44/42 Banden betragen 44 und 42 kDa

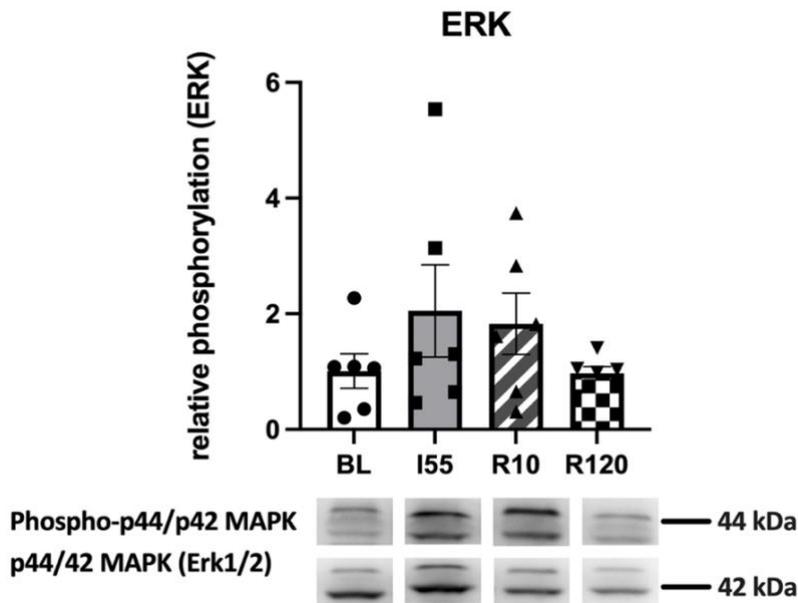


Abb. 11: Analyse der ERK-Gesamt Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perconditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger (R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung von ERK44/42 ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert.) Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide ERK-Banden mit Phospho-p44/42 MAPK und dem dazugehörigen p44/42 MAPK total-Signal dargestellt. Die Molekülmasse für die ERK44/42 Banden entspricht 44kDa bzw. 42 kDa

3.2 Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Titin

3.2.1 Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Serinrest S11878 in der PEVK-Region

Eine Phosphorylierung der PEVK-Region führt zu erhöhter Myofilamentsteifigkeit. Daher wurde mithilfe von spezifischen Antikörpern der Phosphorylierungsstatus am Serinrest S11878 der PEVK-Region von konditionierten Schweinekardiomyozyten ermittelt. Sowohl an der N2B- als auch an der N2BA-Bande konnte keine statistisch signifikante Veränderung nach I55 (N2BA: $0,84 \pm 0,09$; N2B: $0,91 \pm 0,14$), bei R10 (N2BA: $0,8 \pm 0,12$; N2B: $0,91 \pm 0,08$) und bei R120 (N2BA $0,86 \pm 0,12$; N2B: $0,93 \pm 0,06$) im Vergleich zur BL-Gruppe ermittelt werden (siehe Abb. 12 und 13).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

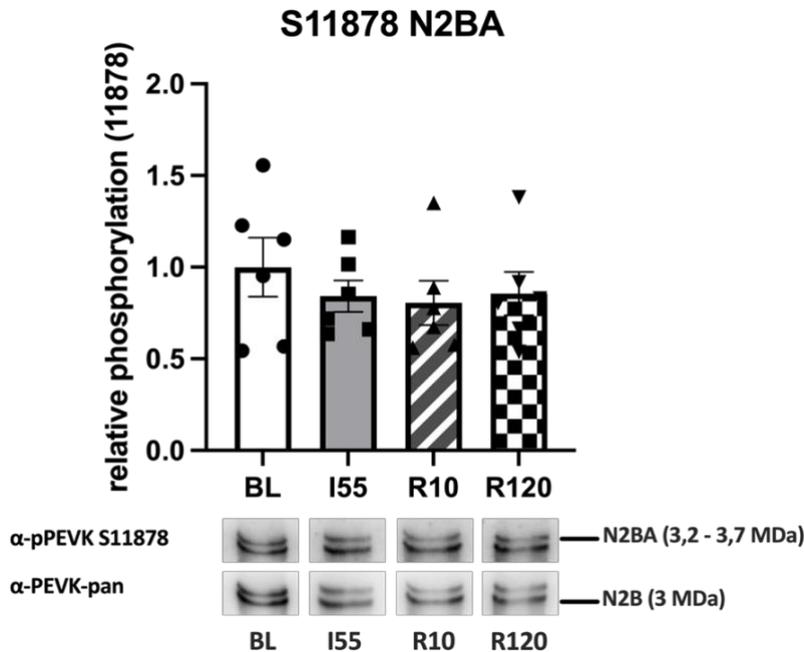


Abb. 12: Analyse der Phosphorylierungsstelle S11878 in der PEVK-Region der N2BA-Titinisoform im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung von S11878 in der PEVK-Region der N2BA-Titinisoform ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide Titinisoformen mit α -pPEVK S1187-Signal und dem dazugehörigen α -PEVK-pan total Signal dargestellt. Die Molekülmasse für die N2BA variiert zwischen 3,2-3,7 MDa

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

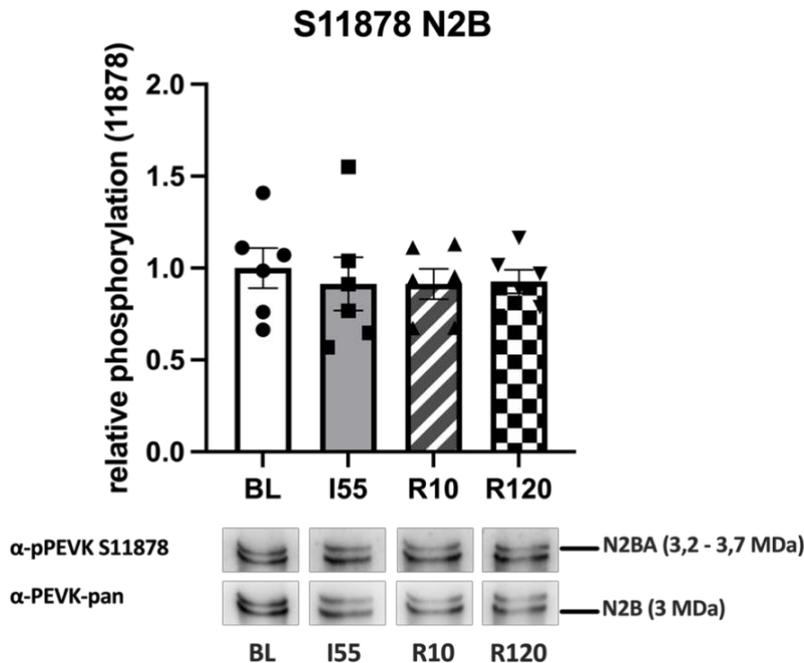


Abb. 13: Analyse der Phosphorylierungsstelle S11878 in der PEVK-Region der N2B-Titinisoform im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkontditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung der S11878 Stelle in der PEVK-Region der N2B Titinisoform ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide Titinisoformen mit α -pPEVK S1187-Signal und dem dazugehörigen α -PEVK-pan Signal dargestellt. Die Molekülmasse beträgt für die N2B Isoform 3 MDa.

3.2.2 Änderungen des Phosphorylierungsstatus am Serinrest S12022 in der PEVK-Region

Der Phosphorylierungsstatus an der PEVK-Region wurde außerdem am Serinrest S12022 gemessen. An der N2BA-Isoform zeigte sich keine statistische signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus nach I55 ($0,91 \pm 0,16$), R10 ($0,84 \pm 0,11$) und R120 ($0,77 \pm 0,1$) im Vergleich zur BL-Gruppe (Abb. 13). Für die N2B Isoform konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung des Phosphorylierungsstatus nach I55 ($0,99 \pm 0,14$) und R10 ($0,85 \pm 0,9$) ermittelt werden. Für die R120 zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der relativen Phosphorylierung um 0,4 gegenüber den Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen ($0,6 \pm 0,06$) (siehe Abb. 14). Der Phosphorylierungsstatus für Gesamttitin (N2B und N2BA), zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen der

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

relativen S12022-Phosphorylierung bei I55, R10, R120 im Vergleich zu Baseline Kontrollbedingungen (siehe Abb. 14 und 15).

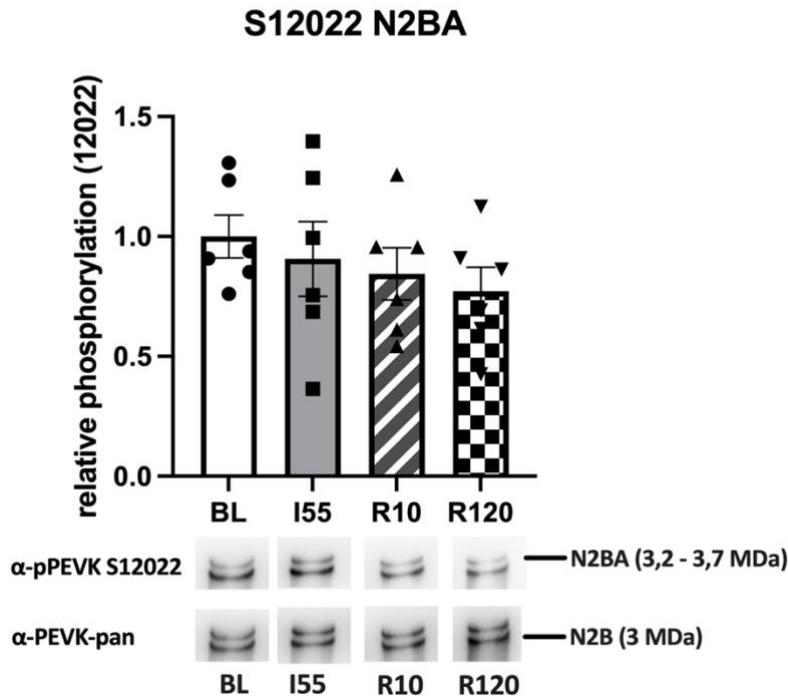


Abb. 14: Analyse der Phosphorylierungsstelle 12022 in der PEVK-Region der N2BA Titinisoform im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkonkonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger (R10) und 120-minütiger (R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung der S12022 Stelle in der PEVK-Region der N2B-Titinisoform ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide Titinisoformen mit α -pPEVK S12022-Signal und dem dazugehörigen α -PEVK-pan total Signal dargestellt. Die Molekülmasse der N2BA-Isoform variiert von von 3,2 bis 3,7 MDa.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

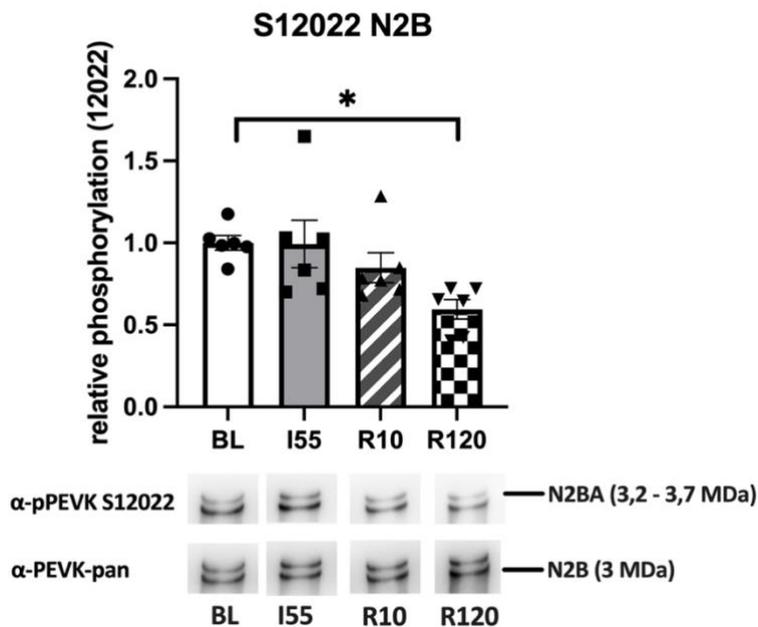


Abb. 15: Analyse der Phosphorylierungsstelle S12022 in der PEVK-Region der N2B Titinisoform im Western Blot. Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkontionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger-(R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Oben: Densitometrie. Die relative Phosphorylierung der S12022 Stelle in der PEVK-Region der N2B-Titinisoform ist nach Normierung auf die Kontrolle dargestellt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 6$ Gruppen pro Gewebe. Jede Gruppe wurde in zwei unabhängigen Durchläufen experimentell analysiert und auf einen Mittelwert normiert). Unten: Es ist ein repräsentativer Westernblot für beide Titinisoformen mit α -pPEVK S12022-Signal und dem dazugehörigen α -PEVK-pan total Signal dargestellt. Die Molekülmasse der N2B-Isoform beträgt 3 MDA. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert ($p < 0,05$, Dunnett's multiple comparisons test)

3.2.3 Änderungen des Phosphorylierungsstatus der N2B und N2BA im zeitlichen Verlauf

Ein Vorteil der Biopsieentnahme von Schweineherzen gegenüber Mäuse- oder Rattenherzen ist die Möglichkeit, mehrere aufeinanderfolgende Biopsien aus einem Herzen entnehmen zu können. Das erlaubt die individuelle Auswertung der Veränderung des Phosphorylierungsstatus im Verlauf der I/R mit dabei angewendeter Perkontionierung für jedes untersuchte Tier (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). In den folgenden Darstellungen wurden beide Titin Isoformen als „Gesamttitin“ ausgewertet. An S11878 zeigten sich bei vier von sechs Schweinen eine Abnahme der Phosphorylierung im Verlauf der I/R. An S12022 sogar bei fünf von sechs Schweinen.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Für die Schweine 27D16, 30D17, 37D17 und 40D17 zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus nach einer 120-minütigen Reperfusion sowohl an der S11878 als auch an S12022 (siehe Tabelle 8, Tabelle 9, Abbildung 16 und Abbildung 17). Bei 25D16 konnte an S12022 ebenfalls eine Abnahme der Phosphorylierung detektiert werden, wohingegen an S11878 ein kontinuierlicher Anstieg der Phosphorylierung gemessen wurde. Dahingegen zeigte 22D16 an beiden Serinstellen ein Anstieg der Phosphorylierung.

Versuchstiernummer	MW (BL)	MW(I55)	MW(R10)	MW(R120)
40D17	1,08	0,69	0,98	0,78
37D17	1,03	0,98	0,78	0,68
30D17	0,99	0,61	0,63	0,80
27D16	1,54	1,37	1,26	1,31
25D16	0,65	0,77	0,84	0,9
22D16	0,70	0,82	0,73	0,86

Tabelle 8: Relative Gesamttitin-Phosphorylierung von S11878 für die jeweiligen Schweinebiopsien vor (BL) und während Ischämie (I55) und nach 10 Min. (R10) bzw. 120 Min. (R120) Reperfusion.

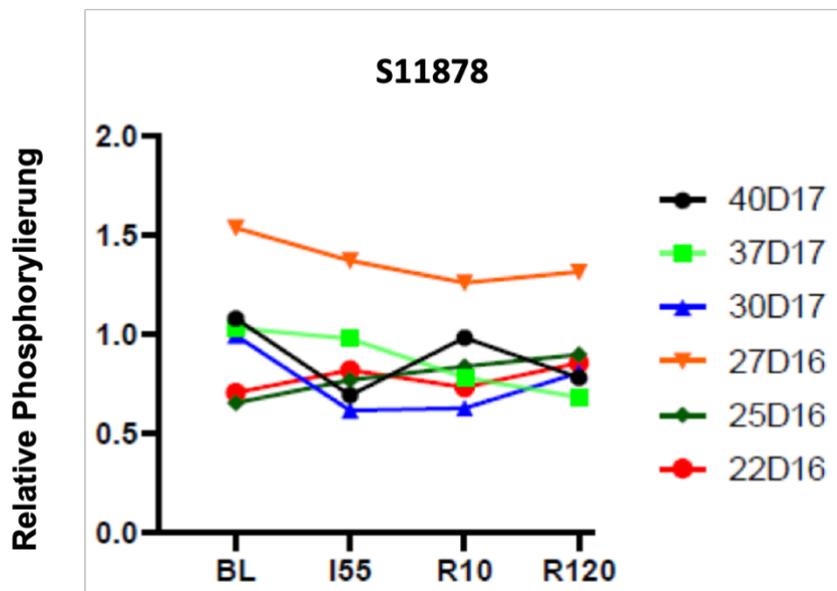


Abb. 16: Analyse der relativen Phosphorylierung von Titin S11878 im zeitlichen Verlauf.

Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perconditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger-(R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Die Abbildung zeigt die Veränderung der relativen Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S11878 des jeweiligen Tiers im Verlauf der I/R

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

bei Anwendung der Perkonditionierung (n=6 Schweine). Schwarz: 40D17; Hellgrün: 37D18; Blau: 30D17; Orange: 27D15; Dunkelgrün 25D16; Rot: 22D16

	MW (BL)	MW(I55)	MW(R10)	MW(R129)
40D17	1,21	1,03	0,80	0,73
37D17	0,91	0,82	0,87	0,64
30D17	0,93	0,84	0,67	0,68
27D16	1,15	1,58	1,35	0,79
25D16	0,81	0,81	0,59	0,51
22D16	0,99	0,62	0,86	1,08

Tabelle 9: Relative Titin-Phosphorylierung an Position S11878 für die jeweiligen Schweinebiopsien vor (BL) und während Ischämie (155) und nach 10 Min. (R10) bzw. 120 Min. (R120) Reperfusion.

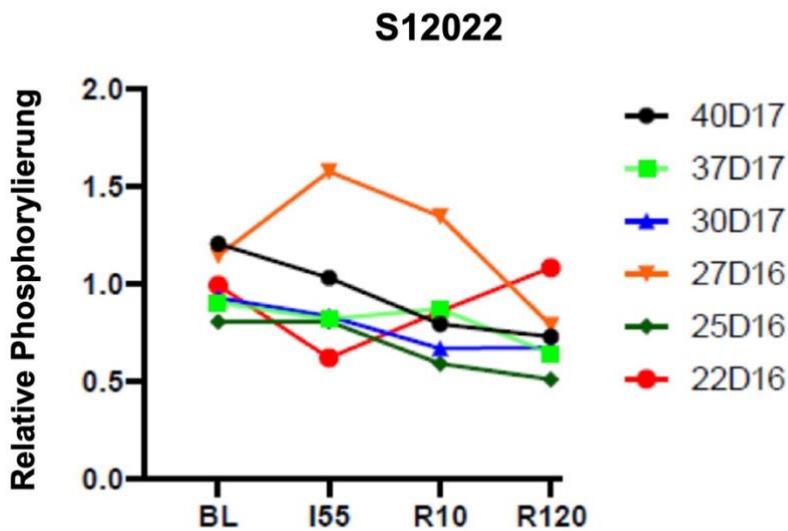


Abbildung 17: Analyse der relativen Phosphorylierung von Titin S12022 im zeitlichen Verlauf.

Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perkonditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger-(R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Die Abbildung zeigt die Veränderung der relativen Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S11787 des jeweiligen Tiers im Verlauf der I/R bei Anwendung der Perkonditionierung (n=6 Schweine). Schwarz: 40D17; Hellgrün: 37D18; Blau: 30D17; Orange: 27D15; Dunkelgrün 25D16; Rot: 22D16

3.2.4 Änderung der PKC α Aktivität im jeweiligen Tier

In vier von sechs Schweinen konnte eine Abnahme der PKC α Aktivität nachgewiesen werden (22D16, 27D16, 37D17 und 40D17). Die Biopsien von Tier 25D16 und 30D16

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

zeigten eine Zunahme der Kinaseaktivität während der Ischämie und der anschließenden Reperfusion (Siehe Tabelle 10)

	MW (BL)	MW(I55)	MW(R10)	MW(R129)
40D17	1,07	1,07	1,1	0,92
37D17	1,26	0,92	1,05	0,73
30D17	0,90	1,15	1,23	0,97
27D16	0,97	1,02	0,70	0,95
25D16	0,89	1,21	1	1,22
22D16	0,9	0,79	0,64	0,58

Tabelle 10: Mittelwerte der relativen PKC α Aktivierung (Phosphorylierung) für die Biopsien des jeweiligen Tiers

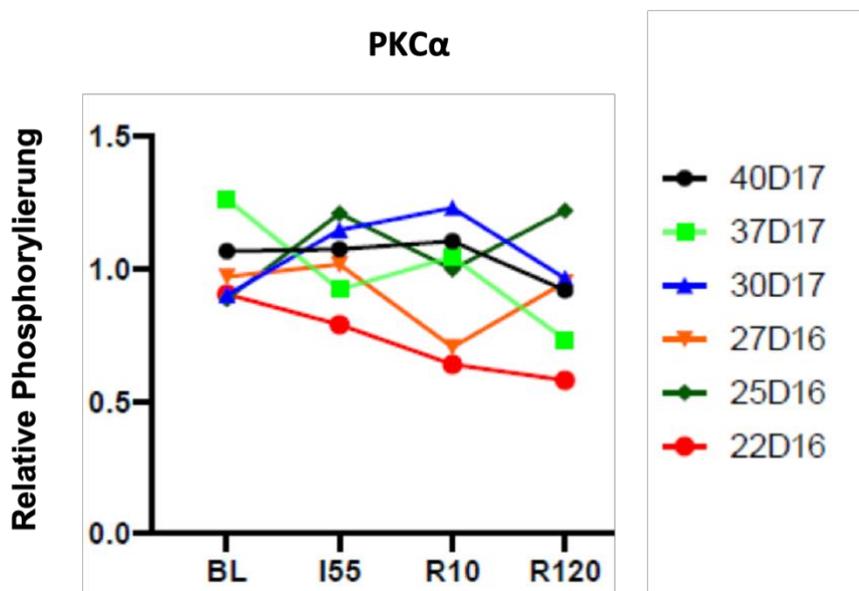


Abbildung 18: Veränderung der relativen PKC α Aktivierung im jeweiligen Schwein anhand des Phosphorylierungsstatus im Verlauf der I/R:

Die Proben wurden nach herzferner ischämischer Perconditionierung entnommen bei 55-minütiger Ischämie (I55) und anschließender 10-minütiger-(R10) und 120-minütiger-(R120) Reperfusion. Die Kontrolle (BL) wurde vor Einsetzen der RPER entnommen. Die Abbildung zeigt die Veränderung der PKC α Aktivität im Verlauf der I/R anhand des Phosphorylierungsstatus. Schwarz: 40D17; Hellgrün: 37D18; Blau: 30D17; Orange: 27D15; Dunkelgrün 25D16; Rot: 22D16

4 Diskussion

4.1 Die Titin-basierte Steifigkeit kann durch Interventionen modifiziert werden

Die kardiovaskulären Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Um die Therapie und Lebensqualität der Patienten nach akuten Ischämien am Myokard und ihren Folgeerkrankungen zu optimieren, ist das Verständnis von pathophysiologischen Vorgängen erforderlich und bildet die Grundlage für neue therapeutische Angriffspunkte. Wie bereits in 1.3.2 und 1.3.3.1 erklärt, schützt die RPER vor Reperfusionsschäden, welche nach Intervention einer Ischämie auftreten können. Das Myofilament Titin ist bei den Umbauprozessen des Myokards nach Infarkt maßgeblich beteiligt, da es die passive Steifigkeit im Gewebe wesentlich beeinflusst. Gewisse Signalkaskaden resultieren in einer Phosphorylierung von Titin, wodurch die Steifigkeit reguliert wird. Diese Signalkaskaden können durch verschiedene Interventionen ausgelöst und verstärkt werden. Ziel dieser Arbeit war es den Phosphorylierungsstatus des Titins nach ischämischer Perikonditionierung im Großtiermodell zu untersuchen und somit weitere Erkenntnisse zur Translation auf das menschliche Herz zu erlangen.

4.2 Keine Veränderung der Titin Isoformenzusammensetzung bei akutem Infarkt

Im Bereich der physiologischen Spannweite des Sarkomers ist die Titinsteifigkeit der entscheidende Faktor für die passive Steifigkeit im Myokard.

Grundsätzlich kann die Titinsteifigkeit über zwei Ansätze reguliert werden. Zum einen über die Veränderung des Isoformenverhältnisses und zum anderen über posttranslationale Modifikation. Im kardialen Gewebe liegt das Titin in der elastischeren N2BA- und der steiferen N2B-Isoform vor. Somit bestimmt das Verhältnis der Zusammensetzung dieser beiden Isoformen über die Grundsteifigkeit im Gewebe. Für

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

diese Arbeit wurden Göttinger Minischweine verwendet, welche mit einer Isoformenzusammensetzung von ungefähr 50 %: 50 % (N2BA: N2B) dem menschlichen Verhältnis von ungefähr 40 %: 60 % (N2BA: N2B) recht nahekommen. Veränderungen der Isoformenzusammensetzung konnten auf genetischer Ebene durch vermehrte Expression der elastischeren N2BA-Isoform gezeigt werden als Reaktion auf dauerhaft pathologisch erhöhte mechanische Anforderungen bei chronischen Erkrankungen wie Bluthochdruck oder chronisch ischämischer Herzerkrankung (Neagoe et al., 2002, Warren et al., 2003). Dieser Mechanismus scheint adaptiv die fibrotischen Umbauprozesse des Myokards auszugleichen, bei denen das vernarbte Myokard drastisch an Elastizität einbüßt. In Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnte allerdings sowohl im Kleintiermodell als auch im Schweinmodell gezeigt werden, dass die Isoformenzusammensetzung sich nach transienter Ischämie und anschließender Reperfusion für 120 Minuten nicht verändert (Kötter et al., 2016). Da die vorangegangenen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ischämische Bedingungen innerhalb der ersten Stunden keinerlei Auswirkungen auf die Expression der Titin Isoformen haben, wurde in dieser Arbeit auf die Untersuchung des Titin-Isoformenverhältnisses verzichtet. Neben der Veränderung der Isoformenzusammensetzung kann die Titin-basierte Steifigkeit über posttranslationale Modifikationen verändert werden, welche bei akuten Veränderungen wie beim I/R-Modell bedeutend ist.

4.3 I/R und RIPC induzieren posttranslationale Modifikationen am Titin

Akute Veränderungen des Titins konnten von Kötter et al. im Mausmodell mit akutem Myokardinfarkt gezeigt werden (Kötter et al., 2016). Die Studie zeigte einen Anstieg der Titinsteifigkeit im nicht-ischämischen Areal in der inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt. Es wird davon ausgegangen, dass der dadurch vermittelte Anstieg der Myozytensteifigkeit zur Stabilität des überlebenden Myokardgewebes beiträgt und die Kontraktilität der verbleibenden Zellen fördert. Es zeigte sich, dass bei Wiederherstellung der Blutzufuhr (Reperfusion) Titin zwar zunächst wieder in einen

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

elastischeren Zustand zurückkehrt, aber dennoch bis mindestens 10 Tage nach Myokardinfarkt in einem signifikant steiferen Zustand verbleibt. Dieser Wert wurde zehn Tage nach Infarkt ereignis ermittelt. In der Reifungsphase 7 bis 14 Tage nach Infarkt ist die fibrotische Narbenbildung abgeschlossen (Ma et al., 2012). Die Abnahme der Titinsteifigkeit könnte daher mit der fibrotischen Narbenbildung erklärt werden, welche fortan die Stabilität im Myokardgewebe gewährleistet. Eventuell würde eine permanent hohe Titinsteifigkeit bei gleichzeitig gebildeter Narbe zu einer Einschränkung der Ventrikelfüllung führen, sodass die Erhöhung der Titinsteifigkeit lediglich ein Überbrückungsphänomen bis zur abgeschlossenen Narbenbildung sein könnte.

Um Ergebnisse von Kötter et al. in einem Schweinemodell zu bestätigen, wurde von C. Jahns et al. (AG Krüger, Institut für Herzkreislaufphysiologie an der Heinrich-Heine-Universität) die Steifigkeit von Titin bei Ischämie und Reperfusion im Schweinemodell untersucht (Kötter et al., 2016). Hierbei wurde die Kardiomyozytensteifigkeit sowohl bei alleiniger Ischämie und Reperfusion (I/R) (ähnlich wie im Mausmodell bei Kötter et al.) als auch bei zusätzlicher Anwendung der gewebefernen ischämischen Präkonditionierung untersucht (RIPC). Im Infarktmodell konnte in der Kraftmessung gezeigt werden, dass die Titinsteifigkeit in den Arealen nicht-betroffener Kardiomyozyten bei Ischämie zunimmt und während der Reperfusion wieder abnimmt (Kraftmessung durchgeführt von Sebastian Kötter, AG Krüger, Institut für Herzkreislaufphysiologie an der Heinrich-Heine-Universität). Bei zusätzlicher Anwendung der RIPC zeigte sich sogar verstärkte I/R induzierte Titin Modifikation. Erstaunlicherweise zeigte sich bei Anwendung der RIPC eine erhöhte Phosphorylierung bereits nach 6 Minuten, wodurch das Titin scheinbar eine Stabilität in den Myozyten vor Infarkt ereignis gewährleisten kann und eventuell so vor Infarktschäden schützt (Celerina Jahns). Die für die vorliegende Arbeit untersuchte gewebeferne ischämische Perkonditionierung (RPER) zeichnet sich durch protektive Effekte am Herzen aus bei gleichzeitig praktischerer Anwendung im Vergleich zu RIPC, sodass die RPER im klinischen Alltag als relevanter gewertet wird als die gewebeferne ischämische Präkonditionierung (siehe 1.3.2) (Botker et al., 2010, Kötter et al., 2016, Kleinbongard et al., 2018).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

4.4 Veränderungen an der Titin PEVK-Region (bei I/R mit RPER)

Um den Phosphorylierungsstatus in der PEVK-Region des Titins zu ermitteln, wurden die Serinstellen S11878 und S12022 mittels Western Blot analysiert, da eine Phosphorylierung dieser Stellen zu einer erhöhten Myofilamentsteifigkeit führt. Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass die Phosphorylierung der Serinreste S11878 und S12022 durch die Kinase PKC α erfolgen kann und dass die Phosphorylierung dieser Reste im Mausmodell für die infarktbedingte Erhöhung der Kardiomyozytensteifigkeit verantwortlich ist (Hidalgo et al., 2009, Kötter et al., 2013). Aus diesem Grund wurde hier biochemisch auch die PKC α -Aktivität ermittelt.

Die Analyse der Mittelwerte der relativen PEVK-Phosphorylierung beider Titin-Isoformen zeigte in den hier untersuchten Schweineproben keine statistisch signifikante Veränderung an S11878 und S12022. Auch die PKC α -Aktivität zeigte in der Zusammenschau aller untersuchter Biopsien keine statistisch signifikante Veränderung. Isoliert betrachtet, konnte jedoch in der N2B-Isoform des Titins an Position S12022 eine statistisch signifikante Verminderung der relativen Phosphorylierung nach 120-minütiger Reperfusion festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderung zu einer funktionell verminderten Titinsteifigkeit führt.

Bei Betrachtung der Phosphorylierung von S11878 und S12022, sowie der PKC α im zeitlichen Verlauf der I/R für die einzelnen Versuchstiere, zeigt sich eine Tendenz zur erhöhten Elastizität von Titin. Für S11878 zeigte sich bei vier von sechs Schweinen eine im Verlauf der I/R verminderte Phosphorylierung und bei S12022 bei fünf von sechs Schweinen. Es scheint so, als würde die RPER die Titin Phosphorylierung an der PEVK-Region signifikant reduzieren und an der S11878 Stelle aufheben. Auch PKC α zeigte im Verlauf der I/R bei vier von sechs Schweinen eine Abnahme der relativen Phosphorylierung, was auf eine verminderte Aktivität hindeutet.

Die Daten zeigen eine deutliche Abweichung von dem bisher untersuchten Mausmodell, für das sowohl nach 20-minütiger Ischämie als auch nach dreitägiger permanenter Ligatur eine erhöhte Phosphorylierung der PKC α und der Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 gezeigt wurden (Kötter et al., 2016). Auch in Vorarbeiten in

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Schweineherzen mit I/R zeigte sich nach 55-minütiger Ischämie ein erhöhter Phosphorylierungsstatus der PKC α und der Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022. Dieser Effekt wurde sogar durch vorgeschaltete Präkonditionierung verstärkt. Bislang wurde die erhöhte Phosphorylierung und somit erhöhte Titinsteifigkeit im gesundem Gewebe als protektiver Effekt bei Myokardinfarkt vermutet (Celerina Jahns). In dieser Arbeit zeigte sich eine erniedrigte Phosphorylierung und somit eine erhöhte Elastizität des Titins bei gleichzeitigem Vorliegen mehrerer klinischer Studien, welche ein positives kardiales Outcome nach RPER zeigen (siehe 1.3.2). Inwieweit die Phosphorylierung Titins zum Schutz des Myokards bei Konditionierung beiträgt, ist nicht abschließend geklärt.

Interessanterweise zeigte sich bei der Probe 22D16 ein Anstieg der Phosphorylierung sowohl in S11878 und S12022. Die erhöhte Phosphorylierung der Probe 22D16 würde sich mit den Ergebnissen aus reiner I/R sowie I/R mit Präkonditionierung decken. Eventuell konnte die Perkonditionierung bei dieser Probe ihren Effekt nicht erzielen. Im Zeitverlauf der PKC α -Aktivität sind es die Proben 25D16 und 30D17, die einen Anstieg zeigen und sich mit den Ergebnissen ohne Perkonditionierung decken (Celerina Jahns).

Im Nachgang zu dieser Arbeit wurden auch funktionelle Kraftmessungen an isolierten Kardiomyozyten, aus den in dieser Arbeit verwendeten Schweineherzbiopsien durchgeführt (Dr. Lale Azer-Güney Herzkreislaufphysiologie Heinrich-Heine-Universität) (n=4/Gruppe, unpublizierte Daten). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

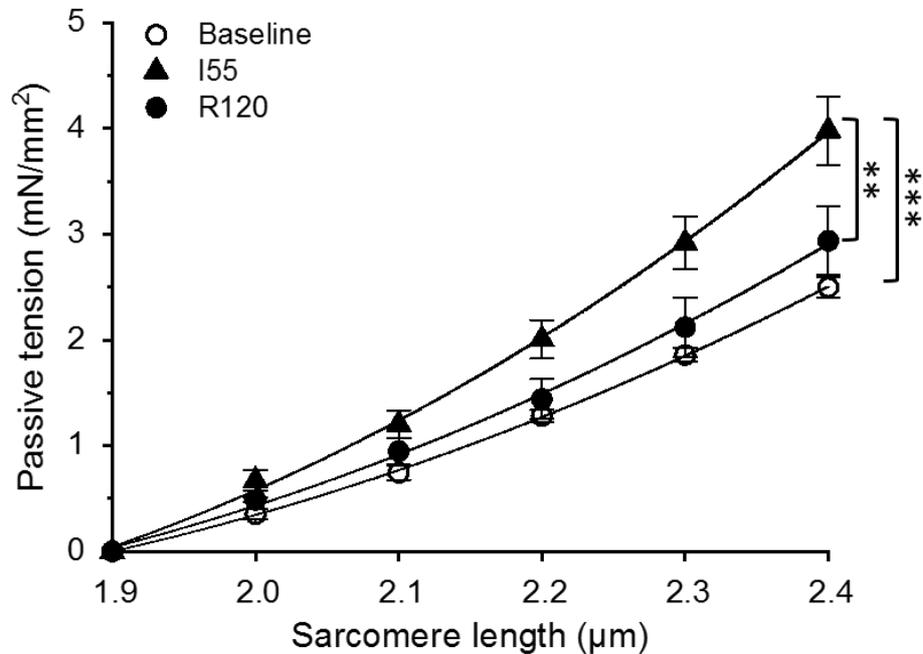


Abbildung 19: Kraftmessung von Kardiomyozyten nach RPER, durchgeführt von Lale Azer-Güney

Die Abbildung zeigt die passive Spannung in Abhängigkeit der Sarkomerlänge. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der passiven Spannung nach 55-minütiger Ischämie mit einer nachfolgenden signifikanten Abnahme der Steifigkeit nach 120-minütiger Reperfusion über den Ausgangswert.

Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Steifigkeit nach 55-minütiger Ischämie (I55), sowie einer anschließenden Minderung der Steifigkeit bei 120-minütiger Reperfusion, die sich noch über dem Ausgangswert (BL) befindet. Allerdings wurde bei den untersuchten Proben lediglich zwei der vier Proben auch in dieser Arbeit verwendet. Interessanterweise waren es diese zwei Proben (22D16 und 25D16), welche sich in der Phosphorylierung der PEVK-Region von den anderen Proben unterscheiden und eine erhöhte Phosphorylierung nach R120 zeigten, also eine vermutete erhöhte passive Spannung. Bei 22D16 zeigte sich dies sogar in S11878 und S12022.

Zudem zeigen die anderen Proben, welche nicht in der Kraftmessung verwendet wurden, am Ende der Reperfusion eine niedrigere Phosphorylierung als im Ausgangswert (BL). Die in der Kraftmessung verwendeten Proben zeigen am Ende der Reperfusion eine erhöhte Steifigkeit im Vergleich zum Ausgangswert (BL) und die Minderung ist nur im Vergleich zwischen Ischämie und Reperfusion messbar. Die Daten lassen sich nicht genau aufeinander übertragen, da größtenteils verschiedene Proben

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

verwendet wurden. Diese Beobachtungen zeigen, dass nicht alle Tiere gleich auf die Perkonditionierung reagieren. Demnach könnte RPER zu weiteren, hier nicht untersuchten, Titinmodifikationen führen, welche die elastischen Eigenschaften verändern.

4.5 Veränderungen der Kardiomyozytensteifigkeit sind dynamisch

Aufgrund der enormen Größe des Titinmoleküls existieren auch außerhalb der N2-Bus und PEVK eine Vielzahl weiterer Phosphorylierungsstellen. In Proteomdatenbanken sind hunderte potenzielle Phosphorylierungsstellen für Titin aufgelistet (Linke and Hamdani, 2014). Die Identifizierung weiterer relevanter Phosphorylierungsstellen ist für das Gesamtverständnis der Titinsteifigkeit erforderlich. Zudem wurde bisher nicht abschließend geklärt, ob sich der gegenteilige Effekt der Phosphorylierung an der N2-Bus- und der PEVK-Region ausgleichen kann oder ob sich die Phosphorylierung an einzelnen Stellen stärker auf die Steifigkeit auswirkt als andere. Da außerdem keine der untersuchten Kinasen eine Veränderung zeigte, lässt dies die Veränderung der passiven Steifigkeit durch andere, in dieser Arbeit nicht berücksichtigte, Kinasen vermuten. Basierend auf den Vorarbeiten aus anderen Tiermodellen wäre eine ischämiebedingte Aktivierung der PKC α auch ohne Anwendung eines Konditionierungsmodell zu erwarten gewesen. In zwei von sechs Schweinen zeigte sich dies. Inwiefern die RPER unmittelbar zu einem Ausbleiben der PKC α -Aktivierung führt, eventuell über negative Feedback-Hemmung der PKC α , bleibt aktuell spekulativ. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Serinrest S12022 nicht nur durch PKC α , sondern auch von der CaMKII δ phosphoryliert werden kann (Hamdani et al., 2013). Die CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstellen wurden sowohl für die N2-Bus, als auch für die PEVK-Region identifiziert, und eine CaMKII δ vermittelte Titinphosphorylierung führte in Summe zu einem in vitro elastischerem Titin (Hamdani et al., 2013). Ein Ausbleiben einer CaMKII δ -vermittelten Phosphorylierung könnte somit eine erhöhte Steifigkeit des Titins bei gleichzeitig niedrigem Phosphorylierungsstatus des S12022 erklären. Dies könnte die

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Diskrepanz zwischen der erhöhten Steifigkeit in der Kraftmessung von Lale Azer-Güney und den Ergebnissen einer erhöhten Elastizität in der biochemischen Analyse erklären. Andererseits ist bekannt, dass bei Myokardinfarkt die CaMKII δ in starkem Ausmaß aktiviert wird (Vila-Petroff et al., 2007). Eine Aktivierung wird über erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel ausgelöst, welche im Infarktareal gegeben ist durch einen verlangsamten Abtransport von Kalzium in den Extrazellulärraum und sarkoplasmatische Retikulum (Krause et al., 1989). Eventuell führt eine RPER zu einem verringertem intrazellulärem Ca²⁺-Spiegel durch verringerten myokardialen Schaden.

Mit der Kraftmessung hat man den Beweis einer gesteigerten Steifigkeit der Kardiomyozyten nach 55-minütiger Ischämie, die dafür ursächliche posttranslationale Modifikation der beteiligten Proteine bleibt jedoch unerkant. Zusammengenommen legen die hier diskutierten Daten die Vermutung nahe, dass die ischämiebedingte Zunahme der Kardiomyozytensteifigkeit bei Perkonditionierung über andere Titinmodifikationen erfolgt, als in den bisher untersuchten, nicht-perkonditionierten Modellen. Die Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass die beobachtete, verminderte Phosphorylierung an S12022 vermutlich ursächlich für den Abfall der Myofilamentsteifigkeit in der Reperfusionsphase ist.

4.6 Untersuchung der N2-Bus

Die N2-Bus, die eine erniedrigte Steifigkeit vermittelt, wurde auf ihren Phosphorylierungsstatus untersucht. Dabei wurde die Aktivität *extracellular regulated kinase* (ERK) gemessen, welche die N2-Bus an S3916, S3960 und S4010 phosphoryliert (Raskin et al., 2012, Perkin et al., 2015). Die Serinstelle 4010 wird außerdem durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Die Aktivität von PKA wurde in der vorliegenden Arbeit indirekt über den PKA-abhängigen Phosphorylierungsstatus von Troponin I an S23/S24 bestimmt. (Noland et al., 1995, Yamasaki et al., 2002, Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2013). Die Serinstelle S4010 wird ebenfalls von der CaMKII δ phoshoryliert, welches auch an der Phosphorylierung zehn weiterer Stellen an der N2-Bus beteiligt ist. Wie im vorherigen Absatz bereits erklärt, wurde die Aktivität von CaMKII δ in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse in den vorherigen Arbeiten zur Aktivität von

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

ERK in Bezug auf hypoxischem Gewebe waren unterschiedlich. Grundsätzlich konnte bei Kardiomyozyten von Ratten eine *rapidly accelerated fibrosarcoma-protein* (RAF) abhängige Aktivitätserhöhung von ERK nach Hypoxie und Reperfusion gezeigt werden (Seko et al., 1996). Signifikante Anstiege der ERK-Phosphorylierung konnten zudem bei transienter Hypoxie und bei Präkonditionierung im Schwein gezeigt werden. Bei Gent et al. zeigte sich sowohl im I/R-Modell als auch bei Präkonditionierung ein signifikanter Anstieg der ERK-Phosphorylierung, wohingegen bei Jahns et al eine Signifikanz erst nach Präkonditionierung detektiert wurde. (Gent et al., 2017, Celerina Jahns). Dagegen zeigte sich nach permanenter LAD-Ligatur im Mausmodell weder beim Phosphorylierungsstatus von ERK noch in der indirekten Messung von PKA über S23/24 eine signifikante Veränderung. Auch der Phosphorylierungsstatus von N2-Bus war unverändert (Kötter et al., 2016). Dies legt zunächst nahe, dass der ERK-Anstieg abhängig vom Tier- und Ischämiemodell sein könnte. Im Schwein wird vornehmlich der SAFE-Pathway aktiviert, wohingegen bei Nagetieren eher der RISK-*pathway* aktiviert wird (Lecour, 2009, Skyschally et al., 2009). Auch das Entnahmegebiet der Biopsie scheint eine Rolle zu spielen. Während die Untersuchungen von Gent et al. direkt aus dem Infarktareal durchgeführt wurden, wurden die Biopsien bei Kötter et al. und Jahns et al aus dem nicht-infarzierten *remote* Gewebe entnommen. Zusammengefasst zeigte sich im Präkonditionierungsmodell am Schwein unabhängig vom Entnahmegebiet der Biopsie eine signifikant erhöhte ERK-Phosphorylierung, während in der vorliegenden Arbeit am Perkonditionierungsmodell am Schwein keine signifikante Veränderung der ERK-Aktivität ermittelt werden konnte. Die Perkonditionierung im remote Areal scheint somit ERK unabhängig vermittelt zu werden. Die Ursache hierfür kann die Aktivierung der Serin/Threonin Protein Phosphatase (PP5) sein, welche antagonistisch auf Proteinkinasen der MAPK-Familie wirkt. Außerdem konnte in menschlichen Herzen mit Herzinsuffizienz eine Desphosphorylierung der N2-Bus durch PP5 nachgewiesen werden, was in einer erhöhten Titinsteifigkeit resultiert. Eine Aussage bezüglich der Aktivierung der PP5 lässt sich allerdings in dieser Arbeit nicht treffen (Krysiak et al., 2018).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Troponin I wies in den hier untersuchten Geweben keine Veränderung der PKA-abhängigen Phosphorylierung auf, was für eine unveränderte Aktivität der PKA spricht. Die PKA-Aktivität selbst wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt untersucht. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen der Präkonditionierung, die ebenfalls keine Veränderung im indirekten Nachweis von PKA über Troponin I zeigten (Celerina Jahns).

4.7 Oxidativer Stress

Die Titin-basierte Steifigkeit von Kardiomyozyten wird auch von zunehmendem oxidativem Stress moduliert (Grutzner et al., 2009). Oxidativer Stress wird definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der Abwehr durch Antioxidantien (Betteridge, 2000). Der oxidative Stress kann induziert werden durch ischämische- und Reperfusionsschäden, Alterungsprozesse, Diabetes Mellitus oder Adipositas (Linke and Hamdani, 2014). An der N2-Bus führt oxidativer Stress zu einer begünstigten Bildung von bis zu drei Disulfidbrücken aus sechs Cysteinen, welche zu einer Stabilisierung der N2-Bus und somit zu einer erhöhten Myofilamentsteifigkeit führen (Grutzner et al., 2009, Beckendorf and Linke, 2015). Es ist denkbar, dass eine Disulfidbrückenbindung auch zu einer erhöhten Kardiomyozytensteifigkeit in den hier untersuchten perkonditionierten Schweineproben beiträgt. An den Ig-Domänen führt oxidativer Stress zu einer reduzierten Myofilamentsteifigkeit. Sogenannte verborgene (kryptische) Cysteine in der Ig-Domäne bleiben unmodifiziert, solange ihre zugehörige Domäne in der gefalteten Form vorliegt (Alegre-Cebollada et al., 2014). Mechanische Kräfte und Dehnung beschleunigen das Entfalten von Proteindomänen, sodass die kryptischen Cysteine in der entfalteten Form zugänglich sind für Modifikationen (Schlierf et al., 2004). Bei oxidativem Stress kann es zu solch einer Modifikation kommen durch S-Glutathionylierung (Alegre-Cebollada et al., 2014). Durch diese S-Glutathionylierung entstehen Disulfidbindungen mit Glutathion. Dadurch resultiert eine Blockierung des Rückfaltens der entfalteten Ig-Domänen, eine daraus resultierende Erhöhung der Länge, sowie eine verminderte Myofilamentsteifigkeit (Alegre-Cebollada et al., 2014). Eine S-Glutathionylierung von Titin wurde bereits für nicht-ischämisches Ventrikelmyokard im

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Mausmodell gezeigt (Avner et al., 2012). Die S-Glutathionylierung von Titin wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da wie oben beschrieben die passiven Kraftmessungen der Proben eine Zunahme der passiven Steifigkeit zeigten und Glutathionylierung eher eine verminderte Myofilamentsteifigkeit vermittelt, scheint in dem vorliegenden Modell die Glutathionylierung keine ausschlaggebende Rolle bei der Modifikation der passiven Steifigkeit zu spielen.

Unter physiologischen Bedingungen kann eine Veränderung der Kardiomyozytensteifigkeit über den NO/cGMP/PKG-Signalweg bewirkt werden. Die Produktion von NO durch NOS-Enzyme kann die lösliche Guanylylcyclase (sGC) aktivieren und darüber die cGMP-Produktion ankurbeln. Ein erhöhtes cGMP führt zur Aktivierung von PKG, wodurch eine PKG-abhängige Phosphorylierung an der N2-Bus entsteht. Unter oxidativem Stress sinkt die NO-Produktion, was sich in einer Hypo-Phosphorylierung und somit einer gesteigerten Kardiomyozytensteifigkeit auswirkt (Beckendorf and Linke, 2015). Allerdings wurde ein Defizit der PKG-abhängigen Phosphorylierung bislang zwar bei terminaler Herzinsuffizienz in menschlichen Herzen festgestellt, jedoch nicht in den bisher untersuchten Geweben akut nach Myokardinfarkt (Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2016). Eine Messung der PKG-Aktivität wurde in dieser nicht durchgeführt und wäre im Zusammenhang mit oxidativem Stress hilfreich gewesen.

Zu beachten ist weiterhin, dass der oxidative Stress im nicht-ischämischen Remote-Myokard vermutlich nicht sehr ausgeprägt ist, weshalb fraglich ist, ob die hier beschriebenen Titinmodifikationen in den untersuchten Proben überhaupt eintreten könnten.

Weitere Elemente der SAFE- oder RISK-Signalwege könnten im Zusammenhang mit der Perkonditionierung an dem kardioprotektiven Effekt beteiligt sein, wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

4.8 Die Perkonditionierung ist ein geeignetes Verfahren im klinischen Alltag

Wie in 1.3.2 erklärt, zeigte die herzferne Perkonditionierung bereits kardioprotektive Effekte in mehreren klinischen Studien. Auch die kostengünstige Anwendung bietet sich für den klinischen Alltag, da lediglich ein Tourniquet oder eine Blutdruckmanschette benötigt werden. Auch das Ausmaß unerwünschter Nebenwirkungen wäre bekannt und vernachlässigbar. Anders als im Modell der Präkonditionierung bietet sich für die Perkonditionierung zudem ein geeignetes Therapiefenster. Präventiv eignet sich die Präkonditionierung operativ aus ethischen Gründen nicht und ist gänzlich direkt vor Einsetzen des Myokardinfarktes aufgrund fehlender Vorhersage des Ereignisses ungeeignet. Wie sich in der vorliegenden Arbeit zeigte, scheinen für die Perkonditionierung andere Signalkaskaden beteiligt zu sein als für die Präkonditionierung. Eine eingehendere Erforschung dieser molekularen Mechanismen könnte zukünftig die Basis für neue pharmakologische Angriffspunkte bieten. Denkbar wäre beispielsweise eine pharmakologisch gesteigerte Titin-basierte Myofilamentsteifigkeit, die die kardiale Pumpfunktion nach akutem Myokardinfarkt steigert. Auch wenn die genauen physiologisch-biochemischen Effekte unbekannt bleiben, machen die preiswerte, effektive und einfache Anwendung einer herzfernen Perkonditionierung dies zu einer realistischen und effektiven Therapieoption.

4.9 Limitationen

Die Limitationen der Methodik dieser Arbeit wird im folgenden Abschnitt erörtert, um die Aussagekraft der Ergebnisse einordnen zu können. Für die Arbeit wurden sechs Göttinger Minipigs verwendet. Aufgrund der Größenordnung dieser Tiere musste das Kosten-Nutzen-Verhältnis abgewogen werden, weshalb eine höhere Anzahl von Versuchstieren nicht zur Verfügung stand. Eine höhere Anzahl der Versuchstiere würde möglicherweise genauere Ergebnisse und Mittelwerte liefern und würde auch weiterführende bzw. ergänzende Untersuchungen ermöglichen. Andererseits wurden die Proben in Serie im Verlauf der I/R aus jeweils einem Schwein entnommen. Dies

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

ermöglicht eine Auswertung der Veränderung der Phosphorylierung im zeitlichen Verlauf der I/R, was einen Vorteil gegenüber Modellen mit Kleintierproben darstellt.

Eine weitere Einschränkung zeigte sich in der geringen Größe der Biopsien, welche zwischen 2-4 µg lagen, da die Biopsieentnahme am schlagenden Herzen erfolgte. Dadurch konnten die Biopsien lediglich zweimal untersucht werden. Drei technische Replikate hätten gegebenenfalls eine höhere Aussagekraft durch genauere Mittelwerte liefern können. Die geringe Größe der Biopsien limitiert zudem die Option an Untersuchungen ein. Die Anwendung von biochemischer Analyse als auch funktionelle Kraftmessung konnte nur bei zwei von sechs Proben verwendet werden, sodass die Kraftmessung von Lale Azer-Güney an anderen Proben erfolgte. Lediglich zwei der vier Proben aus der Kraftmessung wurden auch in dieser Arbeit verwendet. Die Veränderungen von Ischämie und Perikonditionierung auf die Titinphosphorylierung wurden in dem verwendeten Modell nur nach max. 4 Stunden (60 Min. Ischämie und 180 Min. Reperfusion) analysiert. Effekte, die erst nach Tagen oder Wochen auftreten könnten, wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers.....	6
Abb 2: Schmatische Darstellung der kardialen Titin-Isoformen N2B und N2BA in einem Halbsarkomer von Z-Scheibe bis zum M-Band.	9
Abb 3: Beitrag von Titin und Kollagen zur passiven Steifigkeit im Myokard bei steigender Sarkomerlänge. Angelehnt an Linke und Hamdani (Linke and Hamdani, 2014).	11
Abb 4: Schematische Darstellung der Titin Phosphorylierung an der N2-B unique sequence (N2-Bus) und die prolin, glutamat, valin und lysinreichen Titinregion (PEVK). Angelehnt an Linke und Hamdani (Linke and Hamdani, 2014).	13
Abb 5: Modelle der Konditionierungsarten.	17
Abbildung 6: Aktivierung der RISK- und SAFE-Signalkaskaden nach ischämischer Konditionierung. Angelehnt an (Lecour, 2009):	22
Abb. 7: Schematische Darstellung der jeweiligen Zeitpunkte der entnommenen Proben bei gewebeferner ischämischer Perkonditionierung.	29
Abb. 8: Analyse der Troponin I (S23/S24) Phosphorylierung im Western Blot.	33
Abb. 9: Analyse der Proteinkinase α (PKC α) Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot.	34
Abb. 10: Analyse der ERK42 (p42) und ERK44 Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot.	35
Abb. 11: Analyse der ERK-Gesamt Aktivität anhand des Phosphorylierungsstatus im Western Blot.	36
Abb. 12: Analyse der Phosphorylierungsstelle S11878 in der PEVK-Region der N2BA-Titinisofom im Western Blot.	37
Abb. 13: Analyse der Phosphorylierungsstelle S11878 in der PEVK-Region der N2B-Titinisofom im Western Blot.	38
Abb. 14: Analyse der Phosphorylierungsstelle 12022 in der PEVK-Region der N2BA Titinisofom im Western Blot.	39
Abb. 15: Analyse der Phosphorylierungsstelle S12022 in der PEVK-Region der N2B Titinisofom im Western Blot.	40

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

Abb. 16: Analyse der relativen Phosphorylierung von Titin S11878 im zeitlichen Verlauf.	41
Abbildung 17: Analyse der relativen Phosphorylierung von Titin S12022 im zeitlichen Verlauf.....	42
Abbildung 18: Veränderung der relativen PKC α Aktivierung im jeweiligen Schwein anhand des Phosphorylierungsstatus im Verlauf der I/R:.....	43
Abbildung 19: Kraftmessung von Kardiomyozyten nach RPER, durchgeführt von Lale Azer-Güney	49

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	25
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	26
Tabelle 3: Laborgeräte	27
Tabelle 4: Antikörper	27
Tabelle 5: Titinantikörper	28
Tabelle 6: Pipettierschema für die Herstellung zweier Titingele.....	30
Tabelle 7: Pipettierschema für je die Herstellung zweier SDS-Standardgele/ Sammelgele	30
Tabelle 8: Relative Gesamttitin-Phosphorylierung von S11878 für die jeweiligen Schweinebiopsien vor (BL) und während Ischämie (155) und nach 10 Min. (R10) bzw. 120 Min. (R120) Reperfusion.....	41
Tabelle 9: Relative Titin-Phosphorylierung an Position S11878 für die jeweiligen Schweinebiopsien vor (BL) und während Ischämie (155) und nach 10 Min. (R10) bzw. 120 Min. (R120) Reperfusion.....	42
Tabelle 10: Mittelwerte der relativen PKC α Aktivierung (Phosphorylierung) für die Biopsien des jeweiligen Tiers.....	43

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AGARKOVA, I. & PERRIARD, J. C. 2005. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 15, 477-85.
- ALEGRE-CEBOLLADA, J., KOSURI, P., GIGANTI, D., ECKELS, E., RIVAS-PARDO, J. A., HAMDANI, N., WARREN, C. M., SOLARO, R. J., LINKE, W. A. & FERNANDEZ, J. M. 2014. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156, 1235-1246.
- ANDREKA, G., VERTESALJAI, M., SZANTHO, G., FONT, G., PIROTH, Z., FONTOS, G., JUHASZ, E. D., SZEKELY, L., SZELID, Z., TURNER, M. S., ASHRAFIAN, H., FRENNEAUX, M. P. & ANDREKA, P. 2007. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart*, 93, 749-52.
- AVNER, B. S., SHIOURA, K. M., SCRUGGS, S. B., GRACHOFF, M., GEENEN, D. L., HELSETH, D. L., JR., FARJAH, M., GOLDSPIK, P. H. & SOLARO, R. J. 2012. Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification. *Mol Cell Biochem*, 363, 203-15.
- BAIGENT, C., KEECH, A., KEARNEY, P. M., BLACKWELL, L., BUCK, G., POLLICINO, C., KIRBY, A., SOURJINA, T., PETO, R., COLLINS, R., SIMES, R. & CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS, C. 2005. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366, 1267-78.
- BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- BECKENDORF, L. & LINKE, W. A. 2015. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 25-36.
- BETTERIDGE, D. J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 3-8.
- BOENGLER, K., HILFIKER-KLEINER, D., HEUSCH, G. & SCHULZ, R. 2010. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 105, 771-85.
- BOENGLER, K., UNGEFUG, E., HEUSCH, G. & SCHULZ, R. 2013. The STAT3 inhibitor statin impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation. *Curr Pharm Des*, 19, 6890-5.
- BORBELY, A., FALCAO-PIRES, I., VAN HEEREBEEK, L., HAMDANI, N., EDES, I., GAVINA, C., LEITE-MOREIRA, A. F., BRONZWAER, J. G., PAPP, Z., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J. & PAULUS, W. J. 2009. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*, 104, 780-6.
- BOTKER, H. E., KHARBANDA, R., SCHMIDT, M. R., BOTTCHE, M., KALTOFT, A. K., TERKELSEN, C. J., MUNK, K., ANDERSEN, N. H., HANSEN, T. M., TRAUTNER, S., LASSEN, J. F., CHRISTIANSEN, E. H., KRUSELL, L. R., KRISTENSEN, S. D., THUESEN, L., NIELSEN, S. S., REHLING, M., SORENSEN, H. T., REDINGTON, A. N. & NIELSEN, T. T. 2010. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*, 375, 727-34.
- BRAUNWALD, E. & KLONER, R. A. 1982. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66, 1146-9.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- BREIVIK, L., HELGELAND, E., AARNES, E. K., MRDALJ, J. & JONASSEN, A. K. 2011. Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 106, 135-45.
- BURLEY, D. S., FERDINANDY, P. & BAXTER, G. F. 2007. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol*, 152, 855-69.
- CANDILIO, L., MALIK, A. & HAUSENLOY, D. J. 2013. Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 14, 193-205.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITAS, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 86, 59-67.
- CAZORLA, O., WU, Y., IRVING, T. C. & GRANZIER, H. 2001. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res*, 88, 1028-35.
- CELERINA JAHNS, S. K., MARTINA KRÜGER The impact of ischemia/reperfusion and ischemic preconditioning on the titin-based passive tension of cardiomyocytes in a large animal model.
- COHEN, M. V., YANG, X. M., LIU, G. S., HEUSCH, G. & DOWNEY, J. M. 2001. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res*, 89, 273-8.
- COLLET, J. P., THIELE, H., BARBATO, E., BARTHELEMY, O., BAUERSACHS, J., BHATT, D. L., DENDALE, P., DOROBANTU, M., EDVARDSEN, T., FOLLIGUET, T., GALE, C. P., GILARD, M., JOBS, A., JUNI, P., LAMBRINOU, E., LEWIS, B. S., MEHILLI, J., MELIGA, E., MERKELY, B., MUELLER, C., ROFFI, M., RUTTEN, F. H., SIBBING, D., SIONTIS, G. C. M. & GROUP, E. S. C. S. D. 2020. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*.
- COUCHONNAL, L. F. & ANDERSON, M. E. 2008. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*, 23, 151-9.
- DE LUCA, G., SURYAPRANATA, H., STONE, G. W., ANTONIUCCI, D., TCHENG, J. E., NEUMANN, F. J., VAN DE WERF, F., ANTMAN, E. M. & TOPOL, E. J. 2005. Abciximab as adjunctive therapy to reperfusion in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, 293, 1759-65.
- DESTATIS. 08/2023a. *Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen* [Online]. Available: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> [Accessed].
- DESTATIS 08/2023b. Gruppen häufigster Todesursachen.
- DOST, T., COHEN, M. V. & DOWNEY, J. M. 2008. Redox signaling triggers protection during the reperfusion rather than the ischemic phase of preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 103, 378-84.
- DOWNEY, J. M., DAVIS, A. M. & COHEN, M. V. 2007. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*, 12, 181-8.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2006. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1907-39.
- FREEMANTLE, N., CLELAND, J., YOUNG, P., MASON, J. & HARRISON, J. 1999. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ*, 318, 1730-7.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- FUKUDA, N., WU, Y., NAIR, P. & GRANZIER, H. L. 2005. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*, 125, 257-71.
- FUKUZAWA, A., LANGE, S., HOLT, M., VIHOLA, A., CARMIGNAC, V., FERREIRO, A., UDD, B. & GAUTEL, M. 2008. Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J Cell Sci*, 121, 1841-51.
- FURST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. & WEBER, K. 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. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
- GASPAR, A., LOURENCO, A. P., PEREIRA, M. A., AZEVEDO, P., RONCON-ALBUQUERQUE, R., JR., MARQUES, J. & LEITE-MOREIRA, A. F. 2018. Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI). *Basic Res Cardiol*, 113, 14.
- GAUTEL, M. 2011. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch*, 462, 119-34.
- GBE-BUND. 19.05.2020. *Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998)*. [Online]. Available: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_n eu/&p_aid=3&p_aid=70895060&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=29779486 [Accessed].
- GENT, S., SKYSCHALLY, A., KLEINBONGARD, P. & HEUSCH, G. 2017. Ischemic preconditioning in pigs: a causal role for signal transducer and activator of transcription 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312, H478-H484.
- GHO, B. C., SCHOEMAKER, R. G., VAN DEN DOEL, M. A., DUNCKER, D. J. & VERDOUW, P. D. 1996. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*, 94, 2193-200.
- GRANZIER, H. L. & LABELLE, S. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 94, 284-95.
- GRANZIER, H. L. & WANG, K. 1993. Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophys J*, 65, 2141-59.
- GRAY, M. O., KARLINER, J. S. & MOCHLY-ROSEN, D. 1997. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem*, 272, 30945-51.
- GRAY, M. O., ZHOU, H. Z., SCHAFFHALTER-ZOPPOTH, I., ZHU, P., MOCHLY-ROSEN, D. & MESSING, R. O. 2004. Preservation of base-line hemodynamic function and loss of inducible cardioprotection in adult mice lacking protein kinase C epsilon. *J Biol Chem*, 279, 3596-604.
- GREASER, M. L., BERRI, M., WARREN, C. M. & MOZDZIAK, P. E. 2002. Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 23, 473-82.
- GRITSOPOULOS, G., ILIODROMITIS, E. K., ZOGA, A., FARMAKIS, D., DEMEROUTI, E., PAPALOIS, A., PARASKEVAIDIS, I. A. & KREMASTINOS, D. T. 2009. Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*, 23, 193-8.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- GRUTZNER, A., GARCIA-MANYES, S., KOTTER, S., BADILLA, C. L., FERNANDEZ, J. M. & LINKE, W. A. 2009. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, 97, 825-34.
- HADEBE, N., COUR, M. & LECOUR, S. 2018. The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res Cardiol*, 113, 9.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRUGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2016. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*, 13, 193-209.
- HEUSCH, G. 2004. Postconditioning: old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol*, 44, 1111-2.
- HEUSCH, G. 2015. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*, 116, 674-99.
- HEUSCH, G. 2018. 25 years of remote ischemic conditioning: from laboratory curiosity to clinical outcome. *Basic Res Cardiol*, 113, 15.
- HEUSCH, G., BOTKER, H. E., PRZYKLENK, K., REDINGTON, A. & YELLON, D. 2015. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol*, 65, 177-95.
- HEUSCH, G. & GERSH, B. J. 2017. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J*, 38, 774-784.
- HEUSCH, G., LIBBY, P., GERSH, B., YELLON, D., BOHM, M., LOPASCHUK, G. & OPIE, L. 2014. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*, 383, 1933-43.
- HEUSCH, G., MUSIOLIK, J., GEDIK, N. & SKYSCHALLY, A. 2011. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res*, 109, 1302-8.
- HEUSCH, G., MUSIOLIK, J., KOTTENBERG, E., PETERS, J., JAKOB, H. & THIELMANN, M. 2012. STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. *Circ Res*, 110, 111-5.
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- HIDALGO, C. G., CHUNG, C. S., SARIPALLI, C., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRILIS, G., LABEIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HOROWITS, R., MARUYAMA, K. & PODOLSKY, R. J. 1989. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J Cell Biol*, 109, 2169-76.
- HUXLEY, H. & HANSON, J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173, 973-6.
- JENNINGS, R. B. 2013. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, 113, 428-38.
- KATZ, A. M. & ZILE, M. R. 2006. New molecular mechanism in diastolic heart failure. *Circulation*, 113, 1922-5.
- KEELEY, E. C., BOURA, J. A. & GRINES, C. L. 2003. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, 361, 13-20.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- KERENDI, F., KIN, H., HALKOS, M. E., JIANG, R., ZATTA, A. J., ZHAO, Z. Q., GUYTON, R. A. & VINTEN-JOHANSEN, J. 2005. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*, 100, 404-12.
- KHARBANDA, R. K., MORTENSEN, U. M., WHITE, P. A., KRISTIANSEN, S. B., SCHMIDT, M. R., HOSCHTITZKY, J. A., VOGEL, M., SORENSEN, K., REDINGTON, A. N. & MACALLISTER, R. 2002. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, 106, 2881-3.
- KLEINBONGARD, P., AMANAKIS, G., SKYSCHALLY, A. & HEUSCH, G. 2018. Reflection of Cardioprotection by Remote Ischemic Perconditioning in Attenuated ST-Segment Elevation During Ongoing Coronary Occlusion in Pigs: Evidence for Cardioprotection From Ischemic Injury. *Circ Res*, 122, 1102-1108.
- KLONER, R. A., KING, K. S. & HARRINGTON, M. G. 2018. No-reflow phenomenon in the heart and brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315, H550-H562.
- KNAPPEIS, G. G. & CARLSEN, F. 1968. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 38, 202-11.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MULLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GODECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRÜGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KRAUSE, S. M., JACOBUS, W. E. & BECKER, L. C. 1989. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ Res*, 65, 526-30.
- KRÜGER, M., KOHL, T. & LINKE, W. A. 2006. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. 291, H496-506.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
- KRÜGER, M., KOTTER, S., GRUTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M. M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C. G. & LINKE, W. A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2009. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 490-8.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- KRYSIK, J., UNGER, A., BECKENDORF, L., HAMDANI, N., VON FRIELING-SALEWSKY, M., REDFIELD, M. M., DOS REMEDIOS, C. G., SHEIKH, F., GERGS, U., BOKNIK, P. & LINKE, W. A. 2018. Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat Commun*, 9, 262.
- LABEIT, S., GAUTEL, M., LAKEY, A. & TRINICK, J. 1992. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J*, 11, 1711-6.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- LABEIT, S. & KOLMERER, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- LABEIT, S., LAHMERS, S., BURKART, C., FONG, C., MCNABB, M., WITT, S., WITT, C., LABEIT, D. & GRANZIER, H. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol*, 362, 664-81.
- LACERDA, L., SOMERS, S., OPIE, L. H. & LECOUR, S. 2009. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*, 84, 201-8.
- LAHMERS, S., WU, Y., CALL, D. R., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2004. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res*, 94, 505-13.
- LANGE, S., EHLER, E. & GAUTEL, M. 2006. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 16, 11-8.
- LECOUR, S. 2009. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*, 47, 32-40.
- LECOUR, S., SULEMAN, N., DEUCHAR, G. A., SOMERS, S., LACERDA, L., HUISAMEN, B. & OPIE, L. H. 2005. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, 112, 3911-8.
- LI, H., LINKE, W. A., OBERHAUSER, A. F., CARRION-VAZQUEZ, M., KERKVLIT, J. G., LU, H., MARSZALEK, P. E. & FERNANDEZ, J. M. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418, 998-1002.
- LIBBY, P. & THEROUX, P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, 3481-8.
- LINKE, W. A. 2008. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77, 637-48.
- LINKE, W. A. & HAMDANI, N. 2014. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., LABEIT, S., HINSEN, H., RÜEGG, J. C. & GAUTEL, M. 1997. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophysical Journal*, 73, 905-919.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A., POPOV, V. I. & POLLACK, G. H. 1994. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J*, 67, 782-92.
- LINKE, W. A., RUDY, D. E., CENTNER, T., GAUTEL, M., WITT, C., LABEIT, S. & GREGORIO, C. C. 1999. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, 146, 631-44.
- LIU, G. S., RICHARDS, S. C., OLSSON, R. A., MULLANE, K., WALSH, R. S. & DOWNEY, J. M. 1994. Evidence that the adenosine A3 receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res*, 28, 1057-61.
- LOUKOGEORGAKIS, S. P., PANAGIOTIDOU, A. T., BROADHEAD, M. W., DONALD, A., DEANFIELD, J. E. & MACALLISTER, R. J. 2005. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*, 46, 450-6.
- MA, Y., HALADE, G. V. & LINDSEY, M. L. 2012. Extracellular matrix and fibroblast communication following myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, 5, 848-57.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- MAHMOOD, S. S., LEVY, D., VASAN, R. S. & WANG, T. J. 2014. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*, 383, 999-1008.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. 1984. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 497-518.
- MAULIK, N., WATANABE, M., ZU, Y. L., HUANG, C. K., CORDIS, G. A., SCHLEY, J. A. & DAS, D. K. 1996. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett*, 396, 233-7.
- MCLEOD, S. L., IANSAVICHENE, A. & CHESKES, S. 2017. Remote Ischemic Perconditioning to Reduce Reperfusion Injury During Acute ST⁺Segment⁺Elevation Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta⁺Analysis. *Journal of the American Heart Association*, 6, e005522.
- MEIER, J. A., HYUN, M., CANTWELL, M., RAZA, A., MERTENS, C., RAJE, V., SISLER, J., TRACY, E., TORRES-ODIO, S., GISPERT, S., SHAW, P. E., BAUMANN, H., BANDYOPADHYAY, D., TAKABE, K. & LARNER, A. C. 2017. Stress-induced dynamic regulation of mitochondrial STAT3 and its association with cyclophilin D reduce mitochondrial ROS production. *Sci Signal*, 10.
- METHNER, C., SCHMIDT, K., COHEN, M. V., DOWNEY, J. M. & KRIEG, T. 2010. Both A2a and A2b adenosine receptors at reperfusion are necessary to reduce infarct size in mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H1262-4.
- MILLER, M. K., GRANZIER, H., EHLER, E. & GREGORIO, C. C. 2004. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol*, 14, 119-26.
- MORAN, A. E., FOROUZANFAR, M. H., ROTH, G. A., MENSAH, G. A., EZZATI, M., FLAXMAN, A., MURRAY, C. J. & NAGHAVI, M. 2014. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*, 129, 1493-501.
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, 1124-36.
- NAGUEH, S. F., SHAH, G., WU, Y., TORRE-AMIONE, G., KING, N. M., LAHMERS, S., WITT, C. C., BECKER, K., LABELIT, S. & GRANZIER, H. L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 155-62.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- NEUMANN, J. T., GOSSLING, A., SORENSEN, N. A., BLANKENBERG, S., MAGNUSSEN, C. & WESTERMANN, D. 2020. Temporal trends in incidence and outcome of acute coronary syndrome. *Clin Res Cardiol*, 109, 1186-1192.
- NOLAND, T. A., JR., GUO, X., RAYNOR, R. L., JIDEAMA, N. M., AVERYHART-FULLARD, V., SOLARO, R. J. & KUO, J. F. 1995. Cardiac troponin I mutants. Phosphorylation by protein kinases C and A and regulation of Ca²⁺-stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1. *J Biol Chem*, 270, 25445-54.
- OLDENBURG, O., QIN, Q., KRIEG, T., YANG, X. M., PHILIPP, S., CRITZ, S. D., COHEN, M. V. & DOWNEY, J. M. 2004. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H468-76.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- OUDIT, G. Y. & PENNINGER, J. M. 2009. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc Res*, 82, 250-60.
- OVIZE, M., BAXTER, G. F., DI LISA, F., FERDINANDY, P., GARCIA-DORADO, D., HAUSENLOY, D. J., HEUSCH, G., VINTEN-JOHANSEN, J., YELLON, D. M., SCHULZ, R. & WORKING GROUP OF CELLULAR BIOLOGY OF HEART OF EUROPEAN SOCIETY OF, C. 2010. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*, 87, 406-23.
- PERKIN, J., SLATER, R., DEL FAVERO, G., LANZICHER, T., HIDALGO, C., ANDERSON, B., SMITH, J. E., 3RD, SBAIZERO, O., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2015. Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J*, 109, 2592-2601.
- PING, P., SONG, C., ZHANG, J., GUO, Y., CAO, X., LI, R. C., WU, W., VONDRISKA, T. M., PASS, J. M., TANG, X. L., PIERCE, W. M. & BOLLI, R. 2002. Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest*, 109, 499-507.
- PIPER, H. M., GARCIA-DORADO, D. & OVIZE, M. 1998. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 38, 291-300.
- PRADO, L. G., MAKARENKO, I., ANDRESEN, C., KRUGER, M., OPITZ, C. A. & LINKE, W. A. 2005. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, 126, 461-80.
- PRYDS, K., TERKELSEN, C. J., SLOTH, A. D., MUNK, K., NIELSEN, S. S., SCHMIDT, M. R., BOTKER, H. E. & INVESTIGATORS, C. 2016. Remote ischaemic conditioning and healthcare system delay in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Heart*, 102, 1023-8.
- PRZYKLENK, K., BAUER, B., OVIZE, M., KLONER, R. A. & WHITTAKER, P. 1993. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87, 893-9.
- PYLE, W. G. & SOLARO, R. J. 2004. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*, 94, 296-305.
- RASKIN, A., LANGE, S., BANARES, K., LYON, R. C., ZIESENISS, A., LEE, L. K., YAMAZAKI, K. G., GRANZIER, H. L., GREGORIO, C. C., MCCULLOCH, A. D., OMENS, J. H. & SHEIKH, F. 2012. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, 287, 29273-84.
- RIDKER, P. M., THUREN, T., ZALEWSKI, A. & LIBBY, P. 2011. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J*, 162, 597-605.
- RITCHIE, H. 14.02.2018. *What do people die from?* [Online]. Our World Data. Available: <https://ourworldindata.org/what-does-the-world-die-from> [Accessed].
- ROTH, G. A., ABATE, D., ABATE, K. H., ABAY, S. M., ABBAFATI, C., ABBASI, N., ABBASTABAR, H., ABD-ALLAH, F., ABDELA, J., ABDELALIM, A., ABDOLLAHPOUR, I., ABDULKADER, R. S., ABEBE, H. T., ABEBE, M., ABEBE, Z., ABEJIE, A. N., ABERA, S. F., ABIL, O. Z., ABRAHA, H. N., ABRHAM, A. R., ABU-RADDAD, L. J., ACCROMBESSI, M. M. K., ACHARYA, D., ADAMU, A. A., ADEBAYO, O. M., ADEDOYIN, R. A., ADEKANMBI, V., ADETOKUNBOH, O. O., ADHENA, B. M., ADIB, M. G., ADMASIE, A., AFSHIN, A., AGARWAL, G., AGESA, K. M., AGRAWAL, A., AGRAWAL, S., AHMADI, A., AHMADI, M., AHMED, M. B., AHMED, S., AICHOUR, A. N., AICHOUR, I., AICHOUR, M. T. E., AKBARI, M. E., AKINYEMI, R. O., AKSEER, N., AL-ALY, Z., AL-EYADHY, A., AL-RADDADI, R. M., ALAHDAB, F., ALAM, K., ALAM, T., ALEBEL, A., ALENE, K. A., ALIJANZADEH, M., ALIZADEH-NAVAEI, R., ALJUNID, S. M., ALKERWI, A. A., ALLA, F., ALLEBECK, P., ALONSO, J., ALTIRKAWI, K., ALVIS-GUZMAN, N., AMARE, A. T., AMINDE, L. N., AMINI, E., AMMAR, W., AMOAKO, Y. A., ANBER, N. H.,

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- ANDREI, C. L., ANDROUDI, S., ANIMUT, M. D., ANJOMSHOA, M., ANSARI, H., ANSHA, M. G., ANTONIO, C. A. T., ANWARI, P., AREMU, O., ÄRNLÖV, J., ARORA, A., ARORA, M., ARTAMAN, A., ARYAL, K. K., ASAYESH, H., ASFAW, E. T., ATARO, Z., ATIQUE, S., ATRE, S. R., AUSLOOS, M., AVOKPAHO, E. F. G. A., AWASTHI, A., QUINTANILLA, B. P. A., AYELE, Y., AYER, R., AZZOPARDI, P. S., BABAZADEH, A., BACHA, U., BADALI, H., BADAWI, A., BALI, A. G., et al. 2018. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392, 1736-1788.
- SCHLIERF, M., LI, H. & FERNANDEZ, J. M. 2004. The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7299-304.
- SCHMIDT, M. R., SMERUP, M., KONSTANTINOV, I. E., SHIMIZU, M., LI, J., CHEUNG, M., WHITE, P. A., KRISTIANSEN, S. B., SORENSEN, K., DZAVIK, V., REDINGTON, A. N. & KHARBANDA, R. K. 2007. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H1883-90.
- SCHULZ, R., ROSE, J., POST, H. & HEUSCH, G. 1995. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflugers Arch*, 430, 273-82.
- SEKO, Y., TOBE, K., UEKI, K., KADOWAKI, T. & YAZAKI, Y. 1996. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Raf-1, mitogen-activated protein kinase kinase, mitogen-activated protein kinases, and S6 kinase in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 78, 82-90.
- SKYSCHALLY, A., KLEINBONGARD, P., LIEDER, H., GEDIK, N., STOIAN, L., AMANAKIS, G., ELBERS, E. & HEUSCH, G. 2018. Humoral transfer and intramyocardial signal transduction of protection by remote ischemic preconditioning in pigs, rats, and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315, H159-H172.
- SKYSCHALLY, A., VAN CASTER, P., BOENGLER, K., GRES, P., MUSIOLIK, J., SCHILAWA, D., SCHULZ, R. & HEUSCH, G. 2009. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*, 104, 15-8.
- SLOTH, A. D., SCHMIDT, M. R., MUNK, K., KHARBANDA, R. K., REDINGTON, A. N., SCHMIDT, M., PEDERSEN, L., SORENSEN, H. T., BOTKER, H. E. & INVESTIGATORS, C. 2014. Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, 35, 168-75.
- SMITH, R. M., LECOUR, S. & SACK, M. N. 2002. Innate immunity and cardiac preconditioning: a putative intrinsic cardioprotective program. *Cardiovasc Res*, 55, 474-82.
- STONE, G. W., SELKER, H. P., THIELE, H., PATEL, M. R., UDELSON, J. E., OHMAN, E. M., MAEHARA, A., EITEL, I., GRANGER, C. B., JENKINS, P. L., NICHOLS, M. & BEN-YEHUDA, O. 2016. Relationship Between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI: Patient-Level Analysis From 10 Randomized Trials. *J Am Coll Cardiol*, 67, 1674-83.
- SZCZEPANEK, K., CHEN, Q., DERECKA, M., SALLOUM, F. N., ZHANG, Q., SZELAG, M., CICHY, J., KUKREJA, R. C., DULAK, J., LESNEFSKY, E. J. & LARNER, A. C. 2011. Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 286, 29610-20.
- SZCZEPANEK, K., XU, A., HU, Y., THOMPSON, J., HE, J., LARNER, A. C., SALLOUM, F. N., CHEN, Q. & LESNEFSKY, E. J. 2015. Cardioprotective function of mitochondrial-targeted and transcriptionally inactive STAT3 against ischemia and reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 110, 53.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

- TANNO, M., GOROG, D. A., BELLAHCENE, M., CAO, X., QUINLAN, R. A. & MARBER, M. S. 2003. Tumor necrosis factor-induced protection of the murine heart is independent of p38-MAPK activation. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 1523-7.
- TONG, H., CHEN, W., STEENBERGEN, C. & MURPHY, E. 2000. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*, 87, 309-15.
- TROMBITAS, K. & GRANZIER, H. 1997. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*, 273, C662-70.
- TROMBITAS, K., GREASER, M., LBEIT, S., JIN, J. P., KELLERMAYER, M., HELMES, M. & GRANZIER, H. 1998. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 140, 853-9.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- VILA-PETROFF, M., SALAS, M. A., SAID, M., VALVERDE, C. A., SAPIA, L., PORTIANSKY, E., HAJJAR, R. J., KRANIAS, E. G., MUNDINA-WEILENMANN, C. & MATTIAZZI, A. 2007. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 73, 689-98.
- VINTEN-JOHANSEN, J. & SHI, W. 2011. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 16, 260-6.
- WARREN, C. M., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., KRZESINSKI, P. R. & GREASER, M. L. 2003. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res*, 59, 86-94.
- WEGRZYN, J., POTLA, R., CHWAE, Y. J., SEPURI, N. B., ZHANG, Q., KOECK, T., DERECKA, M., SZCZEPANEK, K., SZELAG, M., GORNICKA, A., MOH, A., MOGHADDAS, S., CHEN, Q., BOBBILI, S., CICHY, J., DULAK, J., BAKER, D. P., WOLFMAN, A., STUEHR, D., HASSAN, M. O., FU, X. Y., AVADHANI, N., DRAKE, J. I., FAWCETT, P., LESNEFSKY, E. J. & LARNER, A. C. 2009. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*, 323, 793-7.
- WITT, C. C., BURKART, C., LBEIT, D., MCNABB, M., WU, Y., GRANZIER, H. & LBEIT, S. 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J*, 25, 3843-55.
- YAMASAKI, R., WU, Y., MCNABB, M., GREASER, M., LBEIT, S. & GRANZIER, H. 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 90, 1181-8.
- YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357, 1121-35.
- YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., DANS, T., AVEZUM, A., LANAS, F., MCQUEEN, M., BUDAJ, A., PAIS, P., VARIGOS, J., LISHENG, L. & INVESTIGATORS, I. S. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-52.
- YUSUF, S., JOSEPH, P., RANGARAJAN, S., ISLAM, S., MENTE, A., HYSTAD, P., BRAUER, M., KUTTY, V. R., GUPTA, R., WIELGOSZ, A., ALHABIB, K. F., DANS, A., LOPEZ-JARAMILLO, P., AVEZUM, A., LANAS, F., OGUZ, A., KRUGER, I. M., DIAZ, R., YUSOFF, K., MONY, P., CHIFAMBA, J., YEATES, K., KELISHADI, R., YUSUFALI, A., KHATIB, R., RAHMAN, O., ZATONSKA, K., IQBAL, R., WEI, L., BO, H., ROSENGREN, A., KAUR, M., MOHAN, V., LEAR, S. A., TEO, K. K., LEONG, D., O'DONNELL, M., MCKEE, M. & DAGENAIS, G. 2019. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*, 395, 795-808.
- YUSUF, S., ZHAO, F., MEHTA, S. R., CHROLAVICIUS, S., TOGNONI, G., FOX, K. K. & CLOPIDOGREL IN UNSTABLE ANGINA TO PREVENT RECURRENT EVENTS TRIAL, I. 2001. Effects of

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*, 345, 494-502.

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

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön gilt der gesamten AG Krüger.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Martina Krüger, die mich stets zuverlässig, empathisch und kompetent betreute. Martina, danke für Deine konstruktiven Anregungen, Deine mühevollen Korrekturen und Dein positives, freundliches Gemüt. Danke für die hervorragende Betreuung.

Ein besonderer Dank gilt an Dr. David Monteiro Barbosa, von dem ich viel auf wissenschaftlicher sowie menschlicher Ebene lernen konnte. Einen wichtigen Beitrag leistete Frau Dr. Lale Azer, die meiner Arbeit zusätzlicher Relevanz verlieh. Vielen Dank! Ich möchte mich bei Sabine Bongard bedanken, die mich geduldig einarbeitete und mir die Wichtigkeit von strukturierter Dokumentation auf dem Weg gab. Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Sebastian Kötter, dessen wissenschaftliche Kompetenz mich stets motivierte. Zuletzt bedanke ich mich bei Lukas Behrendt, meinem Kommilitonen, für die moralische Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Außerdem bedanke ich mich beim Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen für die Zusammenarbeit bei der Bereitstellung der Gewebeproben. Ich bin dem Sonderforschungsbereich 1116 dankbar für die finanzielle Förderung meiner Promotionsarbeit.

Ich bin meiner Familie und Freunden sehr dankbar für die jahrelange Unterstützung. Danke Dirk Künnemann, meinem Trainer, der mir die Bedeutung von Körper, Geist und Disziplin vermittelte. Meiner cleveren Cousine und angehenden Ärztin Negin Nader, danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich bedanke mich bei - Dipl. Physiker, Oberstleutnant der Reserve und Freund - Dr. Clas Abels, der mich während meiner Schulzeit als Mentor begleitete. Deine Weisheiten und Lehren werden mich für immer prägen

Meinen Geschwistern Dr. Jegane Rassul, Keihan Taleh und Moby Khalid, bin ich für ewig dankbar für die bedingungslose Liebe und Unterstützung.

Abschließend gilt mein Dank besonders meinen lieben Eltern, die es selbst nie einfach hatten, dennoch stets großen Wert auf Bildung legten und sie mir ermöglichten.