

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

TGF- β 1- und IL-6-vermittelte Modifikationen des Sarkomerproteins Titin im Kontext des Myokardinfarkts

Dissertation

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

vorgelegt von
Linda von der Heiden

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zusammenfassung

Der ischämiebedingte Zelluntergang führt zum Funktionsverlust des infarzierten Myokards und zur Ausbildung einer Infarktnarbe. Um diese zu stabilisieren und die Kontraktilität der Ventrikel aufrecht zu erhalten, kommt es im Rahmen des kardialen *remodelings* auch zu Anpassungsmechanismen des nicht infarzierten (*remote*) Myokards. Ein Teil der akuten postischämischen Adaptation erfolgt durch Modifikation des Makroproteins Titin, welches als molekulare Feder im Sarkomer der Herzmuskelzellen fungiert und eine dynamische Regulation der passiven Myokardsteifigkeit vermittelt. In der Herzmuskulatur werden zwei verschiedene Titinisoformen exprimiert. Das exprimierte Verhältnis der elastischeren N2BA-Isoform zur steiferen N2B-Isoform reguliert die Titin-basierte Zellsteifigkeit und unterliegt Veränderungen bei kardialen Erkrankungen. Dynamischer kann die passive Steifigkeit durch eine Phosphorylierung der elastischen Titinregionen PEVK und N2B beeinflusst werden. Eine Phosphorylierung in der PEVK-Region erhöht die Steifigkeit der Kardiomyozyten und führt damit zu einer Spannungszunahme, während eine Phosphorylierung in der N2B-Region eine Spannungsabnahme bedingt. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Titin-vermittelte passive Steifigkeit in den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt zunimmt und dies durch Zytokine wie Interleukin-6 vermittelt werden kann. Es wird vermutet, dass diese Zunahme die Ventrikelfunktion unterstützt, bis die strukturellen Umbauprozesse innerhalb des Myokards zur Ausbildung einer stabilen Infarktnarbe führen. Etwa 10 Tage nach dem Myokardinfarkt nahm die Titin-vermittelte passive Steifigkeit wieder ab. Ein weiteres Zytokin, das nach einem Myokardinfarkt erhöhte Level im Herzen aufweist, ist Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1). Es wird circa 72 Stunden nach der Ischämie sezerniert und wirkt im postischämischen Myokard antiinflammatorisch sowie profibrotisch. In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss von TGF- β 1 auf die Expression der Titinisoformen sowie mögliche dynamische Modifikationen durch Phosphorylierung in den elastischen Titinregionen untersucht und die zugrundeliegende Signalkaskade analysiert. Hierfür wurden Zellkulturen embryonaler Rattenkardiomyozyten am siebten Tag nach Präparation für 30 Minuten mit TGF- β 1 stimuliert und anschließend Proteine der TGF- β -Signalkaskade mittels biochemischer Methoden (SDS-PAGE und *Westernblot*) analysiert. Dabei zeigten sich eine signifikante Aktivierung der Serin/Threonin Kinase AKT und der MAP-Kinase ERK 1/2, sowie eine erhöhte Phosphorylierung der N2B-Region an Position S4010. Ferner wurden zur Untersuchung des Isoformenverhältnisses embryonale Rattenkardiomyozyten ab dem 19. Gestationstag für zwei, vier, sieben und neun Tage mit TGF- β 1 stimuliert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass am siebten Tag nach Stimulation prozentual höhere Anteile der steiferen N2B-Bande vorlagen als in den Kontrollzellen, wobei dies durch eine Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs vermittelt werden könnte. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass TGF- β 1 über eine erhöhte Phosphorylierung am Serinrest S4010 in der N2B Region kurzfristig zu einer Abnahme der Zellsteifigkeit führen könnte, während langfristige Stimulationen eine Zunahme derselben durch Steigerung der N2B-Isoform bewirken könnten. Diese Schlussfolgerung kann in zukünftig durchgeführten Kraftmessungen überprüft werden, wodurch auch das Ausmaß auf die kardiale Pumpfunktion abgeschätzt werden kann. Die postischämisch erhöhte mechanische Belastung des Myokards geht mit einem vermehrten Titinabbau über das Proteasom-Ubiquitin-System (UPS) einher. Neben dem Abbau über das UPS existiert für Titin eine weitere Degradationsmöglichkeit über das autophagolysosomale System, das nach einem Myokardinfarkt eine erhöhte Aktivierung aufweist. Vor dem Hintergrund, dass IL-6 die Autophagie induzieren kann, wurden in dieser Arbeit IL-6-vermittelte Einflüsse auf den autophagolysosomalen Titinabbau untersucht. Hierfür wurden embryonale Rattenkardiomyozyten am siebten Kultivierungstag für 30 Minuten mit IL-6 stimuliert und die Autophagiemarker und die Ubiquitinierung des Titins mittels des SDS-PAGE- und Western Blot-Verfahrens analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine vermehrte Autophagieinduktion über die Regulatorproteine mTOR und AMPK α . Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Titin-Polyubiquitinierung am Lysinrest K63. Bezüglich des Autophagiemarkers LC3-II ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollzellen. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine Erhöhung von p62/SQSTM-1, das sowohl bei Autophagieinhibition als auch bei einer Proteasomdysfunktion akkumuliert. Zusammenfassend weist die vorliegende Arbeit vielfältige Einflüsse der postischämisch erhöhten Zytokine TGF- β 1 und IL-6 auf die Modifikationen am Titinmolekül nach. Die Ergebnisse bieten neue Ansatzpunkte für weiterführende Studien zur Entwicklung pharmakologischer Interventionsstrategien zum Erhalt der Ventrikelfunktion und damit zur Verbesserung des klinischen *Outcomes* von Patienten nach einem Myokardinfarkt.

Summary

Ischemic-induced cell death leads to loss of function of the infarcted myocardium and the formation of an infarct scar. To stabilise this and maintain ventricular contractility, adaptation mechanisms of the non-infarcted (remote) myocardium also occur as part of cardiac remodelling. Part of the acute post-ischemic adaptation occurs through modification of the macroprotein titin, which acts as a molecular spring in the sarcomere of cardiac myocytes and mediates dynamic regulation of passive myocardial stiffness. Two different titin isoforms are expressed in cardiac muscle. The expressed ratio of the more elastic N2BA isoform to the stiffer N2B isoform regulates titin-based cell stiffness and is subject to changes in cardiac disease. More dynamically, passive stiffness can be influenced by phosphorylation of the elastic titin regions PEVK and N2B. Phosphorylation in the PEVK region increases cardiomyocyte stiffness, leading to an increase in tension, while phosphorylation in the N2B region causes a decrease in tension. In the mouse model, titin-mediated passive stiffness has been shown to increase in the first days after myocardial infarction and this may be mediated by cytokines such as interleukin-6. This increase is thought to support ventricular function until structural remodelling processes within the myocardium lead to the formation of a stable infarct scar. Approximately 10 days after myocardial infarction, passive stiffness mediated by titin decreased again. Another cytokine that shows increased levels in the heart after myocardial infarction is transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). It is secreted about 72 hours after ischemia and has anti-inflammatory and profibrotic effects in the post-ischemic myocardium. In the present study, the influence of TGF- β 1 on the expression of titin isoforms and possible dynamic modifications by phosphorylation in elastic titin regions were investigated and the underlying signalling cascade was analysed. For this purpose, embryonic rat cardiomyocyte cell cultures were stimulated with TGF- β 1 for 30 minutes on the seventh day after preparation and subsequently proteins of the TGF- β signalling cascade were analysed by biochemical methods (SDS-PAGE and Western blot). This revealed significant activation of the serine/threonine kinase AKT and the MAP kinase ERK 1/2, as well as increased phosphorylation of the N2B region at position S4010. Furthermore, to investigate the isoform ratio, embryonic rat cardiomyocytes were stimulated with TGF- β 1 for two, four, seven and nine days from gestational day 19. Here, it was shown that on the seventh day after stimulation, higher percentages of the stiffer N2B band were present than in control cells, and this may be mediated by activation of the PI3K-AKT pathway. Taken together, the results indicate that TGF- β 1 could lead to a decrease in cell stiffness in the short term by increasing phosphorylation of the serine residue S4010 in the N2B region, while long-term stimulations could cause an increase in the same by increasing the N2B isoform. This conclusion can be verified in future strength measurements, which will also allow for estimation of the magnitude on cardiac pump function. Increased post-ischemic mechanical stress on the myocardium is accompanied by increased degradation of titin through the proteasome ubiquitin system (UPS). In addition to degradation through UPS, there is another pathway for degradation of titin through the autophagolysosomal system, which exhibits increased activation after myocardial infarction. Given that IL-6 can induce autophagy, in this work IL-6-mediated influences on autophagolysosomal titin degradation were investigated. To do this, embryonic rat cardiomyocytes were stimulated with IL-6 for 30 minutes on the seventh day of cultivation and autophagy markers and titin ubiquitination were analysed by SDS-PAGE and Western blot methods. The results showed increased autophagy induction through the regulatory proteins mTOR and AMPK α . However, there was no difference in titin polyubiquitination in the K63 lysine residue. Regarding the autophagy marker LC3-II, there were no differences compared to control cells. Interestingly, however, there was an increase in p62/SQSTM-1, which accumulates in response to both autophagy inhibition and proteasome dysfunction. In summary, the present work demonstrates multiple influences of post-ischemically elevated cytokines TGF- β 1 and IL-6 on the modifications in the titin molecule. The results provide new starting points for further studies to develop pharmacological intervention strategies to preserve ventricular function and thus improve the clinical outcome of patients after myocardial infarction.

Verzeichnis der Abkürzungen

A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B; Gene: <i>AKT1</i> , <i>AKT2</i> , <i>AKT3</i>
AMPK α	<i>AMP activated protein kinase alpha</i>
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
ATG	<i>autophagy-related genes</i>
Atg	<i>autophagy-related proteins</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	<i>Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II</i>
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ERC	Embryonale Rattenkardiomyozyten
ERK1/2	<i>extracellular signal-related kinase 1/2</i>
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HCl	Salzsäure
<i>HFrEF</i>	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
<i>HFpEF</i>	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
I-Band	Isotropes Band
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
IL1- β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
kDa	Kilodalton
LC3-II	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LOX	Lysyloxidasen
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen activated protein kinase-kinase</i>
MDa	Megadalton
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

MuRF-1/2	<i>muscle RING-finger protein-1/2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOX4	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidase 4
p62/SQSTM1	p62/Sequestosom-1
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKD	Proteinkinase D
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PKC α	Proteinkinase C alpha
PQC	Protein-Qualitäts-Kontrolle
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBM20	<i>RNA-binding motif protein-20</i>
RCM	Rattenkardiomyozyten
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SDS	Natriumdodecylphosphat
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i>
SMAD	<i>small homologue of mothers against decapentaplegic</i>
SOS	<i>son of seven- less</i>
T ₃	Triiodthyronin
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta-1</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULK1	<i>uncoordinated-51 like kinase</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	<i>unique sequence</i>
VEGF	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
μ m	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Myokardinfarkt	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Pathophysiologische Vorgänge im Infarktgebiet	2
1.1.3	Pathomechanismen im nicht-ischämischen Myokard	5
1.2	Zytokinsekretion nach Myokardinfarkt	6
1.2.1	Interleukin-6	7
1.2.2	<i>Transforming Growth Factor-β</i>	8
1.3	Das Sarkomerprotein Titin	9
1.3.1	Aufbau eines Sarkomers	9
1.3.2	Titin: Molekularer Aufbau und Funktion	11
1.3.3	Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit	13
1.3.4	Titin-vermittelte passive Steifigkeit nach Myokardinfarkt	16
1.4	Die Protein-Qualitäts-Kontrolle nach Myokardinfarkt	18
1.4.1	Protein-Qualitäts-Kontrolle durch Autophagie	18
1.4.2	Der Zusammenhang von Titin mit der Protein-Qualitäts-Kontrolle	22
1.4.3	Titindegredation beim Myokardinfarkt und der mögliche Einfluss von Interleukin-6	23
2	Zielsetzung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Chemikalien	27
3.1.2	Lösungen und Puffer	28
3.1.3	Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten	30
3.1.4	Geräte und Laborbedarf	31
3.1.5	Antikörper	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Zellkultur	33
3.2.2	Biochemische Methoden zum Proteinnachweis	35
3.2.3	Densitometrische Analyse und statistische Darstellung	38
3.2.4	Software	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Auswirkungen von TGF-β1 auf den Titinisoformen-Switch	40
4.1.1	TGF- β 1 beschleunigt den Titinisoformen-Switch in kultivierten ERC	40

4.1.2	PI3K-AKT-Signalweg als mögliche Signalkaskade innerhalb des Isoformen- <i>Switches</i>	41
4.2	Akute Veränderungen in elastischen Titindomänen unter TGF-β1-Einfluss.....	42
4.2.1	TGF- β 1 führt akut zu einer Abnahme der passiven Zellsteifigkeit	42
4.2.2	Untersuchung der Kinaseaktivitäten nach TGF- β 1-Stimulation	43
4.3	Interleukin-6 und die autophagosomale Titindegradation.....	44
4.3.1	Interleukin-6 bewirkt keine vermehrte K63-Polyubiquitinierung an Titin	45
4.3.2	Analyse der Effekte von Interleukin-6 auf den Autophagieprozess	46
5	<i>Diskussion</i>.....	48
5.1	TGF-β1 moduliert die Titin-basierte passive Steifigkeit.....	48
5.1.1	Kurzfristige TGF- β 1-Stimulation beeinflusst die posttranslationale Titinmodifikation.....	48
5.1.2	Der Titinisoformen- <i>Switch</i> wird durch TGF- β 1 beschleunigt	50
5.1.3	Die Titin-abhängige passive Steifigkeit und die kardiale Pumpfunktion	52
5.1.4	Pharmakologische Perspektiven im Kontext der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit.....	53
5.2	Der Interleukin-6-vermittelte Einfluss auf die Titindegradation.....	54
5.2.1	Die Protein-Qualitäts-Kontrolle nach Myokardinfarkt	54
5.2.2	Effekte von Interleukin-6 auf die Autophagiemarker	55
5.2.3	Interleukin-6 beeinflusst nicht die K63-abhängige Titinubiquitinierung	57
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	58
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	61
7	<i>Anhang</i>.....	76
7.1	Abbildungsverzeichnis	76
7.2	Tabellenverzeichnis	76

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen seit 20 Jahren die häufigste Todesursache dar. Zudem ist die absolute Zahl an Menschen, die an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung versterben, 2019 auf neun Millionen Menschen gestiegen (Weltgesundheitsorganisation, 2020). In Deutschland verzeichnet dabei der Myokardinfarkt mit 13,3 % die zweithäufigsten Sterbefälle nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit (Bundesamtstatistik, 2021).

Den meisten Myokardinfarkten liegt die koronare Herzkrankheit (KHK) und damit eine arteriosklerotisch-bedingte Gefäßverengung der Koronararterien zugrunde. Innerhalb der Gefäßwände bilden sich dabei entzündliche lipid- und cholesterinhaltige Auflagerungen, sogenannte *Plaque* (Davies et al., 1976). Bei fortschreitender Erkrankung kann es entweder durch die *Plaque* direkt oder durch deren Ruptur mit konsekutiver Aktivierung der intravasalen Gerinnung und Thrombusbildung zu einer Koronarokklusion kommen (Ross, 1993) (Abb. 1). Der Gefäßverschluss resultiert in der Myokardischämie, also der Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskels im Bereich des jeweiligen Versorgungsgebiets. Wird die Durchblutung nicht unmittelbar wiederhergestellt, kommt es zum Myokardinfarkt, der gekennzeichnet ist durch eine Zellschädigung verbunden mit anschließendem Zelltod und Pumpversagen des Herzens (Thygesen et al., 2018). Das Ausmaß des Infarkts ist abhängig von der Dauer der Minderdurchblutung, bereits ab einer Sauerstoffminderversorgung von 20 Minuten werden anhaltende Zellschäden beobachtet (Takashi und Ashraf, 2000).

Innerhalb der frühen Phase des Herzinfarkts ist die Mortalitätsrate am größten, weshalb eine möglichst schnelle Reperfusion des unterversorgten Gebiets die Überlebenschancen der Patienten deutlich erhöht (Brodie et al., 1998). Dennoch können sowohl die durch Zelltod verursachte Narbenbildung als auch die durch die Reperfusion selbst entstandenen Schäden zur Dysfunktionalität des Herzmuskels führen, die in Langzeitkomplikationen wie Arrhythmien, lokalen Rupturen und Herzinsuffizienz resultieren können (Jenca et al., 2021; Frampton et al., 2023).

Die Erhöhung der Überlebenschancen von Patienten und die Vermeidung infarktbedingter Komplikationen erfordert ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Herzen während und nach einem Myokardinfarkt, um neue Diagnostik- und Therapieansätze entwickeln zu können.

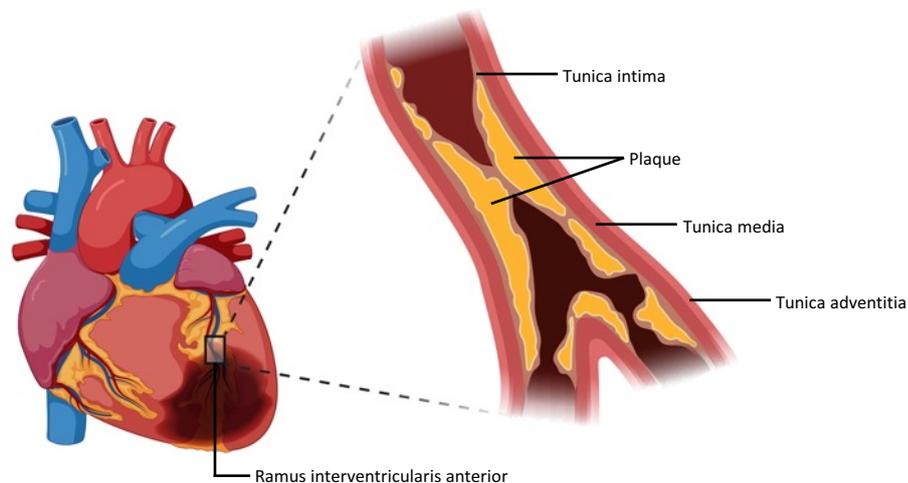


Abb. 1: Ätiologie des Myokardinfarkts

Exemplarische Darstellung des Myokardinfarkts im Stromgebiet des *Ramus interventricularis anterior* eines humanen Herzens. Atherosklerotische Umbauprozesse führen zu Einlagerungen lipidreicher *Plaque* im Bereich der *Tunica intima* des Koronargefäßes. Diese können bei Größenprogredienz zu einer höhergradigen Limitierung des Blutflusses führen. Ebenso kann eine akute Ruptur einer *Plaque* eine totale Okklusion in weiter distal gelegenen Stromgebieten bedingen. Beide Prozesse resultieren in einer Minderperfusion und somit in einer Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskelgewebes. Created with biorender.com.

1.1.2 Pathophysiologische Vorgänge im Infarktgebiet

Der ischämiebedingte Zelluntergang nach einem Myokardinfarkt führt zu intensiven Prozessen auf molekularer und zellulärer Ebene. Sie dienen als essenzielle Reparaturmechanismen, begünstigen jedoch auch das Entstehen einer Herzinsuffizienz (Frangogiannis, 2014). Die Prozesse laufen in drei verschiedenen Phasen ab (Abb. 2). Initial kommt es zur Inflammationsphase, die hauptsächlich gekennzeichnet ist durch eine zytokinvermittelte Invasion von Entzündungszellen in das betroffene Gebiet. Anschließend folgt die Reparations- und Proliferationsphase, in der eine Fibroblasten-basierte Narbenbildung erfolgt, ehe diese in der abschließenden Reifungsphase gefestigt wird (Prabhu und Frangogiannis, 2016). Im Folgenden werden die einzelnen Phasen genauer beschrieben.

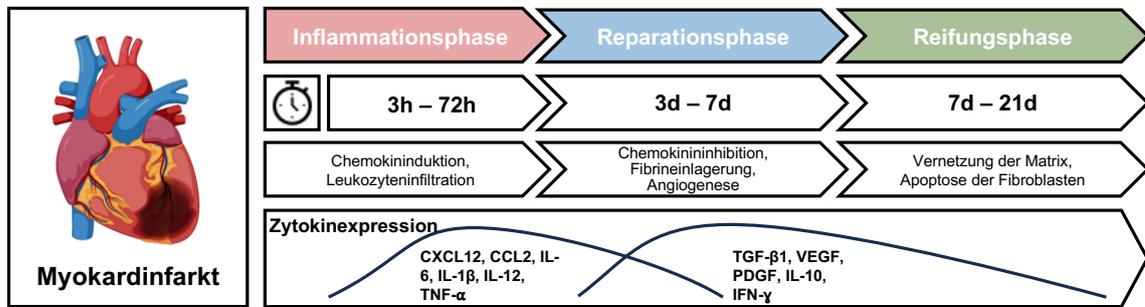


Abb. 2: Chronologie der pathophysiologischen Vorgänge des Myokardinfarkts

Darstellung der Phasen des pathophysiologischen Umbauprozesses nach einem Myokardinfarkt: Inflammations-, Reparations- und Reifungsphase. Abkürzungen: CXCL12 = CXC-Motiv-Chemokin 12, CCL2 = CC-Chemokinligand 2, IL = Interleukin, TNF- α = tumor necrosis factor- α , TGF- β 1 = transforming growth factor- β 1, VEGF = vascular endothelial growth factor, PDGF = platelet derived growth factor, IFN- γ = Interferon- γ . Die Abbildung ist an Nah et al. angelehnt (Nah und Rhee, 2009). Created with biorender.com.

Die Entzündungsphase

Innerhalb der ersten drei bis vier Tage nach dem Infarkt kommt es zu einer ausgeprägten Inflammation im infarzierten Gebiet. Der Zelltod der Kardiomyozyten führt zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren in das Blut und in das umliegende Gewebe, die dem angeborenen Immunsystem einen Zellschaden signalisieren, sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) (Ghigo et al., 2014). Zusätzlich zu aktiv sezernierten DAMPs werden auch durch die Nekrose der Kardiomyozyten intrazelluläre DAMPs wie *heat shock proteins* (HSP) oder Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt (Arslan et al., 2011). Zusammen induzieren sie unter anderem die Bildung von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten auf den Endothelzellen der das Myokard versorgenden Kapillaren und auch die Hypoxie selbst führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität. Daraufhin kommt es zur Extravasation von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, in das Infarktgebiet (Kolaczowska und Kubes, 2013; Yan et al., 2013). Zusätzlich aktivieren die DAMPs innerhalb der Immunzellen die Bildung und Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren, wie Zytokine (exemplarisch *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6)), Chemokine und Komplementfaktoren (Newton und Dixit, 2012). Diese wiederum führen zur erneuten Rekrutierung von Immunzellen, weshalb die Entzündungsreaktion einen sich selbst verstärkenden Prozess darstellt. Durch die eingewanderten Immunzellen sowie durch gewebständige Makrophagen und Mastzellen kommt es über Proteasen, Oxidasen und Phagozytose zum Abbau der geschädigten Zellen des infarzierten Gewebes, um

damit die Wundheilung zu fördern (Heidt et al., 2014; Prabhu und Frangogiannis, 2016).

Die Reparations- und Proliferationsphase

Im Rahmen des Heilungsprozesses muss zunächst die initiale Entzündungsreaktion inhibiert werden. Da die neutrophilen Granulozyten in dem sauren Milieu des entzündeten Gewebes nur eine kurze Lebensdauer haben, führt auch ihre Apoptose und Nekrose zur Freisetzung von Mediatoren, die antiinflammatorisch wirken. Diese umfassen zum Beispiel Lipoxine und Resolvine, die eine weitere Leukozytenmigration verhindern oder Phosphatidylserine, die zu einer Phagozytose durch Makrophagen führen (Mantovani et al., 2011). Den Makrophagen und Monozyten kommt in der Reparationsphase eine wichtige Rolle zu. Zu betonen ist, dass diese Zellen eine heterogene Gruppe darstellen, die unterschiedliche Phänotypen mit verschiedenen Funktionen besitzen. So wirkt ein Phänotyp in der Inflammationsphase zur Beseitigung des Zelldetritus proteolytisch, während gleichzeitig eine andere Population an Makrophagen reparierende Funktionen besitzt (Nahrendorf et al., 2007). Dieser reparierende Phänotyp sezerniert beispielsweise *vascular endothelial growth factor* (VEGF), was zur Neovaskularisation beiträgt und zukünftig die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Infarktgebiets gewährleistet (Frangogiannis, 2012). Zudem kommt es zur Ausschüttung von für die Reparatur bedeutsamen antiinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen wie Interleukin-10 (IL10) und *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) (Dobaczewski et al., 2011; Frangogiannis et al., 2000). Die TGF-β1-Sekretion führt zur Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die für die Neubildung der extrazellulären Matrix durch eine vermehrte Kollagensynthese verantwortlich sind (Dobaczewski et al., 2006). Sie produzieren dabei zunächst eine provisorische Matrix aus Fibrin und Fibronectin und matrizellulären Proteinen wie Periostin oder Osteopontin, deren Aufgabe die Regulation der Reparaturprozesse darstellt (Frangogiannis et al., 2005). Ferner werden kontraktile Proteine wie α -smooth muscle actin (α -SMA) synthetisiert, die zusammen mit Kollagen zur Bildung der Infarkt Narbe und damit der mechanischen Integrität des Herzens beitragen (Santiago et al., 2010).

Die Reifungsphase

Etwa 7-21 Tage nach dem Auftreten des Myokardinfarkts folgt die abschließende Ausreifungsphase der Infarkt Narbe. Nachdem die oben genannten Prozesse

abgeschlossen sind, wird die Sekretion der profibrotischen Zytokine und Wachstumsfaktoren gestoppt und es kommt, durch bisher noch unvollständig geklärte Signalwege, zur Apoptose der nicht mehr benötigten Reparaturzellen (Prabhu und Frangogiannis, 2016). Anschließend wird das Kollagengerüst der gebildeten extrazellulären Matrix durch Lysyloxidasen (LOX) weiter quervernetzt, sodass schließlich eine zug- und reißfeste, stabilisierende Narbe im Infarktgebiet entsteht (Talman und Ruskoaho, 2016).

1.1.3 Pathomechanismen im nicht-ischämischen Myokard

Das Myokard, welches nicht von der Ischämie betroffen ist, wird auch als *remote* Myokard bezeichnet (Kramer et al., 1993). Es existiert zudem eine Randzone, in der Zellen des nicht-ischämischen Gewebes Kontakt zum Ischämiegebiet aufweisen und dadurch ebenfalls den Stoffwechselprozessen dieses Gebiets unterliegen (French und Kramer, 2007). Auch wenn das *remote* Myokard morphologisch zunächst nicht vom restlichen Myokard zu unterscheiden ist, wird es durch das Ischämiegebiet mit beeinflusst. Dies liegt vor allem daran, dass die im ischämischen Gewebe sekretierten Stoffwechselmetabolite oder Entzündungsmediatoren ins Blut übergehen, somit auch das *remote* Myokard erreichen und dort ebenfalls Stoffwechselprozesse aktivieren (Kalogeris et al., 2016). Ferner kommt es, initial durch die Sauerstoffunterversorgung und später auch durch die Narbenbildung, zu einem Verlust der Kontraktilitätsfunktion der Kardiomyozyten im ischämischen Gewebe. Dieser Funktionsverlust bedingt eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften des Herzens, insbesondere des linken Ventrikels, die durch Anpassungsmechanismen ausgeglichen werden müssen (French und Kramer, 2007). Dieser Prozess wird kardiales *remodeling* genannt (Cohn et al., 2000). Er führt dazu, dass das Herz zunächst eine ausreichende Pumpfunktion aufrechterhalten kann. Bleibt das Myokard jedoch den Entzündungsmediatoren für längere Zeit ausgesetzt, kommt es zu maladaptiven Vorgängen mit massiver Einschränkung der Herzdynamik und konsekutiver Herzinsuffizienz (Lorell und Carabello, 2000). Die zentralen pathophysiologischen Prozesse werden im Folgenden kurz erläutert.

Im ischämischen Bereich kommt es unmittelbar nach der Infarzierung durch den Untergang der Zellen zu einer direkt eingeschränkten Pumpfunktion. Dies führt zu einem Stau des Blutes in den linken Ventrikel und damit zu einer enddiastolischen

Volumenbelastung. Durch die vermehrte Nachlast erhöht sich über den Frank-Starling-Mechanismus die Druck-Volumenarbeit des Herzens, was nur unter erhöhtem Sauerstoffverbrauch zu bewältigen ist. Gemäß dem Laplace-Gesetz erhöht sich zudem die Wandspannung und damit der Druck im Ventrikel, was zu einer zusätzlichen Dehnung der Herzwand führt (Heusch et al., 2014). Der Versuch der Aufrechterhaltung der Schlagkraft führt langfristig zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und zu vermehrter reaktiver Fibrosierung des Myokards, wodurch das Herz steifer wird (Talman und Ruskoaho, 2016). Diese Prozesse werden zudem durch sympathoadrenerge Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) gefördert (Patel und Mehta, 2012). Dabei kommt es durch Vasokonstriktion in Verbindung mit einer Salz- und Flüssigkeitsretention zu einer Erhöhung der Vor- und der Nachlast (Kaye et al., 1995). All diese Veränderungen sind zunächst funktional, bleibt die Druck-Volumenbelastung jedoch chronisch bestehen, führt sie zu einer Erhöhung der Ventrikelmasse und letztlich zur Ventrikeldilatation (Kramer et al., 1998). Es kommt zur Dekompensation der Anpassungsmechanismen mit daraus folgender systolischer und diastolischer Dysfunktion und schließlich zur Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2012).

Diese Anpassungsmechanismen treten langfristig auf, also Tage bis Wochen nach einem Infarktereignis (Tsuda et al., 2003). Auf Zellebene ereignen sich jedoch bereits in den ersten Stunden nach der Infarzierung zahlreiche Kompensationsmechanismen. Hierbei spielt auch das *remodeling* auf Sarkomerebene eine Rolle und dabei insbesondere das für dessen Elastizität verantwortliche Makroprotein Titin, um das es in der folgenden Arbeit geht. Dabei ist Titin in der Lage, unmittelbar postischämisch die passive Steifigkeit der Sarkomere und damit des Herzmuskels zu erhöhen (Kötter et al., 2016). Dadurch kann adaptiv die linksventrikuläre Auswurfleistung aufrechterhalten werden, um auch kurzfristig den Funktionsausfall der von der Ischämie betroffenen Kardiomyozyten auszugleichen.

1.2 Zytokinsekretion nach Myokardinfarkt

Innerhalb der postischämischen Vorgänge kommt es phasenabhängig zur Sekretion vielzähliger, unterschiedlicher Zytokine. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den Effekten von *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) und Interleukin-6 (IL-6), die daher im Folgenden kurz eingeführt werden sollen.

1.2.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin, das durch Regulation der Genexpression eine bedeutende Rolle in der Zelldifferenzierung sowie im Zellüberleben spielt (Rincon, 2012). Es wird in der Inflammationsphase nach Myokardinfarkt ausgeschüttet und reguliert durch Aktivierung der angeborenen Immunantwort die Entzündungsreaktion und steigert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in den Hepatozyten (Streetz et al., 2001; Jones, 2005). IL-6 bindet an einen Rezeptorkomplex, der eine α -Bindungsdomäne aufweist und an den ein Homodimer des signaltransduzierenden Glykoproteins 130 (gp130) assoziiert ist (Kishimoto et al., 1995). Der membranständige IL-6-Rezeptor wird vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere auf den neutrophilen Granulozyten und Monozyten, exprimiert. Auch Kardiomyozyten besitzen einen membranständigen IL-6-Rezeptor (Miyao et al., 1993). Zusätzlich existiert ein löslicher, zirkulierender IL-6-Rezeptor, der durch alternatives Spleißen der Rezeptor-mRNA oder durch Proteolyse des membrangebundenen Rezeptors entsteht (Lust et al., 1992; Matthews et al., 2003). Durch das ubiquitäre Vorkommen von gp130 auf nahezu allen Zelloberflächen kann der lösliche Rezeptor nach Bindung von IL-6 mit gp130 interagieren und so auch weitere Zellarten stimulieren (Rose-John et al., 2006).

Intrazellulär existieren hauptsächlich drei verschiedene IL6-vermittelte Signalkaskaden. Über die Rezeptor-assoziierten Komponenten der Januskinasen (JAK) und die *signal transducers and activators of transcription* (STAT) wird der JAK-STAT-Signalweg aktiviert. Bindet IL-6 an die α -Bindungsdomäne des Rezeptorkomplexes, so folgt eine Rekrutierung und Dimerisierung der assoziierten gp130-Moleküle. Hierdurch kommt es zu einer räumlichen Annäherung zweier Rezeptor-gekoppelter Januskinasen und deren Aktivierung durch Autophosphorylierung (Imada und Leonard, 2000). Die Januskinasen phosphorylieren anschließend weitere zytoplasmatisch gelegene Tyrosinreste, wodurch Bindungsstellen für STAT-Moleküle frei werden, die durch die Januskinasen ebenfalls phosphoryliert werden (Gerhartz et al., 1996; Shuai et al., 1993). Diese dimerisieren, translozieren in den Zellkern und beeinflussen die Transkriptionsaktivität der Zelle (Yuan et al., 1994).

Ein weiterer Signalweg beinhaltet die Phosphorylierung über *mitogen activated protein kinases* (MAPK) und Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinasen (PI3K). Nach Aktivierung des IL-6-Rezeptors bindet die Tyrosinphosphatase SHP2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) an phosphorylierte Tyrosinreste des gp130-Rezeptors (Stahl et al., 1995). Durch die Januskinase wird SHP2 anschließend phosphoryliert und es kommt zur Rekrutierung des Grb2/SOS-Komplexes (*Growth factor receptor-bound protein 2*)/(*son of seven-less*) (Schaper et al., 1998). Dieser führt zu einem Austausch von GDP zu GTP im Ras-Protein, welches anschließend die Serin-Threonin-Kinase Raf aktiviert. Diese phosphoryliert MAPK-Kinasen (MAPKK), wie beispielsweise *extracellular signal-related kinase-1/2* (ERK1/2), die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Johnson und Lapadat, 2002). SHP2 und das aktivierte Ras-Protein können aber auch direkt die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase aktivieren, wodurch es zur Bindung und Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase AKT durch Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat kommt (Rodriguez-Viciana et al., 1994; Zhang et al., 2002). AKT phosphoryliert mTOR (*mammalian target of rapamycin*), wodurch schließlich Schlüsselproteine der Genexpression reguliert werden (Dibble und Cantley, 2015). Die Beeinflussung von mTOR scheint allerdings kontextabhängig zu sein. Neben einer möglichen Aktivierung existiert unter IL-6-Einfluss auch eine AMPK-vermittelte mTOR-Inhibierung (White et al., 2013).

1.2.2 Transforming Growth Factor- β

Auch TGF- β ist ein pleiotropes und ubiquitär vorkommendes Zytokin, von dem in Säugetieren drei verschiedene Isoformen (TGF- β 1-3) existieren (Schiller et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden unter Stimulation mit der TGF- β 1-Isoform durchgeführt, das im Folgenden vereinfacht als „TGF- β “ bezeichnet wird. Je nach Zellart und Signalweg weist TGF- β stimulierende oder inhibierende Effekte auf und reguliert unter anderem die embryonale Entwicklung (Thompson et al., 1989), die Immunantwort bei Inflammation (Celada und Maki, 1992) und hat Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung einer Zelle (Piek et al., 1999).

Zirkulierendes TGF- β liegt zunächst in einer inaktiven Form vor und wird durch Proteasen wie Plasmin oder Matrixmetalloproteasen, zusätzlich aber auch durch ein

saures Milieu oder reaktive Sauerstoffspezies, aktiviert und kann so an seine Rezeptoren binden (Annes et al., 2003). Dabei existieren zwei Serin-Threonin-Rezeptortypen, die ohne Ligandenbindung als Homodimere in der Zellmembran vorliegen. Sobald TGF- β an den Typ-II-Rezeptor bindet, bilden beide Rezeptortypen einen Komplex und es kommt zur Transphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Typ-I-Rezeptors (Derynck und Zhang, 2003). Intrazellulär werden verschiedene Signalwege aktiviert, wobei ein Teil der Signalkaskaden über SMAD-Proteine (*small homologue of mothers against decapentaplegic*) transduziert wird (Shi und Massague, 2003). Daneben existieren SMAD-unabhängige Signalwege, auf die sich diese Arbeit fokussiert. Hierbei werden intrazelluläre Signale über den PI3K-AKT-Signalweg, den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg oder über c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) vermittelt (Derynck und Zhang, 2003; Zhang, 2009). Weitere Signalwege existieren über Aktivierung von GTPasen wie Rho A oder des p38 MAPK-Signalwegs (Derynck und Zhang, 2003; Yu et al., 2002).

Bei ischämiebedingten Gewebeschädigungen und deren Reparatur im Rahmen von Myokardinfarkten nimmt TGF- β eine besondere Rolle ein. Mehrere Experimente belegen die Vermutung, dass TGF- β den Übergang von der Inflammationsphase zur Reparations- und Proliferationsphase darstellt (Okada et al., 2005; Ikeuchi et al., 2004). Hierbei unterdrückt TGF- β die weitere Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch Inaktivierung reifer Makrophagen, während es gleichzeitig die Myofibroblastendifferenzierung beeinflusst und ihre Aktivität fördert (Kitamura, 1997; Desmouliere et al., 1993; Werner et al., 2000). Dadurch wird die Synthese der extrazellulären Matrixproteine gesteigert und es kommt zu interstitieller Fibrosierung mit Hypertrophie der Kardiomyozyten, was entscheidende Konsequenzen für das kardiale *remodeling* beinhaltet (Rosenkranz et al., 2002). Der Einfluss SMAD-unabhängiger Signalwege auf das kardiale *remodeling* sind bisher kaum bekannt (Dobaczewski et al., 2011) und werden in dieser Arbeit untersucht.

1.3 Das Sarkomerprotein Titin

1.3.1 Aufbau eines Sarkomers

Der Herzmuskel besteht aus quergestreifter Muskulatur. Namensgebend hierfür ist das im Polarisationsmikroskop darstellbare, charakteristische Lichtbrechungsverhalten der Sarkomere. Das Sarkomer stellt die kleinste funktionelle

Organisationseinheit der Muskelfibrillen dar, die zusammen eine Muskelfaser bilden. Ein Sarkomer ist hauptsächlich aus drei Proteinfilamenten aufgebaut, dem sogenannten „dünnen“ Aktinfilament, dem „dicken“ Myosinfilament, sowie aus dem elastischen Titinfilament. Im Sarkomer liegen die Myosin- und Aktinfilamente überlappend angeordnet vor und führen durch ein Ineinandergleiten zur Verkürzung des Sarkomers und somit zur Kontraktion der Herzmuskelzelle. Dieser Vorgang wird als Gleitfilamenttheorie bezeichnet (Huxley und Hanson, 1954). Die biochemische Grundlage dieser Theorie stellt der Querbrückenzyklus dar. Hierbei wird, unter dem Einfluss von Calcium und Adenosintriphosphat, die chemische Konfiguration der Myosinköpfchen verändert, sodass sie an Aktin binden und durch Kippung der Köpfchen ein Ineinandergleiten von Aktin und Myosin gegeneinander erfolgt (Huxley und Hanson, 1959; Lynn und Taylor, 1971).

Das Sarkomer ist schematisch aus verschiedenen Abschnitten aufgebaut (Abb. 3). Zu den Seiten wird es durch jeweils eine Z-Scheibe begrenzt, an der Aktin- und Titinfilamente fixiert sind. Die entgegengesetzt verlaufenden Myosinfilamente sind mittig des Sarkomers miteinander verbunden und bilden dort die M-Linie. Im Lichtmikroskop erscheint der Bereich, in dem sich die Myosinfilamente befinden, dunkel und wird daher als anisotropes Band (A-Band) bezeichnet. Die Bereiche um die Z-Scheibe erscheinen mikroskopisch heller und werden als isotropes Band (I-Band) beschrieben (Agarkova und Perriard, 2005). Die elastischen Titinfilamente sind mit dem NH₂-Terminus in der Z-Scheibe verankert und durchspannen ein halbes Sarkomer bis zur M-Linie, wo sie mit ihrem COOH-Terminus fixiert sind (Fürst et al., 1988). Im A-Band ist Titin mit den dicken Myosinfilamenten verbunden (Maruyama et al., 1985; Wang et al., 1979). Durch diese enge Interaktion zentriert Titin das Myosin während des Kontraktions-Relaxationszyklus an seinem Platz im Sarkomer und hat überdies durch seine elastischen Eigenschaften einen bedeutenden Einfluss auf die Sarkomerlänge und somit auf die aktive Kontraktionsfähigkeit des Muskels (Agarkova und Perriard, 2005; Horowitz et al., 1989). Als strukturgebendes Protein stellt es damit eine wichtige Voraussetzung für den Frank-Starling-Mechanismus dar (Horowitz et al., 1989; Linke und Krüger, 2010).

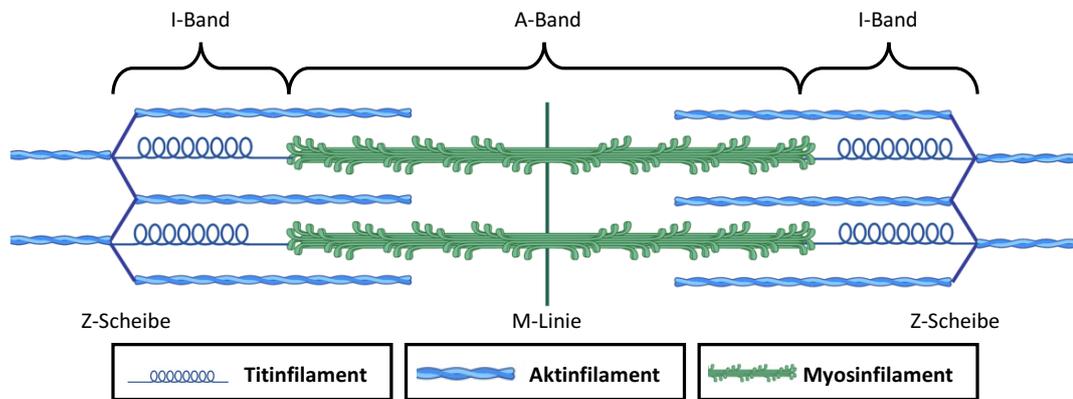


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Sarkomers

In der gezeigten Abbildung sind die Banden des Sarkomers mit den dazugehörigen Filamenten (Titin, Aktin, Myosin) dargestellt. Seitlich sind Aktin- und Titinfilamente in der Z-Scheibe verankert. Mittig laufen die Myosinfilamente zusammen und bilden die M-Linie, an der auch Titin fixiert ist. Durch ein Ineinandergleiten der Filamente erfolgt die Verkürzung des Sarkomers. *Created with biorender.com.*

1.3.2 Titin: Molekularer Aufbau und Funktion

Titin ist mit einer Größe von bis zu 4,2MDa das größte bisher bekannte monomere Protein im menschlichen Organismus (Bang et al., 2001). In Bezug auf kardiale Erkrankungen, wie der dilatativen Kardiomyopathie, wird Titin eine große Bedeutung zugeschrieben. So können nicht nur Mutationen im Titingen, sondern auch maladaptive Isoformenveränderungen und posttranslationale Modifikationen zu Störungen der ventrikulären Funktion führen (LeWinter und Granzier, 2014).

Das Titinmolekül besteht aus einer variablen Anzahl an immunglobulinähnlichen Domänen (Ig-Domänen), Fibronectin-Typ-III-Domänen und bestimmten *unique sequences* (*us*) (Improta et al., 1996). An diesen Stellen können bestimmte regulatorische Modifikationen stattfinden, sodass sich Titin in seiner Beschaffenheit verändern und damit die myokardiale Elastizität beeinflussen kann (Makarenko et al., 2004; Prado et al., 2005).

Titin wird durch ein einziges Gen (TTN) codiert, welches 363 Exons umfasst. Durch alternatives Spleißen, insbesondere in der I-Banden-Region, entstehen in Kardiomyozyten zwei dominierende Titinisoformen (Abb. 4). Die N2B-Isoform (3,0MDa) ist kürzer und von ihren physikalischen Eigenschaften her steifer als die längere und elastischere N2BA-Isoform (3,3MDa) (Bang et al., 2001; Freiburg et al., 2000). Eine besondere Bedeutung kommt der Unterscheidung im Aufbau im Bereich der I-Banden zu: dort besteht die N2B-Isoform aus einer proximalen und distalen Ig-Domäne, einer herzspezifischen N2B-Domäne mit einer *unique sequence* (N2Bus) und einer PEVK-Region. Namensgebend für die PEVK-Region ist das vermehrte

Vorkommen von Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) in diesem Bereich (Labeit und Kolmerer, 1995). Die N2BA-Isoform besitzt zusätzlich noch eine N2A-Domäne, eine weitere mediale Ig-Domäne sowie eine verlängerte PEVK-Region im Vergleich zur N2B-Isoform. Dadurch kommt die oben erwähnte Unterscheidung in der Länge und damit der Elastizität der Isoformen zustande (Bang et al., 2001; Greaser et al., 2002; Linke et al., 1996).

Titin beeinflusst durch seine elastische Variabilität im I-Banden-Bereich maßgeblich die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten. Seine Funktion im Sarkomer wird daher auch als „molekulare Feder“ bezeichnet (Linke et al., 1996; Linke et al., 1999). Bei mechanischer Dehnung des Herzmuskels während der Diastole wird der I-Banden-Teil gedehnt. Dabei werden zunächst die als „*random coil*“ vorliegenden *short linkers* der Ig-Domänen entfaltet, während bei fortschreitender Dehnung auch die PEVK- sowie die N2B-Region elastisch gestreckt werden (Linke et al., 1996; Linke et al., 1999; Trombitas et al., 1998). Diese Regionen haben eine Tendenz zur Rückfaltung und verleihen Titin damit Eigenschaften, die einer physikalischen Federfunktion ähnlich sind. Hierdurch entstehen die elastischen Rückstellkräfte, die direkt die myokardiale passive Steifigkeit beeinflussen. Bis zu einer Dehnung des Sarkomers auf physiologische Längen von circa 2,2µm wird die passive Steifigkeit der Myozyten vornehmlich durch Titin vermittelt, ab einer Sarkomerextension über 2,4µm hinaus hängt die passive Steifigkeit hauptsächlich von extrazellulären Strukturen wie Kollagen ab (Granzier und Irving, 1995; LeWinter et al., 2007; Linke et al., 1994).

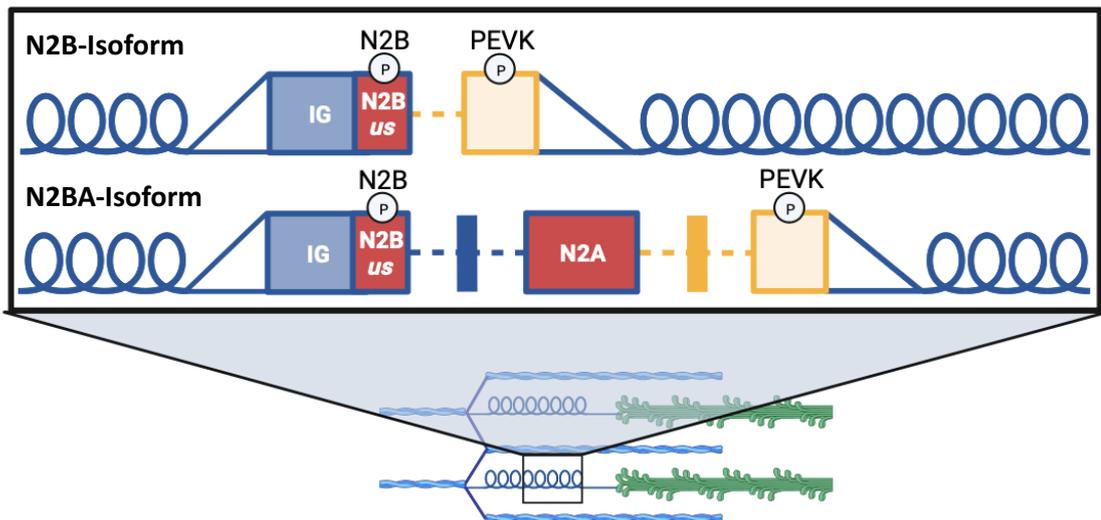


Abb. 4: Schematischer Aufbau der kardialen Titinisoformen N2B und N2BA im Sarkomer

In der gezeigten Abbildung sind die Titinisoformen N2B und N2BA im Bereich der I-Bande des Sarkomers dargestellt. Die N2B-Isoform besteht aus Ig-Domänen, einer N2B-Domäne mit einer *unique sequence* (N2Bus) und einer PEVK-Region. Die N2BA-Isoform ist länger und besitzt eine zusätzliche Ig-Domäne, eine verlängerte PEVK-Region und eine N2A-Region. Die unterschiedlichen Längen der Isoformen bestimmen die physikalischen Eigenschaften. Abkürzungen: PEVK = vermehrtes Vorkommen der Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K); IG = Immunglobulindomäne; us = *unique sequence*. Die Abbildung ist an Linke et al. angelehnt (Linke und Hamdani, 2014). Created with biorender.com.

1.3.3 Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit

Die Titin-vermittelte passive Steifigkeit des Muskels kann über verschiedene Mechanismen dynamisch reguliert werden.

1.3.3.1 Das Verhältnis der kardialen Titinisoformen

Aufgrund der unterschiedlichen Elastizität der koexprimierten Isoformen hat deren relativer Anteil an der gesamten Titinkomposition einen starken Einfluss auf die myokardiale passive Steifigkeit. Während der perinatalen Entwicklung des Herzens ändert sich die Titin-Isoformenkomposition von einer elastischeren hin zu einer steiferen Titinzusammensetzung. So lässt sich pränatal eine lange und sehr dehnbare fetale N2BA Isoform nachweisen (3,7MDa), die im Verlauf der ersten Lebensstage durch eine kürzere und damit steifere N2BA Variante (circa 3,2MDa), sowie eine N2B Isoform (3MDa) ersetzt wird (Opitz et al., 2004; Lahmers et al., 2004; Warren et al., 2004). Zwischen verschiedenen Spezies existiert ebenfalls ein Unterschied im Isoformenverhältnis. Adulte Ratten haben einen N2BA-Anteil von 5-20%, während gesunde, ausgewachsene Menschen einen deutlich größeren N2BA-Anteil von 40% aufweisen (Cazorla et al., 2000; Neagoe et al., 2003; Kötter et al., 2013). Durch den erhöhten Anteil der elastischeren N2BA-Isoform besitzen Menschen somit im

Vergleich zu Nagetieren eine geringere passive Steifigkeit der Kardiomyozyten (Linke und Hamdani, 2014). Auch innerhalb eines Herzens liegen verschiedene Isoformenverhältnisse vor. Der rechte Ventrikel exprimiert einen höheren N2BA-Anteil als der linke und insgesamt gesehen nimmt der N2BA-Anteil von der Herzbasis nach apikal ab (Neagoe et al., 2003).

Im Rahmen von adaptiven Vorgängen bei Herzerkrankungen, wie der ischämischen Kardiomyopathie (Neagoe et al., 2002) und der dilatativen Kardiomyopathie (Makarenko et al., 2004), zeigten sich im Endstadium mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) erhöhte N2BA-Anteile, was sich in einer reduzierten passiven Steifigkeit widerspiegelte (Linke und Hamdani, 2014). Diese Beobachtung ergab sich auch bei der chronisch-ischämischen Kardiomyopathie. Es wird vermutet, dass dies eine Anpassung an die fibrotische Versteifung des hypertrophierten und geschädigten Herzens darstellt. (Neagoe et al., 2002). Bei Erkrankungen mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) zeigten sich im Gegensatz dazu erniedrigte N2BA:N2B-Verhältnisse (van Heerebeek et al., 2006), resultierend in einer erhöhten myokardialen passiven Steifigkeit (Linke und Hamdani, 2014). Auch bei der hypertensiven dilatativen Kardiomyopathie mit kompensierter Hypertrophie ließ sich dieser Umstand nachweisen (Hamdani et al., 2013; Shapiro et al., 2007). Bei fortschreitender Erkrankung und damit weiterer Dekompensation der Herzinsuffizienz nahm der N2BA-Anteil jedoch zu (Borbely et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die jeweilige Ausprägung des Titin-Isoformenverhältnisses die Art des kardialen *remodeling* beeinflusst und vom Stadium der Kompensation sowie der Art der Erkrankung an sich abhängt (Loescher et al., 2022; Linke und Hamdani, 2014).

Bestandteil aktueller Forschung ist die Aufschlüsselung der intrazellulären Signalkaskaden sowie der Moleküle, die den Isoformen-*Switch* beeinflussen. In fetalen Rattenkardiomyocyten (*RCM*) führen Triiodthyronin (T_3) und Insulin zu einem beschleunigten Isoformen-*Switch* von der fetalen N2BA- hin zur steiferen N2B-Isoform (Krüger et al., 2008). Dabei phosphorylieren die Hormone die *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Kinase über Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-AKT-Signalwegs und steigern damit die Proteinsynthese (Krüger et al., 2010; Krüger et al., 2008). Die jeweilige Expression der Isoformen selbst ist unter anderem abhängig vom Spleißfaktor *RNA-binding motif protein-20* (RBM20) (Guo et al., 2012; Li et al., 2013). Ratten, die einer *Missense*-Mutation im RBM20-Gen

unterlagen, exprimierten keine N2B-Isform mehr, dafür jedoch eine außergewöhnlich große N2BA-Variante (Guo et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass RBM20 die Voraussetzung zur Ausbildung der N2B-Isoformen darstellt (Linke und Bucker, 2012; Methawasin et al., 2016). Die Expression von RBM20 wird unter anderem durch Insulin und T₃ gesteigert, weshalb zu vermuten ist, dass die Aktivierung ebenfalls über die PI3K-AKT/mTOR-Signalkaskade vermittelt wird (Zhu et al., 2015; Zhu et al., 2017). Ferner wird vermutet, dass AKT auch weitere Spleißregulatoren und Zellkernpromotoren aktivieren kann, die das Spleißen der Titin-mRNA kontrollieren (Krüger et al., 2010; Blaustein et al., 2005).

1.3.3.2 Posttranslationale Modifikation von Titin

Eine dynamische Regulation der Titin-vermittelten Sarkomersteifigkeit erfolgt über posttranslationale Modifikation.

Am besten untersucht ist bislang die Phosphorylierung von Titin an Serin- und Threoninresten insbesondere im I-Banden-Bereich, was kurzfristig dynamische Veränderungen der myokardialen passiven Steifigkeit bedingt (Koser et al., 2019). Durch Massenspektrometrie sind derzeit über 300 Phosphorylierungsstellen identifiziert worden (Hornbeck et al., 2015), die durch verschiedene Proteinkinasen angesprochen werden. Besonders gut untersucht sind die Phosphorylierungsstellen in der PEVK- und N2B-Region. Dabei haben Phosphorylierungen in diesem Bereich gegensätzliche Auswirkungen: in Kraftmessungen an isolierten Kardiomyozyten führte eine Phosphorylierung der N2Bus zu einer verminderten passiven Steifigkeit (Krüger et al., 2009), wohingegen eine Phosphorylierung in der PEVK-Region zu einer erhöhten passiven Steifigkeit führt (Anderson et al., 2010; Hidalgo et al., 2009). Es wird vermutet, dass dieser Umstand durch eine Veränderung der Nettoladung der jeweiligen Region verursacht wird. Dabei führt eine Addition von negativ geladenen Phosphatgruppen zur bereits negativ geladenen N2Bus zu einer negativen Nettoladung des Bereichs, wodurch es zu elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen den Aminosäuren kommt und das Titin dehnbarer wird. Umgekehrt führt bei der positiv geladenen PEVK-Region ein Hinzufügen von negativ geladenen Phosphatgruppen zu elektrostatischen Anziehungskräften zwischen den Aminosäuren, was in einer verminderten Dehnbarkeit der Region resultiert (Koser et al., 2019).

Die Phosphorylierung an Serinresten wird durch verschiedene Proteinkinasen vermittelt (Abb. 5). In der N2Bus wird S4010 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und durch die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) (Kötter et al., 2013; Krüger et al., 2009; Krüger und Linke, 2006), S4010 durch die PKA (Kötter et al., 2013; Krüger und Linke, 2006) und *extracellular signal-related kinase 2* (ERK2) (Raskin et al., 2012; Perkin et al., 2015), und S4099 durch PKG phosphoryliert (Kötter et al., 2013; Krüger et al., 2009). In der PEVK-Region werden die Serinreste S12022 und S11878 durch die Proteinkinase C alpha (PKC α) phosphoryliert (Hidalgo et al., 2009). Zusätzlich kann die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) Phosphorylierungen an S12022 bedingen (Hidalgo et al., 2013).

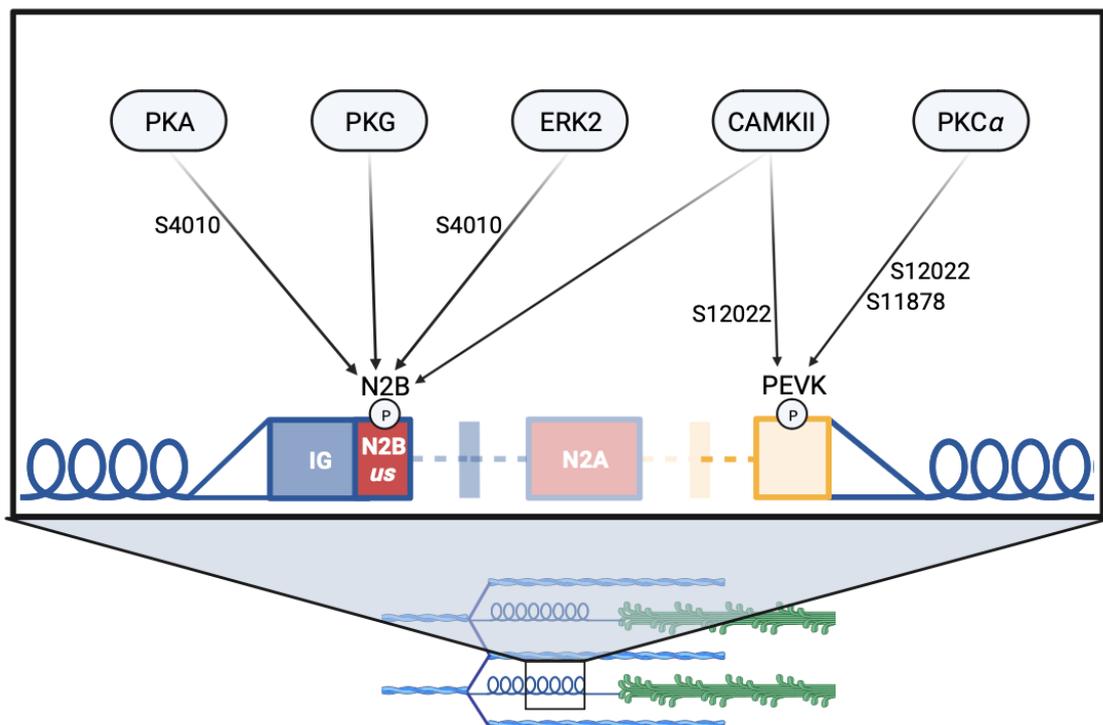


Abb. 5: Phosphorylierungsmöglichkeiten von Titin im Bereich der N2Bus- und PEVK-Region

Darstellung verschiedener Kinasen, die Titin phosphorylieren können. In der N2Bus-Region kann eine Phosphorylierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), eine cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), die *extracellular signal-related kinase 2* (ERK2) oder eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) erfolgen. In der PEVK-Region kann eine Phosphorylierung durch eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) oder die Proteinkinase C α (PKC α) erfolgen. S4010, S12022, S11878 stellen die jeweiligen Serinreste der Phosphorylierungsstelle dar. Created with biorender.com.

1.3.4 Titin-vermittelte passive Steifigkeit nach Mykoardinfarkt

Im Rahmen des Myokardinfarkts laufen zahlreiche kurz- und langfristige Anpassungsmechanismen im Herzen zur Erhaltung der Ejektionsfraktion ab. Dabei spielt die Titin-vermittelte passive Steifigkeit eine entscheidende Rolle, da über

Beeinflussung der Titinphosphorylierung die Kontraktilität unmittelbar im Rahmen des Akutschadens erhöht werden kann (Kötter et al., 2016), während Veränderungen im Isoformenverhältnis auch langfristige Adaptationen widerspiegeln könnten. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass eine Erhöhung der passiven Steifigkeit der Sarkomere durch erhöhte Phosphorylierung in der PEVK-Region und verminderte Phosphorylierung in der N2Bus über das Zytokin Interleukin-6 vermittelt werden kann, welches in der akuten Phase nach Myokardinfarkt vermehrt exprimiert ist (Kötter et al., 2016). Aufgrund der postischämisch vermehrten Sekretion weiterer Zytokine lässt sich vermuten, dass auch diese die durch Titin vermittelte passive Steifigkeit beeinflussen könnten. Welche Zytokine dabei eine Rolle spielen, sowie über welche Signalwege und auf welche Art sie Titin beeinflussen, ist Bestandteil aktueller Forschung. Es existieren bereits *in vitro* Untersuchungen an isolierten Rattenkardiomyozyten, die zeigten, dass TGF- β 1 das ventrikuläre *remodeling* durch Zellhypertrophie über eine Induktion der Synthese kontraktile Proteine beeinflusst (Parker et al., 1990). Zudem führte eine Überexpression von TGF- β 1 in transgenen Mäusen zu vermehrter kardialer Hypertrophie durch hypertrophes Zellwachstum und Zunahme der Fibrose (Rosenkranz et al., 2002). Ob und besonders auch über welche Signalwege TGF- β 1 einen Einfluss auf die Titin-vermittelte passive Steifigkeit hat, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Abbildung 6 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten TGF- β 1-vermittelten Signalwege, durch die ein Einfluss auf die Titin-vermittelte passive Steifigkeit über Modifikation der Phosphorylierung und der Titinisoformen möglich sein könnte.

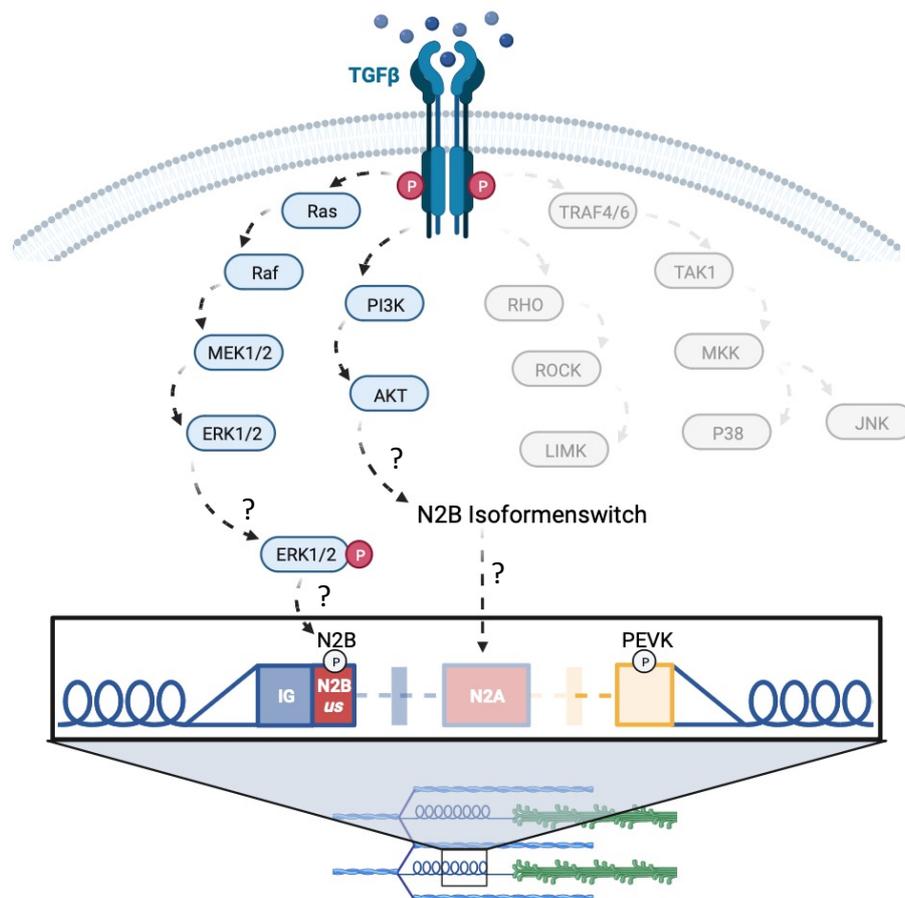


Abb. 6: Intrazelluläre TGF- β -Signalkaskaden und der mögliche Einfluss auf Titin

In der gezeigten Abbildung sind unterschiedliche Möglichkeiten der intrazellulären SMAD-unabhängigen Signaltransduktion von *transforming growth factor- β* (TGF- β) dargestellt. TGF- β bindet extrazellulär an einen Typ-II-Rezeptor, der anschließend mit einem weiteren Rezeptor dimerisiert. Es können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert werden: Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg könnte über eine finale Phosphorylierung im Bereich der N2Bus-Region einen Einfluss auf die Titinfunktion haben. Ebenso könnte der PI3K/AKT-Signalweg den N2B-Isoformen-Switch beeinflussen. Die Signalkaskaden der C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK), GTPasen wie Rho, oder der p38 MAPK wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sind daher ausgegraut. Abkürzungen: Ras = Ratte-Sarkom-Protein, Raf = Ratte-Fibrosarkom-Protein, MEK1/2 = MAPK/ERK Kinase 1/2, MAPK = *mitogen activated protein kinases*, ERK = *extracellular signal-related kinase*, PI3K = Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase, AKT = Proteinkinase B, PEVK = vermehrtes Vorkommen der Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K). Die Abbildung ist an Hata et al. angelehnt (Hata und Chen, 2016). Created with biorender.com.

1.4 Die Protein-Qualitäts-Kontrolle nach Myokardinfarkt

1.4.1 Protein-Qualitäts-Kontrolle durch Autophagie

Die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase ist ein komplexes und dynamisches Geschehen. Die Selbstregulation der Proteinsynthese und -degradation zur Integrität der Zellstruktur und -funktion unterliegt dabei unterschiedlichen Mechanismen. Zur Protein-Qualitäts-Kontrolle (PQC) existiert, neben dem nicht-lysosomalen Abbau von fehlgefalteten oder dysfunktionalen Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (Livneh et al., 2016), der Abbauweg über die Autophagie. Hierbei führen lysosomale

Prozesse zur Eliminierung von geschädigten oder gealterten Zellorganellen (Hale et al., 2013; Shaid et al., 2013). Auch Titin als Makroprotein unterliegt der Autophagie (Lange et al., 2005), die genaue Regulation des Titinabbaus ist jedoch noch ungeklärt (Kötter und Krüger, 2022).

Es existieren 3 Arten der Autophagie: die Mikro- und Makroautophagie sowie die Chaperon-vermittelte Autophagie. Da Titin mit seiner Größe von bis zu 4,2MDa zu den Makroproteinen zählt, wird dieses über die Makroautophagie, im Folgenden „Autophagie“ genannt, abgebaut (Bonaldo und Sandri, 2013).

Zunächst werden die abzubauenen Titinmoleküle durch Polyubiquitinierung markiert. Dabei aktivieren Enzyme der Familie der E1-Ligasen ATP-abhängig ein Ubiquitinmolekül, damit dieses auf E2-Enzyme übertragen werden kann. Anschließend erfolgt die eigentliche Übertragung des Ubiquitins auf bestimmte Lysinreste der abzubauenen Titinmoleküle durch E3-Ligasen (Wang et al., 2011). Die Ubiquitinmoleküle sind untereinander über verschiedene Lysinreste miteinander verbunden (Swatek und Komander, 2016). Findet eine Verknüpfung über den Lysinrest K48 statt, erfolgt ein Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System statt (Thrower et al., 2000). Kommt es zu einer Polyubiquitinierung über K63, so wird Titin über den Prozess der Autophagie degradiert (Barriere et al., 2007; Müller et al., 2021). Dabei wird, wie in Abbildung 7 dargestellt, ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum zunächst eine sichelförmige Phagophore gebildet, die aus einer Lipiddoppelmembran besteht. Durch Elongation der Membran zu beiden Seiten hin wird das abzubauenen Molekül umschlossen, wodurch eine vollständige Vakuole, das Autophagosom, entsteht (Shaid et al., 2013). Anschließend erfolgt die Fusion mit einem Lysosom zum Autolysosom, wodurch eine Degradation der Zielmoleküle mittels Proteasen ermöglicht wird (Levine und Kroemer, 2008; Gatica et al., 2015; Shibutani und Yoshimori, 2014).

In Säugetieren sind über 35 *autophagy-related genes* (ATG) bekannt (Ravikumar et al., 2010; Sciarretta et al., 2018), die für *autophagy-related proteins* (Atg) kodieren. Sie führen zur Ausbildung des Autophagosoms und steuern den komplexen Ablauf der Autophagie (Feng et al., 2014; Suzuki und Ohsumi, 2007). Hypoxie und Inflammation, wie sie beispielweise nach einem Myokardinfarkt auftreten, induzieren die Autophagie (Sciarretta et al., 2018; Dupont und Codogno, 2016). Auch Phasen von unzureichendem Nährstoffangebot fördern den Abbau von Proteinen in der Zelle, um

diese zu recyceln und für essentielle Zellvorgänge zur Verfügung zu stellen (Shibutani und Yoshimori, 2014). Diese Steuerung des Autophagieprozesses erfolgt über die Proteinkinasen *activated protein kinase* (AMPK) und mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Sie können die zentrale Autophagie-induzierende *uncoordinated-51 like kinase* (ULK1) an unterschiedlichen Stellen phosphorylieren, was bei einer Phosphorylierung durch AMPK zu einer Autophagieinduktion und bei mTOR zu einer Autophagieinhibition führt (Kim et al., 2011b). ULK1 ist ein Bestandteil eines Proteinkomplexes, bestehend aus den Proteinen Atg13, Atg101 und FIP200 (*focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*) (Mizushima, 2010). Bei vorhandener Nährstoffdeprivation führt AMPK zu einer ULK1-Phosphorylierung an den Serinresten S317, S777 und S555 und aktiviert den Abbau von Zellproteinen (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011b). Im Gegenzug führt ein hohes Nährstoffangebot zu einer Autophagieinhibition, indem mTOR ULK1 an S757 phosphoryliert, was zu einer Störung der Interaktion von AMPK mit dem ULK1-Komplex führt (Egan et al., 2011; Chan, 2012). mTOR kann das aktuelle Nährstoffangebot der Zelle registrieren, seine Aktivität korreliert mit steigender Nährstoffverfügbarkeit und fungiert somit als Regulator des Zellwachstums (Hale et al., 2013; Egan et al., 2011).

Nach Aktivierung der Autophagie phosphoryliert ULK1 einen weiteren Proteinkomplex, den III-PI3K-Komplex. Dieser besteht aus Beclin-1 sowie der Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase (PI3K). Letztere phosphoryliert Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), welches einen Membranbestandteil des Autophagosoms darstellt (Shibutani und Yoshimori, 2014; Feng et al., 2014). Der aktivierte PI3K-Komplex ist zudem auch dafür verantwortlich, weitere Membranlipide und -proteine zu rekrutieren (Shibutani und Yoshimori, 2014; Hale et al., 2013). Über diese Proteine, wie dem *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) und dem Ubiquitin-bindenden Protein *p62/Sequestosom-1* (p62/SQSTM1), werden die abzubauenen Substrate in der Phagophoren-beziehungsweise der Autophagosomenmembran fixiert (Shaid et al., 2013). Zur Bildung von LC3-II, der aktiven Form des LC3, wird zunächst proLC3 durch Atg4b proteolytisch gespalten. Hierbei entsteht das im Zytosol vorkommende LC3-I (Hale et al., 2013). Durch Konjugation mit Phosphatidylethanolamin mittels Atg7 und Atg3 entsteht schließlich die lipidierte Form LC3-II, welche in die Doppelmembran der Phagophore eingebaut wird und auch die letztliche Größe des Autophagosoms

bestimmt (Tanida et al., 2008; Runwal et al., 2019; Xie et al., 2008). Während der Phagozytose werden die abzubauenen Substrate über ein Bindeglied an LC3-II geknüpft. Dieses Bindeglied stellt p62/SQSTM1 dar, das als Autophagie-Rezeptor K63-ubiquitinierte Substrate registriert und an seiner Ubiquitin-Domäne binden kann. p62/SQSTM1 besitzt zudem eine weitere Bindungsstelle für LC3-II, es verankert somit als Adapterprotein die abzubauenen Substrate mit der Lipiddoppelmembran (Chen et al., 2014). Zudem besteht über p62/SQSTM1 ein Zusammenhang mit dem UPS (Korolchuk et al., 2009a). Während der Verschmelzung der Membranen des Lysosoms mit dem Autophagosom werden das an der inneren Membran gebundene LC3-II und p62/SQSTM1 und das Substrat lysosomal abgebaut (Bjorkoy et al., 2009). Das LC3-II, welches sich in der äußeren Membran befindet, löst sich während der Fusion und kann in einem Recycling-Prozess erneut zur Verfügung gestellt werden (Hale et al., 2013). Somit spiegeln sich aktivierte Autophagieprozesse in erhöhten LC3-II-Leveln wider, die sich in biochemischen Analysen quantifizieren lassen (Tanida et al., 2008). Als biologischer Marker für eine Autophagieinhibition eignet sich p62/SQSTM1, da es bei einem Ausbleiben der Autophagosomenbildung zu einer p62/SQSTM1-Akkumulation in der Zelle kommt, die detektierbar ist (Bjorkoy et al., 2009; Hale et al., 2013).

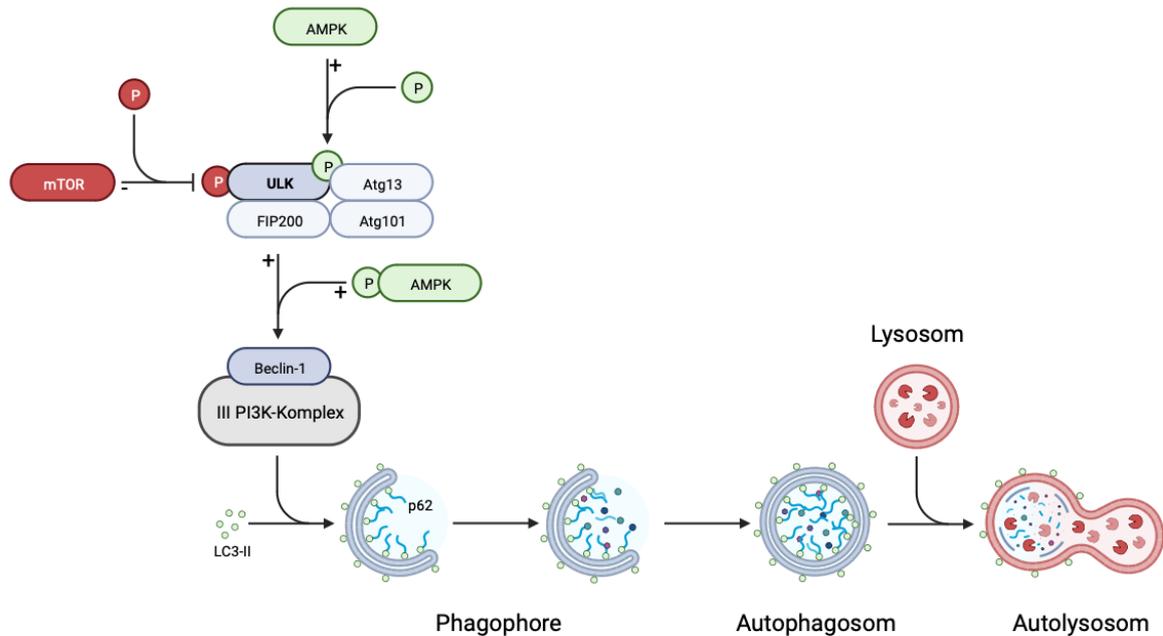


Abb. 7: Einfluss von mTOR und AMPK auf den Autophagieprozess

In der gezeigten Abbildung ist die Bildung eines Autolysosoms sowie eine vorgeschaltete Signalkaskade dargestellt. Die zentrale Autophagie-induzierende Kinase *uncoordinated-51 like kinase* (ULK1) kann durch *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und *activated protein kinase* (AMPK) an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert und somit reguliert werden: mTOR wirkt durch seine Phosphorylierung inhibitorisch, AMPK stimulierend. ULK1 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der wiederum den Proteinkomplex III-PI3K (Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase) phosphorylieren und somit aktivieren kann. Der aktivierte PI3K-Komplex rekrutiert die Membranlipide *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* LC3-II und p62/Sequestosom-1 (p62/SQSTM1), die abzubauenen Substrate in der Phagophorenmembran fixieren. Über die Zwischenschritte der Autophagosom- und Autolysosombildung werden schlussendlich LC3-II, p62/SQSTM1 und das gebundene Substrat lysosomal abgebaut. Abkürzungen: Atg = *autophagy-related proteins*, FIP200 = *focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*. Die Abbildung ist an Mizushima et al. und Hansen et al. angelehnt (Mizushima, 2007; Hansen et al., 2018). Created with biorender.com.

1.4.2 Der Zusammenhang von Titin mit der Protein-Qualitäts-Kontrolle

Die Entwicklung und Erhaltung der sarkomerischen Funktion der Muskelzelle durch Neusynthese von Sarkomerproteinen und Degradation gealterter oder fehlgefalteter Moleküle stellt eine besondere Herausforderung dar. Besondere Beachtung findet dabei der Umsatz von Titin, da es nicht nur eine enorme Größe aufweist, sondern dessen Synthese- und Degradationsprozesse auch während der anhaltenden Kontraktionsphasen des Myokards ablaufen müssen (Kötter und Krüger, 2022). Bei dessen Einbau ins Sarkomer wird angenommen, dass die Zelle auf ein im Zytosol befindliches Reservoir an präsynthetisierten Titinmolekülen zurückgreift (Rudolph et al., 2019). Innerhalb von 14 Stunden ist somit ein Austausch von Titin möglich (da Silva Lopes et al., 2011), der genaue Vorgang des Einbaus in das Sarkomer unterliegt weiterer Forschung.

Innerhalb der Titindegradation existieren verschiedene Wege, um Titin dem UPS oder der Autophagie zuzuführen. Titin wird dabei zum Teil über bestimmte Proteasen und Ligasen vorverdaut, wodurch Bindungsstellen für Enzyme des Autophagie- oder Proteasomenkomplexes verfügbar werden (Loescher et al., 2022). Diese Proteasen sind Calpaine und Matrixmetalloproteinasen (MMP2), die beispielsweise im I-Band-Bereich proximale Ig-Domäne fragmentieren (Coulis et al., 2008; Ali et al., 2010) oder die Ubiquitinligase Mdm2 (*mouse-double-minute 2 homolog*), die exemplarisch im Z-Scheiben-Bereich mit dem *titin capping protein* Telethonin interagieren kann (Tian et al., 2006). In diesem Bereich sind Proteasomen lokalisiert (Rudolph et al., 2019), sodass bei der Degradation der I-Band Domänen eher von einem proteasomalen Abbau ausgegangen wird (Müller et al., 2021). Die E3-Ligasen *muscle RING-finger protein-1/2* (MuRF-1/2) binden Titin im A-Band-Bereich (Witt et al., 2005) und insbesondere MuRF-1 assoziiert auch mit der Titinkinase (Bogomolovas et al., 2021; Bogomolovas et al., 2014; Müller et al., 2021). Eine Ubiquitinierung in diesen Bereichen führt zu einer vermehrten Rekrutierung der Autophagie-assoziierten Proteine des p62/SQSTM1-Komplexes (Bogomolovas et al., 2021; Lange et al., 2005), weshalb ein Abbau des A-Band-Titins eher über Autophagosomen angenommen wird (Müller et al., 2021). Folglich wird davon ausgegangen, dass die Degradation über die jeweiligen Systeme domänenabhängig erscheint. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass intersystemische Querverbindungen existieren, da beispielsweise p62/SQSTM1 Titin auch dem proteasomalen Abbau zuführen kann (Seibenhener et al., 2007).

1.4.3 Titindegradation beim Myokardinfarkt und der mögliche Einfluss von Interleukin-6

Im Rahmen zahlreicher Erkrankungen des Herzens treten Veränderungen der Proteindegradation auf. Bezogen auf die Autophagosomen- und Proteasomenaktivität wurden Dysregulationen sowohl beim Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz als auch beim Diabetes mellitus beobachtet (Gustafsson und Gottlieb, 2008; Portbury et al., 2011; Schlossarek und Carrier, 2011; Xu et al., 2013). Im Rahmen von Autophagieprozessen nach Myokardinfarkten wird vermutet, dass eine erhöhte Autophagieaktivität die Kardiomyozyten vor einer ischämiebedingten Schädigung bewahrt, indem sie die zelluläre Homöostase aufrechterhält (Sciarretta et al., 2012; Wang et al., 2018; Dong et al., 2018). Dabei ist Titin postischämisch eines der ersten Proteine, die der Degradation unterliegen (Ali et al., 2010). Im Langendorff

I/R-Modell (Ischämie-Reperusionsmodell) der Maus konnte gezeigt werden, dass drei Tage nach der Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* eine erhöhte Ubiquitinierung und ein vermehrter Titinabbau über das UPS stattfand (Kötter et al., 2016). Zeitgleich konnte beobachtet werden, dass es nach I/R zu einer erhöhten Titinvermittelten Versteifung des nicht-ischämischen Myokards kommt, wobei vermutet wird, dass dadurch die Mehrarbeit der überlebenden Kardiomyozyten gewährleistet und der Ventrikel sowie die Infarkt Narbe stabilisiert wird (Funk et al., 2022; Kötter et al., 2016). Es wird angenommen, dass die hohe mechanische Belastung die wahrscheinlichste Ursache für eine erhöhte Ab- und Umbaurate von Muskelproteinen wie Titin in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt darstellt (Kötter et al., 2016). Innerhalb dieser ersten drei postischämischen Tage führt die Inflammationsphase zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wozu auch Interleukin-6 gehört (Gwechenberger et al., 1999). Auch für Interleukin-6 ist ein Einfluss auf die Proteindegradation durch Aktivierung der Autophagie in Tumorzellen bekannt (Katheder et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Interleukin-6 auch einen Einfluss auf die Titindegradation in Kardiomyozyten über das autophagosomale System hat (Abb. 8).

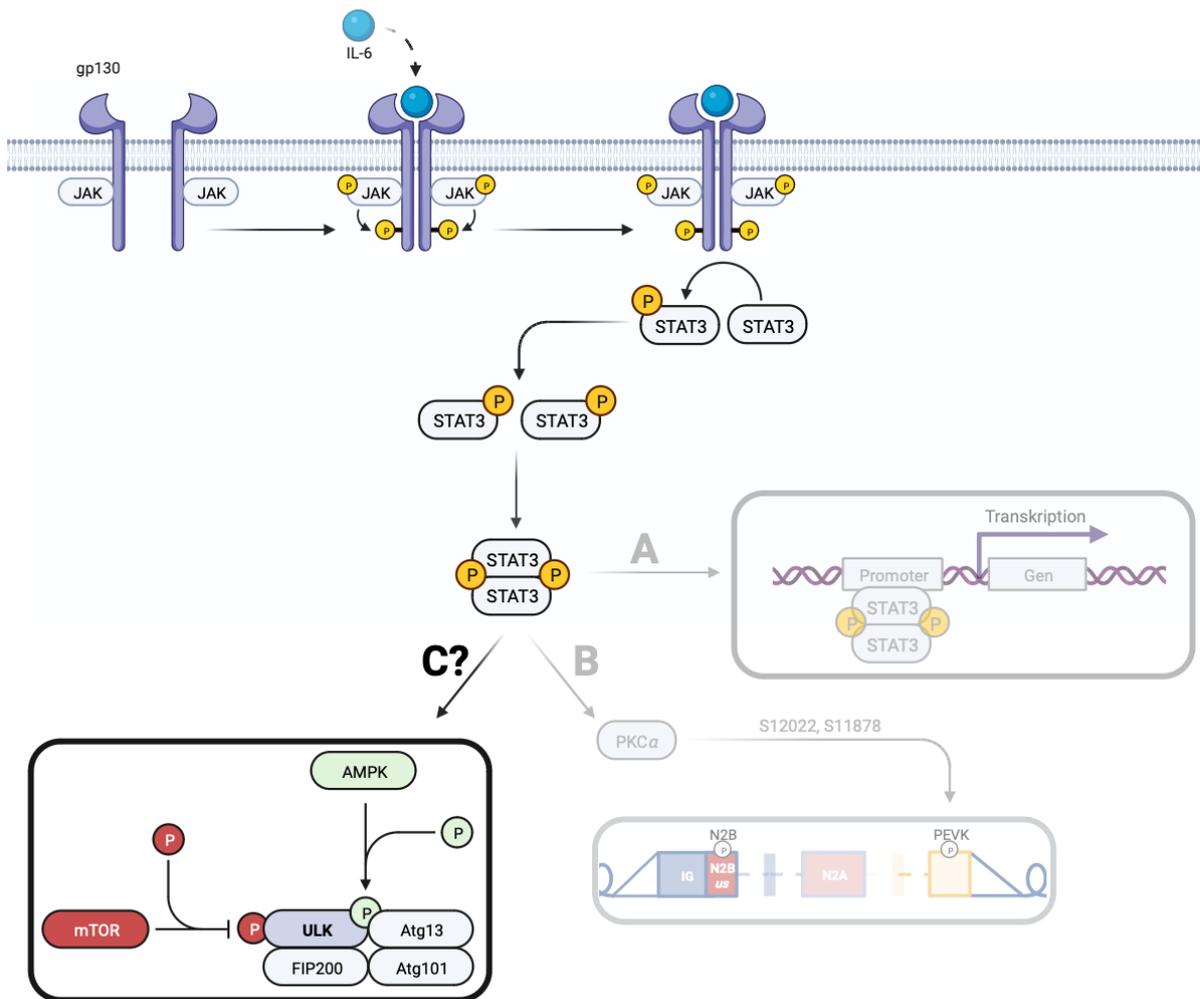


Abb. 8: Intrazelluläre IL-6-Signalkaskade und der mögliche Einfluss auf die autophagolysosmale Titindegredation

In der gezeigten Abbildung ist eine intrazelluläre Signaltransduktion von Interleukin-6 (IL-6) sowie die möglichen Zusammenhänge mit der Titinmodifikation dargestellt. Bindet IL-6 an die α -Bindungsdomäne des Rezeptors, folgt eine Dimerisierung zweier Glykoproteine 130 (gp130). Durch anschließende Autophosphorylierung Rezeptor-gekoppelter Januskinasen (JAK) können Tyrosinreste des Rezeptors und nun gebundene *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3)-Moleküle phosphoryliert werden. Nach Dimerisierung zweier STAT3-Moleküle kann eine Translokation in den Zellkern erfolgen (A). Im Zusammenhang mit Titinmodifikationen ist eine erhöhte Titinphosphorylierung in der PEVK-Region über die Proteinkinase Ca (PKC α) bekannt (B) (Kötter et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wird ein möglicher IL-6-Einfluss auf den Titinabbau über die Autophagie untersucht (C). Abkürzungen: AMPK = *activated protein kinase*, mTOR = *mammalian target of rapamycin*, ULK1 = *uncoordinated-51 like kinase*, Atg = *autophagy-related proteins*, FIP200 = *focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*, PEVK = vermehrtes Vorkommen der Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K). Die Abbildung ist an Abbas et al angelehnt (Abbas et al., 2015). Created with biorender.com.

2 Zielsetzung

Ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Adaptationsvorgänge im Rahmen des kardialen *remodeling* nach Myokardinfarkt ist von großer Bedeutung, um zukünftig gezielte pharmakologische Interventionen einzuleiten und das Outcome der Infarktpatienten zu verbessern. Ein mögliches Zielmolekül solcher pharmakologischen Interventionen ist das Sarkomerprotein Titin, da es eine gezielte und dynamische Beeinflussung der kardialen Steifigkeit und damit eine Regulation der Pumpfunktion des Herzens ermöglichen könnte. Die Erforschung der Einflussfaktoren auf die Titinmodifikation sind daher für das Verständnis der pathophysiologischen Prozesse am postischämischen Herzen essenziell und stellen die Grundlage für mögliche Therapieentwicklungen dar.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der postischämisch erhöhten Zytokine TGF- β 1 und IL-6 auf die Titinphosphorylierung untersucht werden. Zudem sollen mögliche zugrundeliegende Signalwege analysiert und die Auswirkung der Zytokineffekte auf die Titin-abhängige passive Myokardsteifigkeit abgeschätzt werden. Im Zellkulturmodell embryonaler Rattenkardiomyozyten soll unter Kurzstimulation mit TGF- β 1 die Phosphorylierung der elastischen Titinregionen untersucht werden. Zur Beurteilung des Titin-Isoformen-*Switches* soll eine längerfristige Stimulation mit TGF- β 1 erfolgen. Ferner sollen in einem weiteren Teilprojekt embryonale Rattenkardiomyozyten mit IL-6 stimuliert und Einflüsse auf die Titindegradation über das autophagolysosomale System untersucht werden.

Die Analyse TGF- β 1- und IL-6-vermittelter Effekte erfolgt mittels SDS-PAGE und *Western-Blot*-Analysen und umfasst die Auswertung der Titinphosphorylierung und der daran beteiligten Kinasen, sowie die Beurteilung der Isoformenverhältnisse zu verschiedenen Zeitpunkten. Des Weiteren soll über die Analyse von Autophagiemarkern und der Polyubiquitinierung von Titin die Autophagieaktivität untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die in Tabelle 1 genannten Chemikalien wurden zur Durchführung der Experimente verwendet.

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 (<i>Western Blotting detection reagent</i>)	Cyanagen
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Interleukin-6	Gibco
<i>Imperial protein stain</i>	Thermo Scientific
Isofluran	Pirimal Healthcare
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kollagenase Typ II	Biochrom
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Metforminhydrochlorid	Sigma
Methanol	Sigma

Mitomycin C	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Appli Chem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nonident P40	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phenolrot	Sigma
Rapamycin	Sigma
Salzsäure 32 %	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Transforming Growth Factor beta-1 (TGF-β1)	Sigma
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers

3.1.2 Lösungen und Puffer

Zur Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 2 genannten Lösungen und Puffer verwendet.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris/HCl 0,4 % (w/v) Natriumdodecylphosphat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	
10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin

	1 % (w/v) Natriumdodecylphosphat (SDS)
10x TBST (pH 7,4)	0,2M Tris/HCl 1,5M NaCl 1 % Tween 20
Anodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Tris/HCl 100 mM Tricine
Blockierungslösung	2 % BSA in 1x TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocapronsäure 30 mM Tris/HCl
Phosphate buffered saline (PBS)	150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat 3 mM Natriumhydrogenphosphat
PVDF destain	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Ethanol
PVDF stain	0,075 % Serva Blue in Methanol
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8 M Urea 2 M 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 beta-Mercaptoethanol
Verdaupuffer (pH 7,35-7,45)	137 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,7 mM Kaliumchlorid 406 µM Natriumdihydrogenphosphat 12 mM Natriumhydrogencarbonat 190 U/ml Kollagenase Typ II

1512 USP-U/ml Trypsin
Phenolrot

Tabelle 2: Verwendete Lösungen und Puffer

3.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Zur Kultivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Medien verwendet.

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium 1 % FBS DMEM	500 ml <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) 1 % (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom) 1 % (v/v) <i>Non-Essential Amino Acids</i> (Biochrom) 0,1 % (v/v) beta-Mercaptoethanol (Sigma)
Kulturmedium 20 % FBS DMEM	500 ml <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) 20 % (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom) 1 % (v/v) <i>Non-Essential Amino Acids</i> (Biochrom) 0,1 % (v/v) beta-Mercaptoethanol (Sigma)

Tabelle 3: Zusammensetzung der Kulturmedien

3.1.4 Geräte und Laborbedarf

Tabelle 4 zeigt die zur Durchführung der Experimente verwendeten Laborgeräte und Materialien.

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Brutschrank	V234	Thermo Scientific
Computer	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
ECL <i>Imager</i>	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank -20 °C	Typ 311104	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	UXF40086V	Thermo Scientific
Gelektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Gelektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Inverses Lichtmikroskop	AE 2000	Motic
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Series	VWR
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Rollmischer	RM5-30V	CAT
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Tischzentrifuge	Mini Star	VWR
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	PF-5500	Grant
Wasserbad	3042	Köttermann

Vortexer	444-1372	VWR
Zentrifuge	Rotofix 32A	Hettich Zentrifugen

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte mit Typen- und Herstellerangabe

3.1.5 Antikörper

Tabelle 5 zeigt die Auflistung der verwendeten primären Antikörper.

Name	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
α-Aktinin	1:5000	Maus	Sigma Aldrich
AKT (phospho Ser473)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling
AKT	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling
AMPKα (phospho Thr172)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
AMPKα	1:2000	Kaninchen	Abcam
K63 Polyubiquitin	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
LC3B	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
mTOR (phospho Ser2448)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling
mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling
p44/42 MAPK (ERK1/2) (phospho T202/Y204)	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling
p44/42 MAPK (ERK1/2)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling
PKCα (phosphoT497)	1:10000	Kaninchen	Abcam
PKCα (Y124)	1:10000	Kaninchen	Abcam
SQSTM1/p62	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
STAT3 (phospho Y705)	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling
STAT3	1:1000	Maus	Cell Signaling
PEVK total	1:50000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-N2B-us S4010	1:2000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-PEVK S11878	1:1000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-PEVK S12022	1:2000	Kaninchen	Eurogentec

Tabelle 5: Primäre Antikörper mit Angabe der Verdünnungs-, Ursprungs- und Herstellerangabe

Tabelle 6 zeigt die Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.

Name	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
Anti-mouse IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:10000	Pferd	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:10000	Ziege	Cell Signaling

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper mit Angabe der Verdünnungs-, Ursprungs- und Herstellerangabe

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung embryonaler Rattenkardiomyozyten

Zur Durchführung der zellbasierten Experimente wurden Embryonen trächtiger Wistar-Rattenweibchen an Gestationstag E18 eingesetzt. Zur Narkotisierung erhielten die adulten Ratten inhalativ Isofluran, die Tötung erfolgte mittels zervikaler Dislokation (Dekapitation). Durch einen Unterbauchlängsschnitt wurden die Embryonen entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale umgehend mit einem Skalpell dekapitiert. Die Tötung der Ratten zur Organentnahme wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzausschuss der zuständigen Landesbehörde (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) durchgeführt. Die Tötung zur Organentnahme wurde ordnungsgemäß angezeigt beziehungsweise genehmigt (Anzeigenummer: O29/11, LANUV Aktenzeichen 84-02.04.2017.A145). Die Tiertötungen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe mit der erforderlichen Sachkenntnis (gemäß §11 TierSCHG) durchgeführt.

Es erfolgte die Präparation der embryonalen Herzen und deren Lagerung in einem mit PBS gefüllten Mikroreaktionsgefäß auf Eis. Anschließend wurden die Herzen mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und in Gefäße mit einem mit Trypsin und Kollagenase versetzten Verdaupuffer überführt. Diese wurde daraufhin bei 37°C und 5% CO₂ im Wärmeschrank inkubiert. Zur besseren Dissoziation der Gewebestücke

wurde der Inhalt der Gefäße alle 15 Minuten resuspendiert. Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von 1ml Kulturmedium aus DMEM und 20% FBS mit anschließender Filtration des Zellgemischs durch ein 70µm Sieb. Das Filtrat wurde bei 1000rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der daraufhin entstandene Überstand verworfen.

3.2.1.2 Zellkultivierung

Zur Kultivierung der embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) wurden mit Gelatine beschichtete 6-Well-Platten verwendet. Dem durch Filtration entstandenen Zellpellet wurde anhand seines Volumens 20 % FBS-haltiges Kulturmedium zugegeben, um eine etwaige Konzentration von 10^5 Zellen/ml Medium zu erreichen. Das Zellgemisch konnte daraufhin auf den Wells gleichmäßig verteilt werden und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Wärmeschrank inkubiert werden. Die Überprüfung der Vitalität der ERC erfolgte am Lichtmikroskop durch Beurteilung der Kontraktilität.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit (Tag 1) erfolgte eine Behandlung zur Unterdrückung des Fibroblastenwachstum. Hierfür wurden die Zellen eine Stunde lang mit Mitomycin C (10 µl/ml 20% FBS-haltigem Kulturmedium) behandelt, welches daraufhin mittels warmem PBS ausgewaschen wurde. Anschließend folgte ein Wechsel des Kulturmediums auf 1 % FBS-haltiges DMEM, um mögliche hormonelle Auswirkungen auf das Zellverhalten zu reduzieren. Das Nährmedium wurde an den folgenden Tagen täglich gewechselt.

3.2.1.3 Zellstimulation

Die Stimulation der Zellen mit IL-6 oder TGF-β1 erfolgte je nach Versuchsansatz an verschiedenen Tagen (Abb. 9). Zur Untersuchung der Autophagie unter IL-6 Einfluss (Versuchsansatz 1) wurde die Hälfte der Zellen an Tag 7 nach Präparation für 30 Minuten mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert. Anschließend wurden sowohl Kontroll- als auch stimulierte Zellen mit SDS-Probenpuffer geerntet.

Zur Überprüfung der Titinphosphorylierung nach TGF-β1 Stimulation (Versuchsansatz 2) wurde ähnlich vorgegangen. So wurde ebenfalls an Tag 7 nach Präparation die Hälfte der Zellen für 30 Minuten mit 10 ng/ml TGF-β1 stimuliert und daraufhin Kontroll- und TGF-β1-stimulierte Zellen mit SDS- Probenpuffer geerntet.

Zur Messung der Titinisoformenzusammensetzung wurde ein Teil der 6 Well Platten unmittelbar nach der Mitomycinbehandlung mit TGF-β1 in einer Konzentration von 10 ng/ml 1 % FBS-haltiges DMEM stimuliert. Dieses Stimulationsmedium wurde jeden

Tag gewechselt, sodass sichergestellt werden konnte, dass die Zellen jeden Tag mit TGF- β 1 stimuliert wurden. Schließlich wurden die Zellen an Tag 2, 4, 7, und 9 mit SDS-Probenpuffer geerntet.

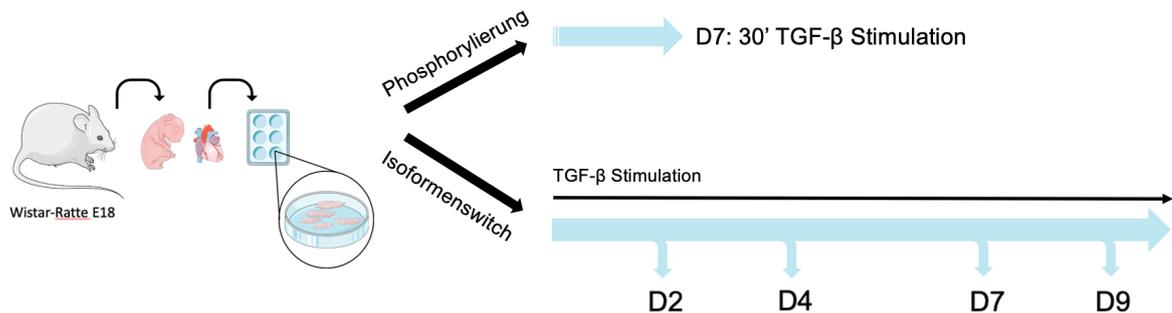


Abb. 9: Schematischer Versuchsaufbau

Visualisierung der TGF- β 1-Stimulation embryonaler Rattenkardiomyozyten (ERC) in Zellkultur. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Titinphosphorylierung wurden ERC an Kultivierungstag 7 (D7) mit TGF- β 1 stimuliert. Zur Analyse der Titinisoformenverhältnisse wurden die ERC an Tag 1 (D1) nach Präparation mit TGF- β 1 stimuliert und an Tag 2 (D2), Tag 4 (D4), Tag 7 (D7) und Tag 9 (D9) geerntet. Die geernteten Proben wurden anschließend für biochemische Analysen verwendet. *Created with smart.servier.com.*

3.2.2 Biochemische Methoden zum Proteinnachweis

3.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

Aufgrund der hohen Molekülmasse des Titins mit 3-4 MDa wurden spezielle Agarose-stabilisierte Polyacrylamidgele (Titingele) mit 2,1 % Acrylamidanteil verwendet. Hierzu wurden zunächst die in Tabelle 7 beschriebenen Chemikalien im Wasserbad bei 48 °C erwärmt und anschließend mit Ammoniumperoxidsulfat (APS) und in der Mikrowelle aufgekochter Agarose versetzt. Nach Vermengung mittels schneller Auf- und Abpipettierung wurde das Gemisch zur Auspolymerisation zwischen zwei Glasplatten gegeben.

Zur Analyse der Proteine im Größenbereich bis 260 kDa wurden 7,5 %- und 12,5 %- Polyacrylamidgele (Standardgele) angefertigt. Hierzu wurden zunächst Trenngele nach Zusammensetzung in Tabelle 8 auspolymerisiert. Durch Zugabe von Isopropanol fand dieser Prozess unter Sauerstoffabschluss statt. Anschließend wurden die Trenngele mit einem Sammelgel übergossen.

Zur Auftragung der Proben wurden die sich im Probenpuffer befindlichen Zellen im Wasserbad bei 98°C für drei Minuten erhitzt, um die Proteine in ihre Sekundär- und

Tertiärstruktur aufzuspalten. Entsprechend der entstandenen Viskosität wurden 12 – 20µl der Probe auf die Gele aufgetragen und diese in Elektrophoresekammern der Geräte Mini-Twin (Biometra) und Mini-PROTEAN (Biorad) mit 1x-Laufpuffer gesteckt. Zum Einlaufen der Proben wurde zunächst eine Spannung von 20mA für Standard- und 2,5mA für Titingele angelegt und diese im Verlauf auf jeweils 30mA und 2,3mA erhöht. Nach circa 40 Minuten war die Proteinauftrennung in den Standardgelen und nach fünf Stunden in den Titingelen beendet.

Lösung	Titingel 2,1%
30 % Akrylamidlösung	1,4 ml
H2Obidest	6,67 ml
4x-SDS-Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 µl
TEMED	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5 %	6,67ml
Gesamtvolumen	20 ml

Tabelle 7: Pipettierschema für 2 Titingele

Lösung	Trenngel 7,5%	Trenngel 12,5%	Sammelgel
30 % Akrylamidlösung	3,75 ml	6,25 ml	0,667 ml
H2Obidest	7,5 ml	5 ml	3,025 ml
4x-SDS-Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	-
4x-SDS-Sammelgelpuffer	-	-	1,25 ml
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	15 µl
APS	75 µl	75 µl	50 µl
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml	5 ml

Tabelle 8: Pipettierschema für je 2 SDS – Standardgele

3.2.2.2 Färbung mit Imperial Protein Stain

Zur Detektierung der Titinisoformenkomposition wurden die fertigen Titingele für 60 Minuten in einer Coomassie-basierten Proteinfärbelösung (Imperial Protein Stain) auf dem Schüttler gefärbt. Mittels deionisiertem Wasser erfolgte über weitere 60 Minuten eine Entfärbung der Gele. Diese wurden anschließend durch den *Fusion FX Imager* (Vilbert & Lourmat) digital dargestellt, sodass sich die Isoformenbanden anhand der Pixeldichte mit der Software Image J quantitativ bestimmen ließen. Aus der Addition der Isoformen N2BA und N2B ergab sich das Gesamt-Titin. Die Isoformenanteile wurden jeweils in Prozent des Gesamt-Titins angegeben. Die Degradationsbande T2 wurde als proteolytisches Titinfragment nicht eingerechnet.

3.2.2.3 Analyse mittels Western Blot

Zur weiteren Analyse wurden die in den Gelen aufgetrennten Proteine mittels *Semi-Dry Western Blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden für die Standardgele je vier, für die Titingele je fünf *Whatmann*-Papiere in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt und eine PVDF-Membran durch Schwenken in Methanol aktiviert. Diese wurde auf die in Anodenpuffer getränkten *Whatmann*-Papiere gelegt und von oben mit dem Polyakrylamidgel bedeckt. Schließlich wurden die in Kathodenpuffer getränkten *Whatmann*-Papiere auf das Gel gelegt und der Stapel in die Kassette eines *Turbo Transfer Blottingsystems* platziert. Für den Blottingvorgang wurde eine Stromstärke von 1,5A pro cm² Gel angelegt und der Prozess nach 12 Minuten (Standardgele) beziehungsweise 20 Minuten (Titingele) beendet. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran anschließend zunächst für 30 Sekunden in PVDF-stain gefärbt und daraufhin für zwei Minuten in PVDF-destain entfärbt. Mittels 1xTBST erfolgte eine mehrfache Auswaschung der in PVDF-destain enthaltenen Essigsäure.

3.2.2.4 Immundetektion

Zur Vermeidung einer Antikörperbindung mit unspezifischen Stellen der PVDF-Membran wurde diese für eine Stunde in zweiprozentigem bovinem Serumalbumin (2% BSA) eingelegt. Über Nacht erfolgte anschließend die Inkubation mit den primären Antikörpern aus Tabelle 5 verdünnt in 2 % BSA in 1x TBST auf einem Taumelrollmischer bei 4°C. Es erfolgten drei zehninütige Waschungen in 1x TBST. Zur Bindung an die Fc-Region des primären Antikörpers wurden entsprechende Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Diese wurden

für zwei Stunden in der Konzentration aus Tabelle 6 in 2% BSA in 1x TBST bei Raumtemperatur auf die Blotmembran gegeben und anschließend dreimal in 1x TBST ausgewaschen.

Die Analyse der mit Antikörpern beladenen Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Hierfür wurde eine 1:1 verstärkte Chemolumineszenz-Reagenzien-Lösung (ECL) verwendet, die bei Kontakt mit der Meerrettich-Peroxidase ein detektierbares Lichtsignal entsprechend des Phosphorylierungsstatus des Proteins bildet. Diese Reaktion wurde mithilfe des *Fusion FX Imager* (Vilbert und Lourmat) gemessen.

Um die mit den angewendeten Phosphorylierungsantikörpern (phospho-Antikörper) beladenen Proteine unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, wurden total-Antikörper zur Beladungskontrolle verwendet. Zur Ablösung der phospho-Antikörper wurde mit β -Mercaptoethanol versetzter Stripping Puffer verwendet. Die Blotmembranen wurden darin für eine Stunde inkubiert, mittels 1x TBST gewaschen und anschließend erneut mit 2% BSA blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem pan-Antikörper, beziehungsweise bei Titin mit dem PEVK-total Titinantikörper, und die Digitalisierung mittels *Fusion FX Imager*.

3.2.3 Densitometrische Analyse und statistische Darstellung

Zur Messung der Pixeldichte der Banden wurde das Programm „Image J“ (*National Institutes of Health*) verwendet. Die Stärke des detektierten Lichtsignals und damit die Pixeldichte entsprach proportional der Menge an Protein, sodass das Signal der phospho-Antikörper in Relation zum Gesamtprotein (total-Antikörper) gesetzt werden konnte. Der Phosphorylierungsgrad wurde somit als relativer Anteil des Gesamtproteins numerisch dargestellt. Für den Vergleich verschiedener Proben untereinander wurden die relativen Anteile durch Division der Mittelwerte der Kontrollproben eines Blots zueinander normiert. Zur Normierung des Phosphorylierungsstatus von p62/SQSTM1 wurde dieser als relativer Anteil des Aktinins der jeweiligen Probe angegeben, bei LC3-II wurde dessen Verhältnis zu LC3-I bestimmt. In den unten aufgeführten Diagrammen sind die Mittelwerte der relativen Anteile sowie der Standardfehler (SEM) dargestellt.

Zur Erhöhung der statistischen Signifikanz wurden Proben aus mindestens 3 unabhängigen Zellkulturen verwendet ($n \geq 3$). Die statistische Auswertung erfolgte

mittels eines *one-way* ANOVA oder eines *student's t-test* über die Software GraphPad Prism 10.1.0. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P=0,05$) angenommen.

3.2.4 Software

Zur Ausarbeitung dieser Dissertation wurde folgende Software verwendet: Adobe Photoshop CS6, EndNote 20, GraphPad Prism 10.1.0., Image J, Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von TGF- β 1 auf den Titinisoformen-Switch

4.1.1 TGF- β 1 beschleunigt den Titinisoformen-Switch in kultivierten ERC

Um die Titinisoformenkomposition unter Einfluss von TGF- β 1 zu untersuchen, wurden embryonale Rattenkardiomyozyten (ERC) ab Kultivierungstag D1 mit TGF- β 1 stimuliert und anschließend zusammen mit Kontrollzellen (CTRL) zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (Kultivierungstag D2, D4, D7 und D9). Nach Auftrennung des geernteten Zelllysats mittels 2,1% SDS-PAGE erfolgte die densitometrische Auswertung der Coomassie-gefärbten Proteinbanden.

Abbildung 10 zeigt das Verhältnis der Titinisoformen der gewählten Kultivierungstage aus drei individuellen Versuchs-/Kulturansätzen (n=3). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Titinisoformen N2B am Gesamt-Titin. Eine für Titin charakteristische Degradationsbande ist als T2 bezeichnet.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigte sich in den ERC ein im Mittel ansteigender prozentualer N2B-Isoformenanteil. Dies zeigte sich ebenfalls nach Stimulation mit TGF- β 1. Innerhalb der Kultivierungstage D2 und D4 ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied der N2B-Anteile zwischen TGF- β 1-stimulierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen darstellen (D2 CTRL 21,07 \pm 0,89% vs. TGF- β 1 21,8 \pm 1,42%; D4 CTRL 39,48 \pm 1,06 vs. TGF- β 1 41,25 \pm 0,96%). Ab dem siebten Kultivierungstag (D7) wiesen TGF- β 1-stimulierte Zellen einen im Mittel signifikant höheren N2B-Anteil im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Der relative Anteil der N2B-Isoform in Kontrollzellen betrug 46,25 \pm 1,43% gegenüber einem N2B-Anteil von 60,15 \pm 2,14% in den mit TGF- β 1-stimulierten Zellen (P =<0,0001). Auch an Kultivierungstag D9 war der relative N2B-Anteil am Gesamttitin in TGF- β 1-stimulierten Zellen mit 66,73 \pm 1,3% signifikant höher als in den Kontrollzellen mit 53,52 \pm 1,8% (P =<0,0001).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Stimulation mit TGF- β 1 den Titinisoformen-Switch ab Kultivierungstag D7 signifikant beschleunigt und somit den Anteil der steiferen N2B-Isoform erhöht.

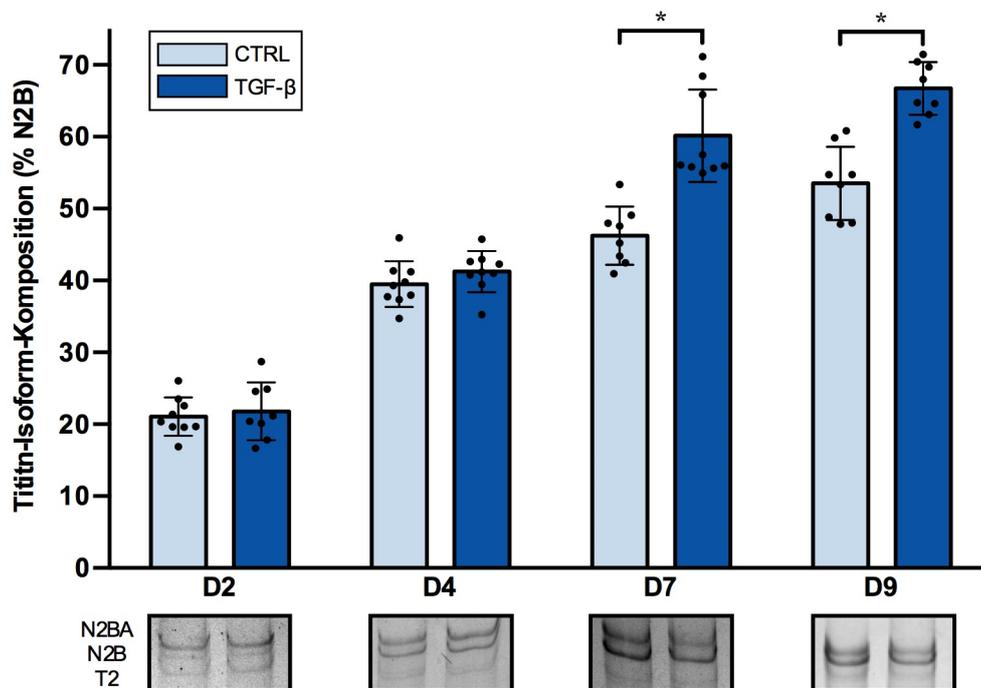


Abb. 10: Einfluss von TGF-β1 auf die Titinisoformenkomposition in ERC nach Stimulation ab D1
 Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Coomassie-gefärbten 2,1% SDS-PAGE Gele von kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und unter Anwesenheit von 10µg TGF-β1 nach 2, 4, 7 und 9 Kultivierungstagen (D2, D4, D7, D9). Die Säulendiagramme repräsentieren den relativen Anteil der N2B-Isoform am Gesamt-Titin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben (n=8-9). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Asterisken gekennzeichnet (p<0,05) in *one-way* ANOVA). Unterhalb der Säulendiagramme sind repräsentative Titingele mit den Isoformen N2BA und N2B dargestellt. Die Degradationsbande T2 stellt ein proteolytisches Titinfragment dar.

4.1.2 PI3K-AKT-Signalweg als mögliche Signalkaskade innerhalb des Isoformen-Switches

Um die Signalkaskade, über die der Isoformen-Switch ab dem 7. Kultivierungstag durch TGF-β1 beschleunigt wird, näher zu charakterisieren, wurde zunächst der Einfluss von TGF-β1 auf den PI3K-AKT/mTOR-Signalweg untersucht. Dieser Signalweg wurde bereits mit Veränderungen der Titinisoformenexpression in Verbindung gebracht: Krüger et al. konnten 2008 zeigen, dass das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T₃) über diesen Signalweg zu einem beschleunigten Isoformen-Switch in Kardiomyozyten führte (Krüger et al., 2008). Ebenso reguliert Insulin über diese Kaskade die Isoformenkomposition (Krüger et al., 2010).

Um eine akute Aktivierung des AKT-Signalwegs zu untersuchen, wurden ERC zunächst bis zum 7. Lebenstag kultiviert und an D7 für 30 Minuten mit 10µg TGF-β1 stimuliert. Die Kinaseaktivität wurde über den Phosphorylierungsstatus aktivitätsregulierender Serin/Threoninreste des Enzyms mittels phospho-spezifischer

Antikörper im *Western-Blot*-Verfahren ermittelt. Hierbei ergab sich durch die TGF- β 1-Behandlung eine gegenüber nicht-stimulierten Kontrollzellen $1,76 \pm 0,19$ -fach erhöhte relative Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) am Serinrest 473 (Abb. 11 A). Für die Kinase mTOR ergaben die *Western-Blot*-Analysen keine statistisch signifikante Veränderung der relativen Phosphorylierung des aktivitätsregulierenden S2448 Restes durch TGF- β 1-Stimulation (Abb. 11 B).

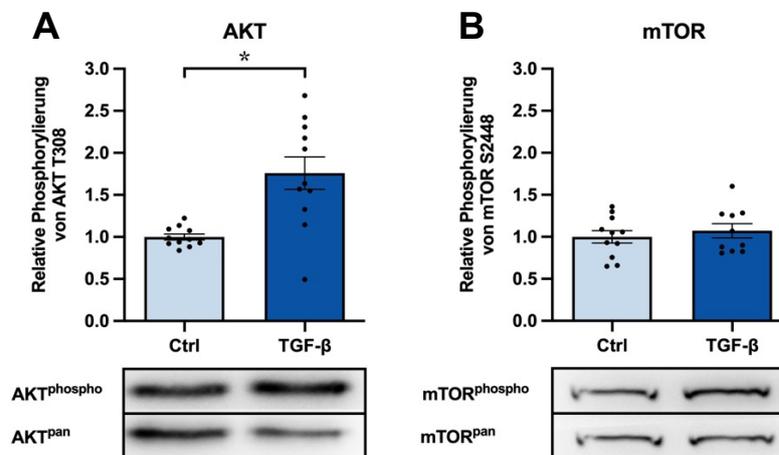


Abb. 11: Veränderung der Kinaseaktivität von AKT und mTOR unter TGF- β 1-Stimulation in ERC
Western-Blot-Analyse von kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulation mit $10\mu\text{g}$ TGF- β am 7. Kultivierungstag. Dargestellt ist die relative Phosphorylierung der Kinasen **(A)** AKT (60 kDa) und **(B)** mTOR (289 kDa). Die Daten wurden auf die Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben ($n=10-11$). Asterisken kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ in *student's-t-test*). Unterhalb der Säulendiagramme sind repräsentative *Western-Blots* dargestellt.

4.2 Akute Veränderungen in elastischen Titindomänen unter TGF- β 1-Einfluss

4.2.1 TGF- β 1 führt akut zu einer Abnahme der passiven Zellsteifigkeit

Zur Untersuchung der Auswirkungen von TGF- β 1 auf die passive Steifigkeit von Titin wurden ERC am 7. Kultivierungstag mit $10\mu\text{g}$ TGF- β 1 stimuliert. Nach 30 Minuten wurden die Kontroll- und stimulierten Zellen geerntet. Anschließend erfolgte mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern und anschließendem *Western-Blot* die Analyse der relativen Phosphorylierung in den elastischen Titindomänen PEVK und N2Bus.

Die Auswertung für den Serinrest S4010 in der N2Bus-Region ergab nach TGF- β 1-Stimulation eine signifikante Zunahme ($P=0,0426$) der relativen Phosphorylierung auf $1,48 \pm 0,2$ gegenüber Kontrollzellen (Abb. 12 A).

Die relative Phosphorylierung in der PEVK-Region an den Serinresten S12022 und S11878 zeigte unter TGF- β 1-Einfluss mit jeweils $1,07\pm 0,04$ und $1,04\pm 0,1$ keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen (Abb 12 B und C).

Eine vermehrte Phosphorylierung der N2Bus-Region korreliert mit einer akut verminderten passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten, während diese durch erhöhte Phosphorylierung der PEVK-Region verstärkt wird (Kötter et al., 2013), Anhand der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden kann, dass TGF- β 1 akut zu einer Abnahme der passiven Zellsteifigkeit führt.

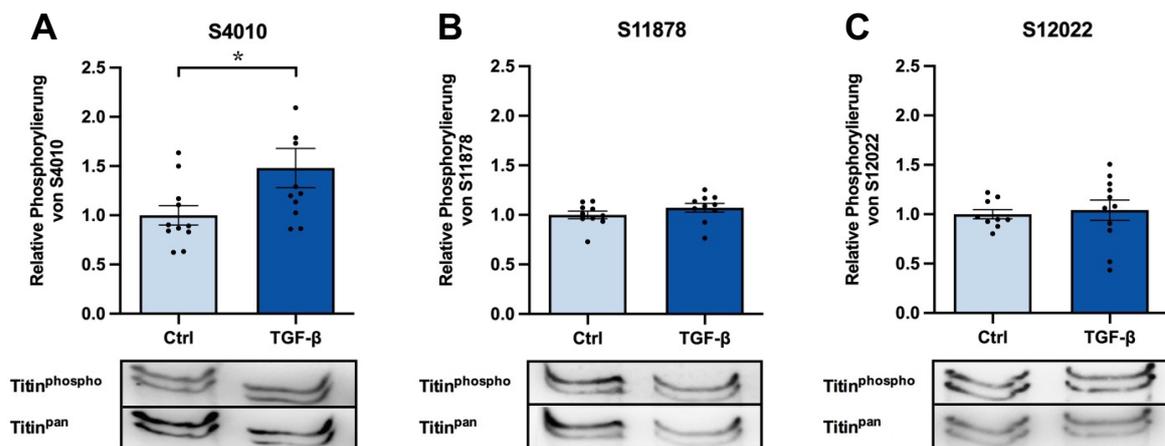


Abb. 12: Modifikationen an elastischen Titindomänen durch TGF- β 1-Stimulation

ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulierung mit $10\mu\text{g}$ TGF- β 1 am 7. Kultivierungstag und anschließender *Western-Blot*-Analyse. Dargestellt ist die relative Titinphosphorylierung (A) in der N2Bus-Domäne am Serinrest S4010, sowie in der PEVK-Domäne an den Serinresten (B) S11878 und (C) 12022. Die Balkendiagramme geben jeweils die Mittelwerte \pm SEM an ($n=9-11$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Asterisken gekennzeichnet ($p<0,05$ in *student's-t-test*). Unterhalb der Balkendiagramme sind jeweils repräsentative Blots mit den zwei Titinbanden N2BA und N2B gezeigt.

4.2.2 Untersuchung der Kinaseaktivitäten nach TGF- β 1-Stimulation

Im Folgenden wurde die Aktivität zweier Kinasen entsprechend der Methodik aus 4.2.2 untersucht, welche die akuten Veränderungen in den elastischen Titindomänen bedingen können.

Es ist bekannt, dass die *extracellular signal-related kinase 1/2* (ERK1/2) über eine vermehrte Phosphorylierung den Serinrest S4010 der N2Bus-Region des Titins posttranslational modifizieren kann (Perkin et al., 2015; Raskin et al., 2012). ERK1/2 stellt außerdem eine über TGF- β 1 aktivierte Kinase innerhalb des SMAD-unabhängigen Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs dar. Auch in den mit TGF- β 1 stimulierten ERC ergab sich gemessen am Phosphorylierungsstatus der aktivitätsregulierenden Aminosäuren T202/Y204 eine signifikante Aktivierung der

ERK1/2 mit $1,37 \pm 0,07\%$ ($P=0,0009$) gegenüber Kontrollzellen (Abb. 13 A). Entsprechend der Ergebnisse aus 4.1.2 lässt sich somit schließen, dass TGF- β 1 über die Aktivierung von ERK1/2 eine vermehrte Phosphorylierung der N2Bus-Region an S4010 bewirkt und somit die passive Titinsteifigkeit akut herabsetzen kann.

Bei der Phosphorylierung der Serinreste S11878 und S12022 in der PEVK-Region spielt die Proteinkinase Ca (PKC α) eine entscheidende Rolle (Hidalgo et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch mit $1,09 \pm 0,09\%$ keine Aktivierung der PKC α durch TGF- β 1 feststellen (Abb. 13 B).

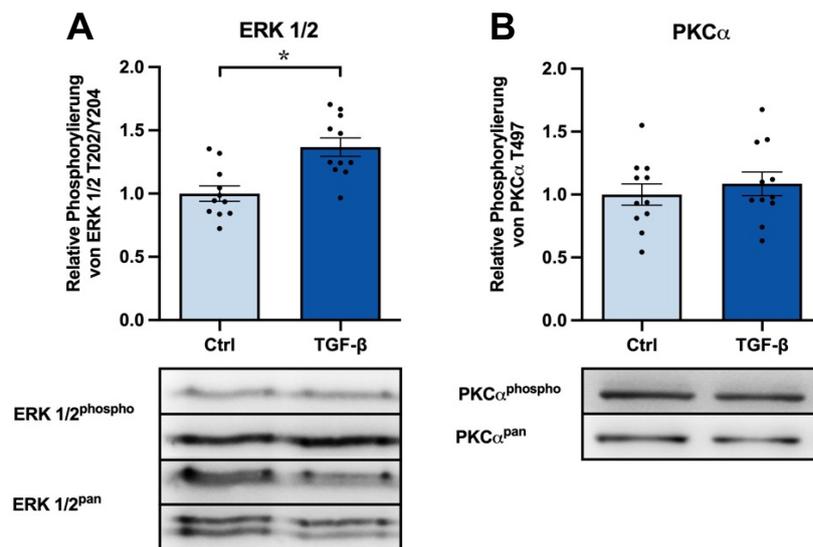


Abb. 13: Relative Phosphorylierung von ERK1/2 und PKC α unter TGF- β 1-Stimulation in ERC
Western-Blot-Analyse von kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulation mit 10 μ g TGF- β 1 am 7. Kultivierungstag. Die jeweilige Kinaseaktivität ist über die relative Phosphorylierung der Kinasen **(A)** ERK1/2 und **(B)** PKC α dargestellt. Die Daten wurden auf die Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (n=11). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *student's-t-test*). Unterhalb der Abbildungen sind repräsentative *Western-Blots* dargestellt.

4.3 Interleukin-6 und die autophagosomale Titindegradation

In einem weiteren Teilprojekt wurde der Einfluss des postischämisch erhöhten Zytokins Interleukin-6 (IL-6) auf die Titindegradation über das autophagolysosomale System untersucht. Hierfür wurden ERC am 7. Kultivierungstag isoliert und über 30 Minuten mit 10 μ g IL-6 stimuliert. Die Aktivierung der IL-6 vermittelten Signaltransduktion in ERC konnte im *Western-Blot* jeweils über eine erhöhte STAT-3 Phosphorylierung bestätigt werden ($3,35 \pm 0,53$) (Abb. 14).

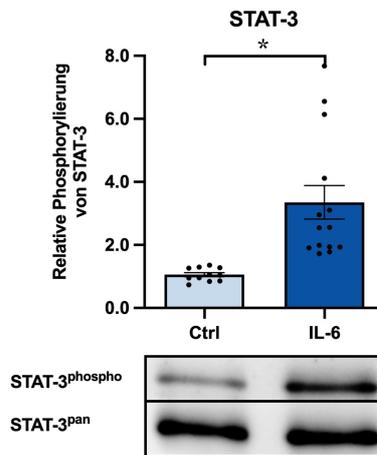


Abb. 14: Bestätigung der IL-6 Signaltransduktion durch erhöhte STAT-3 Phosphorylierung

Western-Blot-Analyse von STAT-3 in kultivierten ERC unter Kontrollbedingen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulation mit 10µg IL-6 am 7. Kultivierungstag. Die Daten wurden auf die Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben (n=11-14). Statistische Signifikanzen wurden durch den *student's-t-test* ($p < 0,05$) ermittelt und sind durch Asterisken gekennzeichnet. Unterhalb der Abbildung ist ein repräsentativer Western-Blot dargestellt.

4.3.1 Interleukin-6 bewirkt keine vermehrte K63-Polyubiquitinierung an Titin

Im Rahmen der Proteindegradation stellt die Polyubiquitinierung am Lysinrest 63 ein Signal zum Abbau über das Autophagosom dar (Tan et al., 2008). In Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass IL-6 als Aktivator der Autophagie gilt (Katheder et al., 2017). Es ist bekannt, dass auch Teile des Sarkomerproteins Titin über Autophagie abgebaut werden (Müller et al., 2021). Im Folgenden wurde untersucht, ob IL-6 ebenfalls einen Einfluss auf die autophagosomale Titindegradation hat. Mittels phospho-spezifischer Antikörper wurde die relative K63-Ubiquitinierung analysiert. Dargestellt ist der Anteil von K63-polyubiquitiniertem Titin am Gesamttitin.

In den IL-6 stimulierten Zellen konnte mit $0,95 \pm 0,07$ relativer K63-Polyubiquitinierung jedoch kein Unterschied zu den nicht stimulierten Kontrollzellen beobachtet werden (Abb.15).

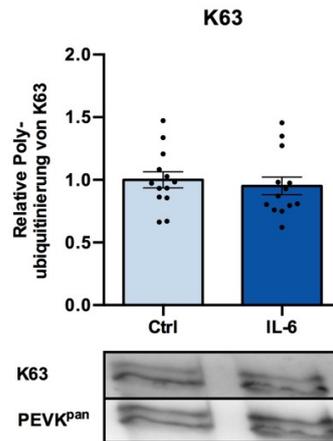


Abb. 15: Relative K63-Polyubiquitinierung von Titin nach 30-minütiger IL-6 Stimulation

Western-Blot-Analyse von kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulation mit 10µg IL-6 am 7. Kultivierungstag. Darstellung der relativen K63-Polyubiquitinierung von Titin am Gesamttitin (PEVK). Die Daten wurden auf die Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben (n=13). Statistische Signifikanzen wurden durch den *student's-t-test* (p<0,05) ermittelt und sind durch Asterisken gekennzeichnet. Unterhalb der Abbildungen ist das Bild eines repräsentativen *Western-Blots* dargestellt.

4.3.2 Analyse der Effekte von Interleukin-6 auf den Autophagieprozess

Im Folgenden wurden die möglichen Einflüsse von Interleukin-6 auf die Kinasen und Markerproteine des Autophagieprozesses ermittelt. In Abhängigkeit des Nährstoffangebots der Zelle kommt es entweder zu einer Induktion oder Inhibition der Proteindegradation. Die Kinase AMP (AMPKα) gilt dabei als Aktivator der Autophagie, während das Protein *mammalian target of rapamycin* (mTOR) diese hemmt (Kim et al., 2011b). Die Autophagiemarker *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3-II) und p62/Sequestosom-1 (p62/SQSTM1) fungieren als Bindeglieder der abzubauenen Proteine an die Autophagosomenmembran (Chen et al., 2014). Über LC3-II ist eine Quantifizierung der Autophagie möglich, die abhängig ist vom Zeitpunkt der Autophagosomenbildung (Klionsky et al., 2021). Für p62/SQSTM1 ist zudem ein Zusammenhang mit dem proteasomalen Abbau bekannt (Korolchuk et al., 2009b).

Die Aktivität der Kinasen nach 30-minütiger IL6-Stimulation sowie die Proteinlevel der Autophagiemarker wurden mittels *Western-Blot*-Analyse ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Für mTOR ergab sich nach IL6 Stimulation mit 0,72±0,06 eine signifikant geringere relative Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollzellen (P=0,0258), sodass anzunehmen ist, dass IL6-Stimulation die mTOR vermittelte Hemmung der Autophagie teilweise aufhebt (Abb. 16 A). Die aktivierende Phosphorylierung der

AMP-Kinase unterschied sich aufgrund starker Abweichungen zwischen den Präparationen mit $1,43 \pm 0,3$ zwar nicht statistisch signifikant von den Kontrollzellen, zeigte sich aber tendenziell erhöht und somit aktiver ($P=0,2186$) (Abb. 16 B).

Im Rahmen der Analyse der Autophagiemarker ließ sich kein Effekt auf den LC3-II/LC3-I-Quotienten detektieren (Abb. 16 C). Der p62/SQSTM1-Proteingehalt stieg nach IL6-Stimulation signifikant auf das $1,38 \pm 016$ -fache an ($P=0,0428$) (Abb. 16 D).

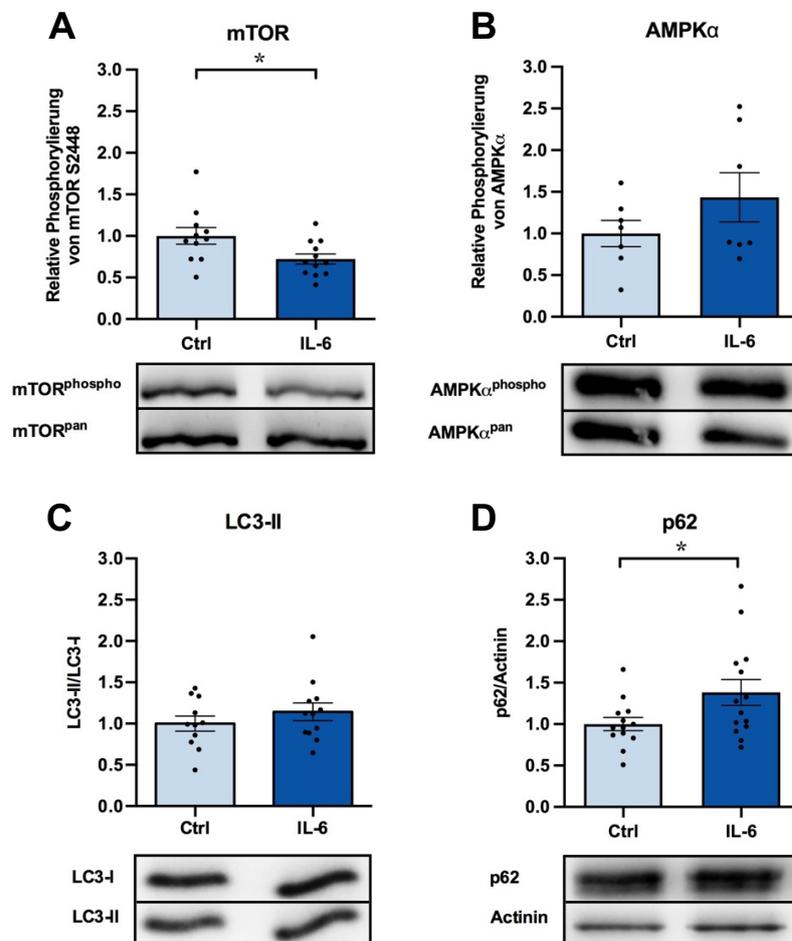


Abb. 16: Analyse der Kinaseaktivitäten und der Autophagiemarker nach 30-minütiger IL-6 Stimulation

Western-Blot-Analyse von kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und nach 30-minütiger Stimulation mit $10\mu\text{g}$ IL-6 am 7. Kultivierungstag. **(A)** Relative Phosphorylierung von mTOR ($n=11-12$) **(B)** Relative Phosphorylierung von AMPK α ($n=7$) **(C)** Relative Proteinlevel von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I ($n=11-1-2$) **(D)** Relativer Proteinanteil von p62/SQSTM1 im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (13-14). Die Daten wurden auf die Kontrollzellen normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Statistische Signifikanzen wurden durch den *student's-t-test* ($p < 0,05$) ermittelt und sind durch Asterisken gekennzeichnet. Unterhalb der Abbildungen ist das Bild eines repräsentativen Western-Blots dargestellt.

5 Diskussion

Die ischämiebedingten Vorgänge beim Myokardinfarkt führen zu multiplen Anpassungsmechanismen und strukturellen Umbauprozessen des Herzens und beeinflussen dadurch maßgeblich dessen Funktion. Dabei spielt die Modulation der Titin-abhängigen passiven Myozytensteifigkeit, auch in Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, eine entscheidende Rolle (Kötter et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Zellkulturmodellen der Einfluss der postischämisch erhöhten Zytokine TGF- β 1 und Interleukin-6 auf die titinbasierte passive Steifigkeit und die Titindegradation untersucht. Zudem unterliegt Titin postischämisch einer deutlich erhöhten Degradation (Kötter et al., 2016; Hein et al., 1994). In dieser Arbeit wurden in diesem Zusammenhang Auswirkungen des postischämisch erhöhten Zytokins Interleukin-6 auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle des Titins analysiert.

5.1 TGF- β 1 moduliert die Titin-basierte passive Steifigkeit

5.1.1 Kurzfristige TGF- β 1-Stimulation beeinflusst die posttranslationale Titinmodifikation

5.1.1.1 Titinphosphorylierung unter ischämischen Bedingungen

Als ein nach Myokardinfarkt stark hochreguliertes Zytokin hat TGF- β 1 multiple Einflüsse auf die postischämischen Anpassungsmechanismen des Herzens (Dobaczewski et al., 2011). Es ist bekannt, dass sich in der frühen Phase nach Herzinfarkt insbesondere auch die Titin-abhängige passive Steifigkeit verändert und damit das ventrikuläre *remodeling* der Kardiomyozyten moduliert wird (Kötter et al., 2016). Das innerhalb eines Halbsarkomers verankerte Titin besitzt hierfür mit der PEVK- und N2Bus-Region in der I-Band-Region des Proteins zwei modulierbare Bereiche zur kurzfristigen Anpassung der passiven Myozytensteifigkeit (Koser et al., 2019). Dabei führt eine vermehrte Phosphorylierung der PEVK-Region an den Stellen S11878 und S12022 zu einer erhöhten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten (Hidalgo et al., 2009), während eine erhöhte Phosphorylierung der N2Bus-Region an der Stelle S4010 diese vermindert (Krüger et al., 2009). Verschiedene Studien konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Tiermodell eine insgesamt erhöhte postischämische passive Steifigkeit der Kardiomyozyten nachweisen (Hidalgo et al., 2013; Kötter et al., 2016). So konnten Kötter et. al sowohl in Mäuseherzen nach Ischämie/Reperfusion

als auch in Mäuseherzen nach dreitägiger Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* eine signifikante Hyperphosphorylierung der PEVK-Region mit Hypophosphorylierung der N2Bus-Region nachweisen. Die erhöhte PEVK-Phosphorylierung war auch nach zehn Tagen weiterhin erhöht, wenn auch weniger stark ausgeprägt (Kötter et al., 2016). Es wurde zudem gezeigt, dass diese PKC- α -abhängig durch postischämisch erhöhte Interleukin-6-Level moduliert werden kann. Vor dem Hintergrund dieser Vorarbeiten wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Phosphorylierungsstatus dieser Regionen auch unter TGF- β 1-Stimulation moduliert wird und welche Signalwege dafür relevant sind.

5.1.1.2 Kurzfristige Stimulation mit TGF- β 1 führt zu einer erhöhten ERK-abhängigen N2Bus-Phosphorylierung

In den durchgeführten Untersuchungen der ERC zeigte sich nach 30-minütiger TGF- β 1-Stimulation eine deutliche Aktivierung der *extracellular signal-related kinase 1/2* (ERK1/2). Zudem ergab sich eine erhöhte relative S4010-Phosphorylierung in der N2Bus-Region. Es ist bekannt, dass ERK1/2 Titin in der N2Bus-Region an dieser Stelle phosphorylieren kann (Perkin et al., 2015; Raskin et al., 2012). Für TGF- β 1 existiert über die Aktivierung des SMAD-unabhängigen Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs eine Möglichkeit zur Aktivierung von ERK1/2 (Derynck und Zhang, 2003). Eine vermehrte ERK1/2-abhängige Phosphorylierung im N2Bus-Bereich korreliert wiederum mit einer verminderten Titin-abhängigen passiven Steifigkeit (Kötter et al., 2013). Innerhalb der PEVK-Region zeigten sich an den Serinresten S11878 und S12022 keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsstatus gegenüber Kontrollzellen. Entsprechend ergab sich unter TGF- β 1-Stimulation auch keine vermehrte Phosphorylierung der PKC α , die eine Phosphorylierung dieser Serinreste vornehmen kann (Hidalgo et al., 2009). In Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse ist somit davon auszugehen, dass TGF- β 1 über Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs akut zu einer Abnahme der passiven Titinsteifigkeit führt.

Unmittelbar nach der Myokardischämie zeigen sich stark erhöhte Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α (Newton und Dixit, 2012). TGF- β 1 wird jedoch erst verzögert ausgeschüttet, es wird auch als „*master switch*“-Zytokin bezeichnet, da es über Inhibierung der proinflammatorischen Zytokine den Übergang der Inflammations- in

die Proliferationsphase darstellt (Dobaczewski et al., 2011). TGF- β 1 unterdrückt auch die weitere Ausschüttung des proinflammatorisch wirksamen Interleukin-6 und kann somit als dessen antiinflammatorischer Gegenspieler betrachtet werden. Diese Tatsache könnte den im Vergleich zur Interleukin-6-Stimulation gegenteiligen Effekt auf die passive Steifigkeit erklären. Zukünftig durchgeführte Kraftmessungen unter TGF- β 1-Stimulation werden zeigen, inwiefern TGF- β 1 die Nettosteifigkeit des Titins akut modulieren kann. Zudem müssen weitere TGF- β 1-vermittelte Signalwege untersucht werden, die möglicherweise zu Phosphorylierungen an anderen Serinresten der I-Band-Region führen. Neben der Regulation über den Phosphorylierungsstatus in der I-Banden-Region existieren zudem weitere kurzfristige Titinmodifikationen. So zeigt Titin im ischämischen Areal unter oxidativem Stress beim Myokardinfarkt ein Ungleichgewicht von Oxidations- und Reduktionsprozessen, wie beispielsweise eine vermehrte Bildung von Disulfidbrücken in der N2B-Region, was wiederum die Titin-abhängige passive Steifigkeit erhöht (Loescher et al., 2020; Grützner et al., 2009). Es ist bekannt, dass TGF- β 1 die Bildung reaktiver Sauerstoffbindungen durch Induktion der Expression von Enzymen wie der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) erhöht (Cucoranu et al., 2005). Zusätzlich zu den oben genannten Signalwegen könnte TGF- β 1 so auch über die Beeinflussung von Redoxreaktionen Veränderungen von Titineigenschaften vornehmen und die passive myokardiale Nettosteifigkeit verändern.

5.1.2 Der Titinisoformen-Switch wird durch TGF- β 1 beschleunigt

5.1.2.1 TGF- β 1 erhöht den relativen Anteil der N2B-Isoform

In Kardiomyozyten dominieren zwei verschiedene Titinisoformen, die elastischere N2BA- und die steifere N2B-Isoform (Bang et al., 2001; Freiburg et al., 2000). Je nach Organismus unterscheiden sich die jeweiligen Isoformenanteile. So besitzen ausgewachsene Ratten einen N2BA-Anteil von 5-20%, während dieser im humanen Herzgewebe mit 40 % deutlich höher liegt (Cazorla et al., 2000; Kötter et al., 2013). Die Isoformenzusammensetzung verändert sich zudem während der Embryonalentwicklung und unter dem Einfluss von kardialen Erkrankungen wie exemplarisch der ischämischen Kardiomyopathie (Opitz et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Die Isoformenkomposition bestimmt die myokardiale Steifigkeit

beziehungsweise Elastizität und hat somit einen direkten Einfluss auf die Herzfunktion (Linke und Hamdani, 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte unter mehrtägiger TGF- β 1-Stimulation von ERC ein beschleunigter Isoformen-*Switch* beobachtet werden. Der Anteil der steiferen N2B-Isoform stieg dabei in den TGF- β 1-behandelten Zellen ab dem 7. Kultivierungstag signifikant an. Basierend auf dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass TGF- β 1 langfristig über die Anpassung des Isoformenverhältnisses eine erhöhte passive Titinsteifigkeit bewirkt. Dies ist besonders vor dem gegenteiligen Effekt der erhöhten N2Bus-Phosphorylierung bei kurzfristigen TGF- β 1-Stimulationen interessant. Ein Grund hierfür könnten die bereits wissenschaftlich belegten pleiotropen Effekte von TGF- β 1 sein, da das Zytokin multiple Zellsignalwege aktivieren kann, die kontextabhängig, je nach Zellart und Zellmilieu, aktivierende oder inhibierende Effekte auslösen (Thompson et al., 1989). In der Proliferations- und Reparaturphase, beginnend ungefähr 72 Stunden nach Myokardinfarkt, fördert TGF- β 1 die Neubildung der extrazellulären Matrix durch Stimulation der Kollagensynthese, wobei zunächst eine provisorische Matrix gebildet wird, die aus Fibronectin und Fibrin sowie matrizellulären Proteinen wie Periostin und Osteopontin besteht (Frangogiannis et al., 2005). Innerhalb dieser Phase sind die Myokardnarbe und das Gewebe der Infarktzone noch sehr fragil (Richardson et al., 2015). Vor diesem Hintergrund könnte ein erhöhter Anteil der N2B-Isoform eine zusätzliche Stabilisierung des Myokards bewirken, um die mechanische Integrität des Herzens aufrechtzuerhalten.

5.1.2.2 Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs

Für TGF- β 1 existieren intrazellulär verschiedene Signalwege, die sich hauptsächlich in SMAD-abhängige und SMAD-unabhängige Signalwege, wie den PI3K-AKT-Signalweg, unterteilen lassen (Shi und Massague, 2003; Derynck und Zhang, 2003). Da Krüger et al. 2008 und 2010 zeigen konnten, dass die Beschleunigung des Titinisoformen-*Switches* in ERC durch Insulin und Triiodthyronin über den PI3K-AKT-Signalweg vermittelt wird, wurde für diese Arbeit die Hypothese untersucht, ob auch TGF- β 1 die Isoformenzusammensetzung über diesen Signalweg beeinflusst. In der Untersuchung von ERC unter 30-minütiger TGF- β 1-Stimulation konnte eine signifikante Aktivierung von AKT beobachtet werden, sodass in der Tat zu schlussfolgern ist, dass TGF- β 1 den Isoformen-*Switch* über den PI3K-AKT-Signalweg beschleunigt. Im Gegensatz zu Krüger et al., die in ihrer Arbeit auch eine AKT-

vermittelte Aktivierung des Spleißfaktors *mammalian target of rapamycin* (mTOR) feststellen konnten, zeigte sich in der aktuellen Arbeit unter TGF- β 1-Stimulation keine vermehrte Phosphorylierung von mTOR. Es wird postuliert, dass AKT auch weitere alternative Spleißregulatoren und Zellkernpromotoren aktiviert, die das Spleißen der Titin-mRNA kontrollieren (Krüger et al., 2010; Blaustein et al., 2005). Hierbei könnte auch das Protein *RNA-binding motif 20* (RBM20) eine Rolle spielen, da es als bekannter Spleißfaktor der Titinisoformen gilt und festgestellt werden konnte, dass das RBM20-Gen eines der Zielgene des TGF- β 1-Signalwegs darstellt (Banerjee et al., 2015).

5.1.3 Die Titin-abhängige passive Steifigkeit und die kardiale Pumpfunktion

Insgesamt lässt sich durch die erhöhte Phosphorylierung der N2Bus-Region vermuten, dass unter kurzfristiger TGF- β 1-Stimulation die Titin-abhängige passive Steifigkeit gesenkt werden könnte, während langfristige Stimulationen über den Isoformen-Switch diese erhöhen könnten. Es stellt sich die Frage, inwiefern dadurch die Pumpfunktion des Herzens beeinflusst wird und ob die TGF- β 1-vermittelte Wirkung auch in Hinblick auf pharmakologische Interventionen wünschenswert ist. Insgesamt zeigt die Studienlage, dass die Gesamtsteifigkeit des Herzens nach einem Myokardinfarkt zunimmt, um die erhöhten endsystolischen Füllvolumina, die sich durch die eingeschränkte linksventrikuläre Funktion aufgrund des Untergangs von Kardiomyozyten ergeben, weiterhin adäquat auszuwerfen (Sutton und Sharpe, 2000; Talman und Ruskoaho, 2016). Über die Erhöhung der passiven Titinsteifigkeit kann Titin nicht nur das remote Myokard vor Überdehnung schützen, sondern unterstützt die Pumpfunktion auch durch seine Funktion als Initiator der längenabhängigen Sarkomeraktivierung und sorgt damit für die strukturelle Sarkomerintegrität (Kötter et al., 2016; Cazorla et al., 2000). Kötter et. al zeigten, dass die Titin-vermittelte passive Steifigkeit über Hyperphosphorylierung der PEVK- sowie Hypophosphorylierung der N2Bus-Region nach I/R und auch drei Tage nach Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* ansteigt, während sie nach 10 Tagen wieder abnimmt (Kötter et al., 2016). Da nach der Proliferations- und Reparaturphase einige Tage bis Wochen nach dem Myokardinfarkt die kollagenbasierte Narbe gebildet ist, kann vermutet werden, dass die titinvermittelte passive Steifigkeit zu späteren Zeitpunkten nicht mehr benötigt wird. Vor diesem Hintergrund wäre die TGF- β 1-vermittelte erhöhte Phosphorylierung der N2Bus-Region eher von Nachteil für die Titin-basierte Aufrechterhaltung der

linksventrikulären Funktion. Die Beschleunigung des Isoformen-Switches könnte allerdings vorteilhaft sein und die Infarktnarbe stabilisieren. Anhaltend hohe TGF- β 1-Level führen jedoch auch zu Herzhypertrophie und Fibrosierung und schränken damit langfristig die Pumpfunktion des Herzens ein, was letztlich in einer Herzinsuffizienz mündet (Rosenkranz et al., 2002; Roger, 2013). Ein über Wochen und Monate nach einem Myokardinfarkt anhaltend erhöhter Anteil der steiferen N2B-Isoform würde zu diesem Problem beitragen, weshalb das Isoformenverhältnis auch unter mehrwöchigen TGF- β 1-Stimulationen untersucht werden sollte. Hieraus könnten auch Erkenntnisse für mögliche pharmakologische Interventionen gewonnen werden, wie etwa einer zeitlich begrenzten Blockade von TGF- β 1, um die verschiedenen mechanischen Anforderungen der postischämischen Phasen einzubeziehen.

5.1.4 Pharmakologische Perspektiven im Kontext der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit

Zwar ist TGF- β 1 physiologisch ein essenzielles Zytokin für die Entwicklung und Funktion von Kardiomyozyten und -fibroblasten, jedoch führen die pathologisch erhöhten TGF- β 1-Level nach einem Myokardinfarkt im Zuge von vermehrtem Gewebeschaden und erhöhter Fibrosierung zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion (Vilahur et al., 2011; Rainer et al., 2014; Liang et al., 2018). Die Untersuchung der Auswirkungen von postischämisch hochregulierten Zytokinen wie TGF- β 1 auf die Herzfunktion sind Bestandteil aktueller Forschung und bieten vielversprechende Ansatzpunkte für pharmakologische Interventionen. So konnten Tan et al. mittels eines löslichen TGF- β -Rezeptors in einem Myokardinfarktmodell bei der Ratte eine signifikante Reduktion der Fibrosierung, Hypertrophie und systolischen Dysfunktion zeigen (Tan et al., 2010). Bemerkenswert ist jedoch, dass die Auswirkungen einer TGF- β -Inhibition in einem zeitlichen Zusammenhang stehen. So führte eine Inhibition innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion und zu einer erhöhten Mortalität, während eine spätere Blockade die Herzleistung verbesserte und die Hypertrophie durch verminderte Kollagenablagerung reduzierte (Ikeuchi et al., 2004). Es wird vermutet, dass die initiale antiinflammatorische Wirkung von TGF- β 1 kardioprotektiv ist, während die profibrotische Eigenschaft die kardiale Dysfunktion fördert, was die Pleiotropie des Zytokins unterstreicht (Flores-Vergara et al., 2021). Auch Okada et al. konnten eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion

feststellen, wenn der lösliche TGF- β -Rezeptor erst drei Tage nach anhaltender Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* durchgeführt wurde (Okada et al., 2005). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte eine pharmakologische Intervention mit löslichen TGF- β -Rezeptoren zeitabhängig erfolgen, was sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegelt. Durch die hier nachgewiesenen Signalwege könnte unter Beachtung der pleiotropen Wirkungen des Zytokins auch eine gezieltere Modulation von Proteinen innerhalb der TGF- β 1-Signalkaskade - wie ERK1/2 oder AKT - eine Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention darstellen. Hierfür sind weitere Studien notwendig, um das maladadaptive postischämische *remodeling* zu beeinflussen und die kardiale Funktion zu verbessern.

5.2 Der Interleukin-6-vermittelte Einfluss auf die Titindegradation

5.2.1 Die Protein-Qualitäts-Kontrolle nach Myokardinfarkt

Der hypoxieinduzierte Zelluntergang im ischämischen Areal und der daraus resultierende, erhöhte mechanische Stress auf die Kardiomyozyten im nicht-ischämischen (*remote*) Myokard führen zu einer Aktivierung der Protein-Qualitäts-Kontrollsysteme wie der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems, um die zelluläre Homöostase und damit die kardiale Pumpfunktion aufrechtzuerhalten (Sciarretta et al., 2018; Dong et al., 2018). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Ischämie/Reperfusion (I/R) zu einer Titin-vermittelten Versteifung der Myofilamente im nicht-ischämischen Areals führt, wobei vermutet wird, dass dadurch die Mehrarbeit des überlebenden Myokards ermöglicht und der Ventrikel stabilisiert wird (Kötter et al., 2016; Funk et al., 2022). Aufgrund dieser postischämischen Umbauprozesse werden die oben genannten Degradationsmechanismen aktiviert, wobei Titin eines der ersten Proteine darstellt, die dem Abbau unterliegen, da es insbesondere aufgrund seiner enormen Größe anfällig für die Degradation ist (Hein et al., 1994). Kötter et. al konnten darlegen, dass die proteasomale Gesamtaktivität im *remote* Myokard innerhalb der frühen postischämischen Phase zunahm und auch einen erhöhten Titinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System umfasste (Kötter et al., 2016). Hierbei zeigte sich ein Anstieg der für den proteasomalen Abbau typischen K48-Titinubiquitinierung und auch der Proteasomaktivität im *remote* Myokard, insbesondere innerhalb der ersten drei Tage nach Myokardinfarkt, während diese nach zehn Tagen wieder abnahm. Kötter et. al stellten jedoch auch eine Akkumulation

von K48-ubiquitiniertem Titin fest, was darauf hindeutet, dass die erhöhte Proteasomaktivität für die Anzahl an abzubauenen Titinmolekülen nicht ausreichend oder auch qualitativ dysfunktional war (Kötter et al., 2016). Interleukin-6 wird als proinflammatorisches Zytokin innerhalb der ersten 72 Stunden nach Myokardinfarkt verstärkt freigesetzt und könnte an der Aktivierung der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sein. Eine Autophagieinduktion durch Interleukin-6 wurde bereits in Tumorzellen sowie in den insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas nachgewiesen (Gwechenberger et al., 1999; Katheder et al., 2017; Linnemann et al., 2017). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit im Zellkulturmodell embryonaler Rattenkardiomyozyten (ERC) der Einfluss des Zytokins IL-6 auf die Titindegradation über das autophagolysosomale System untersucht. IL-6 kommt auch eine bedeutende Rolle im frühen kardialen *remodeling* zu, da es nachgewiesen zu einer Erhöhung der passiven Titinsteifigkeit über Phosphorylierung der PEVK-Region führt (Kötter et al., 2016). Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Interleukin-6-abhängigen Mechanismen der Titindegradation im Arbeitsmyokard zu verstehen und mögliche Einflüsse des Titinabbaus auf die postischämische kardiale Funktion abzuschätzen.

5.2.2 Effekte von Interleukin-6 auf die Autophagiemarker

Zur Untersuchung des Einflusses von Interleukin-6 auf die Autophagieaktivität wurden der Phosphorylierungsstatus von mTOR und AMPK, sowie die Proteinlevel von p62/SQSTM1 und LC3-II nach 30-minütiger IL-6 Stimulation in ERC am 7. Kultivierungstag analysiert. Die signifikante STAT3-Erhöhung bestätigte die erfolgreiche Induktion der IL-6-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion. Für mTOR ergab sich eine signifikant verminderte Phosphorylierung, während die AMPK zwar nicht signifikant, aber tendenziell vermehrt phosphoryliert wurde. Beide Proteine können die zentrale Autophagie-induzierende *uncoordinated-51 like kinase* (ULK1) an unterschiedlichen Stellen phosphorylieren und gelten damit als Regulatorproteine der Autophagie. Dabei führt eine vermehrte AMPK-Phosphorylierung zu einer Autophagieinduktion und eine erhöhte mTOR-Phosphorylierung zu einer Autophagieinhibition (Kim et al., 2011b). Die durch die IL-6 Behandlung verminderte mTOR-vermittelte Autophagieinhibition sowie die tendenziell erhöhte AMPK-vermittelte Autophagieaktivierung deuten auf eine Induktion der Autophagie unter IL-6-Einfluss hin. Dies deckt sich mit einer Studie von Linnemann et. al., die in

pankreatischen Betazellen in Zellkultur und in vivo eine Autophagieinduktion durch IL6-vermittelte AMPK-Aktivierung und mTOR-Inhibierung beschreiben (Linnemann et al., 2017). In Skelettmuskelzellen konnte unter Tumor-induzierter Kachexie ebenfalls eine mTOR-Inhibierung durch IL-6-vermittelte AMPK-Aktivierung gezeigt werden (White et al., 2013). Für Kardiomyozyten ist bekannt, dass die postischämische Inflammationsphase, bei der IL-6 als proinflammatorisches Zytokin eine maßgebliche Rolle spielt, zu einer Aktivierung von AMPK führt und eine Rolle in der Protektion des Herzens vor Ischämie- und Reperfusionsschäden sowie Zelltod spielt (Kim et al., 2011a; Qi und Young, 2015; Matsui et al., 2007). Bei der Analyse der p62/SQSTM1-Level zeigte sich jedoch eine signifikante Akkumulation in den IL-6-stimulierten Zellen, was zunächst in Widerspruch zu der vermuteten Autophagieinduktion steht, da p62/SQSTM1 akkumuliert, wenn es nicht als Adapterprotein in das Autophagosom eingebaut wird (Bjorkoy et al., 2009; Hale et al., 2013). Über p62/SQSTM1 existiert jedoch auch eine intersystemische Querverbindung zum Ubiquitin-Proteasom-System und kann Substrate, inklusive Titin, auch dem proteasomalen Abbau zuführen (Seibenhener et al., 2007; Thrower et al., 2000). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Myokardischämie aufgrund einer Überladung des Proteasoms mit zu degradierenden Zellbestandteilen und durch Oxidationsprozesse am Proteasom selbst zu einer Dysregulation desjenigen führt und durch den Funktionsverlust mehr ubiquitinierte Proteine in der Zelle akkumulieren (Powell et al., 2005; Bulteau et al., 2001). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Autophagieaktivität zunimmt, wenn es zu einem Funktionsverlust des Proteasoms kommt, was auch einhergeht mit der beobachteten gesteigerten Autophagieaktivität nach einem Myokardinfarkt (Matsui et al., 2007; Gustafsson und Gottlieb, 2008; Zheng et al., 2011). Es wird somit postuliert, dass Zellen über diesen Mechanismus versuchen, den Funktionsverlust des Proteasoms auszugleichen (Zheng et al., 2011). Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die erhöhten p62/SQSTM1-Level darstellen, da unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass der p62/SQSTM1-Proteingehalt nach Inhibition des Proteasoms deutlich anstieg (Müller et al., 2021). Zukünftige Projekte werden zeigen, ob IL-6 in Kardiomyozyten auch direkt die proteasomale Aktivität beeinflusst. Zusätzlich sollten weitere Autophagiemarker wie Beclin-1 untersucht werden, das als Bestandteil des III-PI3K-Komplexes bei Autophagieinduktion auch direkt durch die AMPK phosphoryliert werden und die Autophagie verstärken kann (Zhang et al., 2016; Chan, 2012). Bezüglich der LC3-II-Proteinlevel zeigte sich kein Unterschied zwischen den

Kontroll- und den stimulierten Zellen. In Betazellen des Pankreas zeigten sich neben der IL6-abhängigen Autophagieinduktion auch erhöhte LC3-II-Level, jedoch erst nach Stimulation über eine Stunde (Linnemann et al., 2017). Dies könnte eine Erklärung darstellen, weshalb die Messung in dieser Arbeit nach 30-minütiger Stimulation noch keine Unterschiede zeigte. Zudem wurden die LC3-II-Proteinleveln in der vorliegenden Arbeit über das *Western Blot*-Verfahren bestimmt. Die Interpretation der gemessenen Proteinlevel ist bei dieser Methode jedoch zweideutig. Einige Studien vermuten, dass bei aktivierter Autophagie aufgrund des höheren Bedarfs an Autophagosomen mehr LC3-II gebildet wird, während ebenfalls angenommen werden kann, dass es bei vermehrt aktiver Autophagie auch zu einer erhöhten Degradation des an der inneren Autophagosomenmembran lokalisierten LC3-II kommt (Tanida et al., 2008; Shibutani und Yoshimori, 2014). Um die LC3-II-Level diesbezüglich differenzierter zu betrachten, sollte in weiterführenden Studien zusätzlich zu der hier verwendeten Methode ein *flux assay* mit einem Autophagieinhibitor wie Chloroquin durchgeführt werden, um eine Schlussfolgerung bezüglich eines IL-6-Effekts treffen zu können (Klionsky et al., 2021).

Zusammengefasst lässt sich unter IL-6-Stimulation in ERC eine tendenzielle Induktion der Autophagie feststellen, was sich am Phosphorylierungsstatus der Regulatorproteine widerspiegelt und auch einhergeht mit der in der Literatur beschriebenen generell erhöhten Autophagieaktivität nach einem Myokardinfarkt (Matsui et al., 2007; Sciarretta et al., 2012). Vor dem Hintergrund, dass viele Studien gezeigt haben, dass eine experimentelle Autophagieinduktion im Kontext der Myokardischämie einen protektiven Einfluss auf das Herz hat und zusätzlich auch die Infarktgröße reduzieren kann, wäre die hier gezeigte Tendenz der Autophagieinduktion unter IL-6-Stimulation wünschenswert (Mizushima und Komatsu, 2011; Choi et al., 2013; Kroemer und Piacentini, 2015; Mo et al., 2016). Der unter IL-6-Stimulation erhöhte p62/SQSTM1-Proteingehalt sowie die unveränderten LC3-II-Level können unter den oben genannten Bedingungen erklärbar sein, erfordern jedoch eine Erweiterung der angewendeten Methodik und die Untersuchung weiterer Autophagiemarkers.

5.2.3 Interleukin-6 beeinflusst nicht die K63-abhängige Titinubiquitinierung

Eine Polyubiquitinierung am Lysinrest K63 stellt ein Signal für einen Abbau des Titinmoleküls über das autophagosomale System dar (Barriere et al., 2007). Dabei

bedingt eine Autophagieinhibition eine Akkumulation von K63-ubiquitinierten Molekülen, während es durch eine Autophagieinduktion zu einem vermehrten Abbau der K63-ubiquitinierten Titinmoleküle kommt (Salcan et al., 2020). Nach 30-minütiger Stimulation der ERC mit IL-6 zeigten sich in der vorliegenden Arbeit dagegen keine Unterschiede in der K63-Ubiquitinierung zwischen Kontroll- und stimulierten Zellen. Kötter et. al konnten im Tiermodell bereits beobachten, dass es unter dreitägiger permanenter Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* zu einem starken Anstieg von polyubiquitiniertem Titin kam (Kötter et al., 2016). Angesichts der in der Literatur beschriebenen IL-6-vermittelten Aktivierung der Autophagie und der oben erwähnten Ergebnisse der Autophagiemarker wäre eine Reduktion der K63-ubiquitinierten Titinmoleküle erwartet worden, da diese einem verstärkten Abbau über das Autophagie-System unterliegen sollten. Ein Grund für das Ausbleiben der erwarteten K63-Ubiquitinierung könnte ein zu kurzer Beobachtungszeitraum sein. Da die IL6-Applikation in dieser Arbeit lediglich über 30 Minuten erfolgte, für das Zytokin aber auch erhöhte Plasmalevel bis zu 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt beschrieben sind, könnte in zukünftigen Studien die K63-abhängige Polyubiquitinierung unter einer längerfristigen IL-6-Stimulation analysiert werden (Müller et al., 2014).

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Entwicklung pharmakologischer Interventionen zur Verbesserung des *Outcomes* von Myokardinfarktpatienten erfordert ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen adaptiven Reaktionen des Myokards, die zur Aufrechterhaltung der Funktion des Ventrikels auftreten. Hierzu liefert die vorliegende Arbeit mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse über die Einflüsse der postischämisch hochregulierten Zytokine TGF- β 1 und IL-6 auf verschiedene Titinmodifikationen erste Anhaltspunkte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die N2Bus-Region durch Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs vermehrt phosphorylieren kann, was mit einer Verminderung der titinabhängigen passiven Steifigkeit assoziiert ist (Krüger et al., 2009). Ferner ergaben langfristige TGF- β 1-Stimulationen über eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs eine Beschleunigung des Isoformen-*Switches* ab dem 7. Kultivierungstag, wodurch die passive Steifigkeit langfristig erhöht wäre (Krüger et al., 2008). Diese Signalwege könnten Ziele für pharmakologische Interventionen darstellen. In zukünftig durchgeführten Experimenten sollten aktive

Kraftmessungen an isolierten Kardiomyozyten unter TGF- β 1-Stimulation erfolgen. So könnte untersucht werden, ob sich die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse der TGF- β 1-vermittelten Titinmodifikationen auch physikalisch in einer Veränderung der myokardialen Kraftantwort widerspiegeln. Hierbei könnten auch pharmakologische Modulationen an ERK1/2 oder AKT erfolgen und Auswirkungen auf die passive Steifigkeit ermittelt werden. Zusätzlich durchgeführte TGF- β 1-Stimulationen und Kraftmessungen von Kardiomyozyten im Zellverbund, wie beispielsweise des gesamten Herzens im Klein- oder Großtiermodell, könnten zudem eine bessere Translation der Erkenntnisse auf das menschliche Herz erlauben.

Die Ergebnisse des IL-6 Einflusses auf die Titindegradation über das autophagolysosomale System in ERC ergaben eine Induktion der Autophagie über eine tendenziell vermehrte Aktivierung der autophagieinduzierenden AMP-Kinase sowie über eine verminderte Aktivität des autophagiehemmenden mTOR-Proteins. IL-6 wird als proinflammatorisches Zytokin in der postischämischen Inflammationsphase freigesetzt, wirkt autophagieinduzierend und ist in der Lage, die titinabhängige passive Steifigkeit zu erhöhen (Gwechenberger et al., 1999; Linnemann et al., 2017; Katheder et al., 2017; Kötter et al., 2016). Diese Induktion spiegelte sich jedoch nicht direkt in den Autophagiemarkern wider. Die Proteinlevel von LC3-II blieben unverändert, was jedoch über eine Erweiterung der Methodik erneut überprüft werden sollte. Der erhöhte p62/SQSTM-1-Proteingehalt deutete zunächst auf eine Autophagieinhibition hin, könnte aber auch durch eine gehemmte Proteasomaktivität erklärbar sein, die nach einem Myokardinfarkt dysfunktional ist (Powell et al., 2005; Bulteau et al., 2001; Müller et al., 2021). Zur Überprüfung dieser Hypothese kann in einem Anschlussprojekt die Proteasomaktivität in ERC unter IL-6-Stimulation mittels eines Proteasom Assays über die Trypsin-like-, Chymotrypsin-like- und Caspase-like-Aktivitäten gemessen werden. Insgesamt spiegelte sich die nach 30-minütiger IL6-Stimulation tendenzielle Autophagieinduktion nicht in einer erhöhten K63-abhängigen Polyubiquitinierung am Titinmolekül wider. Da IL-6 jedoch bis zu 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt hochreguliert ist, sollten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente unter längerfristigen IL-6-Stimulationen wiederholt werden.

Zusammengefasst zeigen die Experimente dieser Arbeit, dass TGF- β 1 über den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K-AKT-Signalweg Titinmodifikationen in der N2Bus-

Region vornehmen und den Isoformen-*Switch* beschleunigen kann. Bezüglich der Autophagie zeigte sich eine tendenzielle IL-6-vermittelte Autophagieinduktion ohne Einfluss auf die K63-abhängige Polyubiquitinierung. Diese Ergebnisse bieten Grundlagen für weitere Experimente und tragen zum Verständnis der Rolle von Titin beim ventrikulären *remodeling* in der Akutphase nach einem Myokardinfarkt und seinem Einfluss auf die Herzfunktion bei.

6 Literaturverzeichnis

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2015. *Cellular and molecular immunology*, United States, Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier, c2010.
- 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.
- ALI, M. A., CHO, W. J., HUDSON, B., KASSIRI, Z., GRANZIER, H. & SCHULZ, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- ANDERSON, B. R., BOGOMOLOVAS, J., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2010. The effects of PKC α phosphorylation on the extensibility of titin's PEVK element. *J Struct Biol*, 170, 270-7.
- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- ARSLAN, F., DE KLEIJN, D. P. & PASTERKAMP, G. 2011. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*, 8, 292-300.
- BANERJEE, I., CARRION, K., SERRANO, R., DYU, J., SASIK, R., LUND, S., WILLEMS, E., ACEVES, S., MEILI, R., MERCOLA, M., CHEN, J., ZAMBON, A., HARDIMAN, G., DOHERTY, T. A., LANGE, S., DEL ALAMO, J. C. & NIGAM, V. 2015. Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf- β signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 79, 133-44.
- 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.
- BARRIERE, H., NEMES, C., DU, K. & LUKACS, G. L. 2007. Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell*, 18, 3952-65.
- BJORKOY, G., LAMARK, T., PANKIV, S., OVERVATN, A., BRECH, A. & JOHANSEN, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- BLAUSTEIN, M., PELISCH, F., TANOS, T., MUNOZ, M. J., WENGIER, D., QUADRANA, L., SANFORD, J. R., MUSCHIETTI, J. P., KORNBLIHTT, A. R., CACERES, J. F., COSO, O. A. & SREBROW, A. 2005. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 1037-44.
- BOGOMOLOVAS, J., FLEMING, J. R., FRANKE, B., MANSO, B., SIMON, B., GASCH, A., MARKOVIC, M., BRUNNER, T., KNOLL, R., CHEN, J., LABEIT, S., SCHEFFNER, M., PETER, C. & MAYANS, O. 2021. Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep*, 22, e48018.
- BOGOMOLOVAS, J., GASCH, A., SIMKOVIC, F., RIGDEN, D. J., LABEIT, S. & MAYANS, O. 2014. Titin kinase is an inactive pseudokinase scaffold that supports MuRF1 recruitment to the sarcomeric M-line. *Open Biol*, 4, 140041.
- BONALDO, P. & SANDRI, M. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*, 6, 25-39.
- 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.
- BRODIE, B. R., STUCKEY, T. D., WALL, T. C., KISSLING, G., HANSEN, C. J., MUNCY, D. B., WEINTRAUB, R. A. & KELLY, T. A. 1998. Importance of time to reperfusion for 30-day and late survival and recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 32, 1312-9.
- BULTEAU, A. L., LUNDBERG, K. C., HUMPHRIES, K. M., SADEK, H. A., SZWEDA, P. A., FRIGUET, B. & SZWEDA, L. I. 2001. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem*, 276, 30057-63.
- BUNDESAMTSTATISTIK 2021. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2021. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
- 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.
- CELADA, A. & MAKI, R. A. 1992. Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol*, 148, 1102-5.
- CHAN, E. Y. 2012. Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxid Redox Signal*, 17, 775-85.
- CHEN, S., ZHOU, L., ZHANG, Y., LENG, Y., PEI, X. Y., LIN, H., JONES, R., ORLOWSKI, R. Z., DAI, Y. & GRANT, S. 2014. Targeting SQSTM1/p62 induces cargo loading failure and converts autophagy to apoptosis via NBK/Bik. *Mol Cell Biol*, 34, 3435-49.
- CHOI, A. M., RYTER, S. W. & LEVINE, B. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*, 368, 1845-6.
- COHN, J. N., FERRARI, R. & SHARPE, N. 2000. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 35, 569-82.
- COULIS, G., BECILA, S., HERRERA-MENDEZ, C. H., SENTANDREU, M. A., RAYNAUD, F., RICHARD, I., BENYAMIN, Y. & OUALI, A. 2008. Calpain 1 binding capacities of the N1-line region of titin are significantly enhanced by physiological concentrations of calcium. *Biochemistry*, 47, 9174-83.
- CUCORANU, I., CLEMPUS, R., DIKALOVA, A., PHELAN, P. J., ARIYAN, S., DIKALOV, S. & SORESCU, D. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*, 97, 900-7.
- DA SILVA LOPES, K., PIETAS, A., RADKE, M. H. & GOTTHARDT, M. 2011. Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres. *J Cell Biol*, 193, 785-98.
- DAVIES, M. J., WOOLF, N. & ROBERTSON, W. B. 1976. Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi. *Br Heart J*, 38, 659-64.
- DERYNCK, R. & ZHANG, Y. E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, 577-84.

- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DIBBLE, C. C. & CANTLEY, L. C. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*, 25, 545-55.
- DOBACZEWSKI, M., BUJAK, M., ZYMEK, P., REN, G., ENTMAN, M. L. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2006. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res*, 324, 475-88.
- DOBACZEWSKI, M., CHEN, W. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2011. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 600-6.
- DONG, Z., CHU, G., SIMA, Y. & CHEN, G. 2018. Djhs90s are crucial regulators during planarian regeneration and tissue homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 498, 723-728.
- DUPONT, N. & CODOGNO, P. 2016. Autophagy transduces physical constraints into biological responses. *Int J Biochem Cell Biol*, 79, 419-426.
- EGAN, D., KIM, J., SHAW, R. J. & GUAN, K. L. 2011. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, 7, 643-4.
- FENG, Y., HE, D., YAO, Z. & KLIONSKY, D. J. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24, 24-41.
- FLORES-VERGARA, R., OLMEDO, I., ARANGUIZ, P., RIQUELME, J. A., VIVAR, R. & PEDROZO, Z. 2021. Communication Between Cardiomyocytes and Fibroblasts During Cardiac Ischemia/Reperfusion and Remodeling: Roles of TGF-beta, CTGF, the Renin Angiotensin Axis, and Non-coding RNA Molecules. *Front Physiol*, 12, 716721.
- FRAMPTON, J., ORTENGREN, A. R. & ZEITLER, E. P. 2023. Arrhythmias After Acute Myocardial Infarction. *Yale J Biol Med*, 96, 83-94.
- FRANGOGIANNIS, N. G. 2012. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, 110, 159-73.
- FRANGOGIANNIS, N. G. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, 11, 255-65.
- FRANGOGIANNIS, N. G., MENDOZA, L. H., LINDSEY, M. L., BALLANTYNE, C. M., MICHAEL, L. H., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. 2000. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol*, 165, 2798-808.
- FRANGOGIANNIS, N. G., REN, G., DEWALD, O., ZYMEK, P., HAUDEK, S., KOERTING, A., WINKELMANN, K., MICHAEL, L. H., LAWLER, J. & ENTMAN, M. L. 2005. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*, 111, 2935-42.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- FRENCH, B. A. & KRAMER, C. M. 2007. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech*, 4, 185-196.
- FUNK, F., KRONENBITTER, A., ISIC, M., FLOCKE, V., GORRESSEN, S., SEMMLER, D., BRINKMANN, M., BECK, K., STEINHOFF, O., SRIVASTAVA, T., BARBOSA,

- D. M., VOIGT, K., WANG, L., BOTTERMANN, K., KOTTER, S., GRANDOCH, M., FLOGEL, U., KRUGER, M. & SCHMITT, J. P. 2022. Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 173, 47-60.
- FÜRST, 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.
- GATICA, D., CHIONG, M., LAVANDERO, S. & KLIONSKY, D. J. 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ Res*, 116, 456-67.
- GERHARTZ, C., HEESEL, B., SASSE, J., HEMMANN, U., LANDGRAF, C., SCHNEIDER-MERGENER, J., HORN, F., HEINRICH, P. C. & GRAEVE, L. 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*, 271, 12991-8.
- GHIGO, A., FRANCO, I., MORELLO, F. & HIRSCH, E. 2014. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*, 102, 270-80.
- GRANZIER, H. L. & IRVING, T. C. 1995. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, 68, 1027-44.
- 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.
- GRÜTZNER, A., GARCIA-MANYES, S., KÖTTER, S., BADILLA, C. L., FERNANDEZ, J. M. & LINKE, W. A. 2009. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, 97, 825-34.
- GUO, W., SCHAFER, S., GREASER, M. L., RADKE, M. H., LISS, M., GOVINDARAJAN, T., MAATZ, H., SCHULZ, H., LI, S., PARRISH, A. M., DAUKSAITE, V., VAKEEL, P., KLAASSEN, S., GERULL, B., THIERFELDER, L., REGITZ-ZAGROSEK, V., HACKER, T. A., SAUPE, K. W., DEC, G. W., ELLINOR, P. T., MACRAE, C. A., SPALLEK, B., FISCHER, R., PERROT, A., OZCELIK, C., SAAR, K., HUBNER, N. & GOTTHARDT, M. 2012. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nat Med*, 18, 766-73.
- GUSTAFSSON, A. B. & GOTTLIEB, R. A. 2008. Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion. *Autophagy*, 4, 416-21.
- GWECHENBERGER, M., MENDOZA, L. H., YOUKER, K. A., FRANGOIANNIS, N. G., SMITH, C. W., MICHAEL, L. H. & ENTMAN, M. L. 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99, 546-51.
- HALE, A. N., LEDBETTER, D. J., GAWRILUK, T. R. & RUCKER, E. B., 3RD 2013. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*, 9, 951-72.
- HAMDANI, N., BISHU, K. G., VON FRIELING-SALEWSKY, M., REDFIELD, M. M. & LINKE, W. A. 2013. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res*, 97, 464-71.

- HANSEN, M., RUBINSZTEIN, D. C. & WALKER, D. W. 2018. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 579-593.
- HATA, A. & CHEN, Y. G. 2016. TGF-beta Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- HEIDT, T., COURTIÉS, G., DUTTA, P., SAGER, H. B., SEBAS, M., IWAMOTO, Y., SUN, Y., DA SILVA, N., PANIZZI, P., VAN DER LAAN, A. M., SWIRSKI, F. K., WEISSLEDER, R. & NAHRENDORF, M. 2014. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res*, 115, 284-95.
- HEIN, S., SCHOLZ, D., FUJITANI, N., RENNOLLET, H., BRAND, T., FRIEDL, A. & SCHAPER, J. 1994. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 26, 1291-306.
- 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.
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABELIT, 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., LABELIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKIIdelta) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HORNBECK, P. V., ZHANG, B., MURRAY, B., KORNHAUSER, J. M., LATHAM, V. & SKRZYPEK, E. 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res*, 43, D512-20.
- HOROWITS, R., MARUYAMA, K. & PODOLSKY, R. J. 1989. Elastic Behavior of Connectin Filaments during Thick Filament Movement in Activated Skeletal-Muscle. *Journal of Cell Biology*, 109, 2169-2176.
- HUXLEY, H. & HANSON, J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173, 973-6.
- HUXLEY, H. E. & HANSON, J. 1959. The structural basis of the contraction mechanism in striated muscle. *Ann N Y Acad Sci*, 81, 403-8.
- IKEUCHI, M., TSUTSUI, H., SHIOMI, T., MATSUSAKA, H., MATSUSHIMA, S., WEN, J., KUBOTA, T. & TAKESHITA, A. 2004. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res*, 64, 526-35.
- IMADA, K. & LEONARD, W. J. 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*, 37, 1-11.
- IMPROTA, S., POLITOU, A. S. & PASTORE, A. 1996. Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure*, 4, 323-37.
- JENCA, D., MELENOVSKY, V., STEHLIK, J., STANEK, V., KETTNER, J., KAUTZNER, J., ADAMKOVA, V. & WOHLFAHRT, P. 2021. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail*, 8, 222-237.
- JOHNSON, G. L. & LAPADAT, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 1911-2.
- JONES, S. A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175, 3463-8.

- KALOGERIS, T., BAINES, C. P., KRENZ, M. & KORTHUIS, R. J. 2016. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*, 7, 113-170.
- KATHEDER, N. S., KHEZRI, R., O'FARRELL, F., SCHULTZ, S. W., JAIN, A., RAHMAN, M. M., SCHINK, K. O., THEODOSSIOU, T. A., JOHANSEN, T., JUHASZ, G., BILDER, D., BRECH, A., STENMARK, H. & RUSTEN, T. E. 2017. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature*, 541, 417-420.
- KAYE, D. M., LEFKOVITS, J., JENNINGS, G. L., BERGIN, P., BROUGHTON, A. & ESLER, M. D. 1995. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*, 26, 1257-63.
- KIM, A. S., MILLER, E. J., WRIGHT, T. M., LI, J., QI, D., ATSINA, K., ZAHA, V., SAKAMOTO, K. & YOUNG, L. H. 2011a. A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 24-32.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011b. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-54.
- KITAMURA, M. 1997. Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. *J Immunol*, 159, 1404-11.
- KLIONSKY, D. J., ABDEL-AZIZ, A. K., ABDELFATAH, S., ABDELLATIF, M., ABDOLI, A., ABEL, S., ABELIOVICH, H., ABILDGAARD, M. H., ABUDU, Y. P., ACEVEDO-AROZENA, A., ADAMOPOULOS, I. E., ADELI, K., ADOLPH, T. E., ADORNETTO, A., AFLAKI, E., AGAM, G., AGARWAL, A., AGGARWAL, B. B., AGNELLO, M., AGOSTINIS, P., AGREWALA, J. N., AGROTIS, A., AGUILAR, P. V., AHMAD, S. T., AHMED, Z. M., AHUMADA-CASTRO, U., AITS, S., AIZAWA, S., AKKOC, Y., AKOUMIANAKI, T., AKPINAR, H. A., AL-ABD, A. M., AL-AKRA, L., AL-GHARAIBEH, A., ALAOUI-JAMALI, M. A., ALBERTI, S., ALCOCER-GOMEZ, E., ALESSANDRI, C., ALI, M., ALIM AL-BARI, M. A., ALIWAINI, S., ALIZADEH, J., ALMACELLAS, E., ALMASAN, A., ALONSO, A., ALONSO, G. D., ALTAN-BONNET, N., ALTIERI, D. C., ALVAREZ, E. M. C., ALVES, S., ALVES DA COSTA, C., ALZAHARNA, M. M., AMADIO, M., AMANTINI, C., AMARAL, C., AMBROSIO, S., AMER, A. O., AMMANATHAN, V., AN, Z., ANDERSEN, S. U., ANDRABI, S. A., ANDRADE-SILVA, M., ANDRES, A. M., ANGELINI, S., ANN, D., ANOZIE, U. C., ANSARI, M. Y., ANTAS, P., ANTEBI, A., ANTON, Z., ANWAR, T., APETOH, L., APOSTOLOVA, N., ARAKI, T., ARAKI, Y., ARASAKI, K., ARAUJO, W. L., ARAYA, J., ARDEN, C., AREVALO, M. A., ARGUELLES, S., ARIAS, E., ARIKKATH, J., ARIMOTO, H., ARIOSIA, A. R., ARMSTRONG-JAMES, D., ARNAUNE-PELLOQUIN, L., AROCA, A., ARROYO, D. S., ARSOV, I., ARTERO, R., ASARO, D. M. L., ASCHNER, M., ASHRAFIZADEH, M., ASHUR-FABIAN, O., ATANASOV, A. G., AU, A. K., AUBERGER, P., AUNER, H. W., AURELIAN, L., et al. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17, 1-382.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KOROLCHUK, V. I., MANSILLA, A., MENZIES, F. M. & RUBINSZTEIN, D. C. 2009a. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell*, 33, 517-27.

- KOROLCHUK, V. I., MENZIES, F. M. & RUBINSZTEIN, D. C. 2009b. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy*, 5, 862-3.
- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*, 286, 2240-2260.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MULLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GODECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRUGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KÖTTER, S. & KRÜGER, M. 2022. Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Front Physiol*, 13, 914296.
- KRAMER, C. M., LIMA, J. A., REICHEK, N., FERRARI, V. A., LLANERAS, M. R., PALMON, L. C., YEH, I. T., TALLANT, B. & AXEL, L. 1993. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Circulation*, 88, 1279-88.
- KRAMER, C. M., ROGERS, W. J., PARK, C. S., SEIBEL, P. S., SHAFFER, A., THEOBALD, T. M., REICHEK, N., ONODERA, T. & GERDES, A. M. 1998. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 30, 1773-8.
- KROEMER, G. & PIACENTINI, M. 2015. Dying to survive - apoptosis, necroptosis, autophagy as supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol*, 59, 5-9.
- KRÜGER, M., BABICZ, K., VON FRIELING-SALEWSKY, M. & LINKE, W. A. 2010. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 910-6.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRUTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M. M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C. G. & LINKE, W. A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *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., SACHSE, C., ZIMMERMANN, W. H., ESCHENHAGEN, T., KLEDE, S. & LINKE, W. A. 2008. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ Res*, 102, 439-47.
- LABEIT, S. & KOLMERER, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- 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., XIANG, F., YAKOVENKO, A., VIHOLA, A., HACKMAN, P., ROSTKOVA, E., KRISTENSEN, J., BRANDMEIER, B., FRANZEN, G., HEDBERG, B., GUNNARSSON, L. G., HUGHES, S. M., MARCHAND, S., SEJERSEN, T., RICHARD, I., EDSTROM, L., EHLER, E., UDD, B. & GAUTEL, M. 2005. The

- kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308, 1599-603.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- LEWINTER, M. M. & GRANZIER, H. L. 2014. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 63, 207-12.
- LEWINTER, M. M., WU, Y., LABELIT, S. & GRANZIER, H. 2007. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta*, 375, 1-9.
- LI, S., GUO, W., DEWEY, C. N. & GREASER, M. L. 2013. Rbm20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor. *Nucleic Acids Res*, 41, 2659-72.
- LIANG, Z. G., YAO, H., XIE, R. S., GONG, C. L. & TIAN, Y. 2018. MicroRNA-20b-5p promotes ventricular remodeling by targeting the TGF-beta/Smad signaling pathway in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med*, 42, 975-987.
- LINKE, W. A. & BUCKER, S. 2012. King of hearts: a splicing factor rules cardiac proteins. *Nat Med*, 18, 660-1.
- 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., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABELIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2010. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*, 25, 186-98.
- 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., LABELIT, 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.
- LINNEMANN, A. K., BLUMER, J., MARASCO, M. R., BATTIOLA, T. J., UMHOEFER, H. M., HAN, J. Y., LAMMING, D. W. & DAVIS, D. B. 2017. Interleukin 6 protects pancreatic beta cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J*, 31, 4140-4152.
- LIVNEH, I., COHEN-KAPLAN, V., COHEN-ROSENZWEIG, C., AVNI, N. & CIECHANOVER, A. 2016. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res*, 26, 869-85.
- LOESCHER, C. M., BREITKREUZ, M., LI, Y., NICKEL, A., UNGER, A., DIETL, A., SCHMIDT, A., MOHAMED, B. A., KOTTER, S., SCHMITT, J. P., KRUGER, M., KRUGER, M., TOISCHER, K., MAACK, C., LEICHERT, L. I., HAMDANI, N. & LINKE, W. A. 2020. Regulation of titin-based cardiac stiffness by unfolded domain oxidation (UnDOx). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 24545-24556.
- LOESCHER, C. M., HOBACH, A. J. & LINKE, W. A. 2022. Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance. *Cardiovasc Res*, 118, 2903-2918.
- LORELL, B. H. & CARABELLO, B. A. 2000. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 102, 470-9.
- LUST, J. A., DONOVAN, K. A., KLINE, M. P., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & MAIHLE, N. J. 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, 4, 96-100.

- LYMN, R. W. & TAYLOR, E. W. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*, 10, 4617-24.
- 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.
- MANTOVANI, A., CASSATELLA, M. A., COSTANTINI, C. & JAILLON, S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11, 519-31.
- MARUYAMA, K., YOSHIOKA, T., HIGUCHI, H., OHASHI, K., KIMURA, S. & NATORI, R. 1985. Connectin filaments link thick filaments and Z lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 101, 2167-72.
- MATSUI, Y., TAKAGI, H., QU, X., ABDELLATIF, M., SAKODA, H., ASANO, T., LEVINE, B. & SADOSHIMA, J. 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 100, 914-22.
- MATTHEWS, V., SCHUSTER, B., SCHUTZE, S., BUSSMEYER, I., LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., SADOWSKI, T., SAFTIG, P., HARTMANN, D., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem*, 278, 38829-39.
- MCMURRAY, J. J., ADAMOPOULOS, S., ANKER, S. D., AURICCHIO, A., BOHM, M., DICKSTEIN, K., FALK, V., FILIPPATOS, G., FONSECA, C., GOMEZ-SANCHEZ, M. A., JAARSMA, T., KOBER, L., LIP, G. Y., MAGGIONI, A. P., PARKHOMENKO, A., PIESKE, B. M., POPESCU, B. A., RONNEVIK, P. K., RUTTEN, F. H., SCHWITTER, J., SEFEROVIC, P., STEPINSKA, J., TRINDADE, P. T., VOORS, A. A., ZANNAD, F., ZEIHNER, A., TASK FORCE FOR THE, D., TREATMENT OF, A., CHRONIC HEART FAILURE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF, C., BAX, J. J., BAUMGARTNER, H., CECONI, C., DEAN, V., DEATON, C., FAGARD, R., FUNCK-BRENTANO, C., HASDAI, D., HOES, A., KIRCHHOF, P., KNUUTI, J., KOLH, P., MCDONAGH, T., MOULIN, C., POPESCU, B. A., REINER, Z., SECHTEM, U., SIRNES, P. A., TENDERA, M., TORBICKI, A., VAHANIAN, A., WINDECKER, S., MCDONAGH, T., SECHTEM, U., BONET, L. A., AVRAAMIDES, P., BEN LAMIN, H. A., BRIGNOLE, M., COCA, A., COWBURN, P., DARGIE, H., ELLIOTT, P., FLACHSKAMPF, F. A., GUIDA, G. F., HARDMAN, S., IUNG, B., MERKELY, B., MUELLER, C., NANAS, J. N., NIELSEN, O. W., ORN, S., PARISSIS, J. T., PONIKOWSKI, P. & GUIDELINES, E. S. C. C. F. P. 2012. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 14, 803-69.
- METHAWASIN, M., STROM, J. G., SLATER, R. E., FERNANDEZ, V., SARIPALLI, C. & GRANZIER, H. 2016. Experimentally Increasing the Compliance of Titin Through RNA Binding Motif-20 (RBM20) Inhibition Improves Diastolic Function In a Mouse Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*, 134, 1085-1099.
- MIYAO, Y., YASUE, H., OGAWA, H., MISUMI, I., MASUDA, T., SAKAMOTO, T. & MORITA, E. 1993. Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 126, 1299-304.

- MIZUSHIMA, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861-73.
- MIZUSHIMA, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 132-9.
- MIZUSHIMA, N. & KOMATSU, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728-41.
- MO, Y., TANG, L., MA, Y. & WU, S. 2016. Pramipexole pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through upregulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 473, 1119-1124.
- MÜLLER, E., SALCAN, S., BONGARDT, S., BARBOSA, D. M., KRUGER, M. & KOTTER, S. 2021. E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Sci Rep*, 11, 21134.
- MÜLLER, J., GORRESSEN, S., GRANDOCH, M., FELDMANN, K., KRETSCHMER, I., LEHR, S., DING, Z., SCHMITT, J. P., SCHRADER, J., GARBERS, C., HEUSCH, G., KELM, M., SCHELLER, J. & FISCHER, J. W. 2014. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 109, 440.
- NAH, D. Y. & RHEE, M. Y. 2009. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean Circ J*, 39, 393-8.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204, 3037-47.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- NEAGOE, C., OPITZ, C. A., MAKARENKO, I. & LINKE, W. A. 2003. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 175-89.
- NEWTON, K. & DIXIT, V. M. 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- OKADA, H., TAKEMURA, G., KOSAI, K., LI, Y., TAKAHASHI, T., ESAKI, M., YUGE, K., MIYATA, S., MARUYAMA, R., MIKAMI, A., MINATOBUCHI, S., FUJIWARA, T. & FUJIWARA, H. 2005. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation*, 111, 2430-7.
- OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., MAKARENKO, I., BENES, V. & LINKE, W. A. 2004. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 94, 967-75.
- PARKER, T. G., PACKER, S. E. & SCHNEIDER, M. D. 1990. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 85, 507-14.
- PATEL, B. M. & MEHTA, A. A. 2012. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol*, 697, 1-12.
- 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.
- PIEK, E., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J*, 13, 2105-24.

- PORTBURY, A. L., WILLIS, M. S. & PATTERSON, C. 2011. Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*, 286, 9929-34.
- POWELL, S. R., WANG, P., KATZEFF, H., SHRINGARPURE, R., TEOH, C., KHALIULIN, I., DAS, D. K., DAVIES, K. J. & SCHWALB, H. 2005. Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal*, 7, 538-46.
- PRABHU, S. D. & FRANGOIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.
- 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.
- QI, D. & YOUNG, L. H. 2015. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab*, 26, 422-9.
- RAINER, P. P., HAO, S., VANHOUTTE, D., LEE, D. I., KOITABASHI, N., MOLKENTIN, J. D. & KASS, D. A. 2014. Cardiomyocyte-specific transforming growth factor beta suppression blocks neutrophil infiltration, augments multiple cytoprotective cascades, and reduces early mortality after myocardial infarction. *Circ Res*, 114, 1246-57.
- 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.
- RAVIKUMAR, B., SARKAR, S., DAVIES, J. E., FUTTER, M., GARCIA-ARENCEBIA, M., GREEN-THOMPSON, Z. W., JIMENEZ-SANCHEZ, M., KOROLCHUK, V. I., LICHTENBERG, M., LUO, S., MASSEY, D. C., MENZIES, F. M., MOREAU, K., NARAYANAN, U., RENNA, M., SIDDIQI, F. H., UNDERWOOD, B. R., WINSLOW, A. R. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90, 1383-435.
- RICHARDSON, W. J., CLARKE, S. A., QUINN, T. A. & HOLMES, J. W. 2015. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr Physiol*, 5, 1877-909.
- RINCON, M. 2012. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*, 33, 571-7.
- RODRIGUEZ-VICIANA, P., WARNE, P. H., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I., FRY, M. J., WATERFIELD, M. D. & DOWNWARD, J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370, 527-32.
- ROGER, V. L. 2013. Epidemiology of heart failure. *Circ Res*, 113, 646-59.
- ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J., ELSON, G. & JONES, S. A. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*, 80, 227-36.
- ROSENKRANZ, S., FLESCHE, M., AMANN, K., HAEUSELER, C., KILTER, H., SEELAND, U., SCHLUTER, K. D. & BOHM, M. 2002. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H1253-62.
- ROSS, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-9.

- RUDOLPH, F., HUTTEMEISTER, J., DA SILVA LOPES, K., JUTTNER, R., YU, L., BERGMANN, N., FRIEDRICH, D., PREIBISCH, S., WAGNER, E., LEHNART, S. E., GREGORIO, C. C. & GOTTHARDT, M. 2019. Resolving titin's lifecycle and the spatial organization of protein turnover in mouse cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 25126-25136.
- RUNWAL, G., STAMATAKOU, E., SIDDIQI, F. H., PURI, C., ZHU, Y. & RUBINSZTEIN, D. C. 2019. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci Rep*, 9, 10147.
- SALCAN, S., BONGARDT, S., MONTEIRO BARBOSA, D., EFIMOV, I. R., RASSAF, T., KRUGER, M. & KOTTER, S. 2020. Elastic titin properties and protein quality control in the aging heart. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867, 118532.
- SANTIAGO, J. J., DANGERFIELD, A. L., RATTAN, S. G., BATHE, K. L., CUNNINGTON, R. H., RAIZMAN, J. E., BEDOSKY, K. M., FREED, D. H., KARDAMI, E. & DIXON, I. M. 2010. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn*, 239, 1573-84.
- SCHAPER, F., GENDO, C., ECK, M., SCHMITZ, J., GRIMM, C., ANHUF, D., KERR, I. M. & HEINRICH, P. C. 1998. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J*, 335 (Pt 3), 557-65.
- SCHILLER, M., JAVELAUD, D. & MAUVIEL, A. 2004. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci*, 35, 83-92.
- SCHLOSSAREK, S. & CARRIER, L. 2011. The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*, 26, 190-5.
- SCIARRETTA, S., MAEJIMA, Y., ZABLOCKI, D. & SADOSHIMA, J. 2018. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol*, 80, 1-26.
- SCIARRETTA, S., ZHAI, P., SHAO, D., MAEJIMA, Y., ROBBINS, J., VOLPE, M., CONDORELLI, G. & SADOSHIMA, J. 2012. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. *Circulation*, 125, 1134-46.
- SEIBENHENER, M. L., GEETHA, T. & WOOTEN, M. W. 2007. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett*, 581, 175-9.
- SHAI, S., BRANDTS, C. H., SERVE, H. & DIKIC, I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 20, 21-30.
- SHAPIRO, B. P., LAM, C. S., PATEL, J. B., MOHAMMED, S. F., KRUGER, M., MEYER, D. M., LINKE, W. A. & REDFIELD, M. M. 2007. Acute and chronic ventricular-arterial coupling in systole and diastole: insights from an elderly hypertensive model. *Hypertension*, 50, 503-11.
- SHI, Y. & MASSAGUE, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- SHIBUTANI, S. T. & YOSHIMORI, T. 2014. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 24, 58-68.
- SHUAI, K., ZIEMIECKI, A., WILKS, A. F., HARPUR, A. G., SADOWSKI, H. B., GILMAN, M. Z. & DARNELL, J. E. 1993. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*, 366, 580-3.
- STAHL, N., FARRUGGELLA, T. J., BOULTON, T. G., ZHONG, Z., DARNELL, J. E., JR. & YANCOPOULOS, G. D. 1995. Choice of STATs and other substrates

- specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, 267, 1349-53.
- STREETZ, K. L., WUSTEFELD, T., KLEIN, C., MANNS, M. P. & TRAUTWEIN, C. 2001. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47, 661-73.
- SUTTON, M. G. & SHARPE, N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101, 2981-8.
- SUZUKI, K. & OHSUMI, Y. 2007. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 581, 2156-61.
- SWATEK, K. N. & KOMANDER, D. 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 26, 399-422.
- TAKASHI, E. & ASHRAF, M. 2000. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol*, 32, 209-24.
- TALMAN, V. & RUSKOAHO, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 365, 563-81.
- TAN, J. M., WONG, E. S., KIRKPATRICK, D. S., PLETNIKOVA, O., KO, H. S., TAY, S. P., HO, M. W., TRONCOSO, J., GYGI, S. P., LEE, M. K., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. & LIM, K. L. 2008. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 17, 431-9.
- TAN, S. M., ZHANG, Y., CONNELLY, K. A., GILBERT, R. E. & KELLY, D. J. 2010. Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298, H1415-25.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88.
- THOMPSON, N. L., FLANDERS, K. C., SMITH, J. M., ELLINGSWORTH, L. R., ROBERTS, A. B. & SPORN, M. B. 1989. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol*, 108, 661-9.
- THROWER, J. S., HOFFMAN, L., RECHSTEINER, M. & PICKART, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19, 94-102.
- THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A., WHITE, H. D. & EXECUTIVE GROUP ON BEHALF OF THE JOINT EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY /AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY /AMERICAN HEART ASSOCIATION /WORLD HEART FEDERATION TASK FORCE FOR THE UNIVERSAL DEFINITION OF MYOCARDIAL, I. 2018. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, 138, e618-e651.
- TIAN, L. F., LI, H. Y., JIN, B. F., PAN, X., MAN, J. H., ZHANG, P. J., LI, W. H., LIANG, B., LIU, H., ZHAO, J., GONG, W. L., ZHOU, T. & ZHANG, X. M. 2006. MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 355-61.
- TROMBITAS, K., GREASER, M., LABEIT, 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.

- TSUDA, T., GAO, E., EVANGELISTI, L., MARKOVA, D., MA, X. & CHU, M. L. 2003. Post-ischemic myocardial fibrosis occurs independent of hemodynamic changes. *Cardiovasc Res*, 59, 926-33.
- VAN HEEREBEEK, L., BORBELY, A., NIESSEN, H. W., BRONZWAER, J. G., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J., LINKE, W. A., LAARMAN, G. J. & PAULUS, W. J. 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*, 113, 1966-73.
- VILAHUR, G., JUAN-BABOT, O., PENA, E., ONATE, B., CASANI, L. & BADIMON, L. 2011. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 522-33.
- WANG, K., MCCLURE, J. & TU, A. 1979. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3698-702.
- WANG, L., LI, Y., NING, N., WANG, J., YAN, Z., ZHANG, S., JIAO, X., WANG, X. & LIU, H. 2018. Decreased autophagy induced by beta(1)-adrenoceptor autoantibodies contributes to cardiomyocyte apoptosis. *Cell Death Dis*, 9, 406.
- WANG, X., LI, J., ZHENG, H., SU, H. & POWELL, S. R. 2011. Proteasome functional insufficiency in cardiac pathogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H2207-19.
- WARREN, C. M., KRZESINSKI, P. R., CAMPBELL, K. S., MOSS, R. L. & GREASER, M. L. 2004. Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mech Dev*, 121, 1301-12.
- WELTGESUNDHEITSORGANISATION, W. 2020. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- WERNER, F., JAIN, M. K., FEINBERG, M. W., SIBINGA, N. E., PELLACANI, A., WIESEL, P., CHIN, M. T., TOPPER, J. N., PERRELLA, M. A. & LEE, M. E. 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*, 275, 36653-8.
- WHITE, J. P., PUPPA, M. J., GAO, S., SATO, S., WELLE, S. L. & CARSON, J. A. 2013. Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304, E1042-52.
- WITT, S. H., GRANZIER, H., WITT, C. C. & LABEIT, S. 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 350, 713-22.
- XIE, Z., NAIR, U. & KLIONSKY, D. J. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19, 3290-8.
- XU, X., KOBAYASHI, S., CHEN, K., TIMM, D., VOLDEN, P., HUANG, Y., GULICK, J., YUE, Z., ROBBINS, J., EPSTEIN, P. N. & LIANG, Q. 2013. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J Biol Chem*, 288, 18077-92.
- YAN, X., ANZAI, A., KATSUMATA, Y., MATSUHASHI, T., ITO, K., ENDO, J., YAMAMOTO, T., TAKESHIMA, A., SHINMURA, K., SHEN, W., FUKUDA, K. & SANO, M. 2013. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 62, 24-35.
- YU, L., HEBERT, M. C. & ZHANG, Y. E. 2002. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J*, 21, 3749-59.
- YUAN, J., WEGENKA, U. M., LUTTICKEN, C., BUSCHMANN, J., DECKER, T., SCHINDLER, C., HEINRICH, P. C. & HORN, F. 1994. The signalling pathways

- of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. *Mol Cell Biol*, 14, 1657-68.
- ZHANG, D., WANG, W., SUN, X., XU, D., WANG, C., ZHANG, Q., WANG, H., LUO, W., CHEN, Y., CHEN, H. & LIU, Z. 2016. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy*, 12, 1447-59.
- ZHANG, S. Q., TSIARAS, W. G., ARAKI, T., WEN, G., MINICHIELLO, L., KLEIN, R. & NEEL, B. G. 2002. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol*, 22, 4062-72.
- ZHANG, Y. E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19, 128-39.
- ZHENG, Q., SU, H., TIAN, Z. & WANG, X. 2011. Proteasome malfunction activates macroautophagy in the heart. *Am J Cardiovasc Dis*, 1, 214-26.
- ZHU, C., YIN, Z., REN, J., MCCORMICK, R. J., FORD, S. P. & GUO, W. 2015. RBM20 is an essential factor for thyroid hormone-regulated titin isoform transition. *J Mol Cell Biol*, 7, 88-90.
- ZHU, C., YIN, Z., TAN, B. & GUO, W. 2017. Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863, 2363-2371.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: ÄTIOLOGIE DES MYOKARDINFARKTS	2
ABB. 2: CHRONOLOGIE DER PATHOPHYSIOLOGISCHEN VORGÄNGE DES MYOKARDINFARKTS	3
ABB. 3: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES SARKOMERS	11
ABB. 4: SCHEMATISCHER AUFBAU DER KARDIALEN TITINISOFORMEN N2B UND N2BA IM SARKOMER	13
ABB. 5: PHOSPHORYLIERUNGSMÖGLICHKEITEN VON TITIN IM BEREICH DER N2B(US)- UND PEVK-REGION	16
ABB. 6: INTRAZELLULÄRE TGF-B-SIGNALKASKADEN UND DER MÖGLICHE EINFLUSS AUF TITIN.....	18
ABB. 7: EINFLUSS VON MTOR UND AMPK AUF DEN AUTOPHAGIEPROZESS.....	22
ABB. 8: INTRAZELLULÄRE IL-6-SIGNALKASKADE UND DER MÖGLICHE EINFLUSS AUF DIE AUTOPHAGOLYSOSMALE TITINDEGRADATION.....	25
ABB. 9: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU	35
ABB. 10: EINFLUSS VON TGF-B1 AUF DIE TITINISOFORMENKOMPOSITION IN ERC NACH STIMULATION AB D1.	41
ABB. 11: VERÄNDERUNG DER KINASEAKTIVITÄT VON AKT UND MTOR UNTER TGF-B1-STIMULATION IN ERC...	42
ABB. 12: MODIFIKATIONEN AN ELASTISCHEN TITINDOMÄNEN DURCH TGF-B1-STIMULATION	43
ABB. 13: RELATIVE PHOSPHORYLIERUNG VON ERK1/2 UND PKCA UNTER TGF-B1-STIMULATION IN ERC	44
ABB. 14: BESTÄTIGUNG DER IL-6 SIGNALTRANSDUKTION DURCH ERHÖHTE STAT-3 PHOSPHORYLIERUNG	45
ABB. 15: RELATIVE K63-POLYUBIQUITINIERUNG VON TITIN NACH 30-MINÜTIGER IL-6 STIMULATION	46
ABB. 16: ANALYSE DER KINASEAKTIVITÄTEN UND DER AUTOPHAGIEMARKER NACH 30-MINÜTIGER IL-6 STIMULATION.....	47

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE CHEMIKALIEN MIT ANGABE DES HERSTELLERS	28
TABELLE 2: VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER	30
TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG DER KULTURMEDIEN	30
TABELLE 4: VERWENDETE LABORGERÄTE MIT TYPEN- UND HERSTELLERANGABE	32
TABELLE 5: PRIMÄRE ANTIKÖRPER MIT ANGABE DER VERDÜNNUNGS-, URSPRUNGS- UND HERSTELLERANGABE	32
TABELLE 6: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER MIT ANGABE DER VERDÜNNUNGS-, URSPRUNGS- UND HERSTELLERANGABE	33
TABELLE 7: PIPETTIERSHEMA FÜR 2 TITINGELE	36
TABELLE 8: PIPETTIERSHEMA FÜR JE 2 SDS – STANDARDGELE	36

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger bedanken. Deine Unterstützung im Rahmen der Anfertigung dieser Promotion ging weit über die umfangreiche, wissenschaftliche Betreuung und die mühevollen Korrekturen hinaus: Mit deiner herzlichen Art hast du immer an mich geglaubt, mich motiviert und ich konnte mich auf dein offenes Ohr immer verlassen, sodass ich nur jedem eine Doktormutter, wie du mir eine warst und bist, wünschen kann.

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Joachim Schmitt für seine Co-Betreuung und die konstruktiven Vorschläge zur Anfertigung dieser Arbeit.

Ein außerordentliches Dankeschön gilt der gesamten AG Krüger. Die gemeinsame Zeit war geprägt von einer freundschaftlichen Atmosphäre und jeder Menge guter Gespräche. Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Sebastian Kötter für seine wissenschaftlichen Ratschläge und Erklärungen und seine geduldige und liebevolle Art, mir diese zu vermitteln. Gleichmaßen bedanke ich mich bei Frau Sabine Bongardt für die Einarbeitung im Labor sowie die unentwegte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, besonders aber für die Fürsorge und die emotionale Unterstützung, die mich das Forschungsziel nicht aus den Augen verlieren ließen.

Ferner gilt ein großer Dank der wissenschaftlichen und finanziellen Förderung durch den Sonderforschungsbereich SFB 1116 des Graduiertenkollegs. Allen voran möchte ich mich bei Dr. Sandra Berger bedanken, die mir die Teilhabe mit Ihrem herzlichen Engagement ermöglicht hat. Im Rahmen dessen konnte auch ein Forschungsaustausch an das Heart Science Centre in London stattfinden. Für diese Erfahrung möchte ich dem Leiter Prof. Dr. Pieter de Tombe ganz besonders danken.

Ich bin zutiefst dankbar für die mentale Unterstützung meines gesamten engen Freundeskreises, ganz besonders durch Anna-Lena und ebenso durch Debbie, Leonie und Verena. Wir hatten eine grandiose Laborzeit, die wir zusammen unvergesslich gemacht haben.

Die größte Dankbarkeit gilt meiner Schwester Sina, meinen Eltern und meinem Freund Sebastian. Danke, dass ich mich immer bedingungslos auf euch verlassen kann. Ihr seid meine größten Fans und diese Promotion wäre ohne euren Rückhalt, eure Geduld und Liebe nicht entstanden. Ihr wisst, ihr seid die Besten.