

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. *rer. nat.* Jens W. Fischer

**Einfluss von Neuregulin 1 auf die gestörte
Kalzium-Homöostase diabetischer
Kardiomyozyten des *remote* Myokards**

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

vorgelegt von:

Julian M. Dudek

2024

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim P. Schmitt

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Zusammenfassung

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Teile des Herzmuskels, die im Rahmen eines Myokardinfarktes nicht von Ischämie und Reperfusion (I/R) betroffen sind (*remote* Myokard, RM), Störungen in der Kalzium-vermittelten Kontraktion und Relaxation der Herzmuskelzellen aufweisen. Diese Veränderungen waren bei vorbestehendem Diabetes mellitus (DM2) besonders deutlich ausgeprägt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Wachstumsfaktor Neuregulin 1 (NRG-1), der die Aktivität zentraler Kalziumregulatoren modifiziert, den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten des RM mit und ohne DM2 akut korrigieren kann. Dazu wurden Leptin-Rezeptor-defiziente Mäuse (db/db), ein etabliertes Mausmodell für DM2, sowie nicht-diabetische heterozygote Geschwistertiere (db/+) einer 60-minütigen Ligatur der vorderen linken Koronararterie (*LAD, closed chest* Modell) unterzogen. Nach 24 h Reperfusion wurden die Zellen des RM durch retrograde Perfusion des Herzens mit Kollagenase-Lösung isoliert. Frisch isolierte Kardiomyozyten wurden mit NRG-1 (100 ng/ml) inkubiert und elektrisch stimuliert (10 V, 0,5 Hz). Über einen Zeitraum von 5 min wurden die Kalziumtransienten (Fura-2-Methode) und Sarkomerlängen kontinuierlich gemessen und ihre Änderungen (Δ -Werte) als NRG-1-Effekt ermittelt. Identische Untersuchungen wurden an db/db und db/+ ohne I/R durchgeführt. Bei db/db und db/+ ohne I/R divergierten die Δ -Werte im Mittel deutlich hinsichtlich Höhe und Kinetik der Kalziumtransienten (bis zu 8-fach) und Sarkomerkontraktionen (bis zu 11-fach). Die db/db-Myozyten reagierten stärker auf NRG-1 als db/+, am deutlichsten bei der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalzium-Elimination und der Amplitude der Sarkomerkontraktion. Proteinchemische Analysen zeigten in db/db-Zellen im Vergleich zu db/+ unter NRG-1 eine erhöhte S16-Phosphorylierung von Phospholamban (PLN), das die Kalzium-ATPase SERCA2a inhibiert ($p = 0,08$, *two way ANOVA*). 24 h nach I/R reagierten Kardiomyozyten aus dem RM der db/db dagegen nicht stärker auf NRG-1, bei der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalzium-Elimination zeigte sich sogar eine stärkere Reaktion der db/+. Die Phosphorylierung von PLN war zwischen den Gruppen nach I/R nicht unterschiedlich. Diese Befunde zeigen, dass NRG-1 den myozytären Kalzium-Transport in db/db- Herzen deutlicher beschleunigen kann als in nicht-diabetischen db/+ Herzen, möglicherweise aufgrund einer verstärkten Phosphorylierung von PLN. Im RM 24 h nach I/R treten diese Unterschiede dagegen nicht auf. Kontraktion und Relaxation der Sarkomere veränderten sich parallel zu den gemessenen quantitativen und kinetischen Änderungen des myozytären Kalziumhaushalts.

Summary

Previous work has shown that calcium-mediated contraction and relaxation of cardiomyocytes is disturbed in the regions of the myocardium that are not affected by ischaemia and reperfusion (I/R) during myocardial infarction. These changes in the so-called remote myocardium (RM) were more pronounced in pre-existing diabetes mellitus (DM2). In this thesis work, we investigated whether the growth factor neuregulin 1 (NRG-1), which modifies the activity of crucial calcium regulators, can acutely correct the calcium homeostasis of RM cardiomyocytes with and without DM2. For this purpose, leptin receptor-deficient mice (db/db), an established mouse model of DM2, and non-diabetic heterozygous littermates (db/+) were subjected to 60-min ligation of the left anterior coronary artery (LAD, closed chest model). After 24 h of reperfusion, RM cells were isolated by retrograde perfusion of the heart with collagenase solution. Freshly isolated cardiomyocytes were incubated with NRG-1 (100 ng/ml) and electrically stimulated (10 V, 0.5 Hz). Calcium transients (Fura-2-method) and sarcomere lengths were measured continuously for 5 min and their changes (Δ -values) were determined as NRG-1 effect. Identical investigations were performed on db/db and db/+ without I/R. In db/db and db/+ without I/R, the means of Δ -values diverged strongly with respect to the magnitude and kinetics of calcium transients (up to 8-fold) and sarcomere contractions (up to 11-fold). Db/db myocytes responded more strongly to NRG-1, most pronounced in the rate of cytosolic calcium elimination and the amplitude of sarcomere contraction. Protein chemical analyses showed a trend increase in S16 phosphorylation of phospholamban (PLN), an inhibitor of the calcium ATPase SERCA2a ($p = 0.08$, two way ANOVA), in db/db cells compared to db/+ under NRG-1. In contrast, 24 h after I/R, cardiomyocytes from the RM of db/db did not consistently respond more strongly to NRG-1. The rate of cytosolic calcium elimination even showed a stronger response of db/+. Phosphorylation of PLN was not different between groups after I/R. These findings indicate that NRG-1 may accelerate myocyte calcium transport more markedly in db/db-hearts than in non-diabetic db/+ hearts, possibly due to enhanced phosphorylation of PLN. In contrast, these differences do not occur in the RM 24 h after I/R. The changes of sarcomere contraction and relaxation paralleled the measured quantitative and kinetic alterations of myocyte calcium transients.

Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp-Tier
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5' GMP	5'-Guanosylmonophosphat
Abb.	Abbildung, Abbildung, Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANCOVA	Kovarianzanalyse
ANOVA	Varianzanalyse
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Ca ²⁺	Kalziumion
CaMKII	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat, Zyklisches Guanosylmonophosphat
Cl ⁻	Chloridion
CNP	C-natriuretisches Peptid
db/+	Heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier
db/db	Homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier
Dd H ₂ O	Millipore-Wasser
dep v	Freisetzungsgeschwindigkeit
dl	Deziliter
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ErbB	Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors
F ₁ /F ₀	Verhältnis der gemessenen Fura-2-Werte
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
GTP	Guanosyltriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HHU	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Ischämie und Reperfusion
IgG	Immunglobulin G
K	Kontrolle
K ⁺	Kaliumion
kg	Kilogramm
l	Liter
LAD	Linke vordere Koronararterie
LANUV NRW	Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW
M	Molar
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute

mm		Millimeter
ms		Millisekunde
mV		Millivolt
Na ⁺		Natriumion
NADPH		Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCX		Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
nm		Nanometer
nmol		Nanomol
NO		Stickstoffmonoxid
NPR		Rezeptor der natriuretischen Peptide
NRG-1		Neuregulin 1
NSTEMI		Non-ST-segment elevation myocardial infarction
PDE		Phosphodiesterase
peak h		Amplitude
PET		Polyethylen
pGC		Korpuskuläre Guanylatzyklase
PKA		Proteinkinase A
PKC		Proteinkinase C
PKG		Proteinkinase G
PLN		Phospholamban
PMSF		Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1		Proteinphosphatase 1
PP2A		Proteinphosphatase 2A
PP2C		Proteinphosphatase 2C
PVDF		Polyvinylidendifluorid
RM		Remote Myokard
ROI		region of interest
ROS		Reaktive Sauerstoffspezies
RYR2		Ryanodinrezeptor 2
s		Sekunde
SDS		Natriumdodecylsulfat
SERCA2a		Kalzium-ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums 2a
sGC		Lösliche Guanylatzyklase
SHAM		scheinoperiertes Kontrolltier
SR		Sarkoplasmatisches Retikulum
STEMI		ST-segment elevation myocardial infarction
t		Zeit
TBS-T		Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED		N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TnC		Troponin C
Triton™ X-100		t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween® 20		Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
V		Volt
ZETT		Ztr. Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftl. Tierschutzaufg. der HHU

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der akute Myokardinfarkt.....	1
1.1.1	Gesellschaftliche Bedeutung des Myokardinfarktes.....	1
1.1.2	Herzmuskelareale nach Infarkt	2
1.1.3	Phasen des Myokardinfarkts.....	5
1.1.4	Mechanische Konsequenzen für das RM	6
1.2	Diabetes mellitus Typ 2.....	6
1.2.1	Ursachen und Folgen eines Diabetes mellitus Typ 2	6
1.2.2	Diabetes mellitus und Myokardinfarkt	7
1.2.3	Mausmodelle für Diabetes mellitus	8
1.3	Aufbau und Funktionsweise des Herzens	8
1.3.1	Das Sarkomer	8
1.3.2	Ablauf der Kontraktion.....	9
1.4	Kalziumkreislauf von Kardiomyozyten	10
1.4.1	Ionenverschiebungen während der Herzerregung	10
1.4.2	Elektromechanische Kopplung.....	11
1.4.3	Regulationsproteine des Kalziumhaushalts	12
1.5	Neuregulin 1.....	14
1.5.1	Die Familie der ErbB-Rezeptoren	14
1.5.2	Effekte auf die eNOS, den cGMP-Spiegel und die PKG	15
1.5.3	Effekte auf Titin und weitere Proteine.....	17
1.5.4	Klinische Effekte	18
1.6	Fragen, die diese Arbeit beantworten möchte	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Laborgeräte	19
2.1.2	Verwendete Software	22
2.1.3	Verwendete Chemikalien.....	22
2.1.4	Verwendete Antikörper	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Puffer und Lösungen	28
2.2.2	Tierversuche.....	33
2.2.3	Verwendete Tiere.....	33
2.2.4	Eingriffe am Tier	34
2.2.5	Messungen an isolierten Kardiomyozyten.....	37

2.2.6	Darstellung der Sarkomermessungen als <i>phase plane loops</i>	46
2.2.7	Auswertung der Messungen	47
2.2.8	Proteinanalyse.....	48
2.2.9	Statistik.....	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Auswahl der Versuchstiere der drei Gruppen.....	53
3.1.1	Untersuchungen der Tiere vor Experimentbeginn	53
3.1.2	Ergebnisse der Vorversuche.....	54
3.1.3	Auswahl des Messzeitraums	56
3.1.4	Auswahl der Messparameter	57
3.2	Ergebnisse der Gruppe 1 +/- SHAM vs. MI.....	58
3.2.1	Untersuchung der Kalziumbewegungen	58
3.2.2	Untersuchung der Sarkomerkontraktionen	59
3.2.3	<i>Phase plane loops</i>	61
3.2.4	Proteinbiochemische Untersuchungen.....	62
3.2.5	Gruppengröße	63
3.3	Ergebnisse der Gruppe 2 db/+ vs. db/db	64
3.3.1	Untersuchung der Kalziumbewegungen in der Gruppe 2.....	64
3.3.2	Untersuchung der Sarkomerkontraktionen	65
3.3.3	<i>Phase plane loops</i>	66
3.3.4	Analyse der PLN-Phosphorylierung an Serin 16.....	68
3.3.5	Gruppengröße	69
3.4	Untersuchungen der Gruppe 3 (db/+ vs db/db mit MI).....	69
3.4.1	Untersuchung der Kalziumbewegungen	69
3.4.2	Untersuchungen der Sarkomerkontraktionen	70
3.4.3	<i>Phase plane loops</i>	72
3.4.4	Proteinbiochemische Analysen	73
3.4.5	Gruppengröße	74
4	Diskussion.....	75
4.1	Effekte von Neuregulin 1 auf den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion in normoglykämischer und hyperglykämischer Stoffwechselsituation	76
4.1.1	Potentielle Rolle von eNOS, Phospholamban und Titin	76
4.1.2	Potentielle Rolle der PP2A	78
4.2	Einfluss eines akuten Myokardinfarkts auf den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion des <i>remote</i> Myokards	78
4.2.1	ROS im RM?	79
4.2.2	Janusgesicht der eNOS	80

4.2.3	Veränderungen des Titins im RM.....	80
4.3	Myozytärer Kalziumhaushalt und Sarkomerfunktion im <i>remote</i> Myokard bei diabetischer Stoffwechsellage, nach akutem Myokardinfarkt	81
4.3.1	Erhöhte Vulnerabilität diabetischer Kardiomyozyten gegenüber mechanischer Belastung82	
4.3.2	Erhöhte Vulnerabilität des diabetischen Kardiomyokards gegenüber ROS.....	83
4.4	Veränderung der Kontraktion nach fünfminütiger Dauerstimulation.....	83
4.5	Schlussfolgerungen	84
4.6	Ausblick	86
5	Literaturverzeichnis.....	88

1 Einleitung

1.1 Der akute Myokardinfarkt

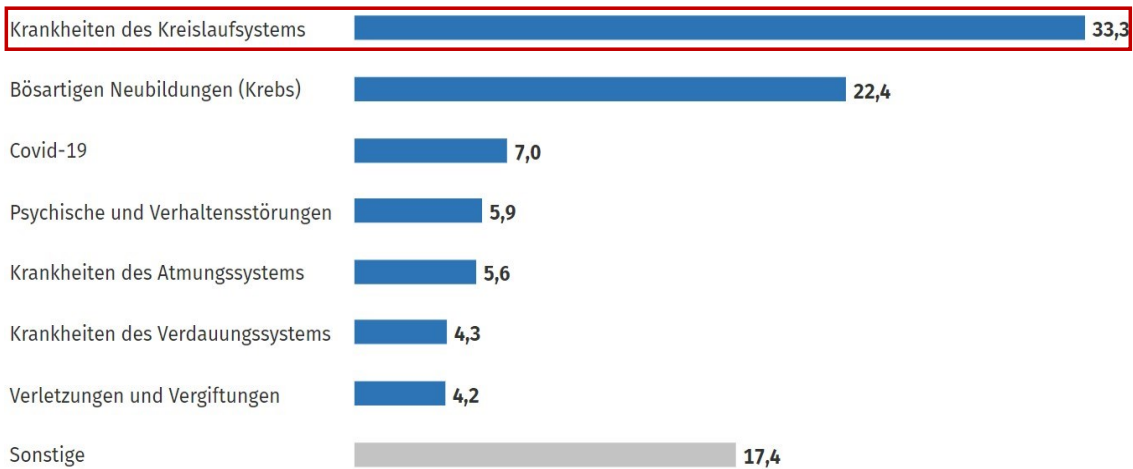
Ein Myokardinfarkt (MI) ist definiert als „... ein Myokardschaden mit klinischen Beweisen einer akuten myokardialen Ischämie und einer Kinetik der cTroponin-Werte mit mindestens einem Wert oberhalb der 99. Perzentile...“ [1]. Klinisch äußert er sich durch ein plötzlich auftretendes thorakales Engegefühl und ausstrahlende Schmerzen in den linksseitigen Kieferbereich, den linksseitigen Arm, die Magengegend oder auch in den Rücken. Als vegetative Begleitsymptomatik treten oft Unruhe, Todesangst und Kaltschweißigkeit auf. Insbesondere bei Menschen mit einem Diabetes mellitus kann ein Myokardinfarkt jedoch auch, aufgrund der diabetischen Neuropathie, vollständig symptomlos ablaufen. Die Symptomexpression kann je nach Alter, medizinischer Vorgeschichte und insbesondere Patientengeschlecht stark variieren. Risikofaktoren für das Erleiden eines Myokardinfarktes sind Fettstoffwechselstörungen, besonders eine Hypercholesterinämie, die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Nikotinabusus und eine positive Familienanamnese.

1.1.1 Gesellschaftliche Bedeutung des Myokardinfarktes

Die Lebenszeitprävalenz eines Myokardinfarktes liegt in Deutschland, bei zwischen 40 und 79 Jahre alten Menschen, bei ca. 4,7 % [2]. Allein im Jahr 2020 starben in Deutschland insgesamt 44.529 Menschen an den Folgen eines akuten Myokardinfarktes [3]. Die Akutsterblichkeit innerhalb eines Krankenhauses liegt, trotz der Fortschritte der Medizin der letzten Jahre und Jahrzehnte, immer noch bei bis zu 12 % [4]. Die beiden häufigsten Todesursachen innerhalb des Akutintervalls stellen Herzrhythmusstörungen [4, 5] und akute Linksherzinsuffizienz dar [4, 6], anhand des Grades der ventrikulären Dysfunktion kann die 30-Tage-Letalität geschätzt werden [7]. Diese Zahlen geben nur den kardiovaskulären Endpunkt wieder. Das Leid und die Einschränkung an Lebensqualität, welche durch eine verminderte linksventrikuläre Funktion bei einem überlebten Myokardinfarkt verursacht werden, sind dadurch nicht erfasst.

Todesursachen nach Krankheitsarten 2021

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2023

Abb. 1: **Die häufigsten Todesursachen in Deutschland.** Dargestellt sind die Daten aus dem Jahr 2021, allgemein sind Erkrankungen des Kreislaufsystems die mit Abstand häufigste Todesursache in Deutschland. Modifiziert nach [8].

1.1.1.1 Arten des Myokardinfarktes

Beim Myokardinfarkt wird zwischen fünf verschiedenen Arten unterschieden. Am häufigsten tritt der Myokardinfarkt Typ 1 (atherosklerotische Plaqueruptur mit Koronarthrombus) auf, da dieser direkt auf die Folgen der sehr weit verbreiteten Atherosklerose zurückzuführen ist [9]. Klinisch wird der Myokardinfarkt in zwei verschiedene Entitäten eingeteilt. Die *ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI)* ist definiert als die Kombination aus der in 1.1 beschriebenen Symptomatik und einer ST-Streckenhebung in zwei benachbarten Ableitungen des EKG. Das Koronargefäß ist vollständig verschlossen und es kommt zu einer transmuralen Ischämie des Myokards. Die *non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI)* ist definiert als die Kombination aus der typischen Symptomatik, ohne ST-Streckenhebungen, jedoch mit gemäß der in 1.1 definierten Erhöhung von cTroponin. Es kommt bei diesem Krankheitsgeschehen zu einem unvollständigen Verschluss des Koronargefäßes und nur zu einer Ischämie der Innenschicht des Myokards, da das Myokard von außen nach innen mit Blut versorgt wird.

1.1.2 Herzmuskelareale nach Infarkt

Nach einem Myokardinfarkt lässt sich das Herz in drei verschiedene Teile einteilen. Das Infarktareal, welches komplett von Ischämie betroffen ist, die Randzone mit direktem

Kontakt zum Infarktgebiet und das sogenannte *remote* Myokard (RM), welches nicht durch die Ischämie betroffen ist.

1.1.2.1 Infarktareal

In den hier durchgeführten Experimenten, wie im untenstehenden Bild (vgl. Abb. 2) dargestellt, wurde die linke vordere Koronararterie (LAD) verschlossen. Damit wird die lebensnotwendige Versorgung mit Blut, Sauerstoff und anderen existenziell wichtigen Stoffen unterbrochen. Aufgrund dessen stirbt das von der verschlossenen Arterie versorgte Gebiet ab. Nach den aktuellen europäischen Leitlinien [4] soll jeder Patient mit einem STEMI, wie ihn auch die Versuchstiere erlitten, innerhalb von 120 min nach Symptombeginn eine Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes erhalten. Auch bis zu zwölf Stunden nach Symptombeginn soll noch eine Wiedereröffnung des betroffenen Gefäßes erfolgen [4]. Die empfohlenen Zeitintervalle der aktuellen ESC-Leitlinie entsprechen dem Evidenzgrad 1A, sind damit durch randomisierte klinische Studien und/oder Metaanalysen untermauert und entsprechen daher dem höchsten Empfehlungsgrad.

Die Größe des Infarktareals wird bestimmt durch die Größe des unter Risiko stehenden Gebiets, die Dauer der Ischämie, die Anzahl und Leistungsfähigkeit evtl. bestehender Kollateralen, die Temperatur und die hämodynamische Situation während der Ischämie [10].

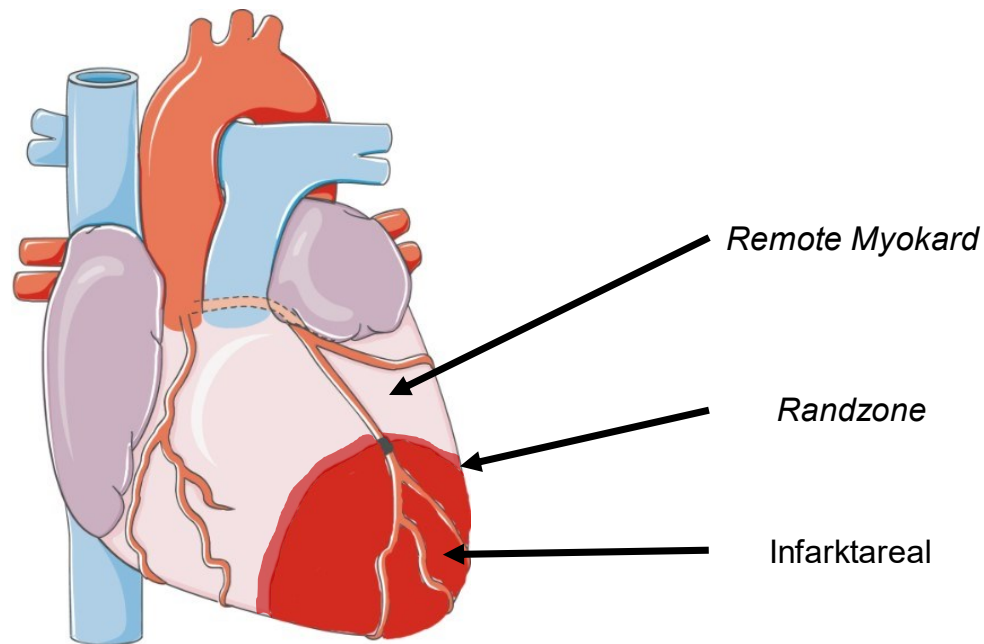


Abb. 2: **Schematische Darstellung eines infarzierten Herzens mit einer Einteilung in *Remote Myokard*, *Randzone* und *Infarktareal*.**

Das Infarktareal wird terminiert die Größe des unter Risiko stehenden Gebiets, die Leistungsfähigkeit etwaiger Kollateralen und die Dauer der Ischämie. Die Randzone schließt sich dem Infarktareal direkt an, die dortigen Myozyten sind durch die Zell-Zell-Verbindungen oxidativem und nitrosativem Stress ausgesetzt. Der Randzone schließt sich das *remote* Myokard an. Die dort residenten Kardiomyozyten sind, obwohl sie keine direkten Zell-Zell-Verbindungen in das Infarktareal besitzen, gegenüber oxidativem und nitrosativem Stress exponiert. Die im Infarktareal produzierten ROS werden nach der Herstellung des Blutflusses auch in das *remote* Myokard ausgeschwemmt. Modifiziert nach [11].

1.1.2.2 Randzone

Die Randzone eines infarzierten Herzens schließt sich an das eigentliche Infarktareal an. Die Kardiomyozyten hier sind nicht von Ischämie betroffen und werden vollständig perfundiert, trotzdem weist das Gebiet eine verminderte Funktion auf. Die Größe der Randzone nimmt in den ersten zwei Wochen nach einem Myokardinfarkt zu [12]. Dies resultiert daraus, dass die dortigen Kardiomyozyten über direkte Zell-Zell-Verbindungen mit dem ischämischen Gebiet verbunden und darüber direkt dem vom ischämischen Gebiet aufgebauten oxidativen und nitrosativen Stress ausgesetzt sind. Ein Hauptmechanismus scheint auch die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen zu sein [13].

1.1.2.3 *Remote* Myokard

Das *remote* Myokard (RM) ist die nicht-ischämische Region eines infarzierten Herzens, welche auch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zum ischämischen Gebiet hat (vgl. Abb. 2). Dieser Bereich ist auch vom Reperfusionsschaden (vgl. 1.1.3) betroffen, da durch eine Wiederherstellung der Blutversorgung des ischämischen Gebiets, die dort gebildeten Sauerstoffradikale und andere Metabolite in das RM ausgeschwemmt

werden und so auch entfernte Bereiche des Herzens erreichen können [13]. Auf Einzelzellebene zeigen sich im RM bereits 24 h nach I/R reduzierte Kontraktionsamplituden und einen beeinträchtigten kardiomyozytären Kalziumkreislauf [14, 15].

1.1.3 Phasen des Myokardinfarkts

Nach einem Myokardinfarkt muss so schnell wie möglich eine Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes durchgeführt werden muss, um die Schäden am Gewebe möglichst gering zu halten. Jedoch kommt es trotz der Rekanalisierung zu einem Schaden am Gewebe. Bereits nach 20 Minuten Ischämie beginnen die ersten Kardiomyozyten abzusterben. Durch Sauerstoff-Mangel ist es der Zelle unmöglich mittels ihrer Mitochondrien ATP zu erzeugen. Der Kardiomyozyt stellt auf anaeroben Stoffwechsel um, dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Laktat, welches den pH-Wert absenkt. Pyruvat wird im anaeroben Stoffwechsel zu Laktat umgewandelt um das für die Glykolyse wichtige NAD^+ zu regenerieren [16]. Dieser Stoffwechsel ist weniger effektiv als der Aerobe, es kommt zum ATP-Mangel. Parallel dazu wird die Fettsäureoxidation massiv verstärkt und die Glykolyse von der Glukoseoxidation entkoppelt. Dies führt zu einer starken Produktion von Protonen. Der Überhang an Protonen und Kalziumionen führt zur Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [17]. Durch den ATP-Mangel kommt es schließlich zu einem Kalziumüberhang im Zytosol und zu einem Erlöschen der Kontraktionen [18]. Aufgrund des Mangels an ATP kann die aktive Ionenhomöostase nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Aktivität der SERCA2a ist reduziert, das Kalzium kann nicht mehr effektiv in das SR gepumpt werden [14]. Im Zuge der Reperfusion kommt es zu einem schnellen Ausschwemmen der erzeugten Protonen, mittels des Na^+/H^+ -Austauschers. Dadurch steigen die intrazellulären Natrium-Spiegel an, was wiederum dazu führt, dass es durch den $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zu steigenden intrazellulären Kalziumkonzentrationen kommt. Diese Kalziumüberladung kann zum Zelltod führen [19]. Nach der Wiederherstellung des Blutflusses beginnt die Produktion der (ROS), die über verschiedene Synthesewege erzeugt werden können. Sie verursachen eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums und locken neutrophile Granulozyten an, die eine Entzündungsreaktion induzieren. Darüber hinaus beschädigen sie die Zellmembran, denaturieren Enzyme und beschädigen auch die DNA direkt oxidativ [18]. Die verursachten zellulären Schäden, der sogenannte Reperfusionsschaden, locken schließlich neutrophile Granulozyten an und der Heilungsprozess beginnt. Dieser Heilungsprozess lässt sich in drei verschiedene Phase einteilen.

1. **Inflammatorische Phase:** In dieser Phase, die sich zwischen 3 h und 72 h nach Reperfusion durchlaufen wird, infiltrieren Immunzellen das ehemals ischämische Gebiet und räumen nekrotisches Material ab.
2. **Proliferative Phase:** In dieser Phase, welche im Zeitraum von drei bis sieben Tagen nach der Ischämie durchlaufen wird, endet die Synthese von proinflammatorischen Botenstoffen und die Heilung beginnt, indem ein Netzwerk aus Fibroblasten, Makrophagen und Gefäßen geformt wird.
3. **Reifephase:** Diese Phase wird zwischen dem siebten und dem 14. Tag nach der Ischämie durchlaufen. In dieser Phase gehen die Fibroblasten in Apoptose und die Blutgefäße ziehen sich zurück. Es hat sich eine Narbe ausgebildet [20].

1.1.4 Mechanische Konsequenzen für das RM

Zellen des RM stehen unter erheblicher mechanischer Beanspruchung [13]. Es konnte auch gezeigt werden, dass das RM bereits 72 h nach einem Myokardinfarkt deutlich fibrotisch ist [21]. In kurzer Folge nach einem Infarkt mit hämodynamischer Relevanz kommt es im RM zu einer verstärkten Dehnung zum Ende der Diastole und dadurch bedingt zu einer relativ gesehen stärkeren Kontraktion [22, 23]. Durch die Infarktnarbe und die Dehnung des RM kann es dazu kommen, dass die Spannung im Ventrikel, auch während der Diastole, konstant erhöht ist [22, 24]. Diese Wandspannung repräsentiert die mechanischen Veränderungen, die im RM nach einem Infarkt ablaufen [25]. Es kommt zur kompensatorischen Hypertrophie [13].

1.2 Diabetes mellitus Typ 2

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine sehr große globale Herausforderung mit ca. 379 Millionen diagnostizierten Erkrankungen und ca. 180 Millionen zusätzlichen nicht diagnostizierten Erkrankten [26]. Zusätzlich zu der bereits bestehenden starken Krankheitslast, besteht in weltweit jedem Land eine steigende Prävalenz [26]. Er stellt einen bedeutenden und unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar [27], ca. 60% aller Diabetes-Patientinnen und -Patienten versterben an kardiovaskulären Ereignissen oder Schlaganfällen [28].

1.2.1 Ursachen und Folgen eines Diabetes mellitus Typ 2

Als Hauptursache des Diabetes mellitus Typ 2 wird eine Kombination aus Fehlernährung und Bewegungsmangel angenommen [29]. Bei näherer Betrachtung erscheint ein erhöhter BMI weniger relevant zu sein, während v. a. eine erhöhte Menge viszeralen

Fettes für die Entwicklung relevant ist [30]. Dieser Phänotyp äußert sich pathophysiologisch in einem Verlust von pankreatischen β -Zellen mit verminderter Insulin-Sezernierung, einer Dysregulation des Immunsystems, reduzierter peripherer Glukoseaufnahme und Insulinresistenz [29].

Diabetes mellitus Typ 2 verursacht eine Vielzahl von Folgeerkrankungen, die sich in fast jedem funktionellen System des Körpers wiederfinden. So lassen sich im psychiatrischen Kontext erhöhte Raten von Depressionen und Angststörungen finden. Im urogenitalen System ist die Rate von Schwangerschaftskomplikationen, Nephropathien und sexuellen Funktionsstörungen erhöht. Kardiovaskulär lässt sich zeigen, dass die Raten an Amputationen, chronischen Herzerkrankungen und Schlaganfällen deutlich erhöht sind. Ebenso ist die Gesamtmortalität deutlich gesteigert [31].

1.2.2 Diabetes mellitus und Myokardinfarkt

Diabetes mellitus ist ein sehr wichtiger Risikofaktor für das Erleiden eines akuten Myokardinfarkts [32]. Das Risiko ist ca. dreifach erhöht im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus, bzw. der Myokardinfarkt wird ca. 15 Jahre früher erlitten, als ohne Diabetes mellitus [33, 34]. Erkrankte haben eine ca. zweifach erhöhte Krankenhausletalität, verursacht durch vermehrte Re-Infarkte und höhere Rate an akuter Herzinsuffizienz [32, 35-37]. Auch ein schlechteres Langzeitüberleben nach einem Myokardinfarkt ist mit einer Erkrankung an Diabetes mellitus verbunden [38].

Mechanistisch stehen diabetische Kardiomyozyten bereits basal stärker unter Stress als Nicht-diabetische. Sie sind durch eine exzessive Einlagerung von Fettsäuren der toxischen Wirkung von Lipidfragmenten ausgesetzt. Ebenso ist ihre ATP-Produktion eingeschränkt und es herrscht bereits basal ein erhöhtes Niveau an ROS [39]. Energie wird vermehrt durch Fettsäureoxidation gewonnen [40]. Die Funktionsparameter (Ventrikelkontraktilität, Bradykardie und Hypotension) nach einem I/R-Schaden sind, im Vergleich zu nicht-diabetischen Herzen, in diabetischen Herzen stark eingeschränkt. Dies liegt daran, dass die Proteinkonzentrationen von Akt und GLUT4, über den insulinabhängig die mengenmäßig größte Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten geschieht, dramatisch reduziert sind. Dies ist einer der Hauptmechanismen für den verstärkten I/R-Schaden bei DM2 [40].

1.2.3 Mausmodelle für Diabetes mellitus

Db/db Mäuse sind ein anerkanntes Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) [41]. Diese Mäuse sind homozygot Leptin-Rezeptor defizient, das bedeutet das sie keine Rezeptoren für das von weißem Fettgewebe gebildete Leptin besitzen [42, 43]. Dieses Mausmodell wurde bereits in mehreren hundert wissenschaftlichen Artikeln zu verschiedenen Themen, die DM2 betreffen genutzt [42]. Das in den db/db Mäusen erzeugte Bild ist dem Menschen sehr ähnlich mit erhöhtem Gewicht, ausgeprägter diabetischer Stoffwechsellaage verkürzter Lebensdauer [41, 44].

1.3 Aufbau und Funktionsweise des Herzens

Das Herz ist ein schlauchförmiger Muskel, der sich funktionell in zwei Ventrikel und zwei Vorhöfe unterteilt. Im Feinbau der Muskulatur des menschlichen Körpers unterscheidet man zwischen der quergestreiften Muskulatur, der quergestreiften Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur [45]. Allen Muskelzellen ist gemein, dass sie die Fähigkeit zur Verkürzung besitzen. Diese Kontraktionsfähigkeit wird durch den ATP-verbrauchenden Gleitmechanismus zwischen Aktin- und Myosinfilamenten verursacht. Der Herzmuskel unterscheidet sich vom quergestreiften Skelettmuskel durch die geringere Größe der Zelle, den zentral gelegenen Zellkern, bzw. deren deutlich geringere Anzahl pro Zelle und durch die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums zwischen den Kardiomyozyten. Des Weiteren existieren spezialisierte Herzmuskelzellen zur Erregungsweiterleitung innerhalb des Herzens und in den Vorhöfen Herzmuskelzellen die zur Hormonproduktion befähigt sind.

1.3.1 Das Sarkomer

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit einer Muskelzelle und ist definiert als die Einheit, die sich zwischen zwei Z-Streifen befindet. Die sogenannten Myofibrillen bestehen aus den dickeren Myosin- und den dünneren Aktinfilamenten. Einzelne Aktinmoleküle sind kugelförmig und zu Ketten zusammengelagert, auf der wiederum die regulatorischen Proteine Troponin und Tropomyosin aufgelagert sind. Die Gesamtheit aus Aktin, Troponin und Tropomyosin bildet das dünne Filament, hier findet die Regulation der Kontraktion statt. Myosinmoleküle sind länglich und bestehen aus einem dünneren und beweglichen Halsteil und einem dickeren Kopfteil. Die Kopfteile ragen aus dem Myosinfilament heraus, an ihnen befinden sich die Bindungsstellen für ATP und Aktin. Das dicke Filament besteht zum größten Teil aus Myosin. Es ist über Titin am Z-Streifen befestigt. Titin ist das größte Protein des menschlichen Körpers und fungiert als

eine Art Feder und zentrales Regulationsprotein des humanen Sarkomers, bspw. im Rahmen des Frank-Starling-Mechanismus [46, 47]. Die Expression dieses Proteins ist je nach Gewebe sehr unterschiedlich, die Masse eines Titin Moleküls variiert je nach Gewebe, aufgrund alternativen *Splicings*, um das fast sechsfache [46]. Die für diese Arbeit besonders relevante Steifigkeit des Titins wird über drei Mechanismen reguliert: die Expression verschiedener Titinformen, die sich in ihrer Steifigkeit unterscheiden, die verschiedenen Phosphorylierungsstadien und über oxidative Veränderungen [47].

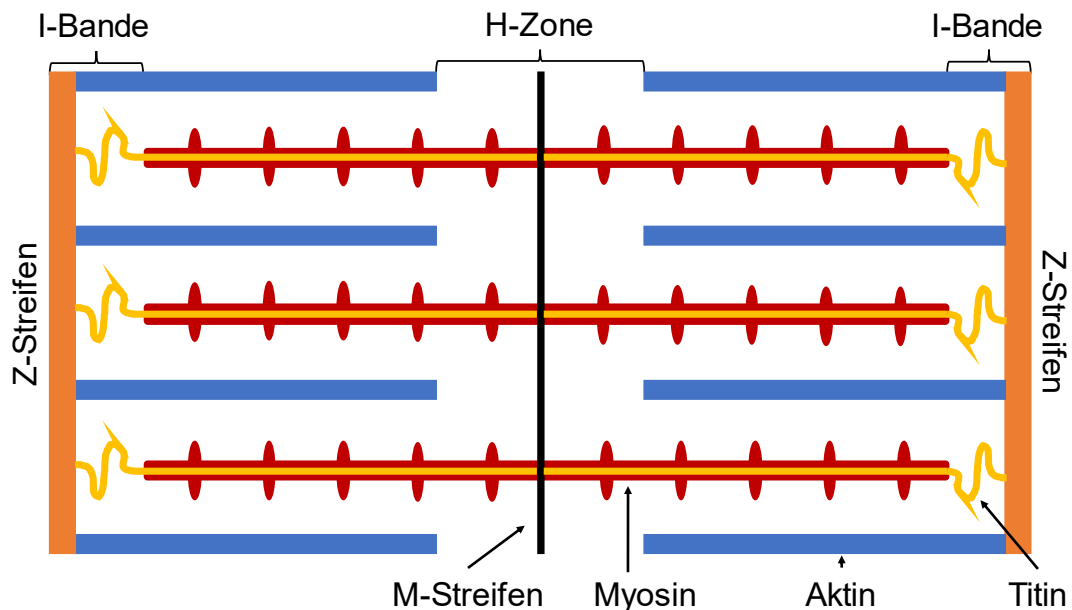


Abb. 3: **Schematische Darstellung eines Sarkomers.**

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle Einheit eines Muskels, sie spannt sich zwischen zwei Z-Streifen auf. Aktin liegen die, in diesem Schema nicht gezeigten, regulatorischen Proteine Troponin und Tropomyosin auf. Zusammen bilden diese Moleküle das dünne Filament. Das dicke Filament besteht größtenteils aus Myosin. Dieses ist über Titin am Z-Streifen befestigt. Das Sarkomer lässt sich lichtmikroskopisch noch in weitere Banden und Zonen einteilen, von denen hier die I-Bande und die H-Zonen exemplarisch gezeigt sind.

1.3.2 Ablauf der Kontraktion

Kommt es zu einer Kontraktion werden die dünneren Aktinfilamente noch tiefer zwischen die Myosinfilamente geschoben und das Sarkomer als Ganzes, sowie die H-Zone und die I-Bande verkürzen sich. Bei geringen Kalziumkonzentrationen in der Zelle blockiert der Komplex aus Troponin und Tropomyosin die Bindung von Myosin an Aktin [48]. Steigt in der Systole die Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten an, so bindet Kalzium an die Troponin C - Untereinheit des Troponins und ermöglicht es, dass die von Tropomyosin sterisch blockierten Bindungsstellen für das Myosin nun freigegeben werden. Unter der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat knickt der Myosinkopf ab und schiebt das dünne Filament in Richtung der Sarkomermitte [49]. Auf diese Weise

verkürzt sich das Sarkomer um bis zu 20% seiner Gesamtlänge. Fällt in der Diastole die Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten ab, kommt es erneut zur sterischen Blockade der Myosinbindungsstelle des dünnen Filaments und das Myosin löst sich vom Aktin ab.

1.4 Kalziumkreislauf von Kardiomyozyten

1.4.1 Ionenverschiebungen während der Herzerregung

Kardiomyozyten haben in Ruhe ein stabiles Membranpotential von -90 mV. Wird eine Nachbarzelle elektrisch erregt, so bereitet sich diese Erregung über die *gap junctions* auch in die umliegenden Zellen aus. Steigt das Membranpotential auf über -70 mV, kommt es zu einem schnellen Natriumeinstrom, der sogenannte „Aufstrich“ des Membranpotentials beginnt. Der Aufstrich führt zu einem initial positiven Membranpotential. Durch Verschiebung von weiteren Ionen pendelt sich das Membranpotential in einer Plateauphase ein. In der ca. 300 ms langen Plateauphase wird das bei 0 mV liegende Membranpotential von dem langsamen Kalziumeinstrom durch L-Typ-Kalziumkanäle getragen, die ab einem membranpotential von über -40 mV öffnen. In Abhängigkeit von der Herzfrequenz kann die Öffnungszeit dieser Kanäle zwischen 200 ms und 400 ms liegen. In der folgenden Repolarisationsphase schließen sich die L-Typ-Kalziumkanäle wieder. Es kommt zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle, durch sich zeitlich verzögert öffnende verschiedene Kaliumkanäle. Das Membranpotential der Zelle strebt nun wieder das Kaliumgleichgewichtspotential an.

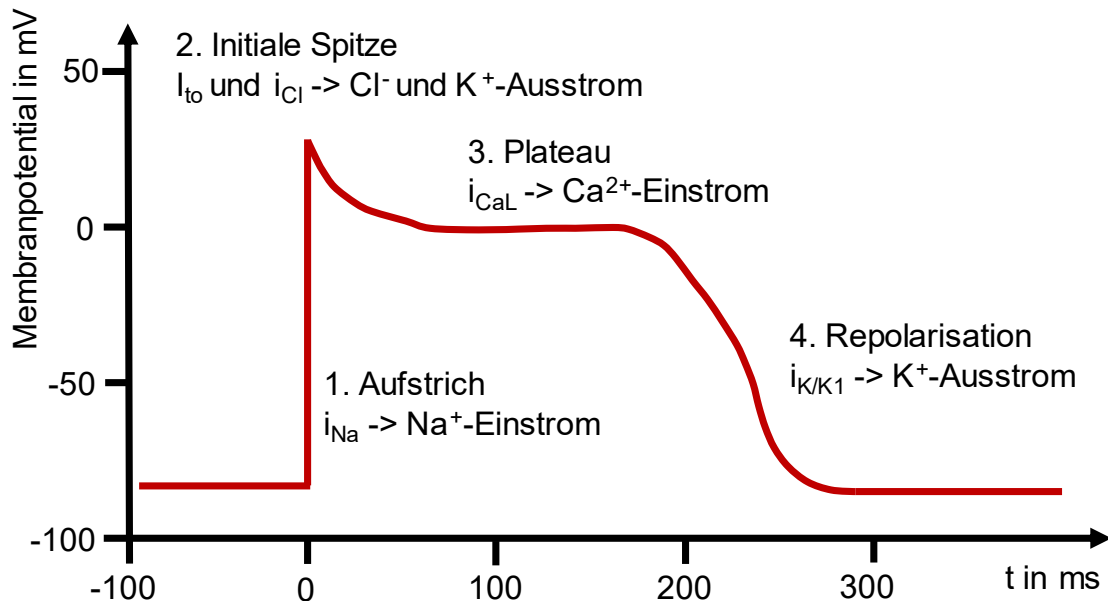


Abb. 4: **Schematische Darstellung des Membranpotentials eines Arbeitskardiomyozyten.**
ms = Millisekunde, mV = Millivolt, Na^+ = Natriumion, Cl^- = Chloridion, K^+ = Kaliumion, Ca^{2+} = Kalziumion

Das stabile Membranpotential eines Arbeitskardiomyozyten liegt bei -90 mV, steigt es auf über -70 mV setzt der sogenannten Aufstrich ein, es kommt zu einem schnellen Einstrom von Natriumionen und das Membranpotential wird initial positiv. Durch den Ausstrom von Chlorid- und Kaliumionen sinkt das Membranpotential wieder auf ca. 0 mV. In der Plateauphase wird dieses Membranpotential von einem Kalziumioneneinstrom getragen. In der sich anschließenden Repolarisation kommt es zu einem Ausstrom von Kaliumionen.

1.4.2 Elektromechanische Kopplung

Kalziumionen (Ca^{2+}) sind die Vermittler zwischen der elektrischen Erregung eines Kardiomyozyten und der daraus folgenden mechanischen Kontraktion der Zelle [50]. In der nicht erregten Zelle ist Konzentration von Kalziumionen um den Faktor 10.000 geringer als im Extrazellarraum. Erreicht der Kardiomyozyt während der Erregungsphase seine Plateauphase (vgl. 1.4.1), so kommt es zu einem Einstrom von Kalziumionen von extrazellulär nach intrazellulär. Erreicht eine Potentialänderung den L-Typ-Kalzium-Kanal, so durchläuft er eine Konformationsänderung und ermöglicht den Durchtritt von Kalziumionen. Dieser Einstrom induziert nun, im Gegensatz zum quergestreiften Skelettmuskel, wiederum den sogenannte Kalzium-induzierten-Kalziumeinstrom [51]. Die durch den L-Typ-Kalzium-Kanal einströmenden Kalziumionen induzieren eine Konformationsänderung des Ryanodinrezeptors 2 (RYR2) im Sarkoplasmatischen Retikulum. Durch diese Konformationsänderung wird nun die Hauptmasse der Kalziumionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt. Die zytosolische Kalziumkonzentration steigt dadurch um den Faktor 100 auf ca. 10^{-5} mol/l an. Die so freigesetzten Kalziumionen binden an Troponin C und ermöglichen die Kontraktion des Muskels (vgl. 1.3.2).

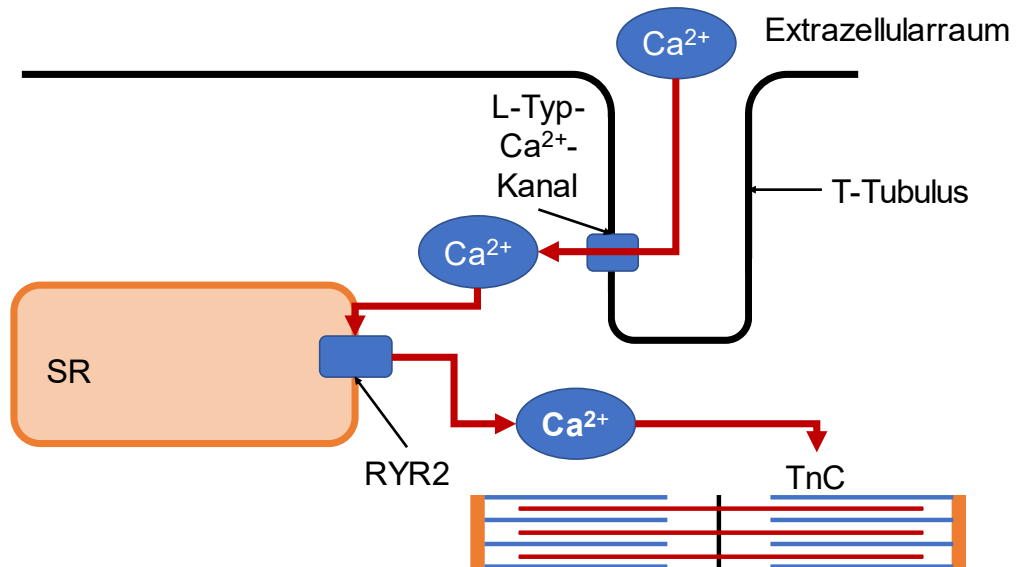


Abb. 5: **Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung eines Kardiomyozyten.**

Ca^{2+} = Kalziumion, SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, RYR2 = Ryanodinrezeptor 2, TnC = Troponin C

Schematisch ist in dieser Abbildung die elektromechanische Kopplung dargestellt. Durch die während der Plateauphase der Herzerregung über den L-Typ-Kalzium-Kanal einströmenden Kalziumionen wird eine Konformationsänderung des RYR2 induziert und Kalziumionen strömen aus dem SR aus. Die freigesetzten Kalziumionen binden nun an Troponin C und ermöglichen die Muskelkontraktion.

Nach Beendigung der Systole und Beginn der Diastole werden die Kalziumionen aus dem Zytosol entfernt. Zum einen werden sie durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) über die Zellmembran wieder in den Extrazellulärraum gepumpt, zum anderen werden sie durch die SERCA2a wieder in das SR zurückgepumpt [51].

1.4.3 Regulationsproteine des Kalziumhaushalts

Der Kalziumhaushalt eines Kardiomyozyten kann durch Modulation der verschiedenen Kalziumpumpen reguliert werden. Der L-Typ-Kalziumkanal wird durch das Gen *CACNA1C* auf Chromosom 12 codiert und gehört zur Gruppe der spannungsaktivierten Kanäle [52, 53]. Reguliert wird die Menge des Ionendurchstroms mittels Phosphorylierung über den cAMP/PKA- und über den NO/cGMP/PKG-Weg [52]. Der Kanal kann durch hohe intrazelluläre Kalziumspiegel Calmodulin-abhängig deaktiviert werden [54].

Der Ryanodinrezeptor 2 wird durch das Gen *RYR2* auf Chromosom 1 codiert [53] und gehört zur Gruppe der Ryanodinrezeptoren, deren Ausfall mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Asthma und Diabetes mellitus assoziiert sind [55]. Eine Phosphorylierung durch die PKA steigert die Aktivität des Ryanodinrezeptors 2 [56],

ebenso weist der Rezeptor auch 13 Aminosäuren entfernt eine Phosphorylierungsstelle für die CaMKII auf [57].

Die SERCA2a ist eine sarkoplasmatische Kalzium-ATPase und wird durch das Gen *ATP2A2* auf Chromosom 12 codiert [53, 58]. Sie verschiebt über 75 % des insgesamt in das Zytosol ausgeschütteten Kalziums wieder zurück in das SR [59] und wird entscheidend von Phospholamban (PLN) reguliert [60]. PLN ist ein 52 Aminosäuren langes transmembranäres Protein des SR, welches in seinem unphosphorylierten Zustand die Aktivität der SERCA2a inhibiert. Mechanistisch stabilisiert es dabei die Konformation der SERCA2a, die kein Kalzium binden kann [61]. Eine Phosphorylierung inaktiviert das PLN, es kommt zu einer gesteigerten diastolischen Eliminationsgeschwindigkeit des Kalziums und somit zu einer schnelleren Relaxation [61]. Es ist somit ein wichtiger Regulator des Kalziumhaushalts und damit der Kontraktilität und der Relaxationsgeschwindigkeit.

1.4.3.1 Regulation des Phospholambans

Phospholamban besitzt insgesamt drei verschiedene Phosphorylierungsstellen, diese befinden sich an S10, S16 und T17 [62]. Phospholamban ist das Ziel von vier verschiedenen Kinasen. Die PKA ist in der Lage Phospholamban sowohl an S16, als auch an T17 zu phosphorylieren. Dieser Weg wird z. B. nach β -adrenerger Stimulation aktiviert und führt im Rahmen einer Stressreaktion zu einer erhöhten kardialen Kontraktilität [63]. Eine β -adrenerge Stimulation führt ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität der CaMKII, die in der Lage ist, PLN an T17 zu phosphorylieren [64]. Auch die Proteinkinase G (PKG) ist in der Lage PLN an der Stelle S16 zu phosphorylieren und ein schnellere Kalziumaufnahme in das SR zu verursachen [65, 66]. Die Proteinkinase C ist *in vitro* in der Lage PLN an der Stelle S10 zu phosphorylieren [62, 67]. Eine Phosphorylierung an S16 oder T17 verursacht durch eine Konformationsänderung des PLN eine erhöhte Aktivität der SERCA2a, wobei sich das PLN dabei nicht von der SERCA2a ablöst, sondern nur den zu Kalziumbindung unfähigen Zustand der SERCA2a nicht mehr stabilisiert [61]. Eine doppelte Phosphorylierung an S16 und T17 führt zu keiner verstärkten SERCA2a-Aktivität im Vergleich zu einer einfachen an einer der beiden Stellen [62].

Proteinphosphatasen sind die physiologischen Gegenspieler der Proteinkinasen, sie sind in der Lage die von Kinasen angefügten Phosphatgruppen wieder zu entfernen. Damit sind sie ein weiteres wichtiges Regulationssystem der Kardiomyozyten. Die Serin-/Threoninphosphatasen PP1, PP2A und PP2C sind für die Dephosphorylierungen von Phospholamban in Kardiomyozyten verantwortlich, dabei entfällt 70 % dieser Aktivität auf die PP1, die restlichen 30 % verteilen sich auf die PP2A und die PP2C [68].

Proteinphosphatasen sind hochregulierte Proteine, so wird allein die katalytische Untereinheit der PP1 von drei verschiedenen Genen codiert und die Aktivität von mehr als 200 verschiedenen Proteinen reguliert [69]. In vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine gesteigerte Aktivität der PP1 und der PP2A 24 h nach I/R im RM identifiziert werden [14].

1.5 Neuregulin 1

Neuregulin 1 ist ein von Endothelzellen ausgeschütteter endothelialer Wachstumsfaktor, der unerlässlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des Herzens ist. Neureguline werden in vielfältigen Geweben ausgeschüttet und vermitteln ihre Wirkung durch Bindung an Mitglieder der Familie der ErbB-Rezeptoren. Durch die Bindung an diese Rezeptorfamilie wirkt Neuregulin 1 auf verschiedenste zelluläre Systeme, z. B. über den ErbB2 und ErbB3 auch auf den Kalziumhaushalt eines Kardiomyozyten [70]. Neuregulin 1, als kardialer Stressmediator, zu dessen Freisetzung es bei jeder Form von kardialen Stress kommt [71], wird direkt nach einem I/R-Ereignis ausgeschüttet [72]. In den folgenden Kapiteln soll auf die verschiedenen Mechanismen eingegangen werden, über die Neuregulin 1 Einfluss auf den kardialen Kalziumhaushalt nehmen kann.

1.5.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren

Es existieren insgesamt vier verschiedene ErbB-Rezeptoren (ErbB1-4, bzw. HER1-4), alle diese Rezeptoren sind Tyrosinkinasen und sitzen in der Zellmembran [73]. Rezeptor-Tyrosinkinasen sind allgemein involviert in Zell-Zell-Kommunikation und in viele andere intrazelluläre Signalkaskaden. Es existieren insgesamt 54 verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche alle strukturell ähnlich sind [74]. Neuregulin 1 bindet selektiv an ErbB3, ErbB3 selbst besitzt keine funktionierende Kinasedomäne, während ErbB2 keine Bindungsstelle für etwaige Liganden besitzt. Durch die Bindung von Liganden werden die Rezeptoren zur Hetero- oder Homodimerisierung angeregt, wobei ErbB2 der bevorzugte Dimerisierungspartner der anderen ErbB-Rezeptoren ist [75]. Durch diese Dimerisierung werden die entsprechenden Signale in das Zellinnere geleitet [73]. Die Signalwege, die von den Rezeptoren aktiviert werden sind äußerst vielfältig, miteinander verbunden und überlappen sich auch. Sie lösen Zellproliferation, Apoptose und viele andere Aktionen aus [73, 75].

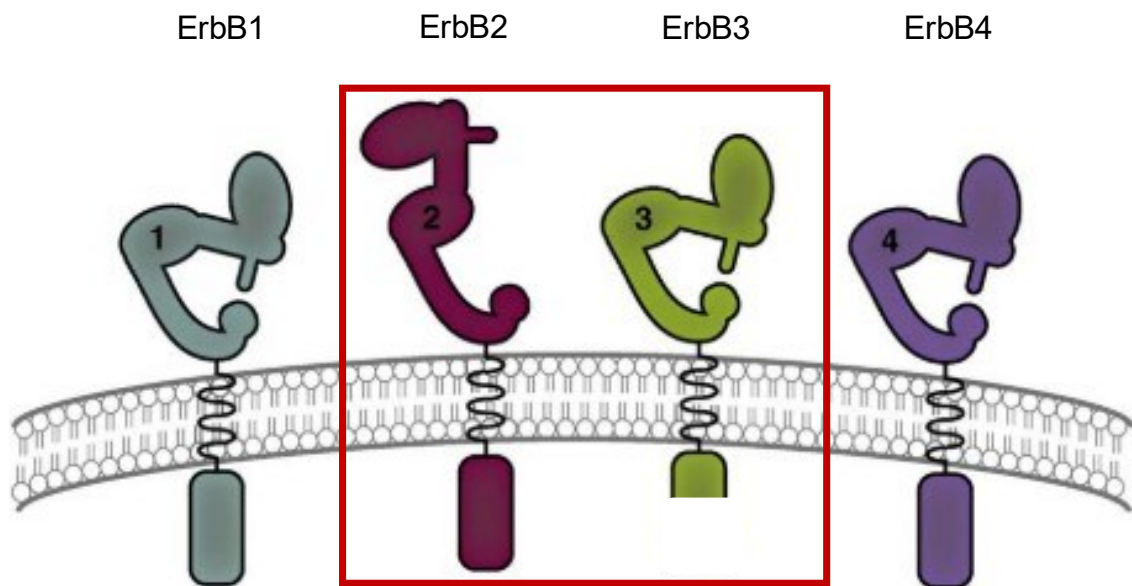


Abb. 6: **Exemplarische Darstellung der vier verschiedenen ErbB-Rezeptoren.** ErbB = Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors
Dargestellt sind hier beispielhaft die vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie. Durch den roten Kasten markiert sind die für die Signaltransduktion von Neuregulin 1 besonders wichtigen ErbB2 und ErbB3. Bild modifiziert nach [75].

1.5.2 Effekte auf die eNOS, den cGMP-Spiegel und die PKG

Es ist bekannt, dass Neuregulin 1 innerhalb von zwei Minuten die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) induziert, bzw. nach fünfminütiger Exposition deren Phosphorylierung erhöht [65, 76]. Dadurch steigt die intrazelluläre NO-Konzentration rapide an [65]. Mechanistisch erhöht NO über eine Aktivierung der Guanylatzyklase [77-79] die intrazellulären cGMP-Spiegel [79-81]. Das cGMP aktiviert wiederum unter anderem die PKG [79, 82], welche wiederum Phospholamban phosphoryliert [62, 83, 84] und somit die Kinetik des Kalziumhaushalts, über eine Enthemmung der SERCA2A, beschleunigt [84]. Die Autoren eingangs erwähneter Studie konnten zeigen, dass durch die erhöhte Phosphorylierung der PKG, die im SR befindliche Kalziummenge signifikant gesteigert wird, was durch eine Enthemmung der SERCA2a begründet ist [65].

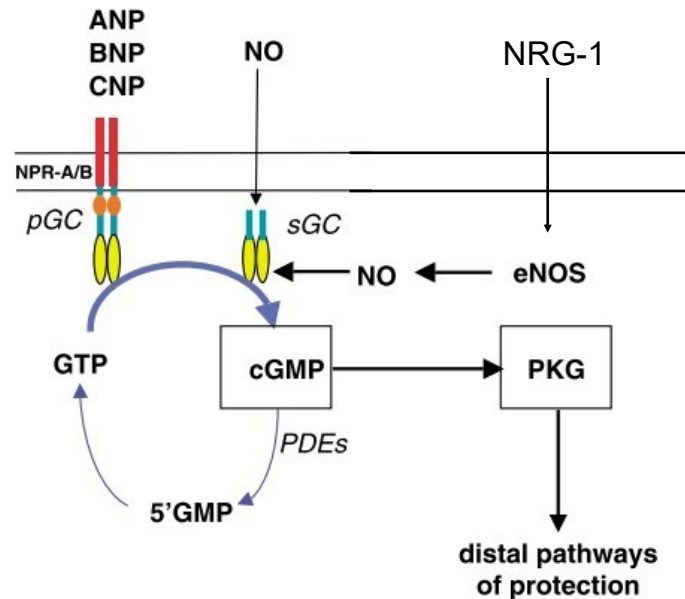


Abb. 7: Schematische Darstellung der Wirkung von NRG-1 über eine Aktivierung der eNOS.

ANP = Atriales natriuretisches Peptid, BNP = B-Typ natriuretisches Peptid, CNP = C-natriuretisches Peptid, NPR = Rezeptor der natriuretischen Peptide, NO = Stickstoffmonoxid, NRG-1 = Neuregulin 1, eNOS = Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, sGC = Lösliche Guanylatzyklase, pGC = Korpuskuläre Guanylatzyklase, GTP = Guanosyltriphosphat, cGMP = Zyklisches Guanosylmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, PDE = Phosphodiesterase, 5'-GMP = 5'-Guanosylmonophosphat
NRG-1 ist in der Lage die eNOS zu aktivieren, dadurch die intrazellulären cGMP zu steigern und somit eine Aktivierung der PKG auszulösen. Modifiziert nach [85].

1.5.2.1 eNOS und NO

Die eNOS ist eine von drei verschiedenen NO-Synthasen [86-88], welche von insgesamt drei Genen codiert werden und sich ca. 60% ihrer Aminosäuresequenzen teilen [80]. Es ist bekannt, dass NO die diastolische Relaxation beschleunigt [89, 90]. NO-Anwesenheit kann zwar die basale Inotropie von Kardiomyozyten nicht beeinträchtigen, jedoch die β -adrenergen Effekte modulieren und bremsen [80, 91]. NO kann in den eng verwandten quergestreiften Skelettmuskeln den Sauerstoffbedarf der Muskelfilamente senken, indem es den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch reduziert [92, 93].

1.5.2.2 cGMP und PKG

cGMP ist ein *second-messenger*, der durch die Guanylatzyklase in Folge der Aktivierung von Signalwegen der natriuretischen Peptide im Herzen gebildet wird.[85]. Kojda *et al.* konnten zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel mittels NO ebenfalls diametral zueinanderstehende Effekte haben kann. Bei einer moderaten intrazellulären cGMP-Erhöhung kam es zu einer verbesserten Reaktion der isolierten Kardiomyozyten auf Stimulation. Kam es hingegen zu einer massiven cGMP-Erhöhung, so verschlechterte sich die kontraktile Antwort der Zellen [94]. Gonzalez *et al.* konnten

diese Befunde 2008 nochmals bestätigen [79]. Die PKG ist, z.B. nach Aktivierung durch NO [95], in der Lage den L-Typ-Kalziumkanal direkt durch Phosphorylierung oder über Phosphorylierung eines Regulators zu inhibieren [95, 96]. Auf diese Weise kann NO und somit auch Neuregulin 1 hemmend in die elektromechanische Kopplung des Kardiomyozyten eingreifen und die intrazellulären Kalziumströme negativ beeinflussen. Neben den inhibitorischen Effekten der PKG auf die intrazellulären Kalziumströme, kann die PKG darüber hinaus auch die kardialen Myofilamente für Kalzium desensitivieren und somit die Inotropie senken [66, 80, 97-99]. Die PKG kann Phospholamban an der Phosphorylierungsstelle S16 phosphorylieren und somit die Aktivität der SERCA2A erhöhen [62, 85, 98, 100]. Diese Phosphorylierung findet nach cGMP Stimulation schon innerhalb von fünf Minuten statt [101].

1.5.3 Effekte auf Titin und weitere Proteine

Die Aufgaben des Titins sind in 1.3.1 beschrieben worden. Es sind fünf verschiedene Kinasen bekannt, die Titin phosphorylieren. Als erste wurde die PKA entdeckt [102], darüber hinaus phosphorylieren auch die PKG [103, 104], die PKC [105], die CaMKII [106] und ERK2 [107] Titin. Im Folgenden werden v.a. die Effekte auf die PKA und PKG erläutert.

Es ist bekannt, dass die PKG Titin an den Stellen S4092, S4099 und S4185 phosphoryliert und so die Steifigkeit von isolierten humanen und caninen Kardiomyozyten verringern kann [103, 104]. Dies führt bei Diabetes mellitus Typ 2 zu einem wieder normalisierten Phosphorylierungsschema des Titins [108, 109]. Diese Studie konnte auch zeigen, dass unter Therapie mit Neuregulin 1 die Phosphorylierung an S4010 verstärkt und die Phosphorylierung an der für die Steifigkeit wichtigen Stellen S11878 verringert wird [108-110]. In diabetischen Mäusen stellt eine Neuregulin 1 Behandlung die normale Phosphorylierung an der Position S4099 wieder her [108]. Die beschriebenen Phosphorylierungsänderungen traten nach nur einer einstündigen Behandlung mit Neuregulin 1 auf [108, 110]. Eine Behandlung mit Neuregulin 1 verringert die Steifigkeit isolierter Papillarmuskeln [76]. Es wird dort gleichsam vermutet, dass Neuregulin 1 in seiner chronischen Applikation (40 µg/kg für eine Woche) den Kalziumhaushalt positiv beeinflusst, indem es zu einer erhöhten Phosphorylierung von Phospholamban führt und so die Inhibition der SERCA2a vermindert [111, 112].

1.5.4 Klinische Effekte

All die in den vorangegangenen Absätzen beschriebenen Effekte des Neuregulin 1 auf Kardiomyozyten, wie z. B. die Veränderung des Schlagverhaltens der Kardiomyozyten konnten auch bereits *in vivo* im Menschen gezeigt werden. Neuregulin 1 kann auch beim Menschen effektiv und in kurzer Zeit das Schlagvolumen des Herzens erhöhen. So konnten Patienten mit einer Herzinsuffizienz der Stadien NYHA II und III und optimaler medikamentöser Einstellung gut von einer Infusion mit Neuregulin 1 profitieren. Während der sechsstündigen Infusion stieg das kardiale Auswurfvolumen um bis zu 30% an. Nach zwölf Wochen war das die Ejektionsfraktion immer noch um 12 % gesteigert. Die Therapie wurde gut vertragen [113].

1.6 Fragen, die diese Arbeit beantworten möchte

1. Beeinflusst eine diabetische Stoffwechsellage den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion im *remote* Myokard nach akutem MI?
2. Kann Neuregulin 1 den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion akut beeinflussen und, wenn ja, gibt es sich diesbezüglich Unterschiede bei diabetischer Stoffwechsellage und/oder nach akutem MI?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

2.1.1.1 Laborgeräte für die Isolation der Kardiomyozyten

Tabelle 1: **Aufstellung der für die Isolation der Kardiomyozyten verwendeten Laborgeräte.**

Gerätebezeichnung	Handelsname	Hersteller
Blutzuckermessgerät	Statstrip Xpress	Nova Biomedical Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Feinwaage		Sartorius, Göttingen, Niedersachsen, Deutschland
Inkubator	Orbital Shaker-Incubator ES-20	Grant-bio, Fisher scientific GmbH, Schwerte, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Millipore-Wasser-Anlage	Milli-Q Advantage A10	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Pumpe (peristaltisch)	Perimax	Spetec, Erding, Bayern, Deutschland

Thermostat Wasserbad

Fisher Bioblock
Scientific S.A.S., Illkirch-
Grafenstaden, Bas-
Rhin, Frankreich

Zentrifuge

Minifuge RF

Heraeus Sepatech,
Hanau, Hessen,
Deutschland

2.1.1.2 Laborgeräte für die Kalziummessungen an isolierten Kardiomyozyten

Tabelle 2: **Aufstellung der Bestandteile des Kalziummessplatzes der Firma IonOptix.**

Gerätebezeichnung	Handelsname	Hersteller
Arc-Lampe		Cairn Research, Kent, England, Vereinigtes Königreich
Elektrischer Stimulator	MyoPacer EP Field Stimulator	Ionoptix, Westwood, Massachuchetts, USA
Heizung	Digital mTCII 2Ch micro- Temp controller	Cell MicroControls, Norfolk, Virginia, USA
Hyperswitch (Fluoreszenzaufnahmen)	HyperSwitch Myocyte System	Ionoptix, Westwood, Massachuchetts, USA
Mikroskop (Kalzium- und Sarkomermessung)	Myocyte Fluorescence Microscope, MoticAE31 & Olympus UApo/340 Objective	Ionoptix, Westwood, Massachuchetts, USA
Mikroskopkamera	MyoCam-S	Ionoptix, Westwood, Massachuchetts, USA

Pumpe (peristaltisch)

Ismatec, Wertheim,
Baden-Württemberg,
Deutschland

2.1.1.3 Laborgeräte für die proteinchemischen Analysen der Kardiomyozyten

Tabelle 3: Aufstellung der für die proteinchemischen Analysen der isolierten Kardiomyozyten verwendeten Laborgeräte.

Gerätebezeichnung	Handelsname	Hersteller
CCD-Kamerasystem zur Proteindetektion (Western Blot)	UVP-ChemStudio	Analytik Jena US, Upland, Kalifornien, USA
Dispergiergerät (Lysatherstellung)	ULTRA-TURRAX IKA T10 basic	IKA Works Inc., Wilmington, North Carolina USA
Plattenlesegerät	Synergy Mx microplate reader	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Proteindetektionssystem	SNAP i.d. 2.0	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
PVDF-Membran	Immobilon-P Membran 0,45 µm Porengröße	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland
Tiefkühlschrank -80 °C	Thermo Scientific Forma - 86 °C Ultratiefkühlschrank	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Western Blot und SDS-PAGE-System	Protean 2	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R, Rotorbezeichnung: F45-24-11	Eppendorf, Hamburg, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verwendete Software

Tabelle 4: **Darstellung der verwendeten Software.**

Bezeichnung	Hersteller
GraphPad Prism® 9	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Microsoft Word®, Excel®, Powerpoint®	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Vision Works®	Analytik Jena US, Upland, Kalifornien, USA
IonWizard® 6.4	Ionoptix, Westwood, Massachusetts, USA

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 5: **Darstellung aller verwendeter Chemikalien.**

Bezeichnung	Hersteller	Chargennummer
2,3-Butandion-monoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	0000058872
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Trizma® base (Tris))	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	092K5458
4-(2-Hydroxyethyl) -piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	SLCD6197
Acrylamid / Bis-acrylamid (30 %) (Aa/Bis) Verhältnis 37,5:1	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	328274419

Albumin Standard	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	SK258450
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	MKCG5404
Benzamidin	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland	3222639
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Roche, Basel, Basel- Stadt, Schweiz	48412628
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	81H3633
D(+)-Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	039277259
Desoxycholsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland	3180455
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1354C451
Ethylenglycol-bis(β- Aminoethylether) -N, N, N', N'- Tetra-acetsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	124H5712

Fura-2-AM	Vormals Invitrogen, inzwischen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	2077760
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	07677155
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	367260165
Heparin-Natrium-25.000 I.E.	Ratiopharm GmbH, Ulm, Baden- Württemberg, Deutschland	W07530
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	96H0089
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland	7447-40-7
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland	10035-04-8
Kollagenase Type 1	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, New Jersey, USA	40C20080

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	BCCC0031
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	406249742
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	325229712
Millipore Wasser	Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA	PM2KB06013
N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	BCBZ6523
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	468277021
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	348273699
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	SLBT7525
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Deutschland	144-55-8
Natriumkalium-Tartrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	

Neuregulin 1	BIOMOL GmbH, Hamburg, Hamburg, Deutschland	1610
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	00973617
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	BCBP5502V
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	UH287197
Pierce BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	UH289272
Polyoxyethylen-20- sorbitanmonolaurat (Tween® 20)	Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland	079280519
Probenecid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	BCISG9604V
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton™ X-100)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	67H0044

2.1.4 Verwendete Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 6: **Aufstellung der primären Antikörper.**

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung	Ursprungstier
Total PLN: A1 (A010-14)	Badrilla Ltd., Leeds, England, Vereinigtes Königreich	1:5000	Maus
Calsequestrin: PA1-913	Vormals Invitrogen, inzwischen Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	1:5000	Kaninchen
p-PLN(S10): A010-10AP	Badrilla Ltd., Leeds, England, Vereinigtes Königreich	1:1000	Kaninchen
p-PLN(S16): A010-12AP	Badrilla Ltd., Leeds, England, Vereinigtes Königreich	1:5000	Kaninchen

2.1.4.2 HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper

Tabelle 7: **Aufstellung der sekundären Antikörper.**

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung	Ursprungstier
Goat-anti- mouse-hrp	Abcam, Cambridge, England, Vereinigtes Königreich	1:10.000	Ziege

Goat-anti-rabbit-IgG	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pennsylvania, USA	1:10.000	Ziege
-----------------------------	--	----------	-------

2.2 Methoden

2.2.1 Puffer und Lösungen

2.2.1.1 Puffer und Lösungen für die Isolation der Kardiomyozyten

Tabelle 8: **Aufstellung der Puffer und Lösungen für die Isolation der Kardiomyozyten.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Enzymlösung	15 mg Kollagenase 1 5,0 µl 0,1 M Kalziumchlorid (CaCl ₂) 20 ml Puffer 2
Puffer 1	73,6 g Natriumchlorid (NaCl) 3,28 g Kaliumchlorid (KCl) 2,03 g Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 500 ml Millipore-Wasser (dd H ₂ O)
Puffer 2	0,336 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) 2,383 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES) 3,03 g 2,3-Butandion-monoxim (BDM) 1,98 g Glucose 50 ml Puffer 1 ad 1000 ml Millipore-Wasser (dd H ₂ O) pH 7,3 – 7,35 Filtration (0,2 µm)

Puffer 3	0,168 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) 1,192 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES) 0,99 g Glucose 25 ml Puffer 1 ad 500 ml Wasser (H_2O) pH 7,3 – 7,35 Filtration (0,2 μm)
Waschpuffer 1	0,4 g Bovines Serumalbumin (BSA Fraction V) 2,0 μl 1 M Kalziumchlorid (CaCl_2) 20 ml Puffer 2
Waschpuffer 2	0,2 g Bovines Serumalbumin (BSA Fraction V) 2,0 μl 1 M Kalziumchlorid (CaCl_2) 10 ml Puffer 2
Waschpuffer 3	0,2 g Bovines Serumalbumin (BSA Fraction V) 5,0 μl 1 M Kalziumchlorid (CaCl_2) 5 ml Puffer 2 5 ml Puffer 3

2.2.1.2 Puffer und Lösungen für die Kalziummessungen an isolierten Kardiomyozyten

Tabelle 9: **Aufstellung der Puffer und Lösungen für die Kalziummessungen an isolierten Kardiomyozyten.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ladepuffer	8,01 g Natriumchlorid (NaCl) 0,403 g Kaliumchlorid (KCl) 0,102 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 2,383 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES) 0,991 g Glucose Ad 1000 ml Millipore-Wasser (dd H_2O) pH 7,3 – 7,35 Filtration (0,2 μm)
Perfusionspuffer	8,01 g Natriumchlorid (NaCl) 0,403 g Kaliumchlorid (KCl) 0,102 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 2,383 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1- piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES) 0,991 g Glucose 0,143 g Probenecid 1,2 ml 1 M Kalziumchlorid (CaCl_2) Ad 1000 ml Millipore-Wasser (dd H_2O) pH 7,3 – 7,4 Filtration (0,2 μm)

2.2.1.3 Puffer und Lösungen für die proteinchemischen Analysen der Kardiomyozyten

Tabelle 10: **Aufstellung der verwendeten Puffer und Lösungen für die proteinchemischen Analysen der Kardiomyozyten.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
--------------------	------------------------

Blockpuffer	0,5 % Milchpulver <i>Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)</i> pH 7,6
Probenpuffer nach Lämmli	0,6 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 3 ml Glycerol 1,5 mg Bromphenolblau 3,9 ml 50 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) pH 6,8 Ad 10 ml Millipore-Wasser (dd H ₂ O)
Laufpuffer	1 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 3 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris) 14,4 g Glycin
Unterer Puffer	4 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 500 ml 1 M 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) pH 6,8 Ad 1000 ml Millipore-Wasser (dd H ₂ O)
Modifizierter RIPA- Lysepuffer	10 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) 0,5 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'- tetraessigsäure (EGTA) 0,5 % t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton™X-100) 0,1 % Desoxycholsäure 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 140 mM Natriumchlorid (NaCl) pH 8,0
Phosphatase- inhibitoren- mischung (100x)	200 mM Imidazol 500 mM Natriumfluorid (NaF) 400 mM Natriumkalium-Tartrat (NaK-Tartrat)
Proteaseinhibitoren mischung	1 M Benzamidin (100x) 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (1000x)

Sammelgel 5% (4x)	8,25 ml Wasser (H ₂ O) 3,3 ml Oberer Puffer 1,65 ml Acrylamid / Bis-acrylamid (40 %) (Aa/Bis) 0,0132 ml N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 0,132 ml Ammoniumperoxodisulfat (APS, 100 ng/ml)
Trenngel 15% (4x)	8,5 ml Wasser (H ₂ O) 7,87 ml Unterer Puffer 15,14 ml Acrylamid / Bis-acrylamid (40 %) (Aa/Bis) 0,01575 ml N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 0,20475 ml Ammoniumperoxodisulfat (APS, 100 ng/ml)
<i>Tris-buffered saline</i> <i>with Tween20</i> (TBS-T)	10 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) 150 mM Natriumchlorid (NaCl) 0,1 % Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween®20)
Übernacht- Antikörper- Inkubation	5 % Milchpulver <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> (TBS-T) pH 7,6
Oberer Puffer	2 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 250 ml 1 M 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) pH 6,8 Ad 500 ml Wasser (H ₂ O)
Western-Blot-Puffer 10x	15,15 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propandiol (Tris) 56,25 g Glycin ad 500 ml Wasser (H ₂ O) 500 ml Methanol (10%)
Western Blot-Puffer 1x	100 ml Western-Blot-Puffer 10x 200 ml Methanol 700 ml Millipore Wasser (dd H ₂ O)

2.2.2 Tierversuche

Die Maus wurde als Versuchsorganismus gewählt, da sie als Modell für das menschliche Herz-Kreislauf-System etabliert ist. Ebenso besteht durch homozygot Leptin-Rezeptor-defiziente Tiere (db/db-Tiere) ein bereits etabliertes Modell für den Diabetes mellitus Typ 2 [15, 116, 117]. Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierexperimente und Organentnahmen wurden nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (TschG), der EU-Richtlinie EU/2010/63, der deutschen Tierschutzverordnung (TSchVerV) und nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) (Aktenzeichen 84-02.04.2017.A145) durchgeführt. Der Autor hat die „Versuchstierkundliche Einführung zur Erlangung des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes“ im Juni und Juli 2020 absolviert und am 10.07.2020 erfolgreich bestanden (FELASA Certificate ID: F048/16_#_0542).

Die verwendeten Tiere der Gruppen zwei und drei (vgl. 2.2.3) entstammten der standardisierten Haltung und Zucht der *Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben* (ZETT) der *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (HHU). Die Tiere der Gruppe eins (vgl. 2.2.3) wurden vom kommerziellen Anbieter Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Pays de la Loire, Frankreich) bezogen und für die Dauer der Operationen in der standardisierten Haltung der ZETT der HHU gehalten.

2.2.3 Verwendete Tiere

Für die Experimente wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt. In den Gruppen eins und zwei wurden ausschließlich männliche, in der dritten Gruppe ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Für den ausgebildeten Phänotyp der db/db-Tiere ist das Geschlecht nicht relevant, jedoch wurde zwecks besserer Vergleichbarkeit innerhalb der einzelnen Gruppen darauf geachtet, dass das Geschlecht der Versuchstiere der einzelnen Gruppen gleich war.

Die in der ersten Gruppe verwendeten Tiere der Linie C57BL/6J waren im Durchschnitt 10 Wochen alt, sie stammten vom kommerziellen Züchter Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Pays de la Loire, Frankreich). Genotypisch waren die Tiere der ersten Gruppe sämtlich Wildtypen (+/+). In der zweiten Gruppe wurden Tiere der in der ZETT etablierten Linie 015 verwendet, das Alter lag zwischen 12 und 17 Wochen. Die zweite Gruppe vergleicht heterozygot Leptin-Rezeptor defiziente Tiere (db/+) mit db/db Tieren. Die Tiere

der dritten Gruppe entstammten ebenfalls der Linie 015, das Alter lag zwischen 13 und 17 Wochen. Die dritte Gruppe vergleicht ebenfalls db/+ Tiere mit db/db Tieren.

Tabelle 11: **Übersicht über die im Experiment verwendeten Tiere**

db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, m = männlich, w = weiblich, SHAM = scheinoperierte Kontrolltiere, welche analog voroperiert worden sind, jedoch ohne LAD-Umstechung und Ischämieinduktion, MI = voroperierte Tiere mit Myokardinfarkt im Zustand nach 60-minütiger Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion

Gruppen-nummer	Genotyp	Geschlecht	Alter	Gruppengröße und Operationen
1	+/+	m	10 Wochen	4 SHAM vs. 4 MI
2	db/+ vs. db/db	m	12-17 Wochen	5 db/+ vs. 4 db/db, keine Operationen
3	db/+ vs. db/db	w	13-17 Wochen	4 db/+ MI vs. 3 db/db MI

2.2.3.1 Homozygot Leptin-Rezeptor defiziente Tiere

Db/db Mäuse sind ein etablierter Modellorganismus für einen Diabetes mellitus Typ 2 [116, 117]. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammten sämtlich der Zuchtlinie 015 der ZETT der HHU. Zur Verifizierung von Übergewicht und Hyperglykämie der Tiere, wurden diese unmittelbar vor der zervikalen Disklokation gewogen, ca. fünf bis zehn Minuten *post mortem* erfolgte eine Blutzuckermessung.

2.2.4 Eingriffe am Tier

Der zeitliche Ablauf der Operationen ist in der nachfolgenden Abb. 8 dargestellt. Es wurde ein zweizeitiges Vorgehen gewählt, zwischen der Operation und der Induktion des Myokardinfarktes vergingen durchschnittlich drei bis vier Tage. 24 Stunden nach der Induktion des Myokardinfarktes wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Herz für die Experimente entnommen.

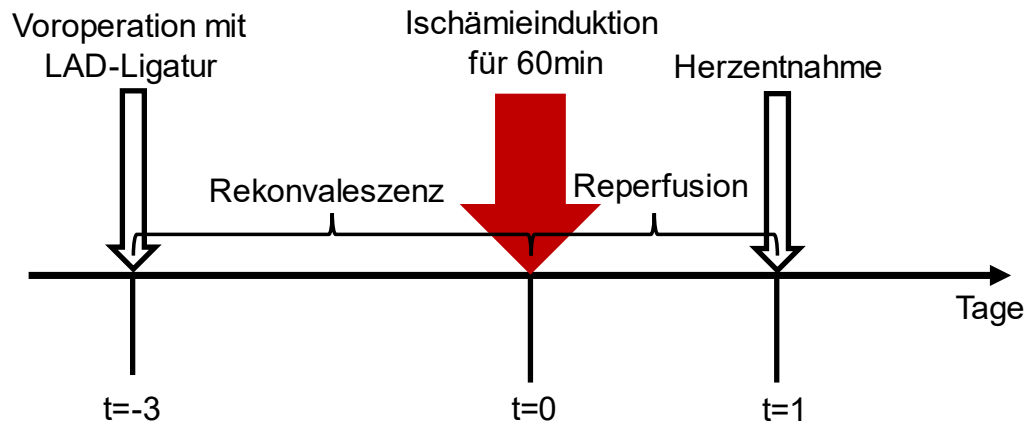


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Operationen.

LAD = vordere linke Koronararterie, min = Minuten, t = Zeit

Die Versuchstiere erhielten drei Tage vor der eigentlichen Ischämieinduktion ihre Voroperation, bei der die LAD ligiert wurde. Nach drei Tagen Rekonvaleszenz wurde für 60 Minuten eine Ischämie induziert, gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion. Nach 24 Stunden wurde das Herz für die Experimente entnommen.

2.2.4.1 Voroperation mit LAD-Ligatur

In der Vorbereitung zu der Operation erhielten die Tiere eine intraperitoneale (i.p.) Narkose mit Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht). Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Körpertemperatur von 35,6 °C bei Raumtemperatur wurden die narkotisierten Tiere auf eine entsprechend eingestellte Heizplatte gelegt [118]. Im Anschluss erfolgte die Intubation der Tiere und eine Beatmung mit physiologischen Atmungsparametern und einer Gasmischung aus zwei Dritteln Raumluft und einem Drittel reinem Sauerstoff. Die Vitalparameter und Schmerzfreiheit der Versuchstiere wurden intraoperativ permanent überwacht.

Die Operation wurde nach dem *closed-chest*-Modell durchgeführt. Über den dritten, linken Interkostalraum wurden die Instrumente in den *Thorax* eingebracht. Von dort erfolgte zuerst die Eröffnung des Perikards, danach die Umstechung der linken vorderen Koronararterie (LAD). Die Nadel des Fadens wurde nach der Umstechung abgetrennt und beide Enden des Fadens wurden durch einen 1mm dicken Polyethylenring gezogen, welcher auf der LAD verblieb. Schließlich wurden die Fadenenden auf Höhe des dritten, linken Interkostalraums subkutan belassen. Der Polyethylenring verblieb auf dem Herzen und induzierte bei Spannung der Fäden einen Verschluss des Gefäßes (vgl. Abb. 9, Kapitel 2.2.4.2). Nach Vernähung der Operationswunde mittels Einzelknopfnähten erwachten die Tiere aus der Narkose. In der sich anschließenden

Phasen der Rekonvaleszenz und Reperfusion (vgl. Abb. 8) wurde eine vollständige Analgesie durch die Gabe von Buprenorphin in der Dosis von bis zu einem Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht gewährleistet.

Die Voroperationen wurden von Herrn Prof. Joachim P. Schmitt und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

2.2.4.2 Ischämieinduktion

Durchschnittlich drei bis vier Tage nach der Voroperation erfolgte die erneute Operation zur Induktion der Ischämie. Bei dieser Operation wurde nach analoger Vorbereitung (vgl. Kapitel 2.2.4.1) ein Myokardinfarkt ausgelöst. Zu dieser Ischämieinduktion wurde die Operationswunde der Voroperation vorsichtig eröffnet und die subkutan belassenen Fäden mobilisiert. Die Fäden wurden für 60 Minuten, mittels hängenden Gewichten von je 3 g pro Fadenende, auf Spannung gebracht. Es wurde elektrokardiographisch überwacht, ob eine Ischämie in der LAD induziert wurde. Als Kriterium für eine stattfindende Ischämie wurden ST-Strecken-Hebungen im Elektrokardiogramm in einer Extremitätenableitung gewählt. Sobald diese sichtbar wurden, wurde die Ischämieinduktion als erfolgreich betrachtet.

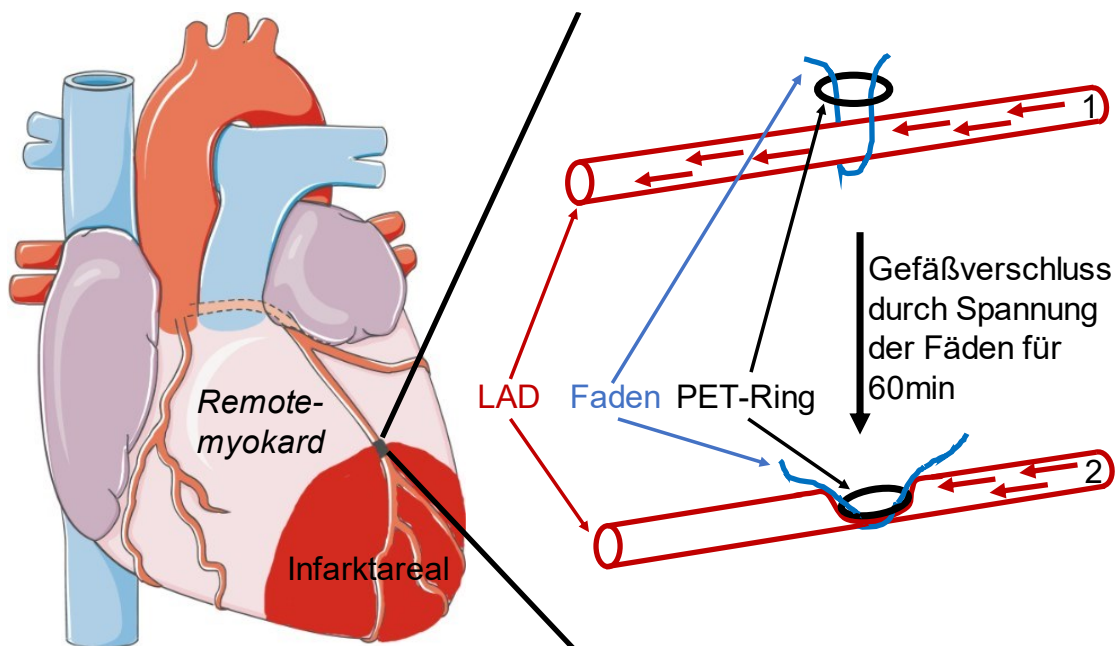


Abb. 9: **Schematische Darstellung der Ischämieinduktion.**

LAD = linke vordere Koronararterie, remote Myokard = Der Teil des infarzierten Herzens, welcher nicht vom Infarkt betroffen ist, min = Minuten, PET = Polyethylen

Nach der Umstechung der LAD in der Voroperation, liegt der blau dargestellte Faden ohne Spannung subkutan vor (1). Der Faden wird auf Zug gebracht, indem er jeweils nach links und rechts weggezogen wird. Dadurch wird der schwarz dargestellte Ring nach dorsal gedrückt und verschließt das Gefäß (2). Diese Spannung auf dem Faden wird für 60 Minuten beibehalten, danach wird die Spannung aus den Fäden genommen und die Phase der Reperfusion beginnt. Bild modifiziert nach [11].

Die postoperative Analgesie erfolgte analog zum Protokoll der Voroperation (vgl. Kapitel 2.2.4.1). Die Ischämieinduktionen wurden von Frau Dr. Simone Gorreßen und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

2.2.4.3 Herzentnahme

24 Stunden nach der Ischämieinduktion erfolgte die Entnahme der Herzen für die im Folgenden beschriebenen Experimente. Mindestens 15 Minuten vor der zervikalen Dislokation wurden den Versuchstieren 400 I.E. Heparin intraperitoneal injiziert. Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Herz sofort für das im Folgenden beschriebene Protokoll entnommen.

2.2.5 Messungen an isolierten Kardiomyozyten

2.2.5.1 Isolierung der Kardiomyozyten

Jedes Tier wurde vor der Heparingabe gewogen. Nach der Tötung des Tieres wurde der *Thorax* eröffnet und das Herz entnommen, hierbei wurde die *Aorta ascendens* am Herz belassen, die Absetzung erfolgte nach Möglichkeit genau proximal des *Truncus brachiocervicalis*.

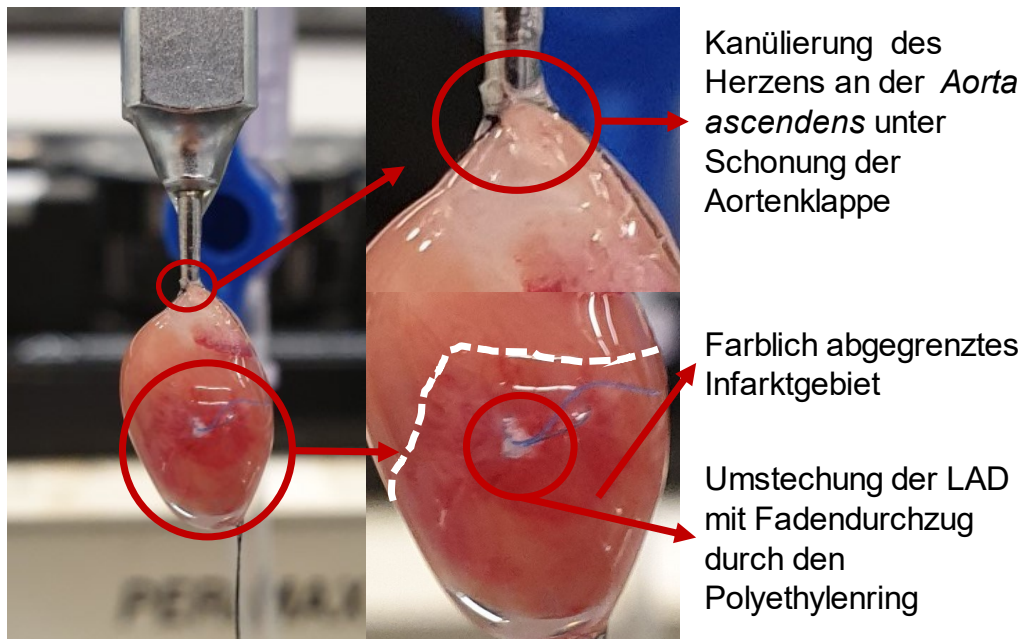


Abb. 10 **Übersicht über den Versuchsaufbau**

LAD = vordere linke Koronararterie

Im oberen roten Kreis ist die Befestigung des Herzens an der Perfusionskanüle mittels schwarzen Garns sichtbar, die Knotung erfolgte mit drei Knoten auf Höhe der *Aorta ascendens*. Im unteren roten Kreis ist der Polyethylenring mit dem hindurchgezogenen Faden der LAD-Umstechung erkennbar. Die weiße gestrichelte Linie stellt die farblich sichtbare Grenze zwischen ischämischem Gebiet und dem *remote* Myokard dar.

Unter dem Präparationsmikroskop wurde anschließend das Herz auf die Perfusionskanüle aufgezogen und dort mit einem dreifachen Knoten befestigt. Hierbei wurde sorgsam darauf geachtet, die Aortenklappe des Herzens nicht zu beschädigen um eine retrograde Perfusion des Herzens durch die Koronarien zu gewährleisten. Die mittlere Dauer zwischen zervikaler Dislokation und Beginn der retrograden Perfusion betrug fünf Minuten und maximal gut sieben Minuten, bei einer Zeit oberhalb von zehn Minuten wäre das Herz verworfen worden.

Die Perfusionskanüle mit dem aufgezogenen Herzen wurde im Anschluss an ein Perfusionssystem angeschlossen. Es wurde eine peristaltische Pumpe verwendet, das Schlauchsystem war in Gänze entlüftet und wurde durch ein Wasserbad auf physiologische Temperaturen von ca. 37 °C erhitzt, die Schläuche waren zu Beginn mit Puffer 2 gefüllt. Nach dem Anschluss der Kanüle wurde der korrekte Sitz des Herzens an der Perfusionskanüle geprüft, indem beobachtet wurde, ob bei Perfusion das Herz deutlich abblasste und deutlich sichtbare Blutropfen ausgewaschen wurden. Nach dieser Kontrolle wurde die Perfusionsflüssigkeit sofort zu einer kalziumhaltigen Kollagenaselösung (vgl. Enzymlösung) hin gewechselt. Nach dem Wechsel von der Perfusionslösung zu der Enzymlösung wurde darauf geachtet, dass das Enzym sechs Minuten Kontakt mit dem Herzen hatte. In dieser Zeit mussten die kompletten 20 ml des Enzyms durch das Herz gepumpt werden. Dies erfolgte, um einen konstant starken

Verdau der Herzen sicherzustellen. Die Durchlaufzeit der Lösung wurde vor jedem Verdau erneut bestimmt, indem die Passagedauer einer Luftblase durch das System gemessen wurde.

Nach dem sechsminütigen Verdau wurde das Herz in eine Petrischale gelegt, welche bereits mit vorgewärmtem Waschpuffer 1 befüllt war. Bei allen Herzen wurde dort die Vorhofebene abgetrennt. In den Gruppen mit einem Myokardinfarkt, beziehungsweise einer Scheinoperation (Gruppe 1 MI und SHAM, Gruppe 3), wurde anschließend das apikal, an der Vorderwand gelegene infarzierte Areal großzügig abgetrennt um sicherzustellen, dass nur Zellen des *remote* Myokards für die weiteren Experimente verwendet wurden. Es wurde dabei proximal der sichtbaren Umstechung geschnitten. Ebenso konnte das Infarktareal aufgrund der verschiedenen Farbe (vgl. Abb. 10), welche vor allem nach der Perfusion eindrücklich imponierte, gut identifiziert werden. Bei den SHAM - Tieren wurde ein gleich großes Areal aus der Vorderwand und dem *Apex* des Herzens herausgetrennt. Der rechte Ventrikel wurde großzügig entfernt. Der verbliebene Rest des linken Ventrikels wurde durch Inzisionen eröffnet und im Waschpuffer 1 zehn Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach der zehnminütigen Inkubation wurde das Herz erneut in die Petrischale gegeben und dort mit einer feinen Schere zerkleinert, nach mehrmaliger Aspiration der Lösung in eine Einmal-Pasteurpipette wurde das Gemisch schließlich durch ein Netz mit 150 µm Porengröße filtriert. Dies diente dazu größere Trümmer zurückzuhalten und nur lebende Kardiomyozyten hindurch zu lassen. Die zurückgehaltenen Trümmer wurden anschließend nochmals in vorgewärmten Puffer 2 gelöst, erneut zerkleinert, aspiriert und nochmals filtriert.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension in der *miniFuge RF* - Zentrifuge für zwei Minuten bei 500 U/min zentrifugiert. Hierbei siedelten sich die lebendigen Zellen am Gefäßboden ab, während Zelltrümmer im Überstand verblieben. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in den Waschpuffer 2 verbracht und resuspendiert. Danach konnten sich die Zellen für 15 Minuten erneut absetzen. Das Prozedere wurde mit Verbringung der Zellen in den Waschpuffer 3 wiederholt.

2.2.5.2 Fura-2 AM

Bei Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2 AM) handelt es sich um das membrangängige Derivat des etablierten Indikators für Ca^{2+} -Ionen Fura-2 [119, 120], zytosolisch wird es durch Esterasen wieder zu Fura-2. Die Kalziumkonzentration eines nicht erregten Kardiomyozyten liegt zytosolisch bei 10^{-7} M und steigt bei Erregung der Zelle durch Entleerung der sarkoplasmatischen Speicher um den Faktor 100 auf 10^{-5} M an [121]. Da

der Konzentrationsunterschied zwischen Zytosol und Extrazellularraum und sarkoplasmatischem Retikulum so groß ist, erfolgt der Einstrom sehr schnell. Kalziumionen sind die wichtigsten Vermittler der elektromechanischen Kopplung und sind darum ein optimales Ziel zur Messung der Funktionsfähigkeit von Muskelzellen. Fura-2 emittiert Licht bei 510 nm, hat es Kalzium gebunden, muss es mit einer Wellenlänge von 340 nm angeregt werden um Licht mit dieser Wellenlänge zu emittieren. Hat Fura-2 kein Kalzium gebunden muss es mit einer Wellenlänge von 380 nm angeregt werden um die Wellenlänge von 510 nm zu emittieren[119].

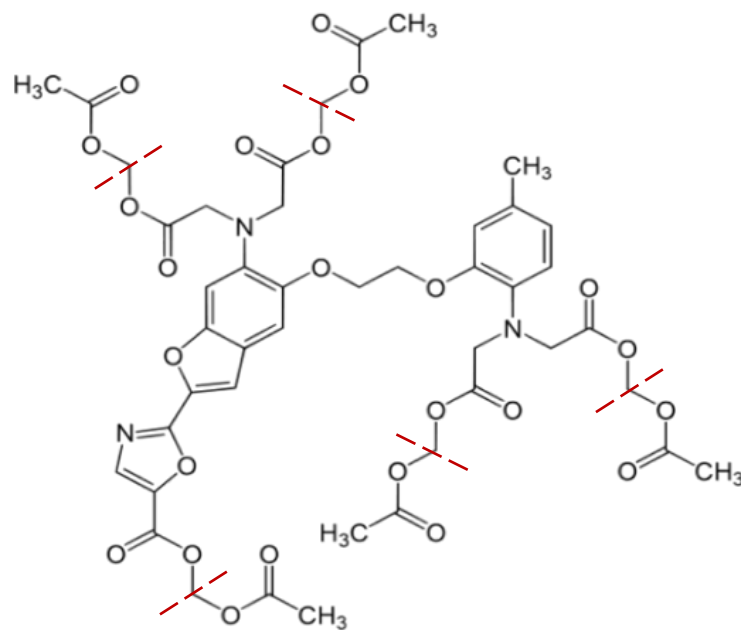


Abb. 11: **Darstellung von Fura-2 AM**

Die gestrichelten roten Linien zeigen die Stellen an, wo das Fura-2 AM von intrazellulären Esterasen zu Fura-2 gespalten wird.

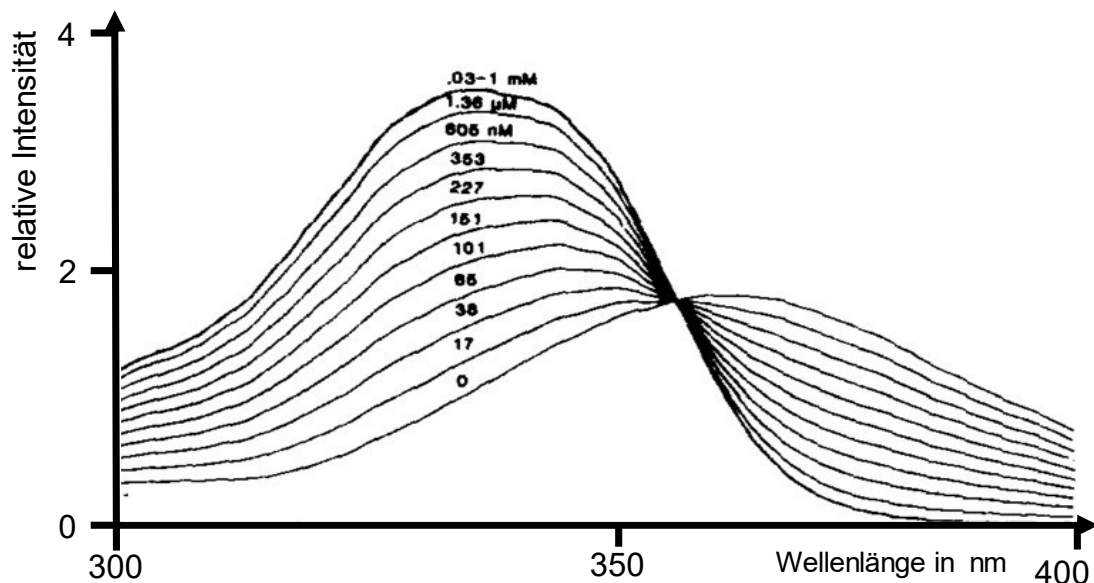


Abb. 12: **Darstellung der Exzitationsmaxima von 1 μ M Fura-2 in Abhängigkeit von verschiedenen Kalziumkonzentrationen bei 20 °C.**

nm = Nanometer, mM = millimolar, μ M = mikromolar, nM = nanomolar, kg = Kilogramm, s = Sekunde

Bild modifiziert nach [119].

2.2.5.3 Messung des intrazellulären Kalziumkreislaufs isolierter Kardiomyozyten

Für die Messungen des Kalziumhaushalts wurde das Pellet, welches am Ende von Kapitel 2.2.5.1 gewonnen wurde, in 3 ml des Ladepuffers resuspendiert. Diese Suspension wurde zu gleichen Teilen in drei verschiedene 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Ein Gefäß verblieb als Kontrollgruppe, ein weiteres wurde mit einem Mikroliter einer Neuregulin1-Lösung mit einer Endkonzentration von 100 nmol/l versetzt. Diese beiden Reaktionsgefäße wurden anschließend für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und nach Abnahme des Überstandes sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und eingelagert. Diese Proben wurden die später in Kapitel 2.2.8 beschriebenen proteinchemischen Analysen benutzt.

Sämtliche im Folgenden beschriebene Schritte wurden ausschließlich in Dunkelheit bei Rotlicht-Beleuchtung durchgeführt, um ein Ausbleichen des lichtsensiblen Fura-2 zu vermeiden. Die Lagerung des Fura-2 erfolgte ebenfalls in absoluter Dunkelheit. Das verbliebene Gefäß wurde mit einem Mikroliter derselben Fura-2 AM – Lösung versetzt und für genau 15 Minuten inkubiert. Nach genau 15 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Ladepuffer resuspendiert, es erfolgte eine erneute Inkubation für fünf Minuten. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in, auf 37 °C vorgewärmtem frischem Perfusionspuffer, resuspendiert. Auf

diesen Schritt folgte die Stimulation der Kardiomyozyten, die im nächsten Abschnitt erläutert werden wird.

Während der elektrischen Stimulation wurde das Gefäß mit den restlichen, nicht in der Messung befindlichen Zellen stets horizontal gelagert, um die mechanische Irritation der Zellen durch das Gewicht des Pallets so gering wie möglich zu halten.

2.2.5.4 Elektrische Stimulation der Zellen

Die elektrische Stimulation der Zellen erfolgte in einer IonOptix© Messkammer, dieses System erlaubt es, parallel in derselben Zelle sowohl die Kalziumbewegungen als auch die Amplitude und Kinetik der daraus resultierenden Sarkomerverkürzung und anschließenden Relaxation zu messen.

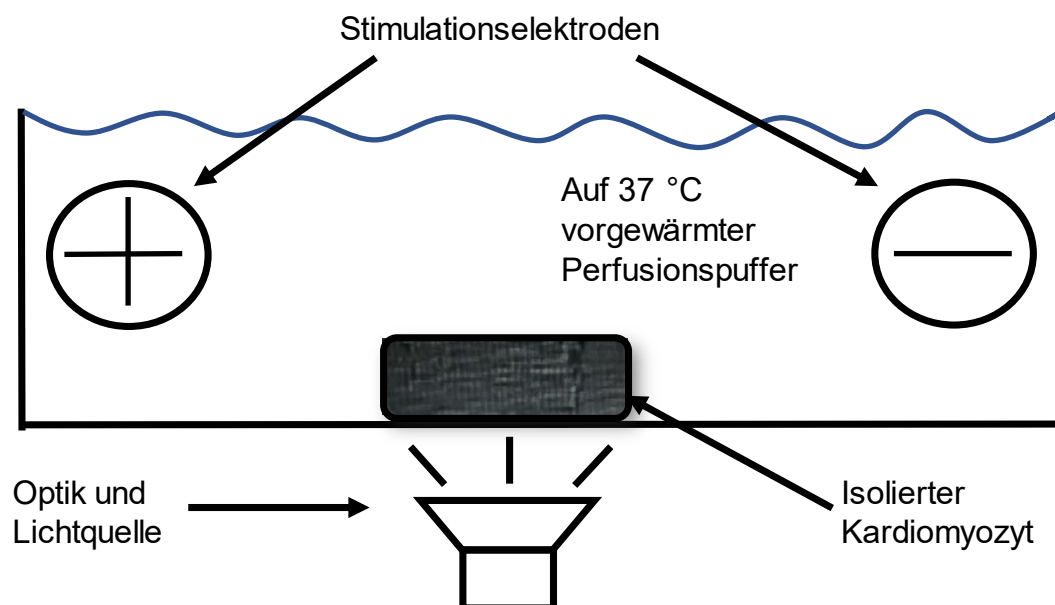


Abb. 13: **Schematische Darstellung der Messkammer in der sämtliche Kalzium- und Kontraktionsmessungen durchgeführt wurden.**

°C = Grad Celsius

Die dargestellte Lichtquelle bezeichnet die ARC-Lampe, welche Licht in Wellenlängen von 340 nm und 380 nm aussendet, dabei strahlt die Lampe konstant dieselbe Wellenlänge aus. Im Abstand von 2 ms wird dieses Licht dann durch zwei verschiedene Filtersysteme gelenkt, die nur die entsprechende Wellenlänge hindurchlassen. Es wurde eine Spannung von 10 V angelegt. Der Perfusionspuffer wurde durch eine vorgeschaltete Heizung erwärmt.

Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden in die Messkammer gegeben, welche vorher mit dem vorgewärmten Perfusionspuffer befüllt worden war. Sobald eine Zelle für die Messungen ausgewählt worden war, wurden Zu- und Abfluss der Messkammer abgestellt und ein Mikroliter einer Neuregulin 1-Lösung mit einer Konzentration von 100 nM hinzugegeben. Die Messungen zu den Zeitpunkten null Minuten, drei Minuten und fünf Minuten erfolgten jeweils an derselben Zelle. Die Messung zum Zeitpunkt null

Minuten erfolgte vor der Zugabe von Neuregulin 1. Der Ablauf der Kontrollgruppe erfolgte analog zu dieser Gruppe.

2.2.5.5 Intrazelluläre Kalziummessung

Für die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde der in Kapitel 2.2.5.2 beschriebene Kalziumindikator Fura-2 verwendet. Fura-2 fluoresziert bei Anregung und die Wellenlänge des maximal stimulierenden Lichts ändert sich in Abhängigkeit davon, ob Kalzium an Fura-2 gebunden ist. Ist Kalzium an Fura-2 gebunden, so liegt das Fluoreszenzmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm. Liegt das Fura-2 jedoch frei vor, so liegt das Fluoreszenzmaximum bei 380 nm. Der *Hyperswitch* wechselt mit einer Frequenz von 500 Hz zwischen diesen beiden Wellenlängen hin und her, so entstehen pro Sekunde 250 Datenpunkte. Eine Wellenlänge von 340 nm wurde als F_1 und von 380 nm als F_0 definiert. Durch die Bildung des Quotienten der beiden Werte (F_1/F_0) ergibt sich der relative Wert von mit Kalzium beladenem Fura-2 innerhalb der Zelle. Der Wechsel zwischen den beiden Wellenlängen minimiert Messfehler durch ungleiche Fura-2 Beladung, durch verschiedene Zelldicken und durch das Ausbleichen des lichtsensiblen Fura-2. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fura-2 erfolgte sowohl dessen Lagerung, wie auch die komplette Verarbeitung in Dunkelheit und nur bei Rotlicht-Beleuchtung.

Als Messparameter wurden drei verschiedene Größen ausgewählt. Die Kalziumfreisetzungsgeschwindigkeit, die Amplitudenhöhe und die Rückpumpgeschwindigkeit.

Die Freisetzungsgeschwindigkeit wurde mittels der Formel $0,75 \times \text{Amplitudenhöhe} / \text{Zeit bis zu 75\% der Amplitudenhöhe}$, aus von dem von IonWizard® software (Version 6.4, IonOptix) übernommen. Die Berechnung der Rückkehrgeschwindigkeit erfolgte analog der Berechnung der Freisetzungsgeschwindigkeit.

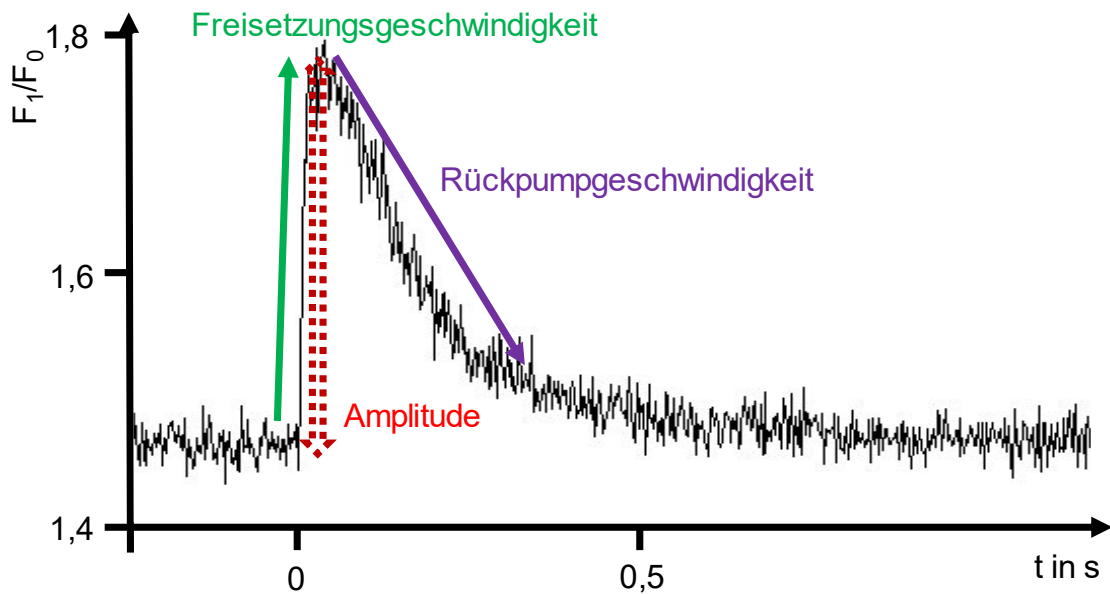


Abb. 14: **Beispielhafter Kalziumtransient mit wichtigen Parametern.**

t = Zeit, s = Sekunde, F_1/F_0 = Verhältnis von mit Kalzium beladenem zu unbeladenem Fura-2
 Kalziumtransienten setzen sich aus einem sehr plötzlichen und steilen Kalziumanstieg bis zur Amplitude, gefolgt von einem deutlich langsameren Kalziumabfall zusammen.

2.2.5.6 Messung der Sarkomerkontraktion

Die Messung der Sarkomerkontraktion erfolgt in dem benutzten System parallel zu der Kalziummessung. Ein geeigneter Kardiomyozyt wurde anhand von vier Kriterien ausgesucht:

1. Der Myozyt musste auf die elektrische Stimulation mit einer kurzen Kontraktion reagieren.
2. Der Myozyt musste Kalziumtransienten erkennen lassen
3. Der Myozyt musste von der Kamera des Messmikroskop so erfasst werden können, dass die einzelnen Sarkomere detektierbar waren.
4. Der Bereich des Kardiomyozyten in dem die Messung stattfand, durfte nicht mit anderen Kardiomyozyten überlappen um Messfehler sowohl in der Kalzium-, wie auch in der Sarkomermessung zu minimieren.

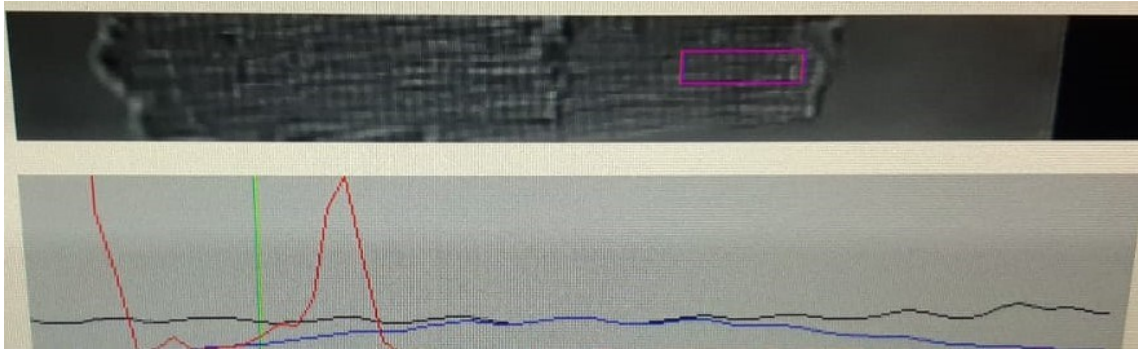


Abb. 15: **Beispielhafter Kardiomyozyt mit repräsentativer Messeinstellung.**

Man erkennt, dass die Zelle (obere Bildhälfte) isoliert liegt und nicht von anderen Zellen überlagert wird. An dem Wellenmuster der blauen und schwarzen Linie in der unteren Bildhälfte lässt sich erkennen, dass das Programm die einzelnen Sarkomere erfasst hat. Der rosafarbene Kasten ist die im Folgenden beschriebene *Region of interest*, welche an jede Messung einzeln angepasst wird.

Wie bereits beschrieben erfolgt die Auswertung der Kontraktion optisch. Hierzu erfasst das IonOptix®-Messprogramm mit Hilfe der Messkamera optisch die Sarkomere. Man wählt am Bildschirm einen kleinen Bereich des eingestellten Kardiomyozyten aus, die sogenannte *Region of interest (ROI)*. Innerhalb der *ROI* erfasst das Programm nun das Hell-Dunkel-Muster der Sarkomere. Die *ROI* ist durch den Benutzer in ihrer Ausdehnung frei bestimmbar und kann für jede Zelle neu und sogar noch während laufender Messungen angepasst werden, wenn sich beispielsweise die Zelle durch permanente Kontraktion aus dem Messfeld bewegt hat. Das Programm misst nun jeweils die Abstände zwischen den Sarkomeren mit 1000 Datenpunkten pro Sekunde. Das Programm zeichnet nun die gemittelte Sarkomerlänge im zeitlichen Verlauf innerhalb der definierten *ROI* auf.

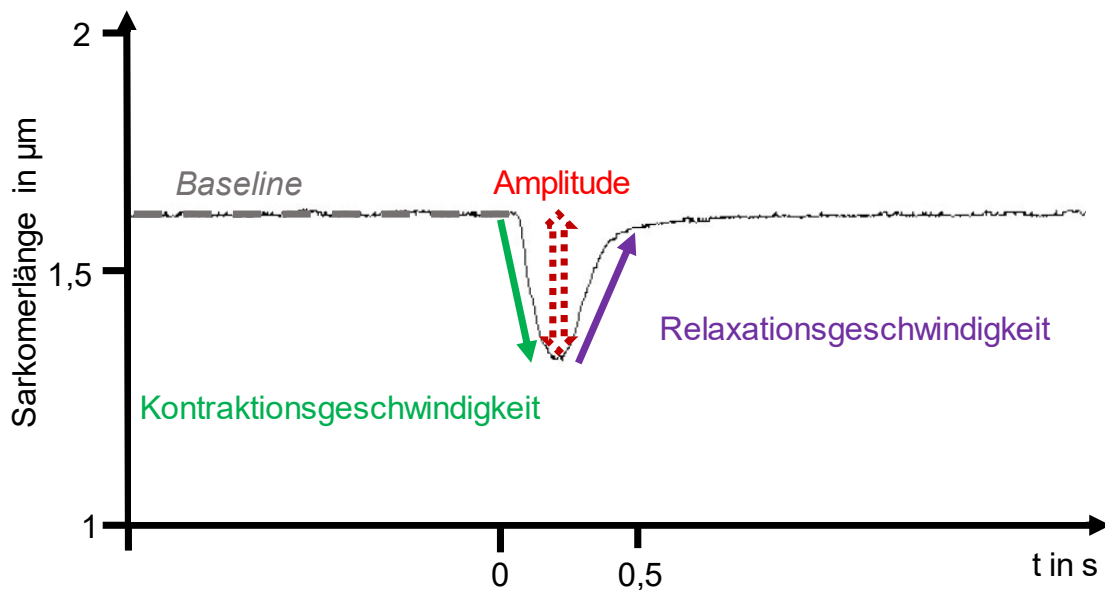


Abb. 16: **Beispielhafte Sarkomerverkürzung eines Kardiomyozyten.**

t = Zeit, s = Sekunde, µm = Mikrometer

Dargestellt ist eine beispielhafte Sarkomerverkürzung, in der die ausgewerteten Parameter eingezeichnet sind.

Ab dem Zeitpunkt der Stimulation beginnen die Sarkomere sich zu verkürzen. Mit der Kontraktionsgeschwindigkeit verkürzen sie sich bis zu einem Minimum. Danach relaxieren sie wieder und kehren auf die Länge der *Baseline* zurück.

2.2.6 Darstellung der Sarkormessungen als *phase plane loops*

Die sogenannten *phase plane loops* dienen der genauen Darstellung der Kontraktion einer Zelle. Es lassen sich so z.B. mit dieser Methode die *Kontraktionsperformance* visualisieren, etwaige Veränderungen der *baseline* oder der Kontraktion bzw. der Relaxation werden so deutlich besser dargestellt, ebenso lässt sich durch die umschlossene Fläche der Kurve die von den Zellen geleistete Arbeit abschätzen. Aus der Steigung der Kontraktion oder Relaxation kann man die Geschwindigkeit ablesen mit der diese jeweils ablaufen.

Bei dieser Methode wird auf der x - Achse die Differenz der gemessenen Fura-2-Werte dargestellt, auf der y - Achse die dazugehörigen Sarkomerlängen. Auf diese Weise erhält man eine Art Kreis, die die Kontraktion eines Kardiomyozyten in Abhängigkeit von seiner Kalziumverschiebung zeigt.

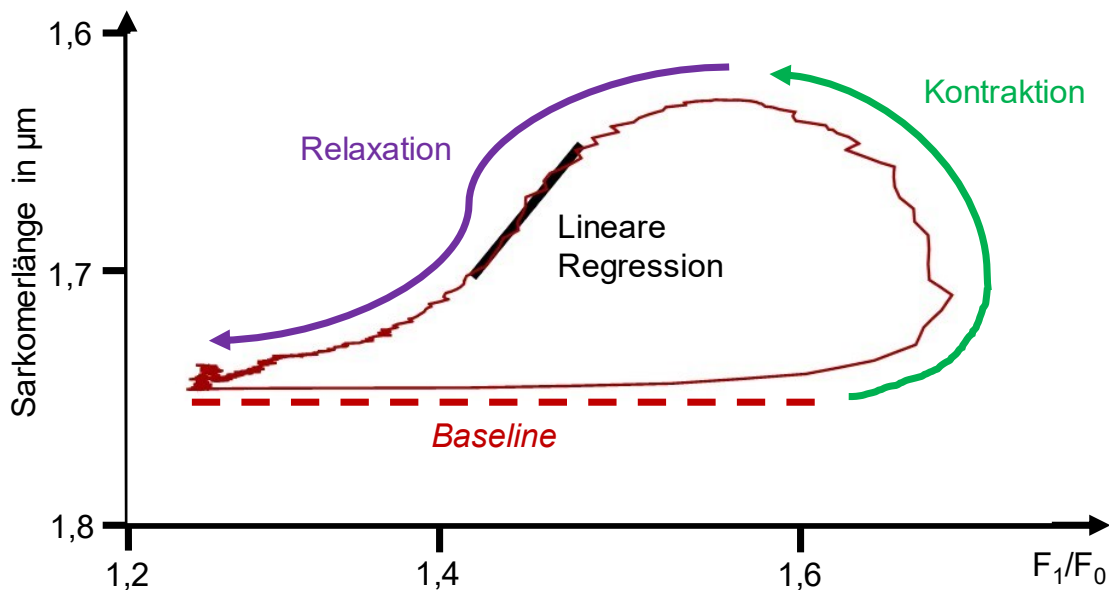


Abb. 17: **Beispielhafter phase plane loop.**

μm = Mikrometer, F_1/F_0 = Differenz der gemessenen Fura-2-Werte
 Auf der x-Achse dargestellt finden sich die gemessenen Fura-2-Werte und damit sind dort die Kalziumbewegungen sichtbar, auf der y-Achse hingegen sind die Sarkomerlängen in invertierter Reihenfolge aufgetragen. So kann hier die Sarkomerlänge in Abhängigkeit von der jeweiligen Kalziumbewegung abgelesen werden.

Die Erstellung der *loops* erfolgte mittels Daten der IonWizard® software (Version 6.4, IonOptix). Hierfür wurde während einer repräsentativen Kontraktion alle 0,002 Sekunden die Sarkomerlänge gemessen. Anschließend wurden aus jeder Gruppe diese Daten für die Zeitpunkte $t = 0$ min und $t = 5$ min gemittelt. Dieser so entstandene gemittelte Transienten wurden dann mittels GraphPad Prism® 9 visualisiert.

Zur Bestimmung der Bereiche der Relaxationsgeschwindigkeit für die lineare Regression wurden bei allen Graphen vom Punkt der maximalen Kontraktion ausgehend, die nächsten 20% der Werte der Relaxation entfernt, ebenso wurden vom Punkt der maximalen Relaxation ausgehend 40% der Werte in Richtung des Punkts der maximalen Kontraktion entfernt. Nach diesem Verfahren wurden alle *phase plane loops* gehandhabt, um nur den annähernd linearen Teil der Sarkomerrelaxation zu untersuchen.

2.2.7 Auswertung der Messungen

Bei Beginn der Auswertung wurden die Sarkomerfunktionen, sowie auch die Kalziumtransienten, daraufhin überprüft ob die Zelle gemäß der Stimulation reagiert hatte. Es wurden von beiden Funktionen jeweils zu den Zeitpunkten null Minuten, drei Minuten und fünf Minuten mindestens sieben Kalziumtransienten bzw.

Sarkomerfunktionen gemittelt. Bei den Kalziumtransienten wurde jeder Transient, der in die Auswertung mit einfließen sollte, manuell auf etwaige Messfehler überprüft und gegebenenfalls aus der Auswertung entfernt. Analog wurde bei den Sarkomerfunktionen verfahren. Von jeder Zelle existieren gemittelte Kalziumtransienten und Sarkomerfunktionen zu den Zeitpunkten null Minuten, drei Minuten und fünf Minuten. Diese wurden nun nach Gruppenzugehörigkeit gemittelt und weiter statistisch ausgewertet. Eine Auswertung nach einzelnen Versuchstieren erfolgte nicht.

Die Auswertung erfolgte ebenso mit den Messprogrammen IonWizard® 6.4, GraphPad Prism® 9 und Microsoft Excel®.

2.2.8 Proteinanalyse

2.2.8.1 Western Blot

Bei dem Western Blot handelt es sich um ein, sowohl in der Arbeitsgruppe, wie auch international etabliertes Verfahren, um Proteine qualitativ wie (semi-)quantitativ zu bestimmen. Bei der Analyse werden die Proteine zuerst mittels Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt die Übertragung auf eine proteinbindende Membran, wo diese durch spezifische Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert und quantifiziert werden konnten.

In den folgenden Kapiteln werden die Schritte des Westernblottings beschrieben. Die Analysen wurden unter Anleitung und Aufsicht von Herrn Dr. Florian Funk vom Promovenden durchgeführt.

2.2.8.2 Vorbereitung der Proben

Wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, wurden zwei Drittel der isolierten Zellen tiefgefroren und für die Western Blot Analysen aufgehoben. Diese Proben wurden für die folgenden Proteinbestimmungen genutzt.

Die Proben wurden aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und aufgetaut. Im Anschluss wurde jedem Probengefäß 100 µl modifizierter RIPA-Lysepuffer zugegeben, ebenfalls hinzugegeben wurden Protease- und Phosphataseinhibitoren. Diese Mischung wurde dann mit einem Dispergierstab mechanisch mehrfach zerkleinert. Nach jedem Gefäß wurde der Rührstab mit frischem, entsalztem Wasser gesäubert um eine Verbringung von Proteinen zwischen den Probengefäßen zu unterbinden. Die zerkleinerten Proben im Lysepuffer mit den Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden für 20 Minuten bei 4 °C in der Zentrifuge *Centrifuge 5424 R* bei 13.000 *rpm* abzentrifugiert. Dabei wurden die Gefäße immer in der gleichen Position aufgestellt, um

sicherzustellen, dass sich das durch Reste von Zelltrümmern entstehende Zellpellet immer an der gleichen Stelle des Gefäßes befand und somit die Zelltrümmer nicht die spätere Analyse stören konnten. 7,5 µl des Überstandes wurden abgenommen und für die spätere Proteinbestimmung im Verhältnis 1:10 mit dd H₂O verdünnt. Diese Lösung wurde im Anschluss sofort in einem separaten Reaktionsgefäß bei in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Es wurde darauf geachtet das Pellet nicht zu manipulieren. Der modifizierte Lämmli-puffer wurde in einem Verhältnis von 1:2 hinzugegeben, sodass ein Drittel des Endvolumens aus Lämmli-puffer bestanden. Die entstandene Lösung wurde im Anschluss zu zwei gleichen Teilen aliquotiert und analog in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Alle Proben wurden während der Verarbeitung permanent auf Eis gelagert, um eine Degradation und Dephosphorylierung der Proteine zu unterbinden.

2.2.8.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA)

Die Proteinkonzentrationen der im vorausgegangenen Kapitel beschriebenen Probe, welche keinen Kontakt zu dem modifizierten Lämmli-puffer hatte, wurde photometrisch mittels *BCA* gemessen. Zuerst wurden dazu definierte Volumina von 25 µl der Proben in Triplets in eine 96-well Platte pipettiert. Ebenso wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin als Vergleich in Dubletten hinzupipettiert. Es wurde das *BCA*-Reagenz gemäß Herstellerangaben angesetzt und 200 µl pro well zugegeben. Im Anschluss wurde der *Proteinassay* für 30 Minuten bei 37 °C unter permanentem Schwenken inkubiert. Die Messung in Dubletten und Triplets erfolgte zur Minimierung von Pipettier-Ungenauigkeiten. Für die spätere Konzentrationsbestimmung wurde immer das arithmetische Mittel der Dubletten bzw. Triplets verwendet.

In dem verwendeten *Proteinassay* bilden sich in alkalischem Milieu Chelatkomplexe zwischen Proteinen und Natriumkaliumtartrat aus. Diese Chelatkomplexe reduzieren, die in dem Assay vorhandenen Cu²⁺-Ionen, zu Cu¹⁺. Das nun reduzierte Kupfer bildet mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen intensiv violett gefärbten Komplex. Bei 562 nm Wellenlänge absorbiert dieser Komplex Licht weitgehend analog zu der Konzentration des Komplexes und damit proportional zu der ursprünglichen Proteinkonzentration. Diese Absorption wird bei der photometrischen Auswertung mittels Mikroplattenlesegerät im 96 wells Format gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergeben sich bei der Auswertung im Vergleich mit der Standardreihe.

2.2.8.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden die mit dem Lämmli-puffer vorbehandelten Proben einer Gelelektrophorese unterzogen.

Dazu wurden ein Trenngel und ein Sammelgel gegossen, in das Sammelgel wurden Taschen eines definierten Volumens eingelassen. In die Taschen wurde zwecks Vergleichbarkeit zwischen den Proben die gleiche absolute Proteinmenge eingefüllt, die Konzentration der Proteine in der jeweiligen Probe war im vorher beschriebenen Schritt photometrisch bestimmt worden. Ebenso wurde zur Einordnung des Molekulargewichts und der Molekulargröße ein Proteinmarker mit bekannter Proteinmenge und bekannten Proteingrößen stets in einer separaten Tasche parallel während der Elektrophorese aufgetrennt.

An die so vorbereiteten Lösungen wurden zuerst eine Spannung von 80 V mit Gleichstrom für 20 Minuten angelegt. Während dieser Zeit durchwandern die Proteine das Sammelgel. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Spannung auf 150 V erhöht und die Proben für weitere 60 Minuten im Trenngel aufgetrennt.

2.2.8.5 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde das Sammelgel abgetrennt. Die im Trenngel befindlichen Proteine wurden zur späteren Analyse auf eine PVDF-Membran übertragen. Um dies zu erreichen wurde ein sogenanntes *Blot-Sandwich* benutzt (vgl. Abb. 18).

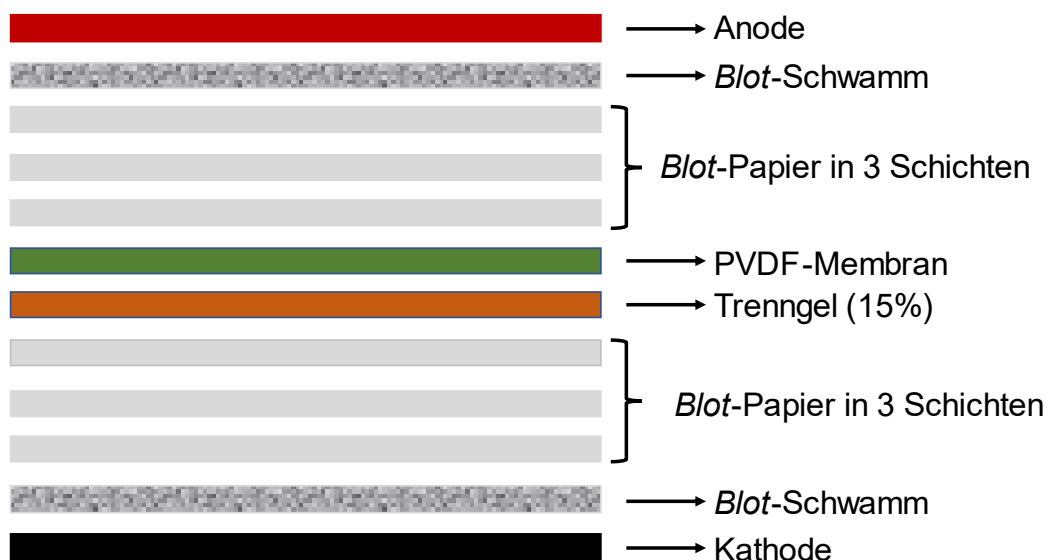


Abb. 18: **Schematischer Aufbau des Blot-Sandwiches.**
PVDF-Membran = Polyvinylidendifluorid-Membran

Bevor die PVDF-Membran in das *Sandwich* eingebracht werden konnte, wurde sie vorher in 100 % Methanol aktiviert. Es wurde sorgfältig geprüft, ob das Sandwich in der richtigen Reihenfolge geschichtet worden war. Besonderes Augenmerk wurde dabei daraufgelegt, ob das Trenngel der Kathode und die PVDF-Membran der Anode

zugewandt waren, da die Proteine durch das gebundene SDS eine negative Ladung tragen und somit zur Anode wandern. Nachdem dies sichergestellt war, wurde das Sandwich in die Blotkammer eingehängt, die Kammer wurde mit Blotpuffer gefüllt. Bei 4 °C wurde mit 100 V für 60 Minuten geblottet.

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen worden waren, wurde die Membran vorsichtig aus dem Sandwich gelöst, dabei wurde genau darauf geachtet, dass die proteintragenden Bereiche der Membran nicht berührt wurden. Im Anschluss wurden die freien Bindestellen der Membran mit einem Gemisch aus 0,5 % Milchpulver in TBS-T blockiert. Die Membran wurde mit dem entsprechenden primären Antikörper in 5 % Milch in TBS-T über Nacht unter permanentem Schwenken bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde jede Membran viermal mit 30 ml TBS-T gewaschen und im Anschluss zehn Minuten mit einem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Nach diesen zehn Minuten wurde die Membran erneut viermal mit 30 ml TBS-T gewaschen. Bei den genannten Waschschritten und Inkubationsschritten wurde das System SNAP i. d. 2.0® der Firma Merck (Darmstadt, Hessen Deutschland) verwendet.

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ mit einem Analysegerät der Firma Jena Analytik, für die digitale Auswertung wurde das Programm *Vision Works*® genutzt.

2.2.8.6 Normierung der Ergebnisse

Die Normierung der digitalen Auswertung durch das Programm *Vision Works*® erfolgte zuerst durch eine Inbezugsetzung der Werte des phosphorylierten Phospholambans mit Calsequestrin. Dieser Wert wurde für jede Probe einzeln ermittelt. Im Anschluss daran wurde für die Kontrollgruppe der Mittelwert gebildet und alle anderen Werte darauf bezogen, indem sie durch diesen Mittelwert dividiert wurden.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels dem Programm GraphPad Prism© 9.0 und Microsoft Excel©. Für statistische Vergleiche zweier Gruppen wurden der gepaarte und ungepaarte *t*-Test verwendet, wobei als signifikant ein Niveau von $P < 0,05$ angesehen wurde. Gepaarte *t*-Tests wurden bei Konstellationen verwendet, bei denen eine Abhängigkeit der Variablen bestand, ungepaarte *t*-Tests bei unabhängigen Variablen. So wurden bei den Vergleichen innerhalb der einzelnen Gruppen ungepaarte *t*-Tests verwendet.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen, bspw. den proteinchemischen Untersuchungen, wurde eine *two-way analysis of variance (two-way ANOVA)* durchgeführt. Hier wurde auch ein Niveau von $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

Mathematische Ausreißer wurden mittels des ROUT-Tests in GraphPad Prism© 9.0 identifiziert und anschließend eliminiert. Dieser Test wurde genutzt, da er am besten geeignet ist um multiple Ausreißer, besonders in kleinen Datenpopulationen zu identifizieren.

Des Weiteren wurden lineare Regressionen und *analysis of covariance (ANCOVA - Tests)* durchgeführt.

3 Ergebnisse

Vorangegangene Arbeiten dieser Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es 24 h nach I/R in nicht-diabetischen Mäuseherzen, im *remote*-Myokard zu einer verlangsamten Kalzium-Kinetik kommt. Als zugrunde liegender pathophysiologischer Mechanismus konnte eine verminderte PKA-abhängige Phosphorylierung des PLN detektiert werden. An dieser verminderten Phosphorylierung ist eine erhöhte Phosphataseaktivität beteiligt. Ebenfalls war die Sarkomerkontraktion in den Myozyoten des *remote* Myokards dieser Herzen beeinträchtigt [15]. In derselben Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Kardiomyozyten aus Mausmodellen für Diabetes mellitus Typ 2 (db/db - Tiere) bereits basal Störungen in ihrem Kalziumstoffwechsel aufweisen, dieser jedoch nicht die Sarkomerkontraktion zu beeinträchtigen scheint. Nach I/R zeigte sich hier jedoch ein deutlich verlangsamter Kalziumstoffwechsel und eine stärker verminderte Sarkomerfunktion, als in nicht-diabetischen Tieren [15].

Gesamtgesellschaftlich betrachtet stellt der Myokardinfarkt ein großes Problem dar, da die Hospitalsterblichkeit weiterhin bei bis zu 12 % liegt. Häufige Ursachen sind Herzrhythmusstörungen und die akute Herzinsuffizienz [4]. Ein möglicher Weg der akuten Herzinsuffizienz entgegenzuwirken soll in dieser Arbeit untersucht werden, indem versucht wird mittels NRG-1 den myozytären Kalziumhaushalt im *remote*-Myokard und die Sarkomerfunktion zu normalisieren.

3.1 Auswahl der Versuchstiere der drei Gruppen

3.1.1 Untersuchungen der Tiere vor Experimentbeginn

Um sicherzustellen, dass die db/db Tiere wirklich übergewichtig waren, wurde bei allen Versuchstieren vor Beginn der Experimente das Körpergewicht bestimmt. Wie in Abb. 19 dargestellt, betrug das Körpergewicht der db/db-Tiere im Schnitt 41,5 g, während die Wildtyp- und db/+ -Tiere durchschnittlich 24,7 g bzw. 24,6 g wogen ($p < 0,0001$ (*one way ANOVA*)). Außerdem wurde unmittelbar nach Präparation des Herzens in dem in der Thoraxhöhle verbliebenen Blut der Blutzucker des jeweiligen Tieres bestimmt. Er war in den db/db-Mäusen mit 590,9 mg/dl signifikant höher als in den Wildtyp- und db/+ -Tieren (175,3 mg/dl bzw. 133,6 mg/dl, $p < 0,0001$ (*one way ANOVA*)). Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser, weshalb die postmortalen Messungen der Blutglukose an nicht nüchternen Tieren durchgeführt wurden.

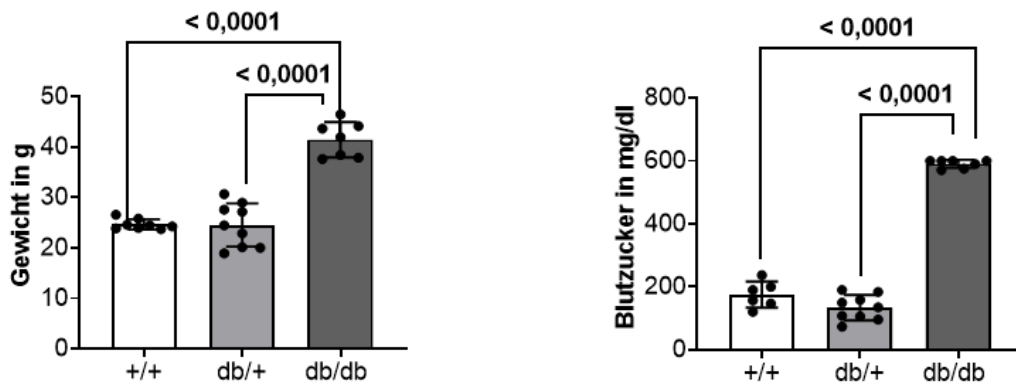


Abb. 19: **Darstellung des Gewichts und des Blutzuckers aller Versuchstiere.** +/+ = Wildtyp, db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier

Dargestellt sind die absoluten Werte für das Gewicht der Versuchstiere in Gramm und der Blutzucker in mg/dl. Die db/db Tiere sind in ihrem Gewicht und in ihrem Blutzuckerspiegel signifikant ($p < 0,0001$ (*one way ANOVA*)) verschieden von den db/+ und den +/+ Tieren.

3.1.2 Ergebnisse der Vorversuche

Für die Vorversuche wurden Mäuse aller Geschlechter und verschiedener Genotypen verwendet. Die Kontrollgruppe bestand aus sieben unterschiedlichen Herzpräparationen, aus denen insgesamt elf Kardiomyozyten gewonnen werden konnten. Die Neuregulin 1-Gruppe besteht aus insgesamt sieben Herzpräparationen, aus denen insgesamt 12 Zellen gewonnen wurden. Dabei wurden hier u. a. die Rückpumpgeschwindigkeit des Kalziums in das SR mittels des in 2.2.5.5 beschriebenen Verfahrens ausgewertet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 5$ min, jedoch wurde eine Tendenz gesehen ($p = 0,054$, gepaarter t Test), dass Neuregulin 1 die Rückpumpgeschwindigkeit nach fünfminütiger Einwirkzeit unter dauerhafter Kontraktion (0,5 Hz) verändert.

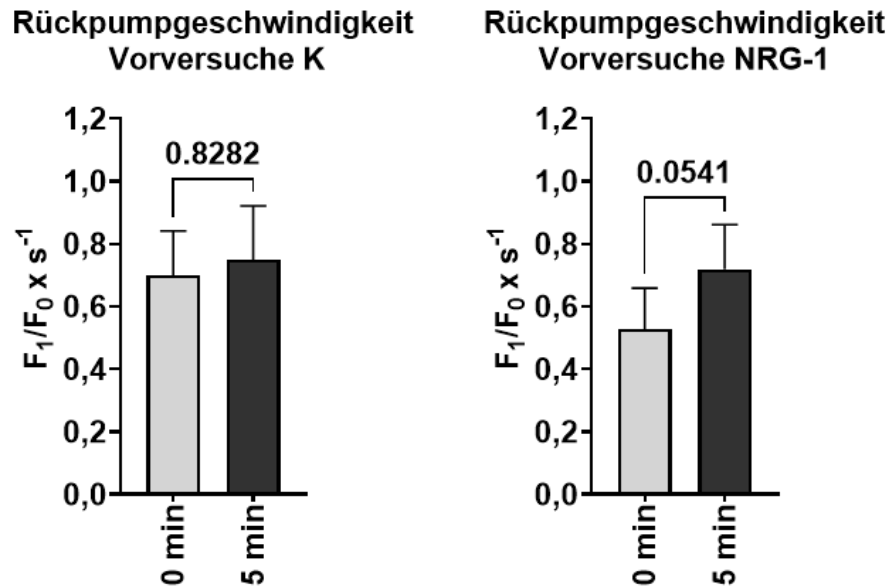


Abb. 20: **Partielle Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche.** K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1, s = Sekunde, F_1/F_0 = Verhältnis der gemessenen Fura-2-Werte bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm. Es handelt sich hier um die Darstellung der absoluten Werte, sie wurde mittels dem ROUT-Test von mathematischen Ausreißern bereinigt. Es zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, gepaarter t Test) (n (K) = 11 Zellen aus 7 unterschiedlichen Herzpräparationen, n (NRG-1) = 12 Zellen aus 7 unterschiedlichen Herzpräparationen). in beiden Gruppen. Jedoch zeigte sich in der Neuregulin 1 Gruppe eine marginale Signifikanz ($p = 0,0541$), dass Neuregulin 1 hier einen Effekt zeigt.

Ebenso wurden Versuche unternommen die Zellen einer Herzpräparation in zwei Gruppen aufzuteilen und eine Gruppe davon jeweils länger mit Neuregulin 1 zu inkubieren. Hier zeigte sich jedoch, wie in Abb. 21 dargestellt, das Problem, dass es eine gewisse Zeit dauert, ausreichend Zellen eines Messzeitraums zu messen. Aufgrund dessen konnte die beiden Gruppen nicht zum selben Zeitraum gemessen werden. Aus Abb. 21 wird ersichtlich, dass die Messungen an den mit Neuregulin 1 inkubierten Zellen ca. 15 Minuten gedauert haben, die letzte gemessene Zelle hatte ca. 60 % länger Kontakt mit Neuregulin 1 als die erste gemessene Zelle dieser Gruppe. Es wurden in der Kontrollgruppe 13 Zellen aus drei verschiedenen Herzpräparationen gemessen, in der mit Neuregulin 1 inkubierten Gruppe waren es ebenfalls 13 Zellen aus drei verschiedenen Herzpräparationen. Es handelt sich um dieselben drei Tiere, welche in beiden Gruppen präpariert worden sind. Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$, ungepaarter t Test), obwohl die Kontrollzellen sich deutlich länger *ex vivo* befanden als die stimulierten Zellen.

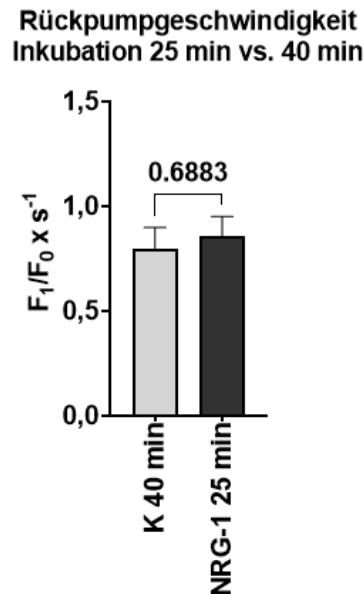


Abb. 21: **Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche mit längerer Inkubation.** F_1/F_0 = Verhältnis der gemessenen Fura-2-Werte, s = Sekunde, K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1, min = Minute

Es handelt sich ebenso um eine Darstellung der absoluten Werte, es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, ungepaarter t Test) (n (K) = 13 Zellen aus 3 unterschiedlichen Herzpräparationen, n (NRG-1) = 13 Zellen aus denselben 3 Herzpräparationen).

Aus den Vorversuchen ergab sich, dass der Ansatz, die Zellen fünf Minuten dauerhaft zu stimulieren der Vielversprechendere ist. Es zeigt sich zum einen eine deutliche Tendenz hin zu einer Wirkung des Neuregulin 1, ebenso können die Messzeitpunkte an derselben Zelle gemessen werden und die Zelle wird während der komplette Wirkdauer von Neuregulin 1 beobachtet. Darüber hinaus ist so sichergestellt, dass alle Zellen auch wirklich nur fünf Minuten Kontakt mit dem Neuregulin 1 haben.

3.1.3 Auswahl des Messzeitraums

Aus denen im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Gründen wurden die Zellen nativ in die Messkammer gegeben und dann bei laufender elektrischer Stimulation das Neuregulin 1 so schnell wie möglich in die Messkammer hinzugefügt. Die Messzeitpunkte $t = \text{null Minuten}$ und $t = \text{fünf Minuten}$ rühren daher, dass eine ausreichende Zellqualität in genug Zellen nicht länger als fünf Minuten garantiert werden konnte, wie die untenstehenden Abb. 22 und Abb. 23 veranschaulichen.

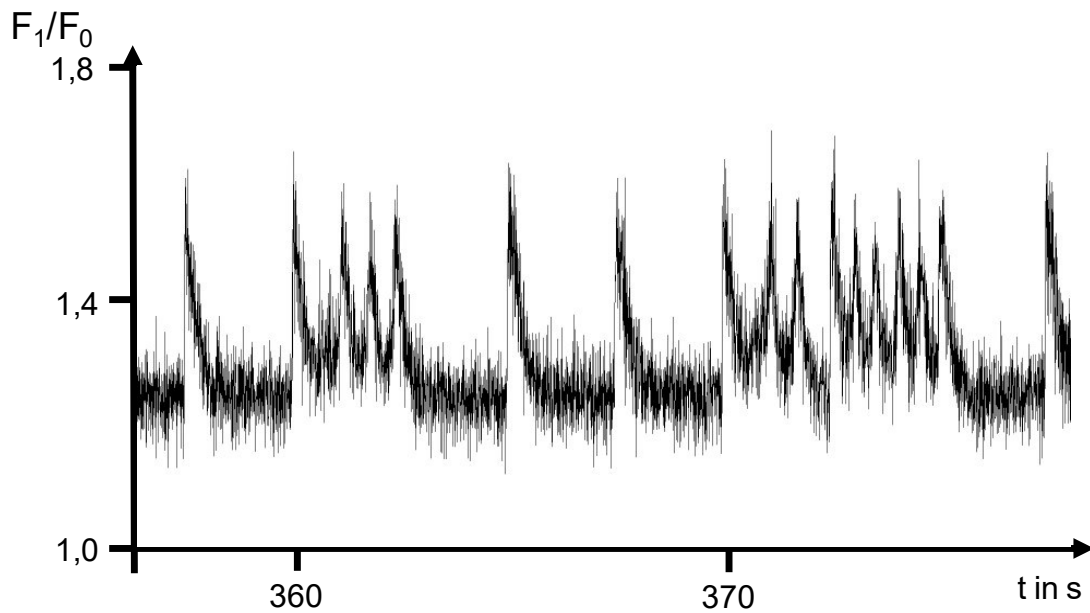


Abb. 22: **Beispielhafte Darstellung eines Kardiomyozyten der nach ca. sechsminütiger Dauerstimulation nicht mehr adäquat auf die Stimulation reagiert.** F_1/F_0 = Verhältnis der gemessenen Fura-2-Werte, t = Zeit, s = Sekunde
Dargestellt ist Verhalten des Kalziumhaushalts nach elektrischer Stimulation.

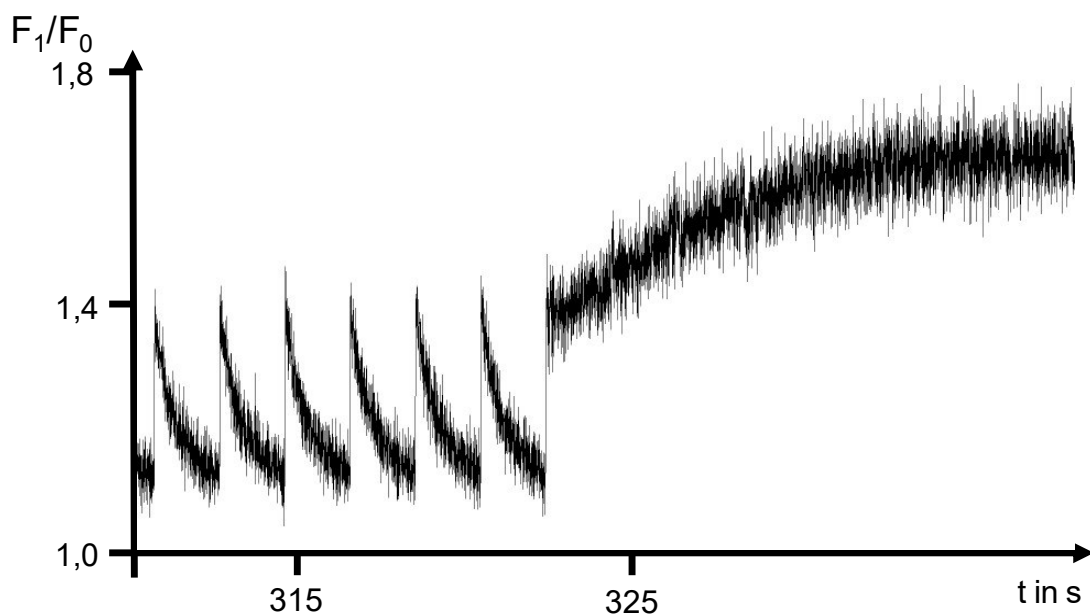


Abb. 23: **Beispielhafte Darstellung des plötzlichen Todes eines Kardiomyozyten nach 325 Sekunden.** F_1/F_0 = Verhältnis der gemessenen Fura-2-Werte, t = Zeit, s = Sekunde
Dargestellt ist Verhalten des Kalziumhaushalts nach elektrischer Stimulation.

3.1.4 Auswahl der Messparameter

Wie in Abschnitt 2.2.5.5 erläutert, wurden für die Auswertung der Kalziumtransienten die Kalziumfreisetzungsgeschwindigkeit, die Amplitudenhöhe und die Rückpumpgeschwindigkeit des Kalziums bestimmt. Diese drei Messparameter wurden

sowohl auf die Auswertung der Kalziumbewegungen, wie auch auf die Sarkomerkontraktionen angewendet.

3.2 Ergebnisse der Gruppe 1 +/- SHAM vs. MI

3.2.1 Untersuchung der Kalziumbewegungen

Wie in 2.2.5.5 beschrieben, wurden die Kalziumbewegungen der Gruppe 1 ausgewertet. Es handelt sich dabei bei der MI-Gruppe um $n = 21$ Zellen aus vier unabhängigen Herzpräparationen, in der SHAM-Gruppe handelt es sich ebenso um $n = 21$ Zellen aus vier unabhängigen Herzpräparationen.

Zur Bestimmung der Änderung der Messparameter (Δ -Werte) wurden die Ausgangswerte von den zu $t = 5$ min gemessenen Werten abgezogen. Im Anschluss wurde von diesen Δ -Werten der nicht mit NRG-1 behandelten Kontrollzellen der Mittelwert pro Maus gebildet. Dieser pro Maus ermittelte Mittelwert wurde von jeder mit NRG-1 behandelten Zelle, die aus derselben Maus stammte, abgezogen, um den Effekt des NRG-1 darzustellen. Die so berechneten Werte werden im Folgenden als $\Delta\Delta$ -Werte bezeichnet.

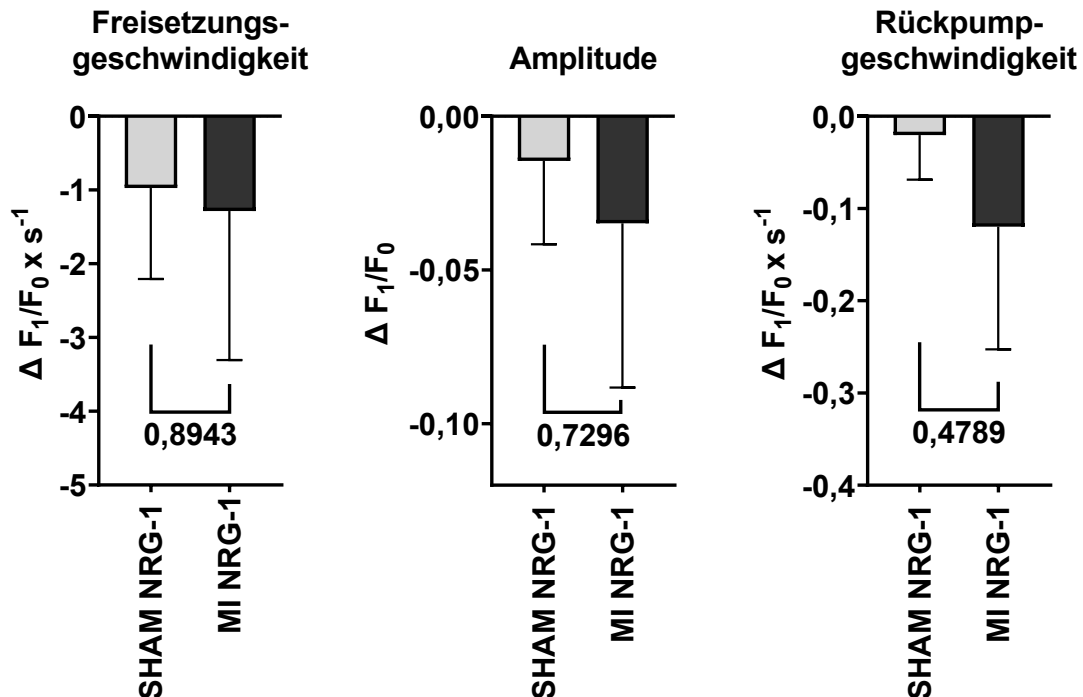


Abb. 24: Darstellung der drei untersuchten Parameter der Kalziumverschiebung in der +/- Gruppe.

$\Delta F_1/F_0$ = Differenz der gemessenen Fura-2-Werte, s = Sekunde, MI = Myokardinfarkt, SHAM = Scheinoperation, NRG-1 = Neuregulin 1

Bei den dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (in beiden Gruppen $n = 21$ Zellen aus vier unterschiedlichen Herzpräparationen, alle p -Werte (ungepaarter t -Test) $> 0,05$).

Es konnte in keinem der drei untersuchten Werte (Freisetzungsgeschwindigkeit (p -Wert = 0,8), Amplitude (p -Wert = 0,7) und Rückpumpgeschwindigkeit (p -Wert = 0,4)) ein signifikanter Unterschied in der NRG-1 Wirkung zwischen Tieren 24 h nach I/R und scheinoperierten Tieren gefunden werden.

Nachdem sich in den analysierten Parametern der Kalziumbewegung kein Unterschied zwischen der SHAM- und der Myokardinfarktgruppe fand, wurde als nächstes untersucht, ob Neuregulin 1 unter den gewählten Bedingungen die Funktion der Sarkomere verändert. Die Sarkomerveränderungen wurden, trotz fehlenden Unterschieds in den Kalziumbewegungen, untersucht, da bekannt ist, dass Neuregulin 1 die Steifigkeit des Titins modulieren kann und somit unabhängig von Kalzium auf die Sarkomerkontraktion wirken kann [108].

3.2.2 Untersuchung der Sarkomerkontraktionen

Für die nachfolgende Abbildung wurden in der MI-Gruppe $n = 14$ Zellen aus insgesamt drei verschiedenen Herzpräparationen, in der SHAM-Gruppe $n = 12$ Zellen aus insgesamt drei verschiedenen Herzpräparationen verwendet.

Analog dem in 3.2.1 beschriebenen Verfahren wurden die Δ -Werte zur Darstellung der Änderung der Messparameter errechnet. Die Werte stammen aus denselben Zellen, aus denen die in Abb. 24. gezeigten Kalziumdaten ermittelt wurden. Die kleinere Stichprobe resultiert unter anderem daraus, dass die Messung der Kontraktion über optische Erfassung der Sarkomergrenzen erfolgt. Da sich die Zellen innerhalb von fünf Minuten bisweilen etwas bewegt haben, konnte dadurch im Verlauf der Messung die Detektion der Querstreifung verloren gehen, so dass die Aufzeichnung der Sarkomerlängen in diesen Zellen abbrach. Die auf diese Weise berechneten Werte werden im Folgenden ebenso als $\Delta\Delta$ -Werte bezeichnet.

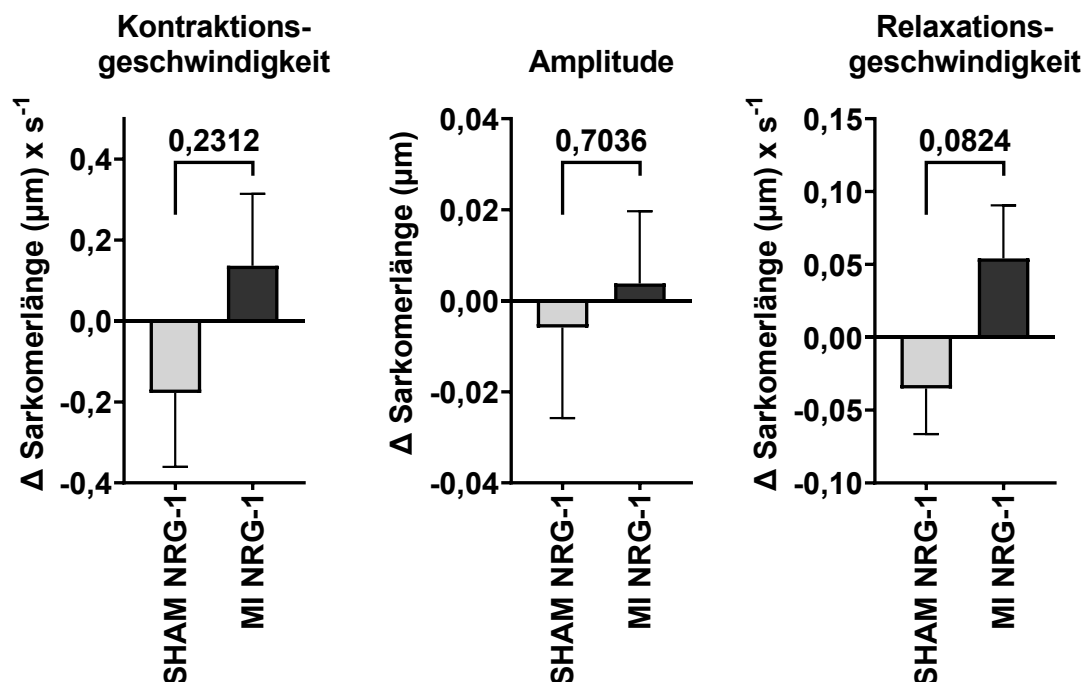


Abb. 25: Darstellung der drei untersuchten Parameter der Sarkomerkontraktion in der +/- Gruppe.

MI = Myokardinfarkt, SHAM = Scheinoperation, NRG-1 = Neuregulin 1, μm = Mikrometer
s = Sekunde

Bei den dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (MI-Gruppe: n = 12 Zellen aus drei verschiedenen Herzpräparationen, SHAM-Gruppe: n = 12 Zellen aus drei verschiedenen Herzpräparationen, alle p -Werte (ungepaarter t -Test) > 0,005).

Es konnte in keinem der drei Werte (Kontraktionsgeschwindigkeit (p -Wert = 0,2), Amplitude (p -Wert = 0,7), Relaxationsgeschwindigkeit (p -Wert = 0,08)) eine Signifikanz in der NRG-1 Wirkung, zwischen den Myozyten des *remote* Myokards der Tiere 24 h nach I/R und den scheinputierten Tieren gefunden werden.

Sowohl in den Kalziumbewegungen als auch in den Sarkomerkontraktionen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden mit Neuregulin 1 behandelten Gruppen finden. Darum erfolgt im Anschluss die Darstellung der verschiedenen Gruppen im Vergleich der Absolutwerte zu $t = 0$ min und zu $t = 5$ min.

3.2.3 Phase plane loops

Die nachfolgend gezeigten *phase plane loops* wurden nach dem in 2.2.6 dargestellten Verfahren erstellt. Sie dienen dazu, Aussagen über die Kalziumsensitivität der Myofilamente zu treffen, da hier die Sarkomerlänge und die Kalziumkonzentration der Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten in ein Verhältnis gesetzt werden.

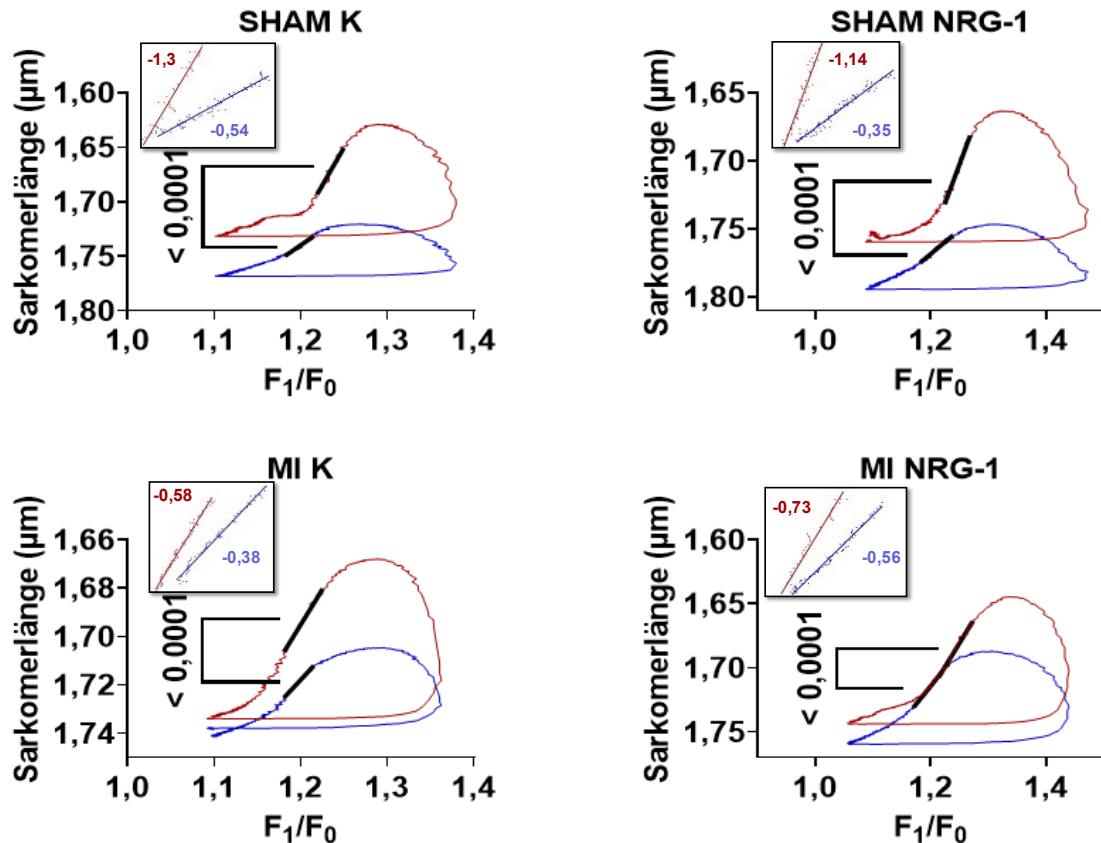


Abb. 26: Exemplarische Darstellung der sogenannten *phase plane loops*. SHAM = Scheinoperation, MI = Myokardinfarkt, K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1, µm = Mikrometer, min = Minuten, F_1/F_0 = Verhältnis des vom Fura-2 absorbierten Lichts zu den verschiedenen Wellenlänge 380nm und 340 nm. Der schwarze, dicke Balken stellt die lineare Regression während der Relaxationsphase dar. Die blaue Farbe den Messzeitpunkt $t = 0$, die rote Farbe den Messzeitpunkt $t = 5\text{min}$ ($p < 0,0001$ (ANCOVA) in jeder Gruppe bei dem Vergleich der linearen Regressionen). Im oberen linken Bereich eines jeden *Loops*, findet sich eine qualitative, vergrößerte Darstellung des Bereichs, der für die linearen Regressionen genutzt wurde. Die dazugehörige Regressionsgerade ist in dieser Vergrößerung, statt in schwarz in rot, bzw. blau dargestellt. In der Vergrößerung sind ebenfalls farblich passend, die Steigungen der Regressionsgeraden dargestellt.

In der Gruppe *SHAM K* lag die Steigung zu $t = 0$ bei -0,54 bei einem r^2 von 0,95, bei $t = 5\text{ min}$ lag sie bei -1,3 bei einem r^2 von 0,94. Der p -Wert war $< 0,0001$ nach ANCOVA-Test, dass die Steigungen zu beiden Zeitpunkten gleich sind, wodurch sich ein signifikanter Unterschied in den Steigungen ergibt.

Analog waren die Steigungen nach 5-minütiger Stimulation auch in den anderen Gruppen stärker. In der Gruppe *SHAM NRG-1* fiel sie von -0,35 ($r^2 = 0,96$) auf -1,140 ($r^2 = 0,93$; $p < 0,0001$), in der Gruppe *MI K* von -0,38 ($r^2 = 0,98$) auf -0,58 ($r^2 = 0,98$; $p < 0,0001$) und in der Gruppe *MI NRG-1* von -0,56 ($r^2 = 0,98$) auf -0,73 ($r^2 = 0,97$; $p < 0,0001$).

Es konnte damit gezeigt werden, dass sich die Geschwindigkeit des linearen Teils der Sarkomerrelaxation innerhalb der fünfminütigen Stimulation der Myozyten (0,5 Hz) relativ zum Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration signifikant verschnellert, im Sinne einer Steigerung der Kalzium-Sensitivität der Myofilamente. Dies geschieht sowohl in den Tieren mit Myokardinfarkt, als auch in den SHAM-Tieren, ebenfalls geschieht dies sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von Neuregulin 1.

3.2.4 Proteinbiochemische Untersuchungen

Die proteinchemischen Analysen wurden vom Promovenden unter Anleitung und Aufsicht von Herrn Dr. Florian Funk durchgeführt.

Phospholamban besitzt drei verschiedene Phosphorylierungsstellen, Serin 10, Serin 16 und Threonin 17 [62]. Die Auswahl des Serin-10 erfolgte aufgrund der Eigenschaft von Neuregulin 1 die Proteinkinase C (PKC) zu hemmen [122, 123]. Die PKC phosphoryliert Serin-10 des Phospholambans. Außerdem reduziert Neuregulin 1 die Aktivität von Phosphatasen, u.a. der Proteinphosphatase 1 und verlangsamt somit die Dephosphorylierung von Phospholamban [70].

Die Proben wurden wie in 2.2.8.2 bis 2.2.8.5 beschrieben, vorbereitet und verarbeitet. Die Auswertung der Western-Blot-Analysen durch Quantifizierung der Antikörper-Signale wurde semiautomatisiert mit Hilfe der *software* Vision Works (Analytik Jena) durchgeführt. Anhand der so ermittelten Daten für Serin-10-phosphoryliertes Phospholamban und für Gesamt-Phospholamban wurde der Anteil des Serin-10-phosphorylierten Phospholambans auf das Gesamt-Phospholamban normiert. Im Anschluss daran erfolgte die Normierung aller Werte, nach dem in 2.2.8.6 beschriebenen Verfahren, auf den Mittelwert der Gruppe SHAM K. Im *two way ANOVA* zwischen den jeweiligen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung gefunden werden, der *p*-Wert lag bei 0,8.

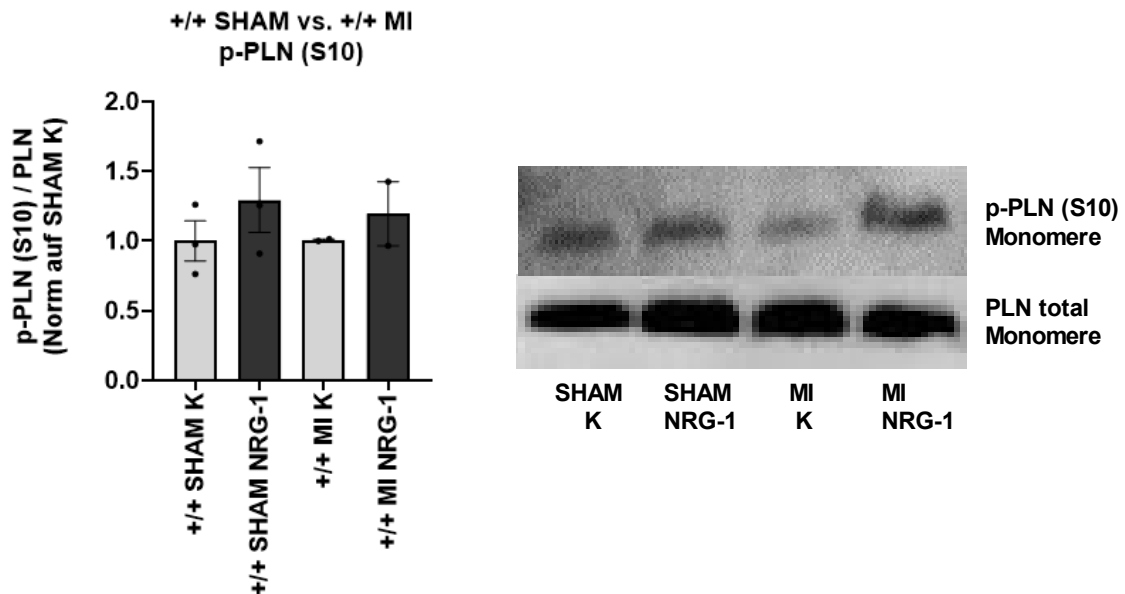


Abb. 27: **Darstellung der Proteinexpressionsmuster in der Gruppe 1 +/+.** PLN = Phospholamban, p-PLN = phosphoryliertes Phospholamban, S10 = Serin 10, MI = Myokardinfarkt, SHAM = Scheinoperation, Die Werte wurden jeweils normiert auf die Gruppe SHAM K angegeben. Bei den angegebenen Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (n (je Säule) = 4, p (ANOVA) > 0,05).

Nachdem sich sowohl in den Kalziumbewegungen, als auch in den daraus resultierenden Sarkomerkontraktionen kein signifikanter Unterschied zwischen den SHAM- und den Myokardinfarkttieren gezeigt hatte, wurden die Proben aus denselben Herzpräparationen auf einen Unterschied in Phosphorylierungsstadien des Phospholambans untersucht. Es zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5 Gruppengröße

Nach ursprünglicher Planung sollte diese Gruppe aus insgesamt fünf vs. fünf Tieren bestehen. Jedoch konnten insgesamt zwei Tiere nicht in die Untersuchung miteinbezogen werden, ein Tier verstarb infolge der Myokardinfarktoperation, das andere Tier fiel aufgrund von Problemen bei der Zellisolation aus.

So resultiert auch die Gruppengröße der proteinchemischen Analysen, vier SHAM-Tiere gegen vier Tiere mit Myokardinfarkt.

3.3 Ergebnisse der Gruppe 2 db/+ vs. db/db

3.3.1 Untersuchung der Kalziumbewegungen in der Gruppe 2

In der Gruppe 2 db/+ vs. db/db wurden in der db/+ Gruppe n = 30 Zellen aus fünf Herzpräparationen untersucht. In der db/db Gruppe wurden n = 28 Zellen aus vier verschiedenen Herzpräparationen untersucht.

Die Ermittlung der $\Delta\Delta$ -Werte erfolgte auch hier analog des in 3.2.1 beschriebenen Verfahrens.

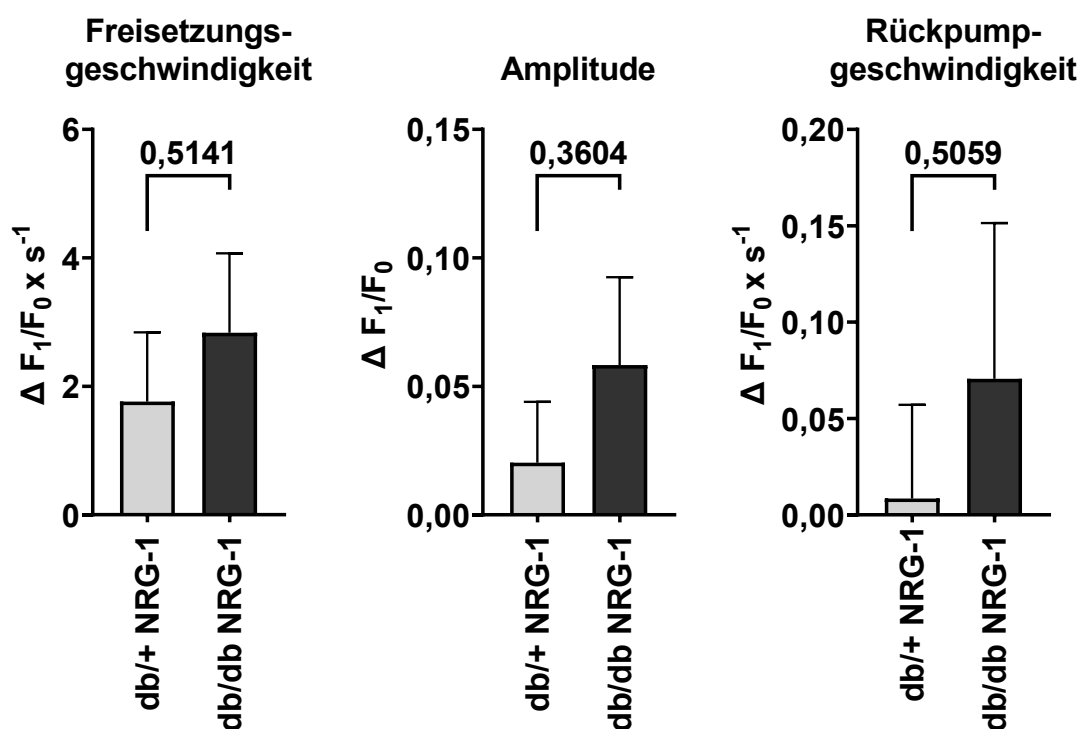


Abb. 28: **Darstellung der drei untersuchten Parameter in der Gruppe 2 db/+ vs. db/db.** $\Delta F_1/F_0$ = Differenz der gemessenen Fura-2-Werte, db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, NRG-1 = Neuregulin 1, s = Sekunde

Bei dem dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler n (db/+ - Gruppe) = 30 Zellen aus fünf unabhängigen Herzpräparationen, n (db/db - Gruppe) = 28 Zellen aus vier verschiedenen Herzpräparationen, alle p (ungepaarter t-Test) > 0,05).

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei untersuchten Parameter in der Wirkung von NRG-1 auf die beiden verschiedenen Gruppen finden. Bei der Freisetzungsgeschwindigkeit zeigte sich im Vergleich der Gruppen mittels ungepaarter t-Test ein p-Wert von 0,5, bei der Amplitude ein p-Wert von 0,3 und bei der Rückpumpgeschwindigkeit ein p-Wert von 0,5.

Es konnten auch hier in den Kalziumbewegungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Auch wenn die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind, so lässt sich hier doch ein eindeutiger Trend dahin gehend erkennen, dass die hyperglykämischen db/db Tiere von einer Neuregulin 1 Stimulation profitieren. Obwohl sich in den Kalziumbewegungen keine signifikanten Unterschiede finden ließen, wurden, aufgrund der starken Tendenz, weiterhin die Sarkomerkontraktionen analysiert, da Neuregulin 1 insbesondere bei hyperglykämischen Mäusen die Steifigkeit des Titins modulieren kann [108].

3.3.2 Untersuchung der Sarkomerkontraktionen

In den hier untersuchten Gruppen wurden die Sarkomerverkürzungen von isolierten Zellen aus db/+ (n=25 5 Herzpräparationen) und db/db (n = 23, 4 Herzpräparationen) untersucht.

Die Auswertungen und Ermittlung der $\Delta\Delta$ -Werte erfolgten analog des in 3.2.1 beschriebenen Wegs.

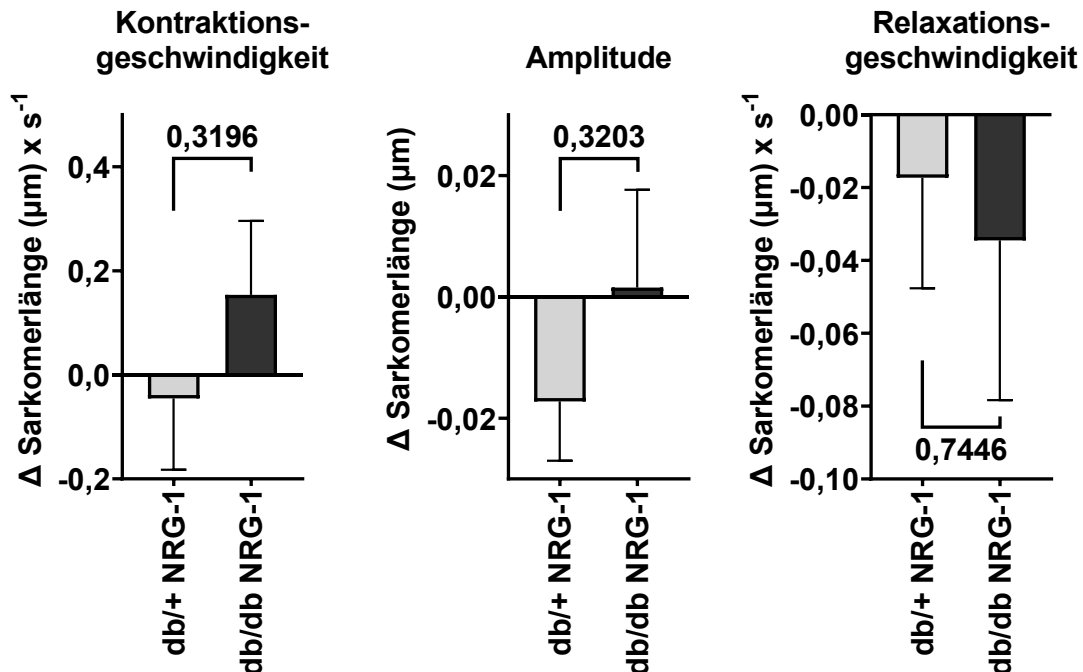


Abb. 29: Darstellung der drei untersuchten Parameter in der Gruppe 2 db/+ vs. db/db. db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, NRG-1 = Neuregulin 1, μm = Mikrometer, s = Sekunde. Bei den angegebenen Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler n (db/+-Gruppe) = 25 Zellen aus fünf unterschiedlichen Herzpräparationen, n (db/db-Gruppe) = 23 Zellen aus vier unterschiedlichen Herzpräparationen, alle p -Werte (ungepaarter t -Test) $> 0,005$.

Es ließen sich hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den drei untersuchten Parametern finden. Bei einem ungepaarten t -Test zwischen den Kontraktionsgeschwindigkeiten zeigte sich ein p -Wert von 0,3, bei der Amplitude ein p -Wert von 0,3 und bei der Relaxationsgeschwindigkeit ein p -Wert von 0,7.

Es konnten in dieser Gruppe weder in den Kalziumbewegungen noch in den resultierenden Sarkomerkontraktionen gefunden werden. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant sind, so setzt sich der bereits in Kalziumbewegungen gezeigte Trend auch in den daraus resultierenden Sarkomerkontraktionen fort. Dort scheinen die db/db-Tiere ebenfalls von der Neuregulin 1 Präsentation zu profitieren. Im Anschluss wird die Sarkomerverkürzung in Abhängigkeit der zytosolischen Kalziumkonzentration im zeitlichen Verlauf gezeigt.

3.3.3 Phase plane loops

Die Erstellung der *phase plane loops* für die Gruppe erfolgte ebenfalls wie in 3.2.3 beschrieben.

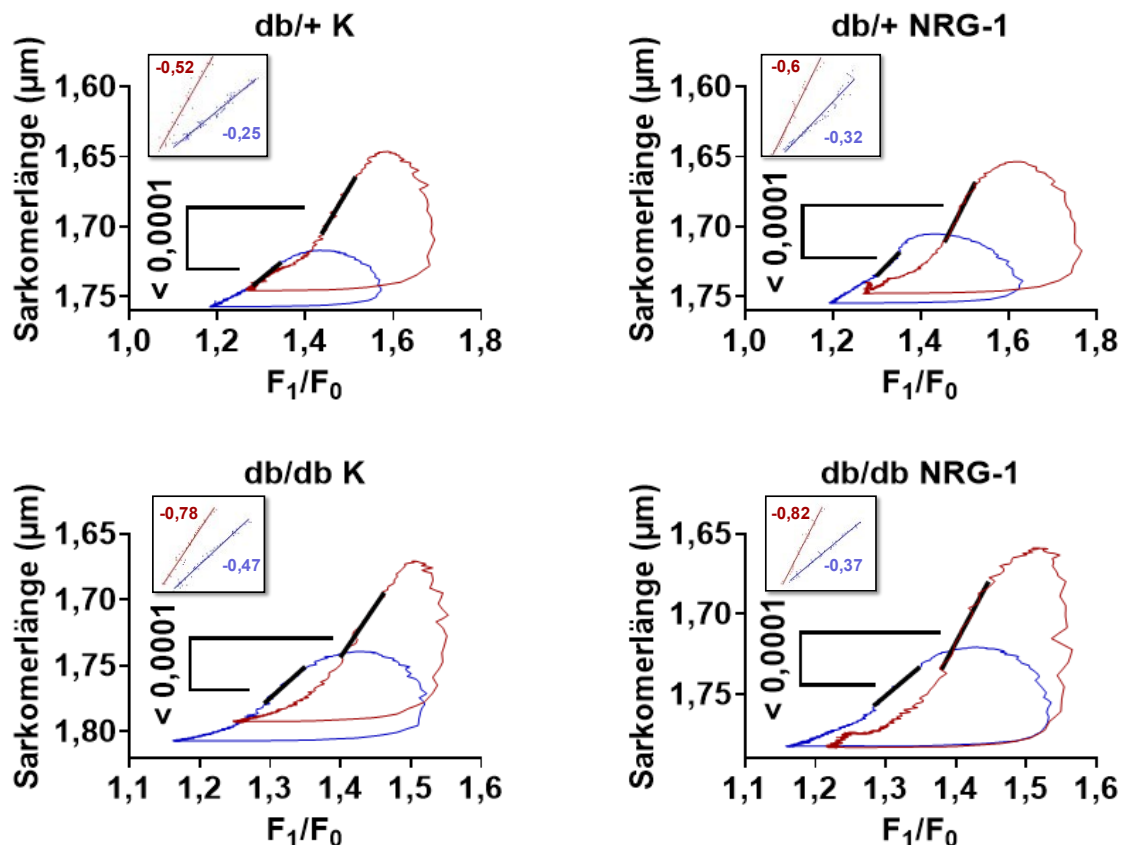


Abb. 30: Exemplarische Darstellung der sogenannten *phase plane loops*. db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1, μm = Mikrometer, min = Minuten, F_1/F_0 = Verhältnis des vom Fura-2 absorbierten Lichts zu den verschiedenen Wellenlängen 380 nm und 340 nm

Der schwarze, dicke Balken stellt die lineare Regression während der Relaxationsphase dar. Die blaue Farbe den Messzeitpunkt $t = 0$, die rote Farbe den Messzeitpunkt $t = 5$ min ($p < 0,0001$ (ANCOVA) in jeder Gruppe bei dem Vergleich der linearen Regressionen). Im oberen linken Bereich eines jeden *Loops*, findet sich eine qualitative, vergrößerte Darstellung des Bereichs, der für die linearen Regressionen genutzt wurde. Die dazugehörige Regressionsgerade ist in dieser Vergrößerung, statt in schwarz in rot, bzw. blau dargestellt. In der Vergrößerung sind ebenfalls farblich passend, die Steigungen der Regressionsgeraden dargestellt.

In der Gruppe db/+ K betrug zum Zeitpunkt $t = 0$ die Steigung -0,25 bei einem r^2 von 0,97, bei dem Messpunkt $t = 5$ min lag die Steigung bei -0,52 bei einem r^2 von 0,96. Nach ANCOVA-Test ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese beiden Steigungen zu den beiden Zeitpunkten gleich sind $p < 0,0001$.

In gleicher Weise wurden auch die Steigungen in den anderen Gruppen steiler. In der Gruppe db/+ NRG-1 änderte sich die Steigung von -0,32 (r^2 0,93) auf -0,6 (r^2 0,96) ($p < 0,0001$), in der Gruppe db/db K von -0,47 (r^2 0,97) zu -0,78 (r^2 0,96) ($p < 0,0001$) und in der Gruppe db/db NRG-1 von -0,37 (r^2 0,98) zu -0,82 (r^2 0,97) ($p < 0,0001$).

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass der lineare Teil der Rückpumpgeschwindigkeit sowohl in den db/db – Tieren, als auch in den db/+ – Kontrolltieren nach fünfminütiger Stimulation der Kardiomyozyten (0,5 Hz), relativ zum Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration, signifikant schneller wird im Sinne einer

Steigerung der Kalzium-Sensitivität der Myofilamente. Dies geschah sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von Neuregulin 1.

3.3.4 Analyse der PLN-Phosphorylierung an Serin 16

Die Durchführung der proteinchemischen Experimente und die Erstellung der gezeigten Werte erfolgte analog des in 3.2.4 beschriebenen Verfahrens.

Die Auswahl der Phosphorylierungsstelle Serin 16 erfolgte aufgrund der Tatsache, dass Serin 16 in Phospholamban PKG-abhängig phosphoryliert wird und Neuregulin 1 die PKG aktiviert [65].

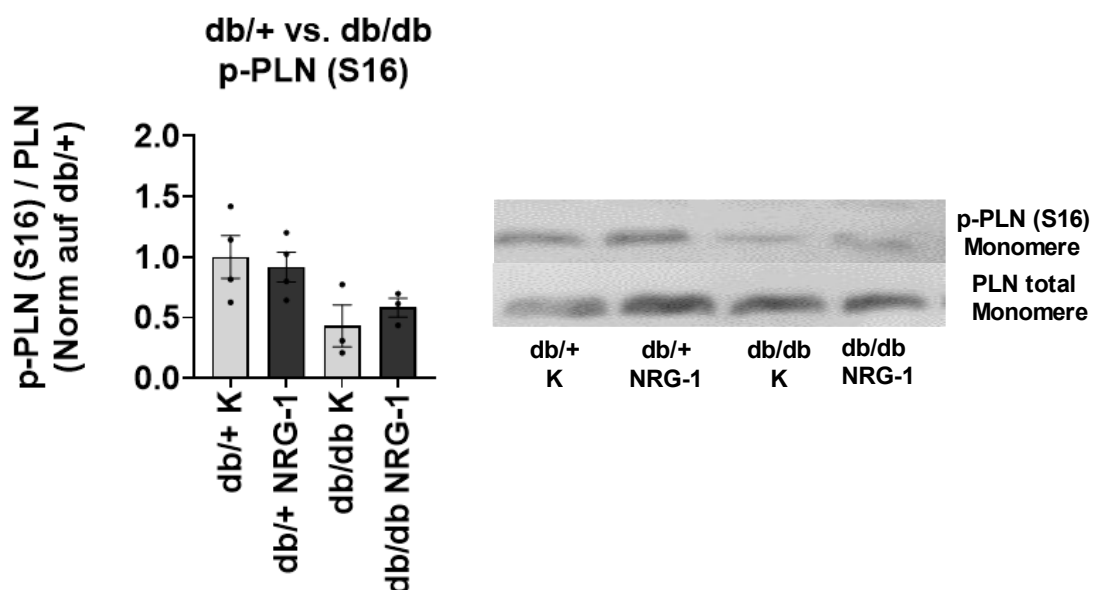


Abb. 31 **Western Blot-Analyse der Phospholamban-Phosphorylierung an Serin 16 in der Gruppe 2 (db/+ vs. db/db).**

PLN = Phospholamban, p-PLN = phosphoryliertes Phospholamban, S16 = Serin 16, db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1

Die Werte wurden jeweils normiert auf die Gruppe db/+ K angegeben. Bei den angegebenen Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (n (db/+ K und db/+ NRG-1) = je 4, n (db/db K und db/db NRG-1) = je 3, *p*-Wert (two way ANOVA) > 0,05).

Es wurde hier gleichermaßen eine *two way ANOVA* Analyse durchgeführt, um zu testen, ob ein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Bei einem *p*-Wert von 0,08 konnte kein signifikanter Unterschied gesehen werden.

Nachdem sowohl die Analyse der Kalziumbewegungen, als auch die Analyse der Sarkomerkontraktionen keinen signifikanten Unterschied gezeigt hatten, wurde der Phosphorylierungszustand des Phospholambans an Serin 16 analysiert. Hier zeigten sich ein marginal signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Auch hier setzt sich hier der bereits in den Kalziumbewegungen und in den Sarkomerkontraktionen beobachtete

Trend fort. So steigt die mittlere Phosphorylierung an S16 der db/db-Tiere mit Neuregulin 1 an.

3.3.5 Gruppengröße

Ursprünglich war eine Gruppengröße von fünf vs. fünf Tieren geplant, es fiel jedoch ein Tier aufgrund von Problemen bei der Zellisolation aus. So resultiert auch hier die Zusammenstellung der Gruppen der proteinchemischen Analyse aus fünf Tieren des Genotyps db/+ vs. vier Tiere des Genotyps db/db.

3.4 Untersuchungen der Gruppe 3 (db/+ vs db/db mit MI)

3.4.1 Untersuchung der Kalziumbewegungen

In dieser Gruppe wurden in der db/+ Untergruppe insgesamt $n = 28$ Zellen aus vier voneinander unabhängigen Herzpräparationen verwendet, in der Subgruppe db/db konnten $n = 26$ Zellen aus drei unterschiedlichen Herzpräparationen genutzt werden.

Die Ermittlung der $\Delta\Delta$ -Werte erfolgte auch hier analog des in 3.2.1 beschriebenen Verfahrens.

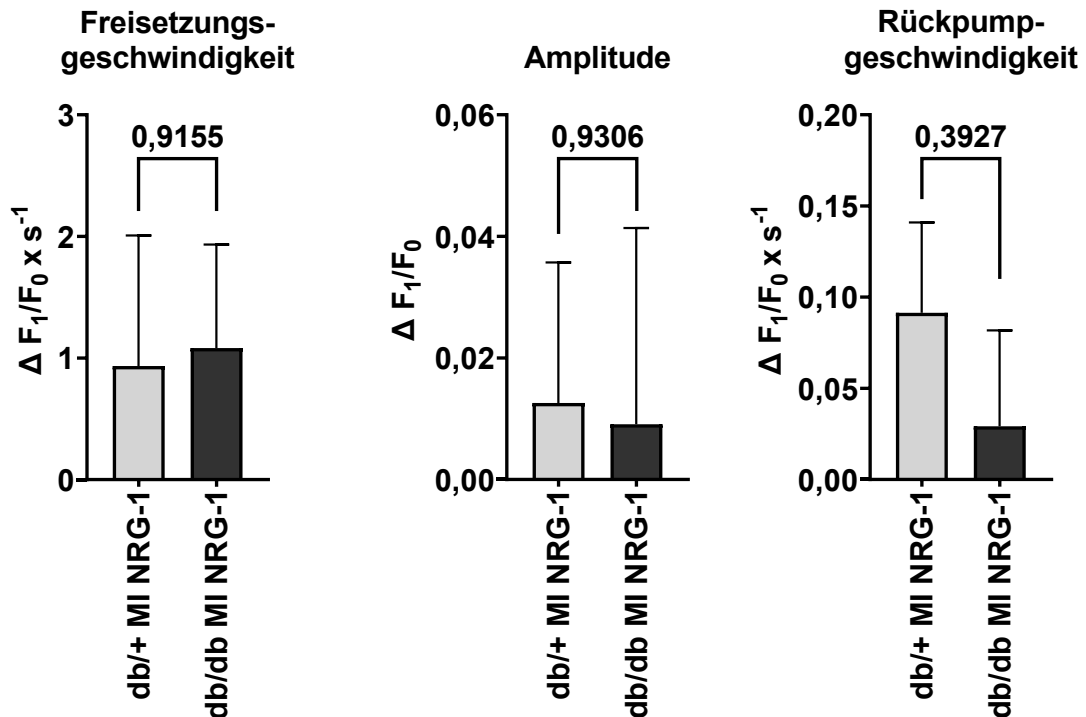


Abb. 32 Darstellung der drei untersuchten Parameter in der Gruppe 3 (db/+ vs. db/db) mit MI.

$\Delta F_1/F_0$ = Differenz der gemessenen Fura-2-Werte, db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, MI = Myokardinfarkt, SHAM = Scheinoperation, NRG-1 = Neuregulin 1. Bei dem dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler, n (db/+) = 28 Zellen aus vier unabhängigen Herzpräparationen, n (db/db) = 26 Zellen aus 3 unabhängigen Herzpräparationen, p -Wert (ungepaarter t -Test $> 0,05$).

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen, im Vergleich der Freisetzungsgeschwindigkeiten ergab der ungepaarte t -Test einen p -Wert von 0,91 und somit keine Signifikanz. Im Vergleich der Amplitudenhöhen ergab der t -Test ebenso einen p -Wert von 0,93 und damit auch keinen signifikanten Unterschied. In dem letzten untersuchten Parameter, der Rückpumpgeschwindigkeit, ergab der t -Test einen p -Wert von 0,39 und somit ebenfalls keine Signifikanz für einen Unterschied.

In den untersuchten Kalziumbewegungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden, als nächstes wurden darum die Sarkomerkontraktionen, betrachtet. Da auch in dieser Gruppe die Möglichkeit besteht, dass Neuregulin die Steifigkeit des Titins moduliert haben könnte [108].

3.4.2 Untersuchungen der Sarkomerkontraktionen

Es konnten in dieser Gruppe insgesamt in der db/+ Untergruppe $n = 21$ Zellen aus vier verschiedenen Herzpräparationen untersucht werden, in der Subgruppe db/db waren es $n = 22$ Zellen aus drei unabhängigen Herzpräparationen.

Die Auswertung der $\Delta\Delta$ -Werte erfolgte hier ebenfalls wie in 3.2.1 beschrieben.

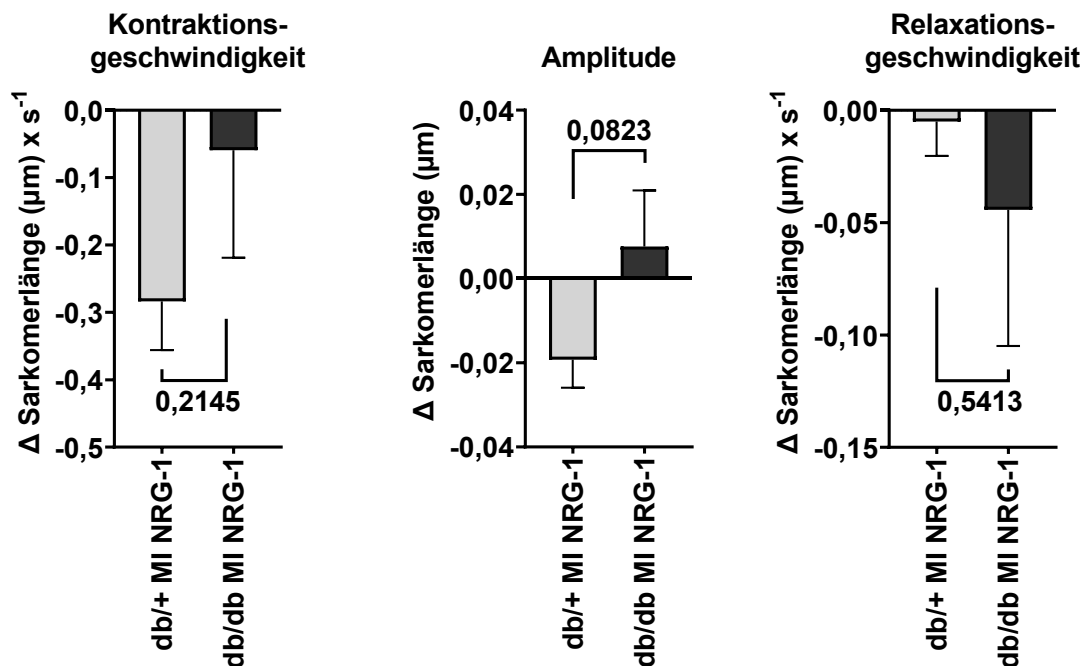


Abb. 33: **Darstellung der drei untersuchten Parameter in der Gruppe 3 db/+ vs. db/db mit MI.**

db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, MI = Myokardinfarkt, SHAM = Scheinoperation, NRG-1 = Neuregulin 1, μm = Mikrometer, s = Sekunde

Bei dem dargestellten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler, n (db/+) = 21 Zellen aus vier unterschiedlichen Herzpräparationen, n (db/db) = 22 Zellen aus drei unterschiedlichen Herzpräparationen, p-Wert (ungepaarter t-Test > 0,05).

Es konnten sich in der Auswertung der drei Parameter keine signifikanten Unterschiede finden lassen. Nach Testung mittels *Student's* ungepaartem t-Test ergab sich bei der Kontraktionsgeschwindigkeit ein nicht signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,21. Bei den Amplitudenhöhen ergab sich bei analoger Testung ein p-Wert von 0,08 und somit kein signifikanter Unterschied. Bei dem Parameter Relaxationsgeschwindigkeit konnte mittels des gleichen Testverfahrens ein p-Wert von 0,54 ermittelt werden und somit gleichermaßen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Es konnten hier, wie in den beiden vorangegangenen experimentellen Gruppen, sowohl in den Kalziumbewegungen, als auch in den daraus resultierenden Sarkomerkontraktionen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Im Folgenden werden die Sarkomerkontraktionen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

3.4.3 Phase plane loops

Die Erstellung der phase plane plots für diese Gruppe erfolgte analog des in 3.2.3 beschriebenen Verfahrens.

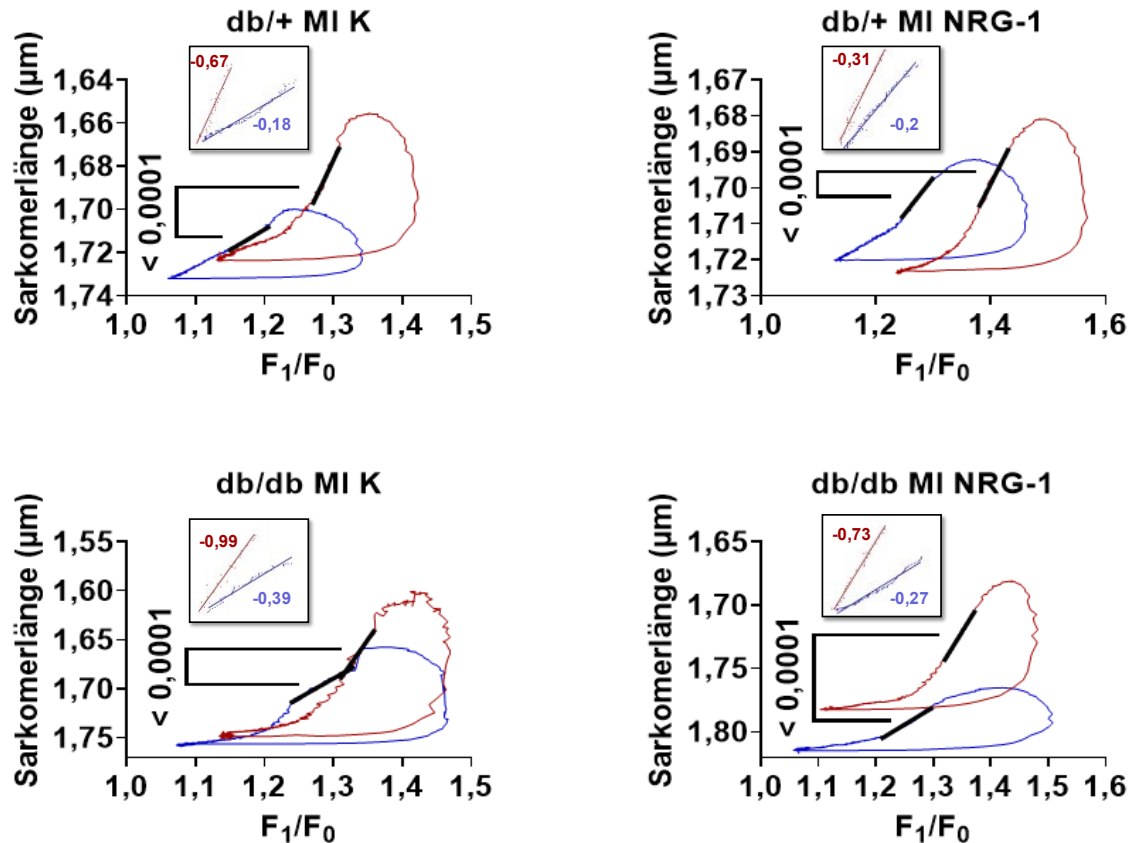


Abb. 34 Exemplarische Darstellung der sogenannten *phase plane loops* db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier, MI = Myokardinfarkt, K = Kontrolle, NRG-1 = Neuregulin 1, µm = Mikrometer, min = Minuten, F_1/F_0 = Verhältnis des vom Fura-2 absorbierten Lichts zu den verschiedenen Wellenlänge 380 nm und 340 nm. Der schwarze, dicke Balken stellt die lineare Regression während der Relaxationsphase dar. Die blaue Farbe den Messzeitpunkt $t = 0$, die rote Farbe den Messzeitpunkt $t = 5$ min ($p < 0,0001$ (ANCOVA) in jeder Gruppe bei dem Vergleich der linearen Regressionen). Im oberen linken Bereich eines jeden *Loops*, findet sich eine qualitative, vergrößerte Darstellung des Bereichs, der für die linearen Regressionen genutzt wurde. Die dazugehörige Regressionsgerade ist in dieser Vergrößerung, statt in schwarz in rot, bzw. blau dargestellt. In der Vergrößerung sind ebenfalls farblich passend, die Steigungen der Regressionsgeraden dargestellt.

In der Gruppe db/+ MI K betrug die Steigung zu $t = 0$ -0,18 bei einem r^2 von 0,97, bei dem Messpunkt $t = 5$ min lag die Steigung bei -0,67 bei einem r^2 von 0,95. Nach ANCOVA-Test ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese beiden Steigungen gleich sind $p < 0,0001$.

Gleichsam waren auch die Steigungen nach 5-minütiger Stimulation in den anderen Gruppen steiler. In der Gruppe db/+ MI NRG-1 von -0,2 (r^2 0,98) auf -0,31 (r^2 0,97) ($p < 0,0001$), in der Gruppe db/db MI K von -0,39 (r^2 0,97) auf -0,99 (r^2 0,94) ($p < 0,0001$) und in der Gruppe db/db MI NRG-1 von -0,27 (r^2 0,97) auf -0,73 (r^2 0,98) ($p < 0,0001$).

Es konnte hier gezeigt werden, dass sich, wie in den Gruppen 1 und 2 auch, die Geschwindigkeit des linearen Teils der Relaxation bei allen Gruppen innerhalb von fünf Minuten Stimulation der Myozyten (0,5 Hz), relativ zum Abfall der zytosolischen Kalzium-Konzentration signifikant, im Sinne einer Steigerung der Kalziumsensitivität der Myofilamente, verschnellert. Dies geschah hier ebenso wie in den beiden anderen Gruppen, sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von Neuregulin 1.

3.4.4 Proteinbiochemische Analysen

Die Durchführung der Experimente und die Erstellung der gezeigten Werte erfolgte gleichfalls wie in 3.2.4 beschrieben. In der Gruppe 3 ergaben sich leider keine auswertbaren Ergebnisse bei den Untersuchungen mit dem Antikörper, der gegen das Serin 16 des Phospholamban gerichtet ist. Aufgrund dessen wird hier das Verhältnis des gesamten Phospholambans zu Calsequestrin gezeigt. Calsequestrin diente hierbei als kardiomyozytenspezifisch exprimiertes *housekeeping* Protein.

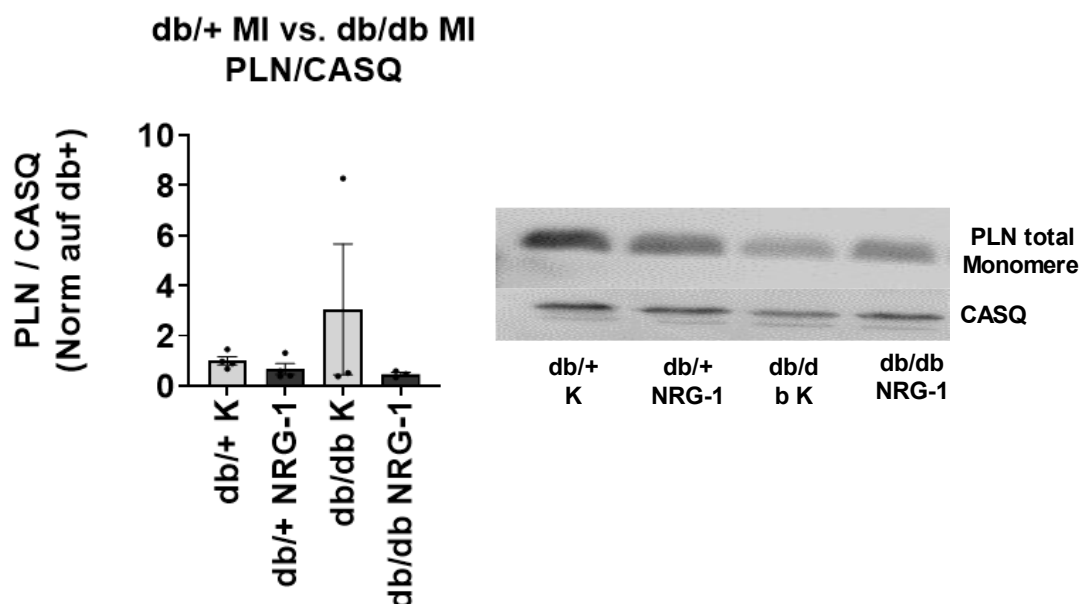


Abb. 35: **Darstellung der Proteinexpressionsmuster in der Gruppe 3 db/+ vs. db/db mit MI.** PLN = Phospholamban, CASQ = Calsequestrin, db/+ = heterozygot Leptin-Rezeptor defizientes Kontrolltier, db/db = homozygot Leptin-Rezeptor defizientes Tier. Die Werte wurden jeweils normiert auf die Gruppe db/+ K angegeben. Bei den angegebenen Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (n (db/+ K und db/+ NRG-1) = je 4, n (db/db K und db/db NRG-1) = je 3, *p*-Wert (*two way ANOVA*) >0,05).

Nach Durchführung eines *two way ANOVA*, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden, ergab sich ein *p*-Wert 0,41 und somit kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Es wurde ebenso ein ROUT-Test durchgeführt, um mathematische Ausreißer zu eliminieren.

Es konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden, sowohl die db/+ -Gruppe als auch die db/db -Gruppe zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Expressionsmustern.

3.4.5 Gruppengröße

Die ursprüngliche Planung der Gruppengröße von fünf vs. fünf Tieren reduzierte sich auf vier vs. drei Tiere, da zwei Tiere aufgrund von Operationskomplikationen vorzeitig verstarben und ein Tier aufgrund von Problemen bei der Zellisolation nicht ausgewertet werden konnte. Es resultiert eine Gruppengröße in der proteinchemischen Analyse aus vier Tieren db/+ vs. drei Tiere db/db.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der endotheliale Wachstumsfaktor Neuregulin 1 einen Effekt auf den Kalziumhaushalt und die daraus resultierenden Kontraktionen von isolierten murinen Kardiomyozyten hat. Die Kardiomyozyten stammten aus der Mauslinie C57BL/6J (+/+) des kommerziellen Züchters Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Pays de la Loire, Frankreich) und aus der Linie 015 der ZETT der HHU Düsseldorf mit (db/db) und ohne (db/+) Diabetes mellitus Typ 2. Es wurden Kardiomyozyten aus Herzen ohne Ischämie und Reperfusion (I/R), sowie Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokard von Herzen 24 h nach transienter LAD-Okklusion (RM) verwendet. Die Tiere wurden in drei verschiedene experimentelle Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe 1 bestand aus +/+ Tieren (4 Tiere SHAM vs. 4 Tiere MI). Die Gruppe 2 bestand aus Tieren der Linie 015 (5 db/+ vs. 4 db/db, beide ohne Operationen). Die Gruppe 3 bestand ebenso aus Tieren der Linie 015 (4 db/+ mit MI vs. 3 db/db mit MI).

Vorarbeiten der AG Schmitt haben gezeigt, dass der Kalziumstoffwechsel und die Sarkomerbewegung im *remote* Myokard 24h nach I/R signifikant verändert sind [15]. Dies wird verursacht durch eine verminderte Phosphorylierung des PLN an Position S16, welche wiederum durch eine erhöhte Aktivität der PP2A, bei gleicher Aktivität der PKA, verursacht wird [15].

Neuregulin 1 greift nun genau an diesem Mechanismus an, indem es die Aktivität der PKA und PKG heraufreguliert, während es gleichzeitig die Aktivität der PP2A hemmt [65, 124]. Diese Effekte des Neuregulin 1 können bereits innerhalb von Minuten auftreten [124]. Darüber hinaus modifiziert Neuregulin 1 auch innerhalb von nur 60-minütiger Behandlung den Phosphorylierungsstatus an S4010 des Titin und kann somit auch kalziumunabhängig in die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten eingreifen [108]. Aufgrund dieser bekannten Effekte des Neuregulin 1 wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass der Einsatz von Neuregulin 1 schon nach kurzer Behandlungsdauer einen positiven Effekt, sowohl auf den Kalziumstoffwechsel der Kardiomyozyten, als auch auf deren Sarkomerkontraktionen haben wird.

4.1 Effekte von Neuregulin 1 auf den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion in normoglykämischer und hyperglykämischer Stoffwechsellaage

Die Experimente haben gezeigt, dass es in der Gruppe 2 (db/+ vs db/db ohne MI) äußerst starke Trends gibt hinsichtlich eines Unterschieds zwischen den Tieren mit und ohne DM2. Die Zellen der db/db Tiere scheinen sowohl in ihrem Kalziumhaushalt als auch in den resultierenden Sarkomerkontraktionen auf den Einsatz des Neuregulin 1 stärker zu reagieren als die heterozygoten Kontrollzellen. Es finden sich zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch unterscheiden sich die Mittelwerte der untersuchten Parameter deutlich um das bis zu Achtfache. Dieser äußerst starke Trend konnte auch in der proteinchemischen Analyse der Phosphorylierung des S16 des Phospholambans (p (two-way ANOVA) = 0,08) mit einem marginal signifikanten Ergebnis gezeigt werden.

Diese Tendenzen waren in den Parametern Kalziumfreisetzungsgeschwindigkeit, -amplitudenhöhe und -rückpumpgeschwindigkeit zu sehen. Bei der Messung der Sarkomerkontraktionen konnten sie in den analogen Parametern (Geschwindigkeit der Kontraktion, Amplitude der Kontraktion, Geschwindigkeit der Relaxation) ebenfalls beobachtet werden. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien zwischen dem Phospholamban der verschiedenen Gruppen rundeten dieses Bild ab. Es zeigt sich eine starke Tendenz dahin, dass die db/db - Tiere im Vergleich zu den db/+ - Tieren so auf Neuregulin 1 reagieren, dass sie mehr vermehrt und schneller Kalzium verschieben und auch verstärkt kontrahieren.

Trotz der deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten waren die Unterschiede nicht signifikant. Dies liegt daran, dass die Werte, trotz Elimination mathematischer Ausreißer mittels ROUT - Test, eine äußerst starke Streuung aufweisen. Die hohe Streuung der gemessenen Werte ist vermutlich vor allem darin begründet, dass die Zellen fünf Minuten am Stück kontinuierlich gemessen wurden und es zu Beginn der Messungen noch nicht absehbar war, wie sich die Zellen nach fünfminütiger Dauerstimulation verhalten würden. Um dem entgegenzuwirken, wurde bereits eine Normalisierung der Werte vorgenommen (vgl. 3.2.1).

4.1.1 Potentielle Rolle von eNOS, Phospholamban und Titin

Lemmens *et al.* konnten die verstärkte Phosphorylierung der eNOS in Kardiomyozyten bereits nach fünfminütiger Neuregulin 1 - Präsentation nachweisen [76]. Ebenso kann Neuregulin 1 durch eine massive Steigerung der eNOS-Aktivität die Phosphorylierung

von Phospholamban um 75 % steigern [65]. Tiere mit DM2 haben, im Vergleich zu nicht diabetischen Kontrolltieren, eine ca. dreifach erhöhte Expression der eNOS. Gleichzeitig haben diese Tiere jedoch keine erhöhte Menge von phosphorylierter eNOS [125]. Diese erhöhte Expression bei gleichzeitig basal nicht erhöhter Phosphorylierung kann erklären, warum es in den Tieren mit DM2 und ohne MI den starken Trend hin zu einer deutlicheren Reaktion der diabetischen Tiere gab. Die Ursache scheint darin zu liegen, dass die Kardiomyozyten eine größere Reserve von unphosphorylierter eNOS hatten, die durch Neuregulin – 1 Stimulation phosphoryliert und somit stimuliert werden kann. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Aktivierung des in 1.5 beschriebenen Wirkmechanismus und somit zu einer verstärkten Induktion der PKG. Die verstärkte Phosphorylierung der PKG findet Ausdruck in der verstärkten mittleren Phosphorylierung des S16 des PLN der db/db-Tiere der Gruppe 2 (vgl. 3.3.4). Die äußerst starken Trends, auch in den Kalziumbewegungen und den Sarkomerkontraktionen, sprechen ebenfalls für einen in den diabetischen Tieren verstärkt induzierbaren Mechanismus über die eNOS und die PKG (vgl. 3.3.1 und 3.3.2).

Titin ist das größte Protein des Körpers und bestimmt entscheidend die passiven mechanischen Eigenschaften des Myokards [103]. Es wirkt wie eine Feder und bringt die Sarkomere nach Dehnung wieder in Ausgangsstellung zurück. Krüger *et al.* konnten 2010 nachweisen, dass eine Erkrankung an Diabetes mellitus das Phosphorylierungsschema von Titin beeinflussen kann [126]. Hopf *et al.* konnten, aufbauend auf den Arbeiten von Krüger *et al.* aus dem Jahre 2010, ferner zeigen, dass in diabetischen humanen Kardiomyozyten die Phosphorylierung an Ser4099 des Titins um ca. 35 % reduziert ist. Durch eine einstündige Neuregulin 1-Therapie konnte die Phosphorylierung wieder normalisiert werden [108]. Die diabetischen Tiere weisen also ein größeres „Reservoir“ an unphosphoryliertem Titin auf und können so entsprechend stärker auf Neuregulin 1 reagieren als normoglykämie Tiere. Gleichzeitig besitzen sie eine weniger phosphorylierte und somit stärker aktivierbare eNOS, was zu einer verstärkten Aktivierung der PKG führen kann. Dadurch ist es möglich, dass es zu einer stärkeren Phosphorylierung am Titin durch die PKG kommt als in den normoglykämischen Kontrollzellen. Aus diesen bekannten Unterschieden zwischen normoglykämischen und hyperglykämischen Tieren in der Titinphosphorylierung ergeben sich potentielle Unterschiede im Ansprechen auf Neuregulin 1. Es ist dadurch möglich, dass die Zellen unabhängig von ihrem Kalziumhaushalt anders kontrahieren können, was eine potentielle Erklärung für die beobachteten Trends ist. Einschränkend muss angefügt werden, dass in dieser Arbeit weder die funktionellen Eigenschaften des Titins noch seine Phosphorylierungsmuster untersucht wurden.

4.1.2 Potentielle Rolle der PP2A

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist ein zentrales Enzym des Herzens bei der Regulation des Kalziumhaushalts, Regulation der Myofilamente und der Regulation der elektro-mechanischen Kopplung [69]. Es ist bekannt, dass diabetische Kardiomyozyten eine erhöhte Expression der PP2A aufweisen [127-129] und so stärker auf Neuregulin 1 reagieren können. Auch dieser Signalweg ist mechanistisch von Neuregulin 1 beeinflussbar. So konnten Chen *et al.* zeigen, dass die Phosphorylierung der PP2A u.a. durch die Familie der EGF-Rezeptoren gesteuert wird [130, 131], über welche Neuregulin 1 wirkt. Die Phosphorylierung über diesen Weg findet ausschließlich an der Aminosäure Tyr307 statt und hat einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphataseaktivität dieses Enzyms [130]. Eine Studie aus Singapur konnte zeigen, dass es bei Stimulation des EGF-Rezeptors HER2/neu innerhalb von zehn Minuten zu einer Phosphorylierung am oben beschriebenen Tyrosin kommt. Als ein weiteres Indiz für eine Hemmung der PP2A durch Neuregulin 1 lässt sich der schwach signifikante Anstieg der Phospholamban-Phosphorylierung in Gruppe 2 nennen ($p = 0,08$). Das Phospholamban der mit Neuregulin 1 behandelten Zellen der db/db-Subgruppe ist an S16 stärker phosphoryliert als in den Kontrollen. Gleichzeitig bleibt das Niveau der Phosphorylierung immer deutlich unter dem Niveau der db/+ -Tiere, was mit dem Literaturkanon einer überaktiven PP2A in diabetischen Tieren in Einklang steht. Die verstärkte PP2A-Aktivität könnte einen weiteren Grund für die gefundenen Ergebnisse in Gruppe 2 liefern. All dies zeigte sich durch die beobachteten starken Trends, wobei der Grund darin liegen könnte, dass die diabetischen Kardiomyozyten vermehrt einem inhibitorischen Effekt der PP2A ausgesetzt gewesen sind und dieser inhibitorische Effekt der PP2A von Neuregulin 1 aufgehoben wird.

4.2 Einfluss eines akuten Myokardinfarkts auf den myozytären Kalziumhaushalt und die Sarkomerfunktion des *remote* Myokards

In der Gruppe 1 (+/+ Myokardinfarkt vs. scheinoperiertes Tier) zeigten sich ähnlich starke Trends wie in Gruppe 2. Die Mittelwerte in den Kalziumbewegungen divergieren um das bis zu Sechsfache dahin, dass die Zellen aus dem RM schlechter auf das Neuregulin 1 reagieren. Die Mittelwerte der Sarkomerkontraktionen divergieren um bis zu Faktor fünf, dass die die Zellen des RM stärker reagieren (vgl. 3.2.1 und 3.2.2). Jedoch bestehen diese Gruppen aus deutlich weniger Zellen (21 + 21 vs. 30 + 28 und 13 + 12 vs. 25 + 23). Es zeigten sich in den biochemischen Messungen (Ser10 des PLN) nicht solch

starke Trends, während sie in den proteinchemischen Messungen in Gruppe 2 auch dort gesehen werden konnten. Die proteinchemischen Analysen an S16 des PLN zeigen einen Trend, dass die Zellpopulationen, die mit Neuregulin 1 behandelt wurden mehr Phosphorylierung aufweisen, die Zellen des RM jedoch etwas weniger Phosphorylierung durch Neuregulin 1 aufweisen, als die analogen Kontrollzellen (vgl. 3.2.4).

4.2.1 ROS im RM?

Kardiomyozyten unterliegen durch ein I/R-Ereignis starken Belastungen durch sich ändernde Umgebungsbedingungen. Zellen außerhalb des eigentlichen Infarktgebietes sind sehr starkem oxidativem und nitrosativem Stress ausgesetzt [132], dieser Stress des RM lässt sich bereits kurz nach I/R funktionell sichtbar machen [14, 15, 133]. Es scheinen insgesamt vor allem drei verschiedene Systeme für die I/R-Schaden verantwortlich zu sein, der Xanthin-Oxidase-Weg, der NADPH-Oxidasen-Weg und die Induktion der NO-Synthasen [134]. All diese drei Systeme produzieren im Rahmen des Ereignisses ROS. Es ist bekannt, dass die ROS-Produktion zu aller erst im ischämischen Gebiet wirkt [13], es wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch Zellen des RM analysiert, während ischämische Zellen großzügig verworfen wurden. ROS werden jedoch im Zuge der Reperfusion auch in nicht ischämische Gebiete des Herzens ausgeschwemmt [13]. Die ROS-Produktion wird im Rahmen der Reperfusion noch verstärkt, gleichzeitig setzt sich eine inflammatorische Kaskade in Gang, welche für mehrere Tage aktiv bleibt [132, 134, 135]. Da die Experimente 24 h nach I/R durchgeführt wurden, ist sichergestellt, dass die Zellen des RM bereits vollständig diesem dynamischen Zustand ausgesetzt waren. Die Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, konnte 2018 bereits die negativen Effekte eines I/R-Ereignisses auf das Myokard zeigen. So waren unter gleichen Bedingungen wie bei den Experimenten dieser Arbeit die gleichen drei gemessenen Kalziumparameter (vgl. 4) im RM 24 h nach I/R signifikant reduziert. Die ROS, welche durch die Ischämie und die Reperfusion gebildet und auch aus dem Infarktgebiet ausgeschwemmt werden, interagieren äußerst stark mit verschiedensten Proteinen von Kardiomyozyten und können somit in die Reaktion der Kardiomyozyten auf Neuregulin 1 eingreifen. Im Jahre 2015 konnte gezeigt werden, dass ROS im Herzen in der Lage sind die PKG zu hemmen und so ihre potentiell kardioprotektiven Effekte zu unterbinden [136, 137], auch können ROS direkt die SERCA2A hemmen [138]. All diese Proteine werden mittelbar von Neuregulin 1 beeinflusst, die PKG bspw. über eine eNOS-Induktion [65]. Diese schädlichen Effekte der ROS können die gefundenen Trends der Kalziumbewegungen der Gruppe 1 begründen, wo ein Unterschied der Mittelwerte um das bis zu fünffache gesehen wurde, dass die Zellen des RM nach fünf Minuten eine stärkere Beeinträchtigung der Kalziumhomöostase aufweisen als die Zellen aus den

SHAM-Herzen (vgl. 3.2.1). Ebenfalls konsistent dazu ist die leicht geringere Phosphorylierung an S10 des Phospholambans der RM-Zellen im Vergleich zu den SHAM-Zellen.

4.2.2 Janusgesicht der eNOS

Eine deutsche Studie konnte das Janusgesicht der NO-Synthasen, auch anhand der eNOS, in infarzierten Mausherzen zeigen [138]. Die Autoren der Studie sahen bei einer alleinigen Infusion von Neuregulin 1 in der Reperfusionsphase nach Myokardinfarkt negative Effekte, insbesondere eine erhöhte Infarktgröße und einen erhöhten diastolischen Druck im Herzen. Die Autoren führten diesen darauf zurück, dass die eNOS bei Aktivierung und nicht ausreichendem Substrat, statt des protektiven NO schädliche ROS produziert [139]. Gleichsam war dieser negative Effekt nicht vorhanden, wenn das eNOS-Substrat L-Arginin in ausreichender Menge bereitgestellt wurde [139]. In der Lösung die in den Experimenten dieser Doktorarbeit genutzt wurde, war kein L-Arginin enthalten. Dies steht im Einklang mit der etwas schwächeren Reaktion der RM-Zellen auf Stimulation mit Neuregulin 1. Das Ergebnis der Studie unterstützt andere Forschungsergebnisse aus den 1990er Jahren, die die Fähigkeit der NO-Synthasen zur ROS-Produktion zeigten [140, 141]. Die Menge an produzierten ROS sank bei einem ausreichenden Angebot von L-Arginin [139-141]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der zentrale Mechanismus, über den Neuregulin 1 die schädlichen Effekte der ROS durch eine vermehrte NO-Produktion hätte abfangen können, selbst die Produktion von ROS induzieren kann. Somit liefert die Literatur eine mögliche Erklärung für den in Gruppe 1 beobachteten Trend, dass sich die Kalziumbewegungen in Zellen des RM binnen fünf Minuten stärker verringern als in SHAM-Zellen.

4.2.3 Veränderungen des Titins im RM

Die veränderten mechanischen Belastungen der Kardiomyozyten des RM haben einen sehr großen Effekt auf die Kontraktionsfähigkeit und den Kalziumhaushalt der einzelnen Zellen. Kötter *et al.* konnten nachweisen, dass sich die erhöhte Wandspannung im RM u. a. dadurch auf Einzelzellebene ausdrückt, dass bereits drei Tage nach dem I/R-Ereignis die Zellen des RM eine deutlich andere Komposition des Titins aufweisen [142]. Titin ist an verschiedenen Stellen, u. a. S4099, deutlich geringer phosphoryliert, während es an anderen Stellen stärker phosphoryliert ist. Verursacht wird dieses geänderte Schema durch eine verringerte PKG- und eine stärkere PKC-Aktivität. Verstärkend dazu konnte auch in einer vorherigen Arbeit der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die kontraktile Amplitude einzelner Kardiomyozyten des RM bereits 24 h nach

Myokardinfarkt signifikant herabgesetzt ist [14]. Dieser Befund lässt sich gut durch die beiden genannten Veränderungen erklären.

Neuregulin 1 ist prinzipiell geeignet die verminderte Compliance des Titins und damit des Sarkomers rückgängig zu machen, da es in der Lage ist die PKG zu aktivieren [79]. Somit kann es die Hypophosphorylierung an den PKG-abhängigen Phosphorylierungsstellen des Titins aufheben. Dies deutet in die Richtung, in die der leichte Trend der Gruppe 1 zeigt, dass die Zellen des RM relativ stärker auf Neuregulin 1 reagieren als die Zellen aus den SHAM – Herzen (vgl. 3.2.2). Dieser Mechanismus ist jedoch abhängig davon, dass die eNOS nach Neuregulin 1 – Stimulation NO produziert. Wie unter 4.2.2 erläutert, gibt es jedoch starke Evidenz dafür, dass die eNOS unter oxidativem Stress ROS anstatt NO produziert [139-141]. Aufgrund dessen, dass die eNOS sich im RM janusgesichtig zeigen kann, lässt sich vermuten, dass das geringfügig stärkere Ansprechen der Zellen aus dem RM (bis zu 1,6-fach) am ehesten als artifiziell zu bewerten ist. Es muss hier einschränkend angemerkt werden, dass der ROS-Status der Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, es aufgrund des Designs der Experimente davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen einer ROS-Belastung ausgesetzt waren.

4.3 Myozytärer Kalziumhaushalt und Sarkomerfunktion im *remote* Myokard bei diabetischer Stoffwechsellage, nach akutem Myokardinfarkt

Im Zuge des Myokardinfarktes scheinen von dem untergegangenen Herzmuskelgewebe Mediatoren freigesetzt zu werden (vgl. 4.2), die v. a. bei den hyperglykämischen Tieren eine veränderte Kalziumantwort auf Neuregulin 1 verursachen, nicht jedoch bei normoglykämischen Tieren (vgl. 3.3 und 3.4). Es konnten in der Gruppe 2 noch starke Trends mit großen Unterschieden (Unterschiede bis zu dem Faktor 11,3) gefunden werden. Diese großen Unterschiede in den Mittelwerten zeigten sich sowohl in den Kalzium- als auch in den Sarkomerdaten. In den Mittelwerten der hier diskutierten Gruppe 3 zeigte sich ein verändertes Bild. Die gemessenen Parameter des myozytären Kalziumhaushalts zeigten im Mittel deutlich weniger Veränderungen, bei einem maximalen Unterschied um das Fünffache. Die Sarkomerdaten hingegen zeigten eine ähnlich deutliche Verschiebung der Mittelwerte wie nicht-diabetische Kardiomyozyten mit einem ebenfalls maximalen Unterschied um den Faktor elf, wobei die Standardabweichung allerdings sehr hoch war.

4.3.1 Erhöhte Vulnerabilität diabetischer Kardiomyozyten gegenüber mechanischer Belastung

Es konnte mit Hilfe menschlicher Autopsiestudien gezeigt werden, dass diabetische Kardiomyozyten, welche erhöhter Wandspannung ausgesetzt waren, noch gedehnter und steifer waren als Kardiomyozyten aus normoglykämischen Körpern [143]. Diese erhöhte Steifigkeit resultierte vor allem daraus, dass diese Zellen weniger cGMP aufweisen [143]. Zusätzlich zu dieser bereits vorher bestehenden erhöhten Steifigkeit, könnte sich noch die durch einen Myokardinfarkt ausgelöste mechanische Mehrbelastung addieren, die Kötter *et al.* in den Kardiomyozyten des RM fanden [142]. In den Ergebnissen von Kötter *et al.* ist auch ein weiterer potentieller Mechanismus zu finden, warum die Zellen der infarzierten diabetischen Herzen nun weniger auf die Neuregulin 1-Präsentation reagieren als noch in der Gruppe 2. So konnten sie zeigen, dass die erhöhte Steifigkeit in den RM-Kardiomyozyten u. a. aus einer erhöhten PKC-Aktivität und einer verminderten PKG-Aktivität resultiert [142]. Es ist auch bekannt, dass eine Hyperglykämie die PKC-Aktivität hochreguliert [144], während ein gleichzeitig erniedrigtes cGMP-Level eine verringerte PKG-Aktivität bedingen kann [143]. Dies ist ein weiterer Grund dafür, dass die Kardiomyozyten verändert auf die Stimulation mit Neuregulin 1 ansprechen, der Unterschied in den Mittelwerten der Kalziumbewegungen nimmt um bis zu 300% ab. Und die db/db Tiere, die in Gruppe 2 noch deutlich stärker auf das Neuregulin 1 reagiert hatten, reagieren nun deutlich schwächer auf die Behandlung. Es ist basal weniger cGMP vorhanden und somit weniger PKG-Aktivität, während gleichzeitig schon die PKC stärker aktiv ist und sie durch die Folgen des Myokardinfarkts auch im RM noch weiter hochreguliert wird. Diese verringerte cGMP-Konzentration kann es ermöglicht haben, dass Neuregulin 1 einen Effekt durch eine Hochregulation der eNOS gehabt hat. Jedoch steht dies im Widerspruch zu der Literatur zur eNOS und ihrem Verhalten bei Stimulation [139], wie bereits in 4.2.2 beschrieben. Gleichzeitig ist die PKC mechanistisch wahrscheinlich deutlich aktiver und doppelt aktiviert durch die mechanische Mehrbelastung des RM und durch den vorhandenen DM2. Dies kann dazu führen, dass die Sarkomere der RM-Zellen der Gruppe 3 noch steifer sind. Es muss hier jedoch einschränkend angefügt werden, dass keine Messungen am Titin oder anderen Sarkomerproteinen durchgeführt wurden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die potentiell schlechtere Kompensation von I/R durch das diabetische RM besteht darin, dass bereits unter basalen Bedingungen ihre ATP-Produktion durch vermehrte Lipolyse und reduzierte Glykolyse reduziert ist [143]. Auch dies spricht eher für eine schlechtere Stimulierbarkeit von diabetischen Zellen, und

steht damit im Widerspruch zu den bis zu elffachen Unterschieden in den Kontraktionsmittelwerten, die jedoch nicht signifikant waren.

4.3.2 Erhöhte Vulnerabilität des diabetischen Kardiomyokards gegenüber ROS

Es ist bekannt, dass in einem diabetischen Organismus bereits basal ein erhöhter oxidativer Stress, verursacht durch veränderte Aktivität der Atmungskette der Mitochondrien und verstärkte Aktivität der NADPH-Oxidase, besteht [145]. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass die in 4.2.2 beschriebene Janusgesichtigkeit bereits durch eine geringere Menge ROS ausgelöst werden könnte. Der Reperfusionstatus des ischämischen Gebiets, dessen Zellen hier nicht untersucht worden sind, mit gesteigerter ROS-Produktion, Zytokinausschüttung und Zellschwellung stellt einen dynamischen Prozess dar, der mehrere Tage anhalten kann [134]. Die dort gebildeten schädlichen Produkte werden im Rahmen der Reperfusion auch in das hier untersuchte RM getragen [13]. Freigesetzte ROS deaktivieren u.a. die eNOS [146, 147]. Dieser Effekt könnte additiv zu den Veränderungen am Sarkomer die gefundenen Ergebnisse gut erklären. Da die durch den I/R-Schaden verstärkte ROS-Konzentration starken oxidativen Stress verursacht, besonders für die hyperglykämischen Zellen. Interessant wären hier weitere Untersuchungen, wie sich das beschriebene größere Reservoir an inaktiver eNOS [125] nach einem I/R-Ereignis verhält. Diese beschriebenen, für den Einsatz von Neuregulin 1 positiven Eigenschaften, können sich aber noch verstärkt in das Gegenteil konvertieren. So konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass die eNOS im Rahmen eines Myokardinfarktes, nach einer Stimulation mit Neuregulin 1 beginnt, ROS anstatt NO, zu produzieren [139]. Diese Produktion der schädlichen ROS führte u.a. zu einer vergrößerten Infarktnarbe. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die eNOS in den diabetischen Tieren der Gruppe 3 unter dem deutlich erhöhten oxidativen Stress, mehr ROS produziert hat, als in den normoglykämischen Kontrolltieren und so den in Gruppe 2 gesehenen Trend, vor allem innerhalb der Kalziumbewegungen (Unterschiede der Mittelwerte um den Faktor acht), negiert hat. In Gruppe 3 fanden sich die Unterschiede der Mittelwerte um 300% reduziert im Vergleich zu Gruppe 2.

4.4 Veränderung der Kontraktion nach fünfminütiger Dauerstimulation

Es konnte in allen drei experimentellen Gruppen eine Veränderung der Kontraktion nach fünfminütiger Dauerstimulation gesehen werden. Zusätzlich zu der durch NO

ausgelösten cGMP-Erhöhung, durch die Neuregulin 1 - Präsentation, konnte auch gezeigt werden, dass alleinige elektrische Stimulation (1 Hz) für fünf Minuten die intrazellulären Spiegel von cGMP und Kalzium erhöht [81]. Der erhöhte Pegel an Kalzium hat wiederum Einfluss auf die eNOS, da deren NO-Produktion u.a. auch von Kalziumpräsenz abhängt [81]. Die Studie konnte jedoch auch zeigen, dass die produzierte cGMP-Menge der Kardiomyozyten abhängig von deren Stimulationsfrequenz, also im weiteren Sinne der Herzfrequenz, abhing. So sanken in die intrazellulären cGMP-Spiegel, wenn die Frequenz der Stimulation auf 3 Hz erhöht wurde [81], bleiben jedoch immer noch erhöht im Vergleich zu den Pegeln von den nicht stimulierten Kontrollzellen [81]. So lässt sich hier schließen, dass es unabhängig von den von Neuregulin 1 induzierten Effekten, aufgrund des experimentellen Designs Effekte gibt, die den intrazellulären cGMP-Spiegel weiter steigern. Dies steht im Einklang mit den gesehenen Ergebnissen, da in jeder Gruppe eine Verbesserung der Kontraktion nach fünfminütiger Dauerkontraktion gezeigt werden konnte.

4.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Großteil im Einklang mit der Literatur. Die leichten Trends der Sarkomere der Gruppe 1 stehen jedoch im Widerspruch zu dieser. Es fanden sich in den Kontraktionsdaten der Sarkomere ein bis zu 1,6-facher Unterschied für ein stärkeres Ansprechen der Zellen aus dem RM, während die Trends in den Kalziumbewegungen eher darauf hindeuten, dass die Effekte durch Neuregulin 1 – Stimulation schlechter werden (vgl. 3.2.1 und 3.2.2). Die Literatur zeigt, dass die Zellen des RM unter erheblichem mechanischem Stress stehen [13, 21, 22, 24]. Dies führt zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Sarkomers [142]. Die mechanischen Eigenschaften des Titins können zwar von Neuregulin 1 beeinflusst werden [108], jedoch bleibt fraglich ob dieser Effekt auch im RM auftritt, da dieser Effekt potentiell über den NO/cGMP – Weg vermittelt wird. Die ROS können auch von der induzierten eNOS, anstelle von dem benötigten NO, produziert werden [140, 141]. Auch ist bekannt, dass die alleinige Gabe von Neuregulin 1 nach Myokardinfarkt eher schädliche Effekte auf das postinfarzielle Herz hat [139], obwohl durch die vermehrte Aktivität der PP2A ein weiterer potentieller Angriffspunkt für das Neuregulin 1 besteht. Die Trends der Sarkomerdaten in Gruppe 1 sollten als artifizielles Geschehen betrachtet werden, auch da sie sich im Vergleich zu den Trends der Gruppe 2 aus nur einer halb so großen Anzahl von Zellen speisen.

Die beobachteten Trends in Gruppe 2 stehen im Einklang mit der Literatur. Es ist wahrscheinlich, dass die diabetischen Mäuse eine geringere Aktivität des von

Neuregulin 1 stimulierten cGMP/PKG-Signalwegs aufweisen [65]. Durch eine vermehrte Stimulation kann ein verstärkter Effekt erzielt worden sein. Zusätzlich weisen die diabetischen Tiere auch noch eine größere Reserve an phosphorylierbarer und somit aktivierbarer eNOS auf [125], welche innerhalb von nur fünf Minuten von Neuregulin 1 stimuliert werden kann [148]. Auch ist es denkbar, dass die gezeigten Effekte eines vermehrten Ansprechens der diabetischen Zellen (vgl. 3.3.1 und 3.3.2) auf das veränderte Schema der Titinexpression bei Diabetes mellitus zurückzuführen sind, wie Krüger et al. bereits beschreiben konnten [126]. Als ein weiterer potentieller Weg, über den der Effekt erzielt wurde, kann auch eine verstärkte PP2A-Expression in den diabetischen Kardiomyozyten dienen. Das Ergebnis des starken Trends, die Mittelwerte unterscheiden sich z.T. um mehr als den Faktor elf, steht somit im Einklang mit den veröffentlichten Daten.

Es fanden sich auch in Gruppe 3 starke Trends. Allerdings waren sie nicht so konsistent wie in Gruppe 2, da sich die in der dritten Gruppe gefundenen Trends (Unterschied um den Faktor elf) vor allem auf die Sarkomerkontraktionen fokussierten, und sich nicht in den Kalziumbewegungen fortsetzten. Dort waren die Unterschiede in den Mittelwerten um bis zu 300 % kleiner als in den gleichen Mittelwerten der Gruppe 2. Die nicht mehr vorhanden Trends in den Kalziumbewegungen passen gut zu der bekannten Literatur, da davon auszugehen ist, dass die diabetischen Kardiomyozyten stärker von dem I/R-Ereignis beeinträchtigt werden als die Kontrollzellen. So kommt es dazu, dass sich das positive Ansprechen aus Gruppe 2 hier nicht mehr fortsetzt und kein Unterschied mehr ausgemacht werden kann. Diabetische Zellen sind bereits basal, vor einem I/R-Ereignis, mechanisch stärker belastet als normoglykämie Zellen. Zusätzlich zu diesem Hauptmechanismus sind die Zellen auch weniger widerstandsfähig gegen ROS, bei gleichzeitig potentiell erhöhter ROS-Produktion, verursacht durch ein verstärkt schädliches Mikromilieu, im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrollzellen. Dieses schädliche Mikromilieu bestand bereits vor dem Infarkt, jedoch konnten die Zellen potentiell durch ihr größeres Reservoir an unphosphorylierter eNOS und vermehrter PP2A-Expression, besser als die normoglykämischen Zellen, auf die Neuregulin 1 – Präsentation reagieren. Nach dem Infarkt kam das Janusgesicht der eNOS zum Tragen und kann das positive Ansprechen auf die Neuregulin 1 – Präsentation negiert haben. Einschränkend muss hier gesagt werden, dass die Menge an phosphorylierter eNOS nicht gemessen wurde und es sich deswegen um potentielle Ursachen für die beobachteten Effekte handelt. Die zum Teil stärkeren Trends in der Sarkomerkontraktion (z.T. 11-fach unterschiedliche Mittelwerte), stehen nicht im Einklang mit der vorliegenden Literatur, die Relaxationsfähigkeit nimmt stärker ab, als die der Kontrollzellen. Dies passt nicht zu den biochemischen Erklärungen, einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber

mechanischer Belastung und verminderter Resistenz gegenüber den aus dem ischämischen Gebiet ausgeschwemmten ROS und sollte deshalb als artefiziell angesehen werden.

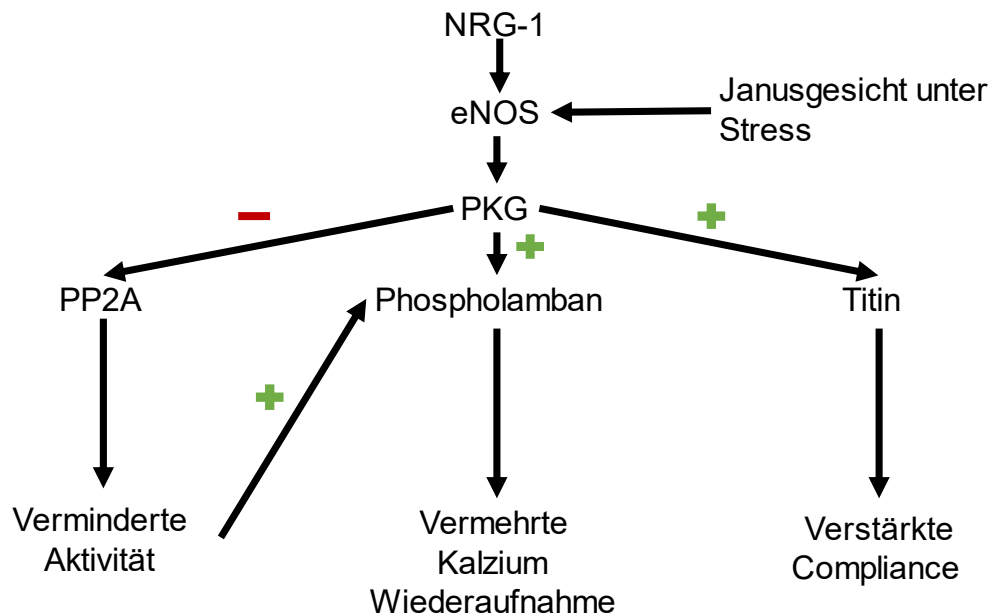


Abb. 36: **Schematische Darstellung der potentiellen Wirkmechanismen von Neuregulin 1.** NRG-1 = Neuregulin 1, eNOS = Endotheliale NO-Synthase, PKG = Proteinkinase G, PP2A = Proteinphosphatase 2A
Dargestellt sind die potentiellen Wirkmechanismen, über die Neuregulin 1 die Effekte ausgelöst haben könnte, die in der Arbeit beobachtet wurden. Ein zentraler Drehpunkt dieses Mechanismus ist die eNOS und ihr gegensätzliches Verhalten unter Stress.

4.6 Ausblick

Der von Annette Kronenbitter in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe postulierte Effekt von Neuregulin 1 [14] wird von dieser Arbeit zum Teil unterstützt. So wurde ein äußerst starker Trend hin zu einer verstärkten Reaktion der diabetischen Zellen in der Gruppe 2 gesehen, welcher sich sowohl funktionell als auch proteinchemisch zeigte. Welcher der drei im vorangegangenen Absatz beschriebenen Effekte verantwortlich ist, lässt sich nur durch weitere Forschungen beziffern. Es wäre sehr interessant zu sehen, wie sich eine Ischämie und eine Neuregulin 1 - Präsentation auf die Phosphorylierungsschemata der eNOS auswirken und ob sich die vermuteten Signalwege untermauern ließen. In der Langzeittherapie nach Myokardinfarkt bei hyperglykämischen Mäusen ist Neuregulin 1 in der Lage die Genexpression von ROS produzierenden Enzymen herunterzufahren [149]. Hier wäre es außerordentlich interessant ob sich dieser bekannte Effekt auch funktionell niederschlägt und sich dadurch die Reaktion von solch vorstimulierten Zellen auf eine kurzfristige Neuregulin 1 - Präsentation beeinflussen lässt. Es könnte auch überlegt werden in einem solch kurzfristigen Setting Neuregulin 1 und Insulin gleichzeitig zu

präsentieren. Bei beiden ist bekannt, dass sie innerhalb von fünf Minuten und weniger in das Phosphorylierungsschema der eNOS eingreifen können [76, 150]. Es wäre denkbar, dass sich dadurch ein additiver Effekt der beiden Substanzen bei hyperglykämischen Tieren einstellt. Von besonderem Interesse wäre auch die kombinierte Gabe von Neuregulin 1 und Arginin um die in 4.2.2 beschriebenen benefiziellen Effekte des Arginins bei gleichzeitiger Neuregulin 1 – Gabe zu untersuchen. Es kann also abschließend gesagt werden, dass weitere Forschung nötig ist um das volle Potential des Neuregulin 1 in der kurzfristigen Anwendung auszuschöpfen.

5 Literaturverzeichnis

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, Group ESD. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2018;40(3):237-69.
2. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2013;56(5):650-5.
3. Statistisches Bundesamt (Destatis). Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - Ausführliche vierstellige ICD10-Klassifikation - 2020 2020.
4. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, Group ESCSD. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.
5. Gorenek B, Blomström Lundqvist C, Brugada Terradellas J, Camm AJ, Hindricks G, Huber K, Kirchhof P, Kuck KH, Kudaiberdieva G, Lin T, Raviele A, Santini M, Tilz RR, Valgimigli M, Vos MA, Vrints C, Zeymer U, Lip GY, Potpara T, Fauchier L, Sticherling C, Roffi M, Widimsky P, Mehilli J, Lettino M, Schiele F, Sinnaeve P, Boriani G, Lane D, Savelieva I. Cardiac arrhythmias in acute coronary syndromes: position paper from the joint EHRA, ACCA, and EAPCI task force. *Europace*. 2014;16(11):1655-73.
6. Goldberg RJ, Spencer FA, Gore JM, Lessard D, Yarzebski J. Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective. *Circulation*. 2009;119(9):1211-9.
7. Killip T, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit: A Two year experience with 250 patients. *The American Journal of Cardiology*. 1967;20(4):457-64.

8. Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistisches Bundesamt (Destatis),; 2022 [Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg229156].
9. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012;33(20):2551-67.
10. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71.
11. Servier Medical Art. HEART o. J. [Available from: https://smart.servier.com/smart_image/heart/].
12. Jackson BM, Gorman JH, Moainie SL, Guy TS, Narula N, Narula J, John-Sutton MG, Edmunds LH, Jr., Gorman RC. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(6):1160-7; discussion 8-71.
13. French BA, Kramer CM. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2007;4(3):185-96.
14. Kronenbitter A. Veränderungen im myozytären Kalziumkreislauf und in der Sarkomerfunktion im nicht-ischämischen Gewebe nach Myokardinfarkt. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.
15. Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorressen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stuhler K, Isic M, Kruger M, Schmitt JP. Impaired Ca(2+) cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;119:28-39.
16. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(14):2577-604.
17. Galindo CL, Kasasbeh E, Murphy A, Ryzhov S, Lenihan S, Ahmad FA, Williams P, Nunnally A, Adcock J, Song Y, Harrell FE, Tran TL, Parry TJ, Iaci J, Ganguly A, Feoktistov I, Stephenson MK, Caggiano AO, Sawyer

- DB, Cleator JH. Anti-remodeling and anti-fibrotic effects of the neuregulin-1beta glial growth factor 2 in a large animal model of heart failure. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(5):e000773.
18. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
 19. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16(3):123-32.
 20. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(11-12):1907-39.
 21. Tsuda T, Gao E, Evangelisti L, Markova D, Ma X, Chu ML. Post-ischemic myocardial fibrosis occurs independent of hemodynamic changes. *Cardiovasc Res.* 2003;59(4):926-33.
 22. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81(4):1161-72.
 23. Theroux P, Ross J, Jr., Franklin D, Covell JW, Bloor CM, Sasayama S. Regional myocardial function and dimensions early and late after myocardial infarction in the unanesthetized dog. *Circ Res.* 1977;40(2):158-65.
 24. Klein MD, Herman MV, Gorlin R. A hemodynamic study of left ventricular aneurysm. *Circulation.* 1967;35(4):614-30.
 25. Tsuda T. Clinical Assessment of Ventricular Wall Stress in Understanding Compensatory Hypertrophic Response and Maladaptive Ventricular Remodeling. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(10).
 26. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137-49.
 27. Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life.* 2015;67(7):506-13.
 28. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli

- A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
29. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389(10085):2239-51.
 30. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, Grundy SM, Khera A, McGuire DK, de Lemos JA. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA*. 2012;308(11):1150-9.
 31. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2016;37(3):278-316.
 32. Milazzo V, Cosentino N, Genovese S, Campodonico J, Mazza M, De Metrio M, Marenzi G. Diabetes Mellitus and Acute Myocardial Infarction: Impact on Short and Long-Term Mortality. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1307:153-69.
 33. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet*. 2006;368(9529):29-36.
 34. Haffner SM. Coronary heart disease in patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2000;342(14):1040-2.
 35. Klein HH, Hengstenberg C, Peuckert M, Jürgensen R. Comparison of death rates from acute myocardial infarction in a single hospital in two different periods (1977-1978 versus 1988-1989). *Am J Cardiol*. 1993;71(7):518-23.
 36. Zuanetti G, Latini R, Maggioni AP, Santoro L, Franzosi MG. Influence of diabetes on mortality in acute myocardial infarction: data from the GISSI-2 study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22(7):1788-94.
 37. Lee KL, Woodlief LH, Topol EJ, Weaver WD, Betriu A, Col J, Simoons M, Aylward P, Van de Werf F, Califf RM. Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators. *Circulation*. 1995;91(6):1659-68.

38. Santos IS, Goulart AC, Brandão RM, Santos RC, Bittencourt MS, Sitnik D, Pereira AC, Pastore CA, Samesima N, Lotufo PA, Bensenor IM. One-year Mortality after an Acute Coronary Event and its Clinical Predictors: The ERICO Study. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(1):53-64.
39. Lehrke M, Marx N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. *Am J Med.* 2017;130(6s):S40-s50.
40. Huang JP, Huang SS, Deng JY, Hung LM. Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic rats. *J Biomed Sci.* 2009;16(1):77.
41. Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. *Metabolism.* 2000;49(1):22-31.
42. Stachura A, Khanna I, Krysiak P, Paskal W, Włodarski P. Wound Healing Impairment in Type 2 Diabetes Model of Leptin-Deficient Mice-A Mechanistic Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15).
43. Bouillon-Minois JB, Trousselard M, Thivel D, Benson AC, Schmidt J, Moustafa F, Bouvier D, Dutheil F. Leptin as a Biomarker of Stress: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2021;13(10).
44. Wyse BM, Dulin WE. The influence of age and dietary conditions on diabetes in the db mouse. *Diabetologia.* 1970;6(3):268-73.
45. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(2).
46. Krüger M, Linke WA. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem.* 2011;286(12):9905-12.
47. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res.* 2014;114(6):1052-68.
48. Xu C, Craig R, Tobacman L, Horowitz R, Lehman W. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys J.* 1999;77(2):985-92.
49. Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(5).

50. Vaughan-Jones RD. Excitation and contraction in heart: the role of calcium. *Br Med Bull*. 1986;42(4):413-20.
51. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017;121(2):181-95.
52. Xu L, Sun L, Xie L, Mou S, Zhang D, Zhu J, Xu P. Advances in L-Type Calcium Channel Structures, Functions and Molecular Modeling. *Curr Med Chem*. 2021;28(3):514-24.
53. Weizmann Institute of Science. Weizmann Institute of Science; 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CACNA1C&keywords=CACNA1C#genomic_location].
54. Ferreira G, Yi J, Ríos E, Shirokov R. Ion-dependent inactivation of barium current through L-type calcium channels. *J Gen Physiol*. 1997;109(4):449-61.
55. Kushnir A, Wajsberg B, Marks AR. Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(11 Pt B):1687-97.
56. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):511-8.
57. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res*. 2012;110(11):1474-83.
58. Hamstra SI, Whitley KC, Baranowski RW, Kurgan N, Braun JL, Messner HN, Fajardo VA. The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;319(4):C694-c9.
59. Owens AT, Brozena SC, Jessup M. New Management Strategies in Heart Failure. *Circ Res*. 2016;118(3):480-95.
60. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):566-77.

61. Funk F. Mechanismen der Phospholamban-vermittelten Regulation von SERCA2a. Duesseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.
62. Colyer J. Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853:79-91.
63. Frank K, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractility. *Ann Med.* 2000;32(8):572-8.
64. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23-49.
65. Brero A, Ramella R, Fitou A, Dati C, Alloatti G, Gallo MP, Levi R. Neuregulin-1beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2010;88(3):443-52.
66. Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(1):39-50.
67. Edes I, Kranias EG. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ Res.* 1990;67(2):394-400.
68. MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem.* 1991;196(3):725-34.
69. Lubbers ER, Mohler PJ. Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:127-33.
70. Xu Y, Li X, Liu X, Zhou M. Neuregulin-1/ErbB signaling and chronic heart failure. *Adv Pharmacol.* 2010;59:31-51.
71. Odiete O, Hill MF, Sawyer DB. Neuregulin in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2012;111(10):1376-85.
72. Fang SJ, Wu XS, Han ZH, Zhang XX, Wang CM, Li XY, Lu LQ, Zhang JL. Neuregulin-1 preconditioning protects the heart against ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(24):3597-604.

73. Jacobi N, Seeboeck R, Hofmann E, Eger A. ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology. *Cancers (Basel)*. 2017;9(4).
74. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):58.
75. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):177-84.
76. Lemmens K, Fransen P, Sys SU, Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004;109(3):324-6.
77. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990;30:535-60.
78. Kitakaze M, Node K, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Hori M, Kamada T. Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes: its augmentation by hypoxia. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(10):2149-54.
79. González DR, Fernández IC, Ordenes PP, Treuer AV, Eller G, Boric MP. Differential role of S-nitrosylation and the NO-cGMP-PKG pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide*. 2008;18(3):157-67.
80. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(10):1846-58.
81. Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmons WW, Smith TW, Kelly RA. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996;78(2):217-24.
82. Priksz D, Lampe N, Kovacs A, Herwig M, Bombicz M, Varga B, Wilisicz T, Szilvassy J, Posa A, Kiss R, Gesztelyi R, Raduly A, Szekeres R, Sieme M, Papp Z, Toth A, Hamdani N, Szilvassy Z, Juhasz B. Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol*. 2021.
83. Wang D, Shan Y, Huang Y, Tang Y, Chen Y, Li R, Yang J, Huang C. Vasostatin-1 Stops Structural Remodeling and Improves Calcium Handling via the eNOS-NO-PKG Pathway in Rat Hearts Subjected to Chronic β -Adrenergic Receptor Activation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016;30(5):455-64.

84. Özakca I, Özçelikay AT. Chronic inhibition of nitric oxide synthase modulates calcium handling in rat heart (1). *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(4):313-9.
85. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol*. 2007;152(6):855-69.
86. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 1991;351(6329):714-8.
87. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1992;90(5):2092-6.
88. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-8.
89. Grocott-Mason R, Fort S, Lewis MJ, Shah AM. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):H1699-705.
90. Smith JA, Shah AM, Lewis MJ. Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol*. 1991;439:1-14.
91. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(1):347-51.
92. Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation*. 1995;92(12):3505-12.
93. Shen W, Xu X, Ochoa M, Zhao G, Wolin MS, Hintze TH. Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ Res*. 1994;75(6):1086-95.
94. Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996;78(1):91-101.

95. Wahler GM, Dollinger SJ. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 1):C45-54.
96. Sumii K, Sperelakis N. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 1995;77(4):803-12.
97. Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *Circ Res.* 1994;74(5):970-8.
98. Zhang Q, Scholz PM, He Y, Tse J, Weiss HR. Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction. *Cell Calcium.* 2005;37(3):259-66.
99. Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2002;540(Pt 2):457-67.
100. Bibli SI, Andreadou I, Chatzianastasiou A, Tzimas C, Sanoudou D, Kranias E, Brouckaert P, Coletta C, Szabo C, Kremastinos DT, Iliodromitis EK, Papapetropoulos A. Cardioprotection by H_2S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. *Cardiovasc Res.* 2015;106(3):432-42.
101. Sabine B, Willenbrock R, Haase H, Karczewski P, Wallukat G, Dietz R, Krause EG. Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214(1):75-80.
102. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 2002;90(11):1181-8.
103. Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res.* 2013;99(4):648-56.
104. Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res.* 2009;104(1):87-94.

105. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*. 2009;105(7):631-8, 17 p following 8.
106. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*. 2013;112(4):664-74.
107. Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F. 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*. 2012;287(35):29273-84.
108. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*. 2018;123(3):342-55.
109. Methawasin M, Granzier H. Softening the Stressed Giant Titin in Diabetes Mellitus. *Circ Res*. 2018;123(3):315-7.
110. Isic M. Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf adaptive Titin Modifikationen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.
111. Adão R, Mendes-Ferreira P, Maia-Rocha C, Santos-Ribeiro D, Rodrigues PG, Vidal-Meireles A, Monteiro-Pinto C, Pimentel LD, Falcão-Pires I, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Neuregulin-1 attenuates right ventricular diastolic stiffness in experimental pulmonary hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46(3):255-65.
112. Soller KJ, Yang J, Veglia G, Bowser MT. Reversal of Phospholamban Inhibition of the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Using Short, Protein-interacting RNAs and Oligonucleotide Analogs. *J Biol Chem*. 2016;291(41):21510-8.
113. Jabbour A, Hayward CS, Keogh AM, Kotlyar E, McCrohon JA, England JF, Amor R, Liu X, Li XY, Zhou MD, Graham RM, Macdonald PS. Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(1):83-92.

114. Lewis FC, Kumar SD, Ellison-Hughes GM. Non-invasive strategies for stimulating endogenous repair and regenerative mechanisms in the damaged heart. *Pharmacol Res.* 2018;127:33-40.
115. Gao R, Zhang J, Cheng L, Wu X, Dong W, Yang X, Li T, Liu X, Xu Y, Li X, Zhou M. A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(18):1907-14.
116. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005;22(4):359-70.
117. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo.* 2009;23(2):245-58.
118. Doss D, Ohnesorge FK. Motilität und Körpertemperatur von Mäusen in verschiedenen Umgebungstemperaturen. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 1966;289(2):91-7.
119. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440-50.
120. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE. Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp.* 2009(23).
121. Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal.* 2001;1:919-25.
122. Baliga RR, Pimental DR, Zhao YY, Simmons WW, Marchionni MA, Sawyer DB, Kelly RA. NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol.* 1999;277(5):H2026-37.
123. De Keulenaer GW, Feyen E, Dugaucquier L, Shakeri H, Shchendrygina A, Belenkov YN, Brink M, Vermeulen Z, Segers VFM. Mechanisms of the Multitasking Endothelial Protein NRG-1 as a Compensatory Factor During Chronic Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2019;12(10):e006288.
124. Rochais F, Fischmeister R. Acute cardiac effects of neuregulin-1/ErbB signalling. *Cardiovasc Res.* 2010;88(3):393-4.

125. Zdychová J, Kazdová L, Pelikanová T, Lindsley JN, Anderson S, Komers R. Renal activity of Akt kinase in obese Zucker rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(10):1231-41.
126. Krüger M, Babicz K, von Frieling-Salewsky M, Linke WA. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(5):910-6.
127. Guan Y, Zhou L, Zhang Y, Tian H, Li A, Han X. Effects of PP2A/Nrf2 on experimental diabetes mellitus-related cardiomyopathy by regulation of autophagy and apoptosis through ROS dependent pathway. *Cell Signal*. 2019;62:109339.
128. Kowluru A, Matti A. Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(5):591-7.
129. Baskaran R, Velmurugan BK. Protein phosphatase 2A as therapeutic targets in various disease models. *Life Sci*. 2018;210:40-6.
130. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*. 1992;257(5074):1261-4.
131. Brekle C. Beeinflussung der Kontraktionskraft des Herzens über eine Proteinkinase C-abhängige Regulation der Proteinphosphatase 2A. Berlin: Freie Universität Berlin; 2016.
132. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016;7(1):113-70.
133. Wyatt HL, Forrester JS, da Luz PL, Diamond GA, Chagrasulis R, Swan HJ. Functional abnormalities in nonoccluded regions of myocardium after experimental coronary occlusion. *Am J Cardiol*. 1976;37(3):366-72.
134. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-67.
135. Borges JP, Lessa MA. Mechanisms Involved in Exercise-Induced Cardioprotection: A Systematic Review. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(1):71-81.

136. Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P, Kass DA. Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2468-72.
137. Rainer PP, Kass DA. Old dog, new tricks: novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G. *Cardiovasc Res*. 2016;111(2):154-62.
138. Köhler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:92-102.
139. Ebner B, Lange SA, Eckert T, Wischniowski C, Ebner A, Braun-Dullaeus RC, Weinbrenner C, Wunderlich C, Simonis G, Strasser RH. Uncoupled eNOS annihilates neuregulin-1 β -induced cardioprotection: a novel mechanism in pharmacological postconditioning in myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2013;373(1-2):115-23.
140. Heinzl B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J*. 1992;281 (Pt 3)(Pt 3):627-30.
141. Culcasi M, Lafon-Cazal M, Pietri S, Bockaert J. Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol Chem*. 1994;269(17):12589-93.
142. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016;119(9):1017-29.
143. Paulus WJ, Dal Canto E. Distinct Myocardial Targets for Diabetes Therapy in Heart Failure With Preserved or Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*. 2018;6(1):1-7.
144. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Lüscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003;107(7):1017-23.
145. Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(3):241-8.

146. Zhao D, Yang J, Yang L. Insights for Oxidative Stress and mTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6437467.
147. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1071-80.
148. Lemmens K, Segers VF, Demolder M, De Keulenaer GW. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19469-77.
149. Gupte M, Lal H, Ahmad F, Sawyer DB, Hill MF. Chronic Neuregulin-1 β Treatment Mitigates the Progression of Postmyocardial Infarction Heart Failure in the Setting of Type 1 Diabetes Mellitus by Suppressing Myocardial Apoptosis, Fibrosis, and Key Oxidant-Producing Enzymes. *J Card Fail*. 2017;23(12):887-99.
150. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):346-53.