

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

**Acetylcholin-abhängige Veränderungen des Sarkomerproteins Titin nach  
kardialer Ischämie-Reperfusion**

Dissertation

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

Düsseldorf

vorgelegt von Sebastian Wülker

2025

# Gutachter

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Joachim Schmi

## Zusammenfassung (deutsch)

Ischämien am Herzmuskel zählen noch heute zu den häufigsten Todesursachen im europäischen Raum. Wenige Mechanismen, die das überlebende Myokard an die neuen Bedingungen anpassen, sind verstanden. Titin ist ein Strukturprotein und kann durch kurz- und langfristige Modifikationen die Steifigkeit des Myokards dynamisch modulieren. In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass sich die Titin-vermittelte Steifigkeit des nicht-ischämischen Ventrikelmyokards unmittelbar nach Herzinfarkt durch PKC $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung erhöht. Es wird vermutet, dass diese Steifigkeitserhöhung der Kardiomyozyten früh nach Myokardinfarkt stabilisierend auf das nicht-ischämische Myokard wirkt. Die molekularen Signalwege dieser Veränderungen sind noch weitgehend unbekannt. Erste Daten aus vorherigen Studien deuten auf eine Beteiligung des Nervus vagus hin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 1.) lokale Ischämie/Reperfusion (I/R) auch im isolierten Rattenherzen zu einer PKC $\alpha$ -vermittelten Titinmodifikation im nicht-ischämischen Myokard führt, und 2.) inwiefern Acetylcholin (ACh)-abhängige Signalwege bei kardialer I/R die Titinmodifikation beeinflussen. Isolierte Rattenherzen wurden einer lokalen Ischämie medikamentöser Acetylcholinblockade durch Hexamethonium und Atropin (HEX+AT) ausgesetzt. Gewebeproben aus dem nicht-ischämischen Areal des linken Ventrikels wurden entnommen, lysiert und die Phosphorylierung von drei Titinloci sowie der Kinasen PKA, PKC $\alpha$  und ERK1/2 analysiert. Die relative Phosphorylierung von Serin S11878 und S12022 wurde weder durch I/R, noch durch Gabe von HEX+AT am isolierten Herzen signifikant verändert. Kombination von HEX+AT und I/R führte dagegen zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung an Titin S12022 und S11878. Eine erhöhte Phosphorylierung und damit Aktivierung von PKC $\alpha$  konnte dagegen in keiner Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Die relative Phosphorylierung von Titin S4010 und der Kinase ERK1/2, blieb unter allen Versuchsbedingungen unverändert. Die Ergebnisse der Studie belegen, dass I/R am isolierten Herzen vermutlich durch Fehlen einer intakten vagalen Signalverschaltung keine adaptiven Titinmodifikationen hervorruft. Die Daten legen weiterhin die Vermutung nahe, dass ACh-abhängige Signalwege unter basalen Bedingungen nicht an der Titinphosphorylierung beteiligt sind. Kardiale I/R scheint dagegen im nicht-ischämischen Myokard Veränderungen in der Signaltransduktion hervorzurufen, die in großer Abhängigkeit von nicht-vagal regulierten ACh-vermittelten Signalwegen stehen. Ob es sich bei diesen Effekten um spezifische und I/R abhängige Mechanismen handelt, oder die beobachteten Veränderungen möglicherweise durch eine paradoxe Effektsteigerung des Acetylcholins durch die eingesetzten Inhibitoren verursacht worden sind, wird in weiterführenden Studien untersucht werden. Ich vermute, dass das Zusammenspiel von vagalen Signalverschaltungen und lokalen ACh-abhängigen Signalwegen bei I/R Einfluss auf die Titin vermittelte Kardiomyozytenfunktion nehmen kann.

## Zusammenfassung (englisch)

Myocardial ischemia is still one of the most common causes of death in Europe today. Few mechanisms that adapt the surviving myocardium to the new conditions are understood. Titin is a structural protein and can dynamically modulate the stiffness of the myocardium through short- and long-term modifications. In various animal models, it has been shown that titin-mediated stiffness of non-ischemic ventricular myocardium increases immediately after myocardial infarction through PKC $\alpha$ -mediated phosphorylation. It is hypothesized that this increase in cardiomyocyte stiffness early after myocardial infarction has a stabilizing effect on the non-ischemic myocardium. The molecular signaling pathways of these changes are still largely unknown, but data from previous studies suggest an involvement of the vagus nerve.

The aim of this study was to investigate whether 1) local ischemia/reperfusion (I/R) also leads to PKC $\alpha$ -mediated titin modification in the non-ischemic myocardium of isolated rat hearts, and 2) to what extent acetylcholine (ACh)-dependent signaling pathways influence titin modification during cardiac I/R. Isolated rat hearts were subjected to local ischemia of drug-induced acetylcholine blockade by hexamethonium and atropine (HEX+AT). Tissue samples were taken from the non-ischemic area of the left ventricle, lysed and the phosphorylation of three titin loci and the kinases PKA, PKC $\alpha$  and ERK1/2 were analyzed.

The relative phosphorylation of serine S11878 and S12022 was not significantly altered by either I/R or HEX+AT administration to the isolated heart. In contrast, the combination of HEX+AT and I/R led to a significant increase in the phosphorylation of titin S12022 and S11878. In contrast, increased phosphorylation and thus activation of PKC $\alpha$  could not be detected in any experimental group. The relative phosphorylation of titin S4010 and the kinase ERK1/2 remained unchanged under all experimental conditions.

The results of the study demonstrate that I/R in the isolated heart does not induce adaptive titin modifications, presumably due to the lack of intact vagal signaling circuitry. The data further suggests that ACh-dependent signaling pathways are not involved in titin phosphorylation under basal conditions. In contrast, cardiac I/R appears to induce changes in signal transduction in the non-ischemic myocardium that are highly dependent on non-Vagal-regulated ACh-mediated signaling pathways. Whether these effects are specific and I/R-dependent mechanisms, or whether the observed changes may have been caused by a paradoxical increase in the effect of acetylcholine by the inhibitors used, will be investigated in further studies. I hypothesize that the interplay of vagal signaling circuitry and local ACh-dependent signaling pathways in I/R may influence titin-mediated cardiomyocyte function.

## Abkürzungsverzeichnis

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| A                                  | Ampere                                  |
| A-Band                             | Anisotropes Band                        |
| Abb.                               | Abbildung                               |
| AC                                 | Adenylatzyklase                         |
| ACh                                | Acetylcholin                            |
| APS                                | Ammoniumpersulfat                       |
| AT                                 | Atropin                                 |
| ATP                                | Adenosintriphosphat                     |
| ATPase                             | Adenosintriphosphatase                  |
| BL                                 | Baseline                                |
| BSA                                | Bovine Serum Albumine                   |
| CaCl <sub>2</sub>                  | Calciumchlorid                          |
| cAMP                               | Zyklisches Adenosinmonophosphat         |
| CK-MB                              | Creatinin kinase muscle Brain           |
| cTn                                | Kardiales Troponin                      |
| cTnI                               | kardiales Troponin I                    |
| CO <sub>2</sub>                    | Kohlenstoffdioxid                       |
| CoA                                | Coenzym A                               |
| DTT                                | Dithiothreitol                          |
| ECL                                | Western blotting detection reagent      |
| ECM                                | Extrazelluläre Matrix                   |
| ERK                                | Extracellular-signal regulated kinases  |
| Eppi                               | Mikroreaktionsgefäß                     |
| Fhl-1                              | four-and-a-half LIM domain protein-1    |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | Zweifach destilliertes Wasser           |
| HCl                                | Salzsäure                               |
| HEX                                | Hexamethonium                           |
| HEX+AT                             | Hexamethonium und Atropin               |
| I-Band                             | Isotropes Band                          |
| I25                                | Ischämie nach 25 Minuten                |
| I/R                                | Ischämie/ Reperfusion                   |
| IU                                 | Internationale Einheiten                |
| KCl                                | Kaliumchlorid                           |
| kDa                                | kiloDalton                              |
| K                                  | Kontrollgruppe                          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | Kaliumdihydrogenphosphat                |
| L                                  | Liter                                   |
| LAD                                | Ramus interventricularis anterior       |
| M                                  | Molar/Mol                               |
| mAChR                              | Muskarinerner Acetylcholinrezeptor      |
| M <sup>2</sup> AChR                | Muskarinerner Acetylcholinrezeptor 2    |
| M <sup>4</sup> AChR                | Muskarinerner Acetylcholinrezeptor 4    |
| M-Band                             | Mediane Verdichtung der Myosinfilamente |
| MgSO <sub>4</sub>                  | Magnesiumsulfat                         |
| MW                                 | Mittelwert                              |

|                    |   |
|--------------------|---|
| MURF1              | Muscle specific RING-finger Protein 1                                   |
| N. vagus           | Nervus vagus  |
| nAChR              | Nikotinerger Acetylcholinrezeptor                                       |
| NaCl               | Natriumchlorid  |
| NaHCO <sub>3</sub> | Natriumhydrogencarbonat   |
| O <sub>2</sub>     | Sauerstoffdioxid  |
| PDE4               | Phosphodiesterase 4   |
| PEVK               | Hoher Anteil an Prolin (P), Glutamatsäure (E), Valin (V), und Lysin (K) |
| PKA                | Proteinkinase A   |
| PKC                | Proteinkinase C   |
| PLC                | Phospholipase C   |
| PVDF               | Polyvinylidendifluorid  |
| RIP                | Remote ischaemic preconditioning  |
| ROS                | Reaktive Sauerstoffspezies  |
| R30                | Reperfusion nach 30 Minuten   |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat  |
| SDS-Page           | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese                     |
| STABW              | Standardabweichung  |
| T2                 | Degradationsbande von Titin   |
| TBST               | Tris-buffered saline with Tween20                                       |
| TC                 | Timematched Control   |
| TEMED              | Tetramethylethylendiamin  |
| TK                 | Titinkinase-Domäne  |
| Tris               | Tris(hydroxymethyl)aminomethane   |
| V                  | Volt  |
| v/v                | Volumen pro Volumen   |
| w/v                | Gewicht pro Volumen   |

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

- 1.1 Epidemiologie und Definition des Myokardinfarktes
- 1.2 Veränderung innerhalb des Myokards nach ischämischen Schäden
- 1.3 Verankerung des Titins im Sarkomer
- 1.4 Die molekulare Struktur und Isoformen des Protein Titin
- 1.5 Kurzfristige Modulationen der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit durch posttranslationale Modifikation
- 1.6 Einflussnehmende Faktoren auf die posttranslationale Modifikation Titins
- 1.7 N. vagus und Acetylcholin
- 1.8 Das intrinsische acetylcholinerge System des Herzens
- 1.9 Funktion von Atropin und Hexamethonium auf acetylcholinerge Neurone
- 1.10 Mögliche Rolle acetylcholinergere Signalwege in der Phosphorylierung Titins nach Herzinfarkt

## 2. Zielsetzung

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

- 3.1.1 Chemikalien
- 3.1.2 Puffer und Lösungen
- 3.1.3 Laborgeräte
- 3.1.4 Antikörper

### 3.2 Methoden

- 3.2.1 Probenherkunft und Behandlung
- 3.2.2 Proteinbiochemie
- 3.2.3 Immunbiochemie
- 3.2.4 Software
- 3.2.5 Datenanalytische Statistik

## **4. Ergebnisse**

- 4.1 Troponinphosphorylierung sinkt stärker durch HEX+AT unter I/R als ohne Behandlung
- 4.2 PKC-Phosphorylierung zeigt in isolierten Herzen unter HEX+AT nach I/R keine signifikante Veränderung
- 4.3 ERK-Phosphorylierung zeigt in isolierten Herzen unter HEX+AT einen leichten Anstieg, der unter I/R-Bedingungen stärker wird
- 4.4 Die Phosphorylierung von p-S12022 steigt unter HEX+AT, unter I/R wird dieser Effekt stark signifikant verstärkt
- 4.5 Die relative Phosphorylierung von p-S11878 steigt leicht unter HEX+AT, mit I/R wird dieser Effekt verstärkt
- 4.6 Die relative Phosphorylierung von p-S4010 sinkt unter HEX+AT, unter I/R wird steigt diese jedoch an

## **5. Diskussion**

- 5.1 Im isolierten Herzen zeigt PKC $\alpha$  nach I/R keine gesteigerte Aktivität
- 5.2 Die Blockierung acetylcholinergere Rezeptoren hat unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die posttranslationale Modifikation am isolierten Herzen
- 5.3 Schlussfolgerung

## **6. Literaturverzeichnis**

# 1. Einleitung

## **Epidemiologie und Definition des Myokardinfarkts**

Der Myokardinfarkt, zusammen mit kardiovaskulären Erkrankungen, zählt heutzutage zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Ein Myokardinfarkt wird dabei definiert als eine Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und Nachfrage zusammen mit einer Steigung des herzspezifischen Troponins (cTn) als Marker für ischämischen Schaden am Myokard. Dieser lokale Sauerstoffmangel kann unterschiedliche Ursachen haben, die jedoch alle in einem reduzierten Blutfluss in den herzversorgenden Arterien zur Folge haben (Thygesen et al., 2018). Risikofaktoren für Herzinfarkte sind unter anderem Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipidämie, die gemeinsam auftretend als metabolisches Syndrom zusammengefasst werden. Die hohe Todesrate und Häufigkeit der Herzinfarkte können mit der steigenden Prävalenz dieser Risikofaktoren zusätzlich zum Nikotinabusus innerhalb Europas erklärt werden.

Aufgrund der hohen Prävalenz und Mortalität der kardiovaskulären Erkrankungen ist es wichtig, die biochemischen Veränderungen des Myokards nach Ischämie zu verstehen, um diese später therapeutisch oder präventiv nutzen zu können.

## **Veränderungen innerhalb des Myokards nach ischämischen Schäden**

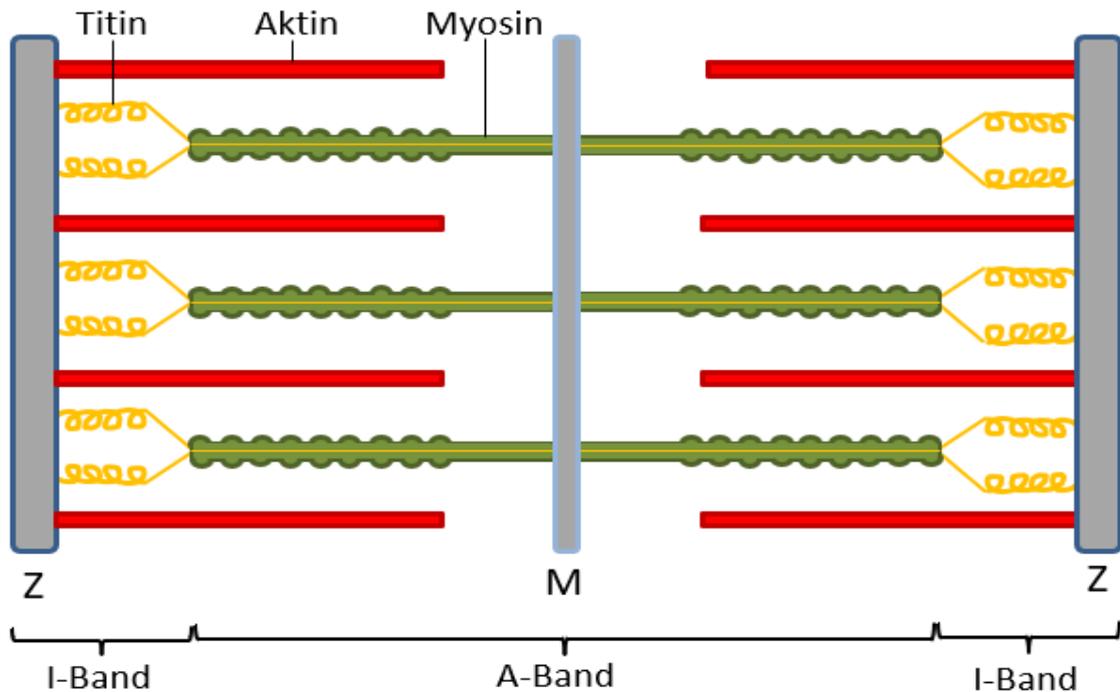
Auf einen Myokardinfarkt folgen eine Vielzahl von Veränderungen innerhalb der Struktur und der Funktion des Myokards, die häufig trotz Reperfusionstherapie mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Herzversagen assoziiert sind. Viele Mediatoren, die für die myokardialen Veränderungen, sogenanntes *Remodeling*, verantwortlich sein können, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Die meisten Veränderungen des Myokards nach Ischämie dienen dazu, das verbliebende Myokard an den vermehrten mechanischen Stress anzupassen und die Integrität des Ventrikels zu erhalten. Hier wird vermutet, dass unter anderem eine Erhöhung der passiven Steifigkeit akut nach Ischämie das verbliebende Myokard stabilisiert und die systolische Auswurfleistung erhält (Kötter et al., 2016). Mehrere Mechanismen, die zur Modulation des kardialen *Remodelings* und der Steifigkeit des Myokards beitragen, sind Gegenstand der Forschung.

Die Entzündungsreaktion des Körpers ist ein wesentlicher Faktor des kardialen *Remodelings* nach Herzinfarkt (Mann, 2002). Eine lange unregulierte Entzündung in Geweben hat fatale Folgen für dessen Funktion und Gewebsarchitektur. Diese Regulation erfordert in der akuten inflammatorischen Phase ein Zusammenspiel aus humoralen und zellulären Faktoren, die durch Mediatoren aktiviert und gehemmt werden (Maskrey et al., 2011). Einer der Mediatoren ist das Interleukin (IL)-6. IL-6 ist ein Zytokin, das in einer Entzündung von Geweben und Entzündungszellen ausgeschüttet wird (Kishimoto et al., 1992). Seine Funktion obliegt in der Immunzellstimulation und Differenzierung sowie in der Stimulation von Akute-Phase-Proteinen wie das C-reaktive Protein. IL-6 wirkt zusätzlich auf Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten und induziert Hypertrophie, myokardiale Dysfunktion und hemmt die Apoptose der Kardiomyozyten (Hirano et al., 1986, Fredj et al., 2005). Messungen mit IL-6-behandelten Kardiomyozyten zeigten zudem eine signifikante Steigerung der passiven Steifigkeit, die auf eine Beteiligung des Zytokins in der Modulation der passiven Steifigkeit hindeutet (Kötter et al., 2016). Die Effekte des inflammatorischen Systems passieren akut nach Herzinfarkt (3- 72 Stunden) und provozieren einen bindegeweblichen Umbau (3- 7 Tage) bis hin zur kollegenösen Infarktnarbe (7- 14 Tage) (Frangogiannis, 2006).

Der Umbau des Bindegewebes des Ventrikels betrifft hauptsächlich das Gewebe der extrazellulären Matrix (ECM), unter anderem die Kollagentypen 1 und 3. Dieser vermehrte Einbau von Kollagen betrifft nicht nur das ischämische Gebiet, sondern auch das nichtischämische Myokard (Cleutjens et al., 1995). Durch den vermehrten Einbau entstehen zwischen den Kollagenen starke *Cross-links*, die die Integrität des Ventrikels sowie die passive Steifigkeit durch die ECM erhöhen, die zur Anpassung an den erhöhten mechanischen Stress benötigt werden (González-Santamaría et al., 2016). Dieser Umbau und Synthese des Kollagens passieren frühestens drei bis vier Tage nach Myokardinfarkt. Das Herz ist jedoch direkt nach Myokardinfarkt durch Funktionsverlust von Kardiomyozyten erhöhter mechanischer Belastung ausgesetzt. Dies zeigten Messungen von reduzierter Ejektionsfraktion und erhöhtem endsystolischem Volumen im Ventrikel nach Myokardinfarkt (Müller et al., 2014). Kötter et al. zeigte, dass die passive Steifigkeit direkt und drei Tage nach Myokardinfarkt signifikant angestiegen ist (Kötter et al., 2016). Dieser kurzfristige Anstieg der passiven Steifigkeit akut nach Myokardinfarkt passiert teilweise durch die Phosphorylierung des kardialen Strukturproteins Titin.

## **Verankerung des Titins im Sarkomer**

Titin ist neben Aktin und Myosin das dritte strukturgebende Protein in quergestreifter Muskulatur. Die Kontraktion quergestreifter Muskulatur funktioniert auf Basis der kleinsten funktionellen Einheiten innerhalb eines Muskels, den Sarkomeren (siehe schematischen Aufbau eines Sarkomers in Abbildung 1). Ein Sarkomer erstreckt sich zwischen zwei Z-Scheiben, die den Rahmen und die äußere Begrenzung eines Sarkomers bilden. Diese dienen als Verankerung der Aktin- und Titinfilamente und fungieren als Verknüpfung von Zytoskelett zum Sarkomer (Pyle and Solaro, 2004). Aktin und Myosin interagieren innerhalb des Sarkomers, indem die Myosinköpfchen durch den Querbrückenzyklus entlang des Aktins binden. Hierdurch bewegt sich die Z-Scheibe auf die M-Bande zu und der Muskel verkürzt sich. Durch das alternierende Überlappen von Aktin- und Myosinfilamenten erhält der Muskel die charakteristische Querstreifung im Lichtmikroskop. Die I-Bande (isotrop), flankiert die Z-Scheibe, besteht vorwiegend aus Aktin- und Titinfilamenten und verkürzt bzw. verlängert sich je nach Dehnungszustand des Sarkomers. Durch das Myosin in den zentralen Anteilen des Sarkomers entsteht das doppelt-lichtbrechende A-Band (anisotrop). Median im A-Band entsteht durch die Verbindungen der einzelnen Myosinfilamente eine Verdichtung, das sogenannte M-Band (Knappeis and Carlsen, 1968). Das Filamentprotein Titin ist mit >300 kDa das bisher das größte bekannte Protein im menschlichen Körper und erstreckt sich innerhalb eines Halbsarkomers von der M-Bande bis zum Z-Streifen (Fürst et al., 1988). Durch die sprungfederartige Struktur und die elastischen Eigenschaften des Proteins ist Titin an der Stabilisierung und optimalen Kraftentwicklung des Muskels beteiligt (Horowitz et al., 1989).



**Abb. 1: Schema eines Sarkomeraufbaus.** A-Band (Anisotropes Band); I-Band (Isotropes Band); M-Band (mediane Verdichtung der Myosinfilamente); Z-Scheibe (Proteinkomplex und Aufhängeapparat für Aktin und Titin). Die Muskelkontraktion funktioniert über das Ineinandergleiten von Aktin und Myosin während des Querbrückenzyklus. Dadurch bewegt sich die Z-Scheibe auf das mediane M-Band zu. Ein Titinfilament durchspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band und ist im A-Band eng an das Myosinfilament assoziiert.

### Die molekulare Struktur und Isoformen des Proteins Titin

Titin ist mit über 3000kDa das bisher größte, bekannte Protein des menschlichen Körpers. Hierbei unterscheidet sich das kardiale Titin in einigen Eigenschaften von dem Titin der Skelettmuskulatur. Diese Studie bezieht sich vor allem auf das kardiale Titin. Titin besteht in seiner Molekularstruktur aus aneinandergereihten Immunglobulinen und Fibronectin Typ 3-ähnlichen Domänen, die innerhalb ihrer Proteinstruktur funktionelle Abschnitte aufweisen (Bang et al., 2001) (siehe Abbildung 2). In der I-Bande, dem elastischen Teil des Titinproteins, befinden sich die N2B *unique sequence* (us) und die PEVK-Region (Hoher Anteil an Prolin (P), Glutamatsäure (E), Valin (V), und Lysin (K)) -Region, die beidseits von Ig-Domänen umschlossen werden. Die N2B(A)-us ist kardial spezifisch und unterscheidet das kardiale Titin von dem der Skelettmuskulatur (Linke et al., 1996, Freiburg et al., 2000). Verankert ist Titin

innerhalb des Sarkomers in der Z-Scheibe und im M-Band, die beide nicht an der Dehnung Titins beteiligt sind (Lange et al., 2006, Linke et al., 1996).

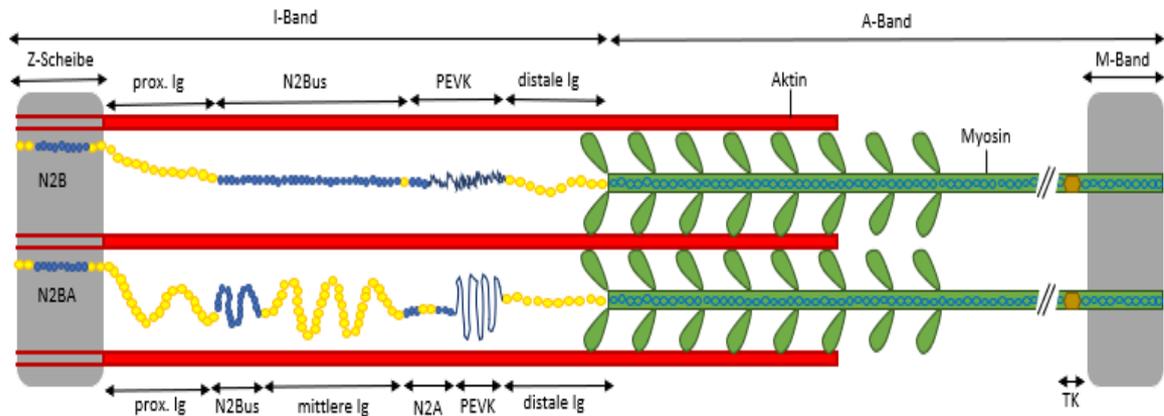


Abb. 2: **Schematische Darstellung der Titinisoformen N2B und N2BA in einem Halbsarkomer einer Herzmuskelzelle.** A-Band (anisotropes Band); distale Ig (distale Immunglobuline) I-Band (isotropes Band); PEVK (Hoher Anteil an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V), und Lysin (K)); prox. Ig (proximale Immunglobuline); TK (Titinkinase-Domäne). Dargestellt sind die zwei kardialen Titinisoformen in einem Halbsarkomer. Beiden Isoformen gemeinsam sind die proximale und distale Ig-Domäne, N2Bus und PEVK. Nur die längere und steifere N2BA-Isoform besitzt eine zusätzliche N2A-Sequenz im Proteinaufbau (modifiziert aus (Krüger and Linke, 2011)).

Durch die Größe, Position im Sarkomer und die Anpassungsfähigkeit des Proteins erfüllt Titin viele zentrale Funktionen. Frühe Messungen der Kraftentwicklung des Titins identifizierten es als Strukturprotein, das die Zentrierung des Myosins nach Muskeldehnung gewährleistet und somit die optimale Kraftentwicklung garantiert (Helmes et al., 1996, Horowitz et al., 1989). Aufgrund seiner Proteinstruktur und der biomechanischen Eigenschaften seiner I-Band Domäne wird Titin oft als molekulare Feder bezeichnet (Linke et al., 1996, Trombitás et al., 1998). Die I-Band-Strukturen liegen im ungedehnten Zustand als unstrukturiertes zufälliges *Coil* vor, ähnlich einer ungedehnten Sprungfeder. Nach Muskeldehnung streckt sich zunächst dieses *Coil* der I-Bande, danach die elastischen Regionen der Ig-Domänen, N2Bus und die PEVK-Region aus. Diese Sequenzen der I-Bande haben individuelle Steifigkeiten und entfalten sich bei Muskeldehnung nacheinander. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten passiven Spannung durch die Muskeldehnung. Titin ist somit für den Großteil der myokardialen Steifigkeit in der Spanne der physiologischen Sarkomerlänge bis etwa  $2,2\mu\text{m}$  verantwortlich (Krüger and Linke, 2011, Linke et al., 1994).

Die passive Steifigkeit des Titins ist nicht festgesetzt, sondern ändert sich dynamisch. Hierfür existieren kurz- und langfristige Mechanismen, die die passive Steifigkeit an die jeweiligen Bedingungen anpassen (Li et al., 2016). Langfristig kann sich die Zusammensetzung der

Isoformen des Titinmoleküls verändern (Krüger and Kötter, 2016). Die Struktur des Titinproteins ist auf dem langen Arm des 2. Chromosoms von 363 Exons kodiert (Bang et al., 2001). Diese Exone kodieren für Proteinabschnitte, die unterschiedlich zusammengesetzt werden können. Durch dieses differentielle Spleißen werden hauptsächlich 2 Titin-Isoformen im Herzmuskel koexprimiert. Die lange und elastische N2BA- (ca. 3200– 3700kDa) und die kürzere und steifere N2B-Isoform (ca. 3000kDa). Beide Titin-Isoformen unterscheiden sich maßgeblich innerhalb der I-Bandenregion (siehe Abbildung 2). Die längere N2BA-Isoform erhält ihre höhere Elastizität durch die längere PEVK, eine zusätzliche Ig-Domäne und das N2A-Element (Freiburg et al., 2000, Bang et al., 2001).

Durch seine sprunghafte Struktur ist Titin maßgeblich an der Stabilisierung und der optimalen Kraftentwicklung der Muskelzelle beteiligt (Horowitz et al., 1989). In mehreren Studien wurden bereits die Änderungen der Steifigkeit des Titinproteins im Zusammenhang mit Herzerkrankungen untersucht, z.B. bei dilatativer Kardiomyopathie oder ischämie-vermittelter Kardiomyopathie. So werden in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zum gesunden Herzen ein signifikant höherer Anteil an der elastischeren N2BA-Isoform exprimiert (Makarenko et al., 2004, Neagoe et al., 2002). Nach Ischämie/Reperfusion und Myokardinfarkt hat sich an Langendorff-perfundierten Herzen im Rattenmodell nach zehn Tagen jedoch keine signifikante Änderung in den Titinisoformen ergeben, aber eine signifikante Erhöhung der passiven Steifigkeit (Kötter et al., 2016). Hierfür sind kurzfristige Mechanismen wie posttranslationale Modifikationen verantwortlich.

### **Kurzfristige Modulationen der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit durch posttranslationale Modifikation**

Kurzfristig kann sich die Titinsteifigkeit durch posttranslationale Modifikation ändern. Mehrere Stellen innerhalb des Proteins sind mittlerweile bekannt, die durch posttranslationale Modifikation auf die passive Steifigkeit Einfluss nehmen. In Abbildung 3 ist ein schematischer Aufbau der Isoform N2BA gezeigt. Die bisher beschriebenen modifizierbaren Stellen des Proteins konzentrieren sich auf die flexible I-Bande und sind in Abbildung 3 dargestellt.

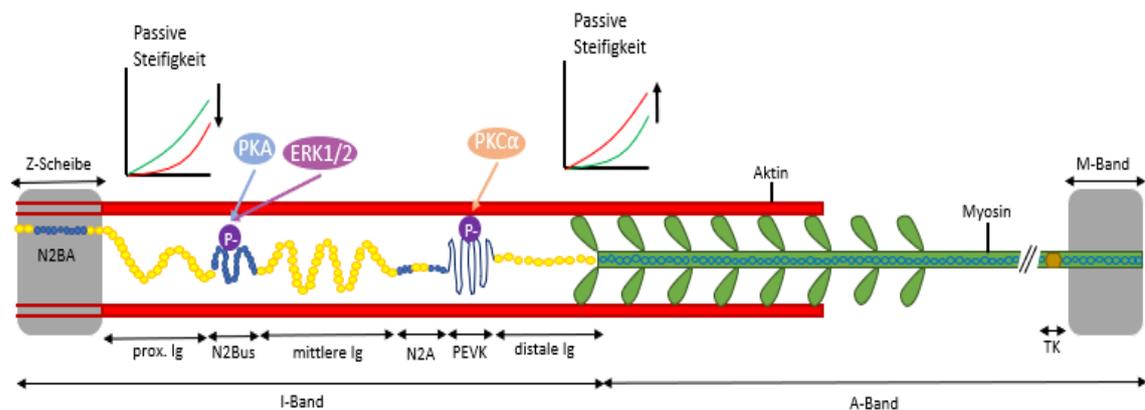
Innerhalb der N2Bus -Domäne befinden sich Serinreste, die als Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) dienen. PKA ist eine Serin-Threonin-Kinase, die G-Proteingekoppelt über cAMP-abhängige Signalwege  $\beta$ -adrenerg aktiviert wird. Insofern ist die PKA-

Aktivität in Situationen erhöht, in denen mehr Herzleistung erforderlich ist, z.B. unter Stress. In isolierten Kardiomyozyten von Ratten und Menschen vermittelt die Phosphorylierung durch PKA an der N2Bus an Serin 4010 (S-4010) eine verringerte passive Steifigkeit (Yamasaki et al., 2002, Fukuda et al., 2005, Krüger and Linke, 2006). Die Änderung der passiven Steifigkeit durch den Einfluss von PKA scheint multiple Ursachen zu haben. Einerseits phosphoryliert PKA unter  $\beta$ -adrenerger Kontrolle nicht nur Titin, sondern auch kardiales Troponin I (cTnI) (Moir et al., 1980). Bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an cTnI, reduziert dies die Hemmung der Actomyosin-ATPase durch cTnI und der Muskel kontrahiert (Zot and Potter, 1987). Phosphoryliert senkt sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinität von cTnI. Dies reduziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kraftentwicklung der Muskulatur und resultiert in reduzierter aktiver Muskelspannung (Zhang et al., 1995). Andererseits induziert PKA eine Reduktion der passiven, nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Steifigkeit der Myofilamente durch die Phosphorylierung des Strukturproteins Titin. Die Bindung ändert die elektrophysiologischen Eigenschaften der Proteinstruktur. Diese PKA-Wirkung auf Titin scheint nur in kardialen Myozyten, nicht aber in der Skelettmuskulatur eine Steifigkeitsreduktion zu verursachen (Krüger and Linke, 2006). Zusätzlich scheint diese passive Senkung unabhängig der Aktin-Myosin-Interaktion und Titin-Myosin-Interaktion zu sein (Kulke et al., 2001).

Zusätzlich zu PKA phosphoryliert die Serin-Threonin-Kinase *Extracellular-signal regulated kinases* (ERK) die N2Bus und reduziert die passive Steifigkeit des Titins. Der Signalweg und die Effekte der ERK1/2 sind gekoppelt an das *four-and-a-half LIM domain protein-1* (Fhl-1). Fhl-1 ist eine Proteinsubfamilie, die unter anderem in hohen Mengen in der Skelettmuskulatur und in moderaten Mengen im Herzmuskel vorkommen. Es besteht aus vier kompletten LIM-Domänen und einer halben LIM-Domäne (Lee et al., 1998). Die LIM-Domäne ist funktional eine Zink-Finger-Schleife, die mehrere Funktionen regulieren, u.a. Genexpression, Signalwege und Proteininteraktionen (Kadmas and Beckerle, 2004). Mehrere Studien indizierten, dass die LIM-Domäne eine Rolle in der Anpassung der Herzmuskulatur an Stress und in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. So ist in Fhl-1-Knock-out Mäusen die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten und die Rate an Kardiomyopathien signifikant erniedrigt. Hier wird vermutet, dass Fhl-1 biochemischen Stress durch die Dehnung der N2Bus wahrnimmt und über MAPK-assozierte Signalwege eine erhöhte passive Steifigkeit auslöst (Knöll et al., 2002, Chu et al., 2000, Sheikh et al., 2008). Die N2Bus-Region ist zusätzlich ein Substrat der ERK1/2, die über die Signalkaskade AKT/Raf/ERK1/2 aktiviert wird und den Titinlocus S-4010

phosphoryliert. Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Phosphorylierung der N2Bus durch ERK die passive Steifigkeit Titins reduziert. Wie genau die Phosphorylierung der N2Bus die passive Steifigkeit reduziert, ist bis heute nicht vollständig verstanden (Raskin et al., 2012, Perkin et al., 2015).

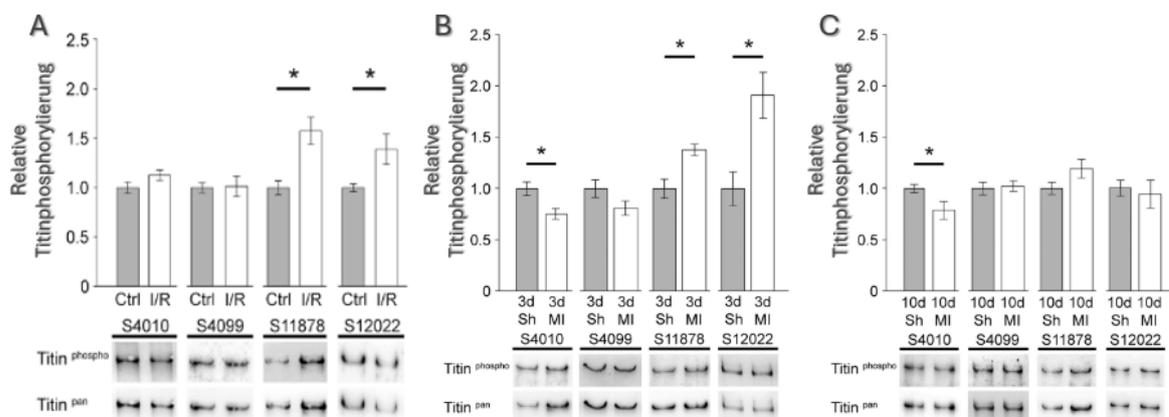
Die Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ ) erhöht die passive Steifigkeit des kardialen Titins durch Phosphorylierung in der PEVK-Region (Hidalgo et al., 2009). PKC $\alpha$  ist eine Serin-Threonin-Kinase, die über den  $\alpha$ 1-adrenergen Signalweg Ca<sup>2+</sup>-abhängig G-Proteingekoppelt aktiviert wird (Solaro, 2008). Hidalgo et al. hat die Effekte der PKC $\alpha$  auf das kardiale Titin immunbiochemisch und biomechanisch untersucht und beschrieb eine erhöhte Titinphosphorylierung an den Serinresten 12022 (S-12022) und 11878 (S-11848) in der PEVK-Region. Kraftmessungen an den durch PKC $\alpha$  phosphorylierten Kardiomyozyten zeigten eine erhöhte passive Steifigkeit (Hidalgo et al., 2009).



**Abb.3: Schematische Darstellung der Phosphorylierungspositionen von ERK1/2, PKA und PKC $\alpha$  an der Titinisoform N2BA.** A-Band (anisotropes Band); distale Ig (distale Immunglobuline) I-Band (isotropes Band); PEVK (Hoher Anteil an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V), und Lysin (K)); prox. Ig (proximale Immunglobuline); TK (Titinkinase-Domäne). Darstellung der beispielhaften Phosphorylierungsstellen im Titinprotein am Beispiel der kardialen N2BA-Isoform. Phosphorylierungen durch PKA und ERK1/2 in der N2Bus bewirken eine Erniedrigung der passiven Steifigkeit, Phosphorylierungen durch PKC $\alpha$  in der PEVK-Region eine Erhöhung der passiven Steifigkeit (modifiziert nach (Krüger and Linke, 2011)).

## Erhöhung der passiven Steifigkeit Titins kurzfristig durch posttranslationale Modifikation nach Ischämie

Titin ist durch seine sprunghafte Struktur und seine Eigenschaften zentraler Bestandteil in der Sicherung der Stabilität und Integrität des Myokards. Vor allem die dynamische Änderung der passiven Steifigkeit des Titinproteins wird als protektiver Mechanismus vermutet. Nach strukturellen Schäden wie einem Myokardinfarkt reagiert das nicht-ischämische Myokard sehr kurzfristig mit einer Erhöhung der passiven Steifigkeit. Kötter et al. haben genau diesen Mechanismus der Steifigkeitserhöhung kurzfristig nach globaler Ischämie und langfristig nach Myokardinfarkt untersucht. In Mäuseherzen nach globaler Ischämie oder nach Myokardinfarkt haben Kraftmessungen an Kardiomyozyten eine signifikante Steifigkeitserhöhung innerhalb der Dehnungsspanne von 2,0 – 2,4µm gegenüber Kardiomyozyten aus Herzen ohne Ischämie gezeigt (Kötter et al., 2016). Diese Steifigkeitserhöhung konnte nach drei und zehn Tagen gegenüber Kardiomyozyten aus Herzen ohne Myokardinfarkt festgestellt werden, wobei die passive Steifigkeit nach zehn Tagen im Vergleich zum dritten Tag abnahm. Interessanterweise konnte keine Änderung der Titinisoformen nach drei und zehn Tagen festgestellt werden, weshalb die Ursache der Steifigkeitserhöhung durch posttranslationale Modifikation der Proteinstruktur des Titins zu erklären ist. Die Phosphorylierung des Titins war in den untersuchten Proben signifikant verändert (Kötter et al., 2016). (Referenz).

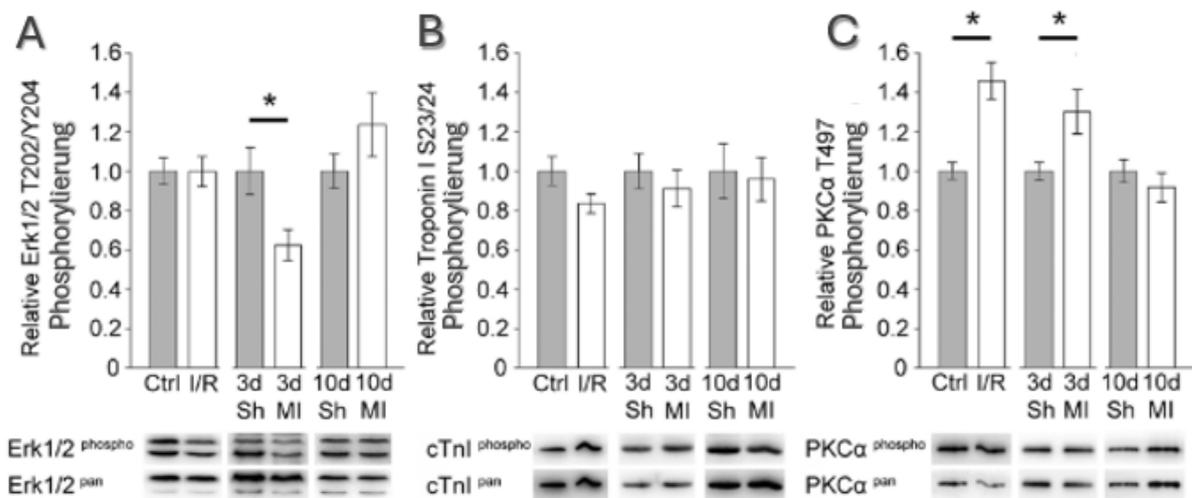


**Abb. 4: Relative Enzymaktivitäten der Titinloci S4010, S4099, S11878 und S12022 A: unmittelbar nach Myokardinfarkt, B: drei Tage nach Myokardinfarkt, C: zehn Tage nach Myokardinfarkt.** 3d (nach drei Tagen); 10d (nach 10 Tagen); Ctrl (Kontrolle); I/R (Ischämie/Reperfusion); MI (Myokardinfarkt); Sh (Sham, Interventionsgruppe ohne Myokardinfarkt). Dargestellt sind die relativen Titinphosphorylierungen Titinloci

S4010, S4099, S11878 und S12022 unmittelbar nach Myokardsetzung (A), drei Tage (B) und zehn Tage (C) nach Myokardinfarktsetzung im Rattenmodell (n=5). Repräsentative Blots sind unter den Graphen aufgeführt. Die Balkengraphen zeigen die jeweiligen Standardabweichungen an. \* zeigen statistische Signifikanzen durch den t-Test ( $p < 0,05$ ) an. Modifiziert aus (Kötter et al., 2016).

Die relativen Phosphorylierungen der Titinloci S11878, S12022, S4010 unmittelbar, drei und zehn Tage nach Ischämie bzw. Myokardinfarkt sind in Abbildung 4 dargestellt. In den analysierten *in vivo* Rattenproben mit globaler Ischämie waren vor allem die Phosphorylierungen der S11878 und S12022 innerhalb der PEVK-Region sehr kurzfristig nach I/R signifikant erhöht. Phosphoryliert steigern diese Serinreste die passive Steifigkeit des Titinproteins. S11878 und S12022 werden von mehreren bekannten Kinasen phosphoryliert, darunter PKC $\alpha$ . Die Aktivität der PKC $\alpha$  war unmittelbar, sowie nach drei Tagen wie die relativen Phosphorylierungen der S11878 und S12022 signifikant erhöht (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich zu der PEVK-Region war die Phosphorylierung der S4010 in der N2B-us nach drei und zehn Tagen nach Myokardinfarkt erniedrigt, blieb aber kurzfristig nach globaler I/R unverändert. Eine erniedrigte Phosphorylierung der S4010 bedingt eine Steifigkeitserhöhung des Titinproteins. S4010 wird unter anderem von den Kinasen PKA und ERK1/2 phosphoryliert. Messungen der Enzymaktivität ergaben eine niedrigere Enzymaktivität der ERK1/2 drei Tage nach Myokardinfarkt, während die kardiale Troponin I-Phosphorylierungen zu allen Zeitpunkten unverändert war (siehe Abbildung 5) (Kötter et al., 2016).



**Abb. 5: Relative Enzymaktivitäten der Kinasen A: ERK1/2, B: Troponin I, C: PKC $\alpha$  unmittelbar, nach drei und zehn Tagen nach Myokardinfarkt.** 3d (nach drei Tagen); 10d (nach 10 Tagen); cTnI (kardiales Troponin I); Ctrl (Kontrolle); I/R (Ischämie/Reperfusion); MI (Myokardinfarkt); Sh (Sham, Interventionsgruppe ohne Myokardinfarkt). Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten der Kinasen ERK1/2 T202/Y204 (A), PKA anhand der relativen Phosphorylierung Troponin I S23/24 (B) und PKC $\alpha$  T497 (C) unmittelbar nach Myokardsetzung, drei

Tage (3d) und zehn Tage (10d) nach Myokardinfarktsetzung im Rattenmodell (n=5). Repräsentative Blots sind unter den Graphen aufgeführt. Die Balkengraphen zeigen die jeweiligen Standardabweichungen an. \* zeigen statistische Signifikanzen durch den t-Test ( $p < 0,05$ ) an. Modifiziert aus (Kötter et al., 2016).

Diese posttranslationalen Modifikationen des Titinproteins können den sehr kurzfristigen Anstieg der passiven Steifigkeit nach Myokardinfarkt erklären.

### **Einflussnehmende Faktoren auf die posttranslationale Modifikation Titins**

Die einzelnen Mechanismen und Signalwege, die zu diesen posttranslationalen Modifikationen führen, sind bis heute nur teilweise untersucht.

Ein Faktor ist eine mechanische Komponente (Krüger and Linke, 2009). Das Titin hat durch seine molekulare Struktur und Position mehrere Protein-zu-Protein Interaktionen, die Einfluss auf die Eigenschaften des Titins nehmen. Vor allem drei Segmente wurden als zentral in Protein-zu-Protein Interaktion identifiziert: die Z-Scheibe, die elastische I-Domäne und das M-Band (siehe Abbildung 1). Innerhalb der Z-Scheibe ist Titin NH<sub>2</sub>-Terminal in Proteinkomplexen integriert, die unter anderem LIM-Proteine enthalten (Linke, 2008, Hoshijima, 2006). Diese verankern das Titin an der Z-Scheibe, haben aber noch weitere Funktionen (Zou et al., 2006). Studien am Mausmodell identifizierten die LIM-Proteine als Komponente im Hypertrophie-Signalweg des Herzens (Hoshijima, 2006). Diese und weitere Proteinverbindungen innerhalb der Z-Scheibe erfüllen wichtige Funktionen zur Aufrechterhaltung der Kardiomyozytenfunktion und reagieren auf mechanischen Stress (Heineke and Molkentin, 2006). Innerhalb der I-Bande, unter anderem innerhalb der N2Bus, wurden ebenfalls mehrere Protein-zu-Protein-Interaktionen gefunden. Eine dieser Interaktionen schließen die zwei Isoformen der Four-and-a-half-LIM-Proteine (FHL) an die N2Bus mit ein. Diese Proteine interagieren mit mehreren Enzymen, unter anderem der ERK1/2, einem Regulatorenzym der Titinsteifigkeit. FHL1-knock-out-Mäuse ergaben erhöhte Elastizitäten der Titinproteine, aber auch eine erhöhte Rate an Kardiomyopathien (Sheikh et al., 2008). Dies schreibt der I-Bande eine zentrale Rolle in der Regulation auf biomechanischen Stress zu. Zuletzt erfüllt die M-Bande wichtige Funktionen innerhalb der mechanischen Signalwege und Hypertrophie. Nahe der Titinkinase-Domäne (TK) binden *Muscle specific RING-finger* Proteine (MURF1) an Titin (Witt et al., 2005). Diese Proteine interagieren mit Proteinen des muskulären Energiemetabolismus zusätzlich zu mehreren Regulationsmolekülen des Zytoskeletts. Mäuse mit fehlenden MURF-Proteinen entwickelten massive kardiale Hypertrophie, die die MURF-Proteine in Kardiomyozyten als Inhibitoren in den Signalwegen kardialer Hypertrophie

identifizieren (Willis et al., 2007, Witt et al., 2008). Die MURF-Signalwege im Herzen werden vor allem durch die Dehnung der TK-Domäne über eine Signalkaskade aktiviert (Gräter et al., 2005).

Ein weiterer Faktor sind humorale Faktoren des Immunsystems. Das Immunsystem reagiert kurzfristig nach Myokardinfarkt mit einer inflammatorischen Reaktion über Immunzellen und Zytokine (Frangogiannis, 2006). Vor allem das Zytokin IL-6 wird nach Myokardinfarkt sekretiert. Isolierte Kardiomyozyten im Rattenmodell reagierten nach Behandlung mit gereinigtem IL-6 mit einer Steigerung der passiven Steifigkeit durch erhöhte PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung innerhalb der S11878 in der PEVK-Region. Interessanterweise war die passive Steifigkeit von Kardiomyozyten signifikant gesenkt, wenn bei I/R die Wirkung von IL-6 durch einen IL-6-Antikörper blockiert wurde (Kötter et al., 2016). Dies indiziert eine Beteiligung des Immunsystems und humoraler Faktoren in der Modifikation der Titinsteifigkeit.

Ein weiterer Faktor sind posttranslationale Modifikationen durch neuronale Signaltransduktion. Mehrere Enzyme, die bekannt sind in der Titinphosphorylierung beteiligt zu sein, stehen auch unter neuronaler Kontrolle. So modulieren  $\alpha^1$ -adrenerge Signalwege die Aktivität der PKC $\alpha$  (Hamdani et al., 2008). Daneben wird die PKA  $\beta$ -adrenerg moduliert (Krüger and Linke, 2006). Der N. vagus nimmt als parasympathischer Nerv Einfluss auf die vegetative Regulation der Herzfunktion. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Stimulation des N.vagus eine kardioprotektive Wirkung nach Myokardinfarkt induziert. Im Tiermodell an Schweinen reduziert die Stimulation des N. vagus die Infarktgröße signifikant (Nuntaphum et al., 2018, Uitterdijk et al., 2015). Auch beim Menschen reduziert der N. vagus die infarktinduzierten Schäden. So reduziert die Stimulation des rechten Truncus vagalis die Konzentration der kardialen Kreatininkinase (CK-MB), einem Indikator für Myokardschaden, nach ST-Hebungsinfarkt (Yu et al., 2017). Einen weiteren Einfluss des N. vagus erkennt man durch das *Remote ischaemic preconditioning* (RIP). RIP beschreibt das Aussetzen repetitiver lokaler Ischämien, entweder an Koronararterien oder Extremitäten über einen kurzen Zeitraum, die die Toleranz gegenüber längeren ischämischen Schäden erhöhen (Murry et al., 1986). Im Tiermodell in isolierten Ratten- und Hasenherzen ist RIP stark verknüpft mit einer Erhöhung endogenen Acetylcholins (ACh), dem Neurotransmitter des N. vagus (Kawada et al., 2009, Pickard et al., 2017). Lieder et al. konnte im Schweine- und Rattenmodell zeigen, dass

vor allem splenektomierte, aber auch vagotomierte Tiere nach RIP einen reduzierten bis sogar fehlenden kardioprotektiven Effekt aufgewiesen haben (Lieder et al., 2018).

Somit stellt sich die Frage, inwiefern eine vagale Signalweiterleitung an der posttranslationalen Modifikation von Titin beteiligt sein könnte.

## **N. Vagus und Acetylcholin**

Das autonome/ vegetative Nervensystem besteht aus zwei Gegenspielern, dem Sympathikus und dem Parasympathikus.

Der N. vagus erzielt seine Wirkung am Effektororgan durch den Neurotransmitter Acetylcholin. Als Teil des parasympathischen Nervensystems sind die vagalen Neurone in der Lage, ACh zu synthetisieren. Die Moleküle des ACh werden im Zytoplasma der Präsynapse durch die Cholinacetyltransferase mit ungebundenen Cholin und Acetyl-Coenzym A (CoA) hergestellt (Nachmansohn and Machado, 1943). Innerhalb der Präsynapse werden die ACh-Moleküle in Vesikeln gespeichert und bei Signalweiterleitung in den postsynaptischen Spalt ausgeschüttet (Parsons et al., 1993). ACh wirkt dabei an der muskulären Endplatte oder der Postsynapse über acetylcholinerge Rezeptoren. Dies initiiert entweder eine neuronale Signalweiterleitung oder eine Aktivierung des Effektororgans (Katz, 1956).

Innerhalb des Nervensystems funktioniert die vagale Signalweiterleitung in autonomen Ganglien vornehmlich über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Hier sezernieren die präsynaptischen Fasern bei Depolarisation ACh in den synaptischen Spalt (Dvorakova et al., 2005). nAChR sind nicht G-Proteingekoppelt und fungieren als ionotrope Kationenkanäle, die sowohl in peripheren Synapsen des parasympathischen Systems als auch im Herzen selbst vorkommen (Hurst et al., 2013, Brodde et al., 2001). Die Funktion der nAChR im Herzen ist bis heute nicht vollständig bekannt. Im Herzen ist vor allem der  $\alpha 7$ -nAChR in den intrakardialen Neuronen, Fibroblasten und auf den Kardiomyozyten exprimiert (Dvorakova et al., 2005).  $\alpha 7$ -nAChR erhöht als Kationenkanal die intrazelluläre Kationen- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.  $\alpha 7$ -nAChR reduziert zusätzlich nach Aktivierung durch selektive  $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten nach lokaler Ischämie und Reperfusion die Infarktgröße und erzielt eine Verbesserung der kardialen Funktion (Mavropoulos et al., 2017). Es wird vermutet, dass dieser Effekt an der Expression von  $\alpha 7$ -nAChR in Mitochondrien der Kardiomyozyten, die den Reaktive Sauerstoffspezies

(ROS)-Metabolismus beeinflussen und die Zelle vor Apoptose schützen, begründet wird (Gergalova et al., 2012, Olshansky et al., 2008).

Am Herzen beeinflusst ACh die Herzfunktion an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) (Nathanson, 1987). mAChR werden in unterschiedlichen Rezeptorgruppen exprimiert, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. Im Herzen wird neben den anderen Subtypen vornehmlich der muskarinerge Acetylcholinrezeptor 2 ( $M^2$ AChR) exprimiert. Die höchste Dichte an  $M^2$ AChR befindet sich im Sinusknoten und Atrioventrikularknoten, den schrittgebenden Zentren des Herzens, sowie im Myokard des Vorhofes (James and Spence, 1966, Hartzell, 1988, Li et al., 2010). Die Expression des Rezeptors in den Ventrikeln ist geringer im Vergleich zum Vorhof (Higgins et al., 1973). Zusätzlich zum  $M^2$ AChR wird der muskarinerge Acetylcholinrezeptor 4 ( $M^4$ AChR) exprimiert, der ebenfalls in höherer Dichte in den Vorhöfen als in den Ventrikeln vorkommt (Tietje et al., 1990). Neben den beiden beschriebenen mAChR erfüllt der muskarinerge Acetylcholinrezeptor 3 wichtige Funktionen im Myokard. Im Gegensatz zu  $M^2$ AChR und  $M^4$ AChR wurde eine höhere Dichte der  $M^3$ AChR im Ventrikel gemessen (Wang et al., 2001).  $M^3$ AChR hat kardioprotektive Effekte. Studien unter selektiver  $M^3$ AChR-Aktivierung haben geringere Infarktgrößen und bessere kardiale Funktion nach Myokardinfarkt gezeigt (Yang et al., 2005). Alle bekannten mAChR sind G-Proteingekoppelt, verfügen jedoch über mehrere mögliche Signalwege (Siehe Abb. 6).  $M^2$ AChR und  $M^4$ AChR können beide die Adenylatzyklase (AC) inhibieren, die über den cAMP-abhängigen Signalweg die PKA aktiviert (Bonner, 1992). Der  $M^3$ AChR aktiviert die Phospholipase C (PLC), die  $Ca^{2+}$ -abhängig die PKC $\alpha$  aktiviert (Nahorski et al., 1997). Zusätzlich aktiviert der  $M^3$ AChR die ERK1/2 (Yang et al., 2005, Wang et al., 2007). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führen zu einer reduzierten Herzfrequenz über die Schrittmacherzentren (Dhein et al., 2001, Caulfield, 1993).

### **Das intrinsische acetylcholinerge System des Herzens**

Neben der vagalen acetylcholinergen Innervation ist bekannt, dass Kardiomyozyten selbst imstande sind, ACh zu synthetisieren und sezernieren. Dies wird als nicht-neuronales intrinsisches acetylcholinerges System bezeichnet (Kakinuma et al., 2009, Rana et al., 2010a). Kakinuma et al. hat elektronenmikroskopisch vesikelähnliche Strukturen im Stroma von Kardiomyozyten nachgewiesen, die ACh enthalten (Kakinuma et al., 2009). Dies indiziert, dass Kardiomyozyten in der Lage sind, ACh zu synthetisieren, in Vesikeln zu speichern, abzubauen und wieder in die Zellen aufzunehmen (Roy et al., 2016, Rocha-Resende et al., 2012).

Das intrinsische System wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Ein bekannter Einflussfaktor ist das neuronale acetylcholinerge System. Das intrinsische System reagiert aktivierend auf Muskarinrezeptoragonisten wie Pilocarpin oder ACh (Kakinuma et al., 2009). Zusätzlich besitzt die intrazelluläre Konzentration von ACh eine zirkadiane Rhythmik wie das neuronale acetylcholinerge System (Oikawa et al., 2017). Neben dem Einfluss der parasympathischen vagalen Efferenzen haben auch adrenerge sympathische Nerven Einfluss auf das intrinsische System. Dies zeigten im Rattenmodell gesteigerte Marker des intrinsischen acetylcholinergen Systems unter chronischer adrenerger Stimulation durch Phenylephrin. Dies impliziert einen Kompensationsmechanismus des intrinsischen acetylcholinergen Systems gegen Überstimulation durch den Sympathikus (Gavioli et al., 2014, Rocha-Resende et al., 2012). Eine zusätzliche geschlechtsspezifische und altersabhängige Funktion des intrinsischen acetylcholinergen Systems konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Rana et al., 2010a, Oikawa et al., 2017).

Die Funktion des intrinsischen acetylcholinergen Systems sind denen des vagalen Systems ähnlich. Unter Ruhebedingungen prädominiert das vagale System in der Kontrolle der Herzfrequenz (Gordan et al., 2015). Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass Mäuse ohne intrinsisches acetylcholinerges System signifikant mehr Zeit zur Normalisierung der Herzfrequenz nach Stressexposition benötigen. Dies impliziert, dass das intrinsische System die vagalen Afferenzen in ihrer Funktion entweder amplifizieren oder unterstützen (Roy et al., 2013). Zusätzlich beeinflusst das intrinsische System die Entstehung von Hypertrophie und kardialen *Remodeling* kardioprotektiv (Roy et al., 2013, Roy et al., 2016). Nichtsdestotrotz ist die Funktion des intrinsischen acetylcholinergen Systems bis heute noch nicht vollständig untersucht (Saw et al., 2018).

Zusätzlich besitzt das intrinsische acetylcholinerge System eine kardioprotektive Wirkung nach Myokardinfarkt. Es reduziert den Sauerstoffbedarf der Kardiomyozyten und verbessert die Sauerstoffversorgung während eines Myokardinfarktes (Kakinuma et al., 2012). Dies wird durch eine Senkung der mitochondrialen Aktivität und einer Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration in Kardiomyozyten erklärt. Zusätzlich zeigten Mäuse mit einer erhöhten Aktivität des intrinsischen acetylcholinergen Systems eine verbesserte Angiogenese in das infarzierte Areal (Kakinuma et al., 2013).

Die verschiedenen Einflussfaktoren und Experimente an isolierten Herzen zeigen, dass das intrinsische acetylcholinerge System und der N. vagus sich gegenseitig beeinflussen, aber auch unabhängig voneinander wirken können. Eine Durchtrennung der vagalen Afferenzen reicht nicht aus, um die acetylcholinerge Wirkung auf die Kardiomyozyten zu untersuchen. Um die Effekte des Neurotransmitters ACh am isolierten Herzen auf die Modulation der Titinsteifigkeit zu verstehen, muss auch das intrinsische System über die Acetylcholinrezeptorblocker Hexamethonium und Atropin (HEX + AT) blockiert werden.

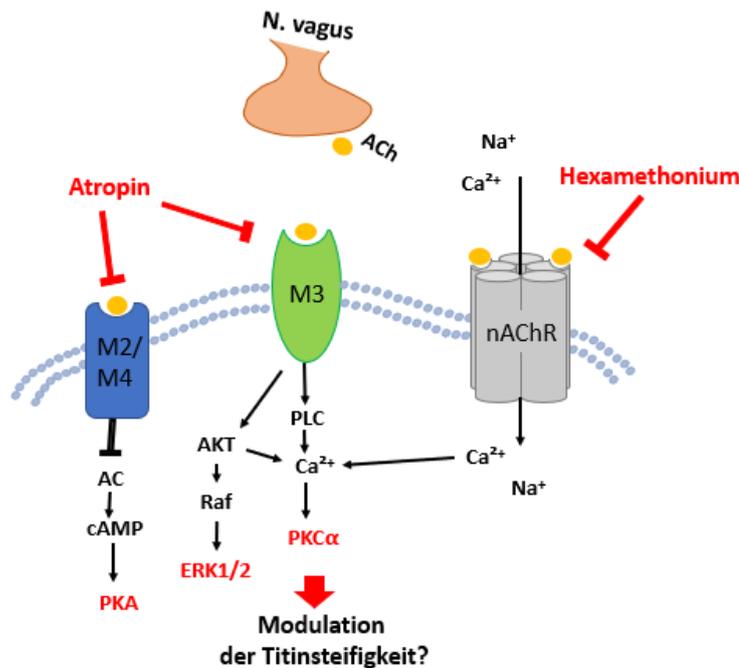
### **Wirkung von Atropin und Hexamethonium auf acetylcholinerge Neurone**

Der N. vagus und das intrinsische acetylcholinerge System des Herzens funktionieren über acetylcholinerge Neurone. Hier unterscheidet man zwischen nikotonergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR).

Hexamethonium (HEX) blockiert den nikotineren Acetylcholinrezeptor indem es mit ACh um die Bindungsstelle konkurriert. Bindet HEX an der Bindungsstelle anstatt ACh, öffnet der Rezeptor nicht und eine Depolarisation kommt nicht zustande (Burn, 1957). Er ist als potenter Blocker der nAChR in den Ganglien des autonomen Nervensystems bekannt (Paton and Zaimis, 1997). HEX wird klinisch in der Behandlung von essenzieller Hypertonie eingesetzt (Burt and Graham, 1950).

Atropin (AT) ist ein unselektiver Antagonist der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und damit ein Parasympatholytikum. Er blockiert kompetitiv die postsynaptischen mAChR und wird klinisch in der Augenheilkunde als Induktor der Mydriasis und in der Kardiologie als Medikament gegen Bradykardie, AV-Block III° und  $\beta$ -Blocker-Überdosierung eingesetzt (Resuscitation and Care, 2000).

Die Wirkung von HEX und AT sind in der Abbildung 8 zusammengefasst.



**Abb. 8. Schematische Darstellung der Funktion von Atropin und Hexamethonium auf acetylcholinerge Signalwege.** AC (Adenylatcyclase); ACh (Acetylcholin); cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat); ERK1/2 (*Extracellular-signal regulated kinases*); M2/4 (muskarinerge Acetylcholinrezeptor 2/4); M3 (muskarinerge Acetylcholinrezeptor 3); nAChR (nikotinerge Acetylcholinrezeptor); PKA (Proteinkinase A); PKC $\alpha$  (Proteinkinase Calpha); PLC (Phospholipase C); Raf (zytosolische Serin/Threonin-Kinase). Darstellung der PKA, PKC $\alpha$  und ERK1/2 abhängigen acetylcholinvermittelten Signalwege, die vermutlich Einfluss auf die Modulation der Titinsteifigkeit nehmen. Atropin ist ein kompetitiver Hemmstoff an den muskarinergen Rezeptoren, Hexamethonium blockiert die nikotinergen Rezeptoren.

### **Mögliche Rolle acetylcholinerge Signalwege in der Phosphorylierung Titins nach Herzinfarkt**

Die kurzfristige Modulation der Titinsteifigkeit durch posttranslationale Modifikation passt das Herz an sich ändernde Voraussetzungen der Herzarbeit an und wurde bereits in mehreren strukturellen Herzerkrankungen nachgewiesen. So wurde eine erhöhte passive Steifigkeit in Herzen von Patienten mit Herzversagen durch unter anderem PKA-vermittelter Hypophosphorylierung der S4010 in der N2B-us Region und PKC $\alpha$ -vermittelter Hyperphosphorylierung der S11878 und S12022 nachgewiesen (Kötter et al., 2013). Kötter et al. hat ebenfalls eine signifikante Erhöhung der passiven Steifigkeit Titins sehr kurzfristig nach globaler I/R mittels Erhöhung der PKC $\alpha$ -induzierten relativen Phosphorylierung innerhalb von S12022 und S11878 nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine Hypophosphorylierung innerhalb der S4010 drei Tage nach Myokardinfarkt festgestellt (Kötter et al., 2016). Beide Mechanismen provozieren eine Steifigkeitserhöhung des Titinproteins. Diese Steifigkeitserhöhung adaptiert das nicht-ischämische Myokard an die neuen mechanischen Anforderungen nach

ischämischen Schäden und erhält kurzfristig die systolische Auswurfleistung (Cazorla et al., 2001). Zusätzlich könnte die Steifigkeitserhöhung Titins das perfundierte Myokard bis zum *Remodeling* und zur Formung der Myokardnarbe stabilisieren. Die genauen Ursachen der Steifigkeitserhöhung sind bis heute nicht vollständig verstanden.

Mehrere Studien zeigen, dass der N. vagus kardioprotektive Effekte nach ischämischen Schäden auf das Myokard und bei strukturellen Herzerkrankungen hat. Eine Reduktion von ACh in strukturellen Herzerkrankungen und Herzversagen provoziert eine Dysregulation der Herzfunktion und ein vermehrtes Auftreten von Herzrhythmusstörungen. Eine Erhöhung der ACh-Konzentration erhält die reguläre Herzfunktion (Lara et al., 2010). Stimulation des N. Vagus während des Myokardinfarktes reduziert die Infarktnarbe und reduziert das *Remodeling* nach Herzinfarkt im Tiermodell (Zhang et al., 2016, Zhao et al., 2021). Lieder et al. identifizierte den N. vagus innerhalb der vagosplenischen Achse als Mediator der kardioprotektiven Effekte durch *Remote ischaemic preconditioning* (Lieder et al., 2018). Eine Beteiligung vagaler Afferenzen und den Einfluss von ACh auf die Signalwege zur Modulation der Steifigkeit Titins sind bisher nicht untersucht worden. Die vorliegende Studie soll daher untersuchen, ob auch lokale Ischämie/Reperfusion in isolierten und Langendorff-perfundierten Rattenherzen zu einer PKC $\alpha$ -vermittelten Titinmodifikation im nicht-ischämischen Myokard führt, und inwiefern Acetylcholin (ACh)-abhängige Signalwege bei kardialer I/R die Titinmodifikation beeinflussen.

## 2. Zielsetzung

Bei Patienten nach Herzinfarkt und im Tiermodell *in vivo* wurde gezeigt, dass sich die Titin-vermittelte Steifigkeit des nicht-ischämischen Ventrikelmyokards unmittelbar nach Herzinfarkt durch PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung erhöht. Die molekularen Mechanismen dieser Veränderung sind noch weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 1.) lokale Ischämie/Reperfusion (I/R) auch im isolierten und Langendorff-perfundierten Rattenherzen zu einer PKC $\alpha$ -vermittelten Titinmodifikation im nicht-ischämischen Myokard führt, und 2.) inwiefern acetylcholinabhängige Signalwege bei kardialer I/R die Titinmodifikation beeinflussen. Der Einfluss von ACh auf die posttranslationale Modifikation sollte somit mit Wirkung und mit blockierter Wirkung des ACh vor Ischämie, während Ischämie und nach Reperfusion untersucht wurden.

Hierzu wurden isolierte Rattenherzen einer lokalen Ischämie ausgesetzt und mit dem muskarinergen ACh-Blocker Atropin und dem nikotinergen ACh-Blocker Hexamethonium behandelt. Proteine aus Proben dieser Herzen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Per Western Blot und spezifischer Antikörper wurde die relative Phosphorylierung unter den jeweiligen Bedingungen bestimmt.

### 3. Material und Methoden

#### 1.1 Material

##### 1.1.1 Chemikalien

In den Experimenten wurden in Tabelle 1 aufgeführte Chemikalien verwendet.

**Tabelle 1: Chemikalien**

| <b>Chemikalie</b>                        | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|
| Acrylamid /Bisacrylamid                  | Roth              |
| Acrylamid /Bisacrylamid 29:1             | Biorad            |
| Agarose LE                               | Biozym            |
| Aminocapronsäure                         | Sigma             |
| Ammoniumpersulfat (APS)                  | Appli Chem        |
| Bradford-Reagenz                         | Sigma             |
| Bovine Serum Albumine (BSA)              | Capricon          |
| Dithiothreitol (DTT)                     | Appli Chem        |
| ECL (Western blotting detection reagent) | Millipore         |
| Essigsäure                               | Roth              |
| Ethanol vergällt                         | VWR               |
| Glycerol                                 | Sigma             |
| Glycin                                   | Roth              |
| Guanidinhydrochlorid                     | Appli Chem        |
| Isopropanol                              | Merck             |
| Methanol                                 | Sigma             |
| Natriumchlorid                           | Roth              |
| Natriumdihydrogenphosphat                | Merck             |

|                                       |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS)            | Appli Chem                 |
| Natriumhydrogencarbonat               | Merck                      |
| Nonident P40                          | Sigma                      |
| Salzsäure 32%                         | VWR                        |
| Serva Blue                            | Serva Electrophoresis GmbH |
| β-Mercaptoethanol                     | Sigma                      |
| Tetramethylethylendiamid (TEMED)      | Appli Chem                 |
| Thiourea                              | Appli Chem                 |
| Tricine                               | Sigma                      |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) | Roth                       |
| Tween 20                              | Sigma                      |
| Urea                                  | Appli Chem                 |

### 1.1.2 Puffer und Lösungen

In den aufgeführten Experimenten wurden die Puffer und Lösungen aus Tabelle 2 verwendet.

**Tabelle 2: Puffer/ Lösungen**

| <b>Puffer/Lösung</b>                     | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--|--|
| <b>10x SDS – Laufpuffer (pH &gt;8.3)</b> | 250mM Tris<br>2M Glycin<br>1% (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| <b>10x TBST (pH 7,4)</b>                 | 0,2M Tris<br>1,5M NaCl<br>1% Tween-20                          |
| <b>4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)</b>   | 0,5M Tris/ HCl<br>0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)        |
| <b>4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)</b>    | 1,5M Tris/ HCl<br>0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)        |
| <b>Anodenpuffer (pH 8,8)</b>             | 300mM Tris/ HCl<br>100mM Tricine                               |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Blockierlösung</b>            | 2% BSA in 1x -TBST  |
| <b>Kathodenpuffer (pH 8,7)</b>   | 300mM Aminocapronsäure<br>30mM Tris/ HCl  |
| <b>PVDF destain</b>              | 10% (v/v) Essigsäure<br>40% (v/v) Ethanol   |
| <b>PVDF stain</b>                | 0,075% Serva Blue in Methanol   |
| <b>SDS-Probenpuffer (pH 6,8)</b> | 8M Urea<br>2M Thiourea<br>3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)<br>0,035% (w/v) Serva Blue<br>10% (v/v) Glycerol<br>0,05M Tris/ HCl |
| <b>Stripping Buffer (pH 7,5)</b> | 6M Guanidinhydrochlorid<br>20mM Tris<br>0,2% Nonident P40<br>0,1M $\beta$ -Mercaptoethanol  |

### 1.1.3 Laborgeräte

In den aufgeführten Experimenten wurden in Tabelle 3 aufgeführte Laborgeräte verwendet.

**Tabelle 3: Laborgeräte**

| <b>Laborgerät</b>       | <b>Typ</b>       | <b>Hersteller</b> |
|-------------------------|------------------|-------------------|
| Bildschirm              | V243             | HP                |
| Blottingapparatur       | Trans Blot Turbo | Biorad            |
| Chemilumineszenz Imager | Fusion FX        | Thermo Scientific |
| Elektrophorese-Kammer   | Mini-Twin        | Biometra          |
| Elektrophorese-Kammer   | Mini-PROTEAN     | Biorad            |
| Feinwaage               | ADB 200-4        | KERN ADB          |
| Gefrierschrank          | Typ 311104       | Liebherr          |
| Heizblock/Thermomixer   | Compact 5350     | Eppendorf         |
| Kombischüttler          | SM-30            | Bühler            |

|                                  |                        |                          |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Kühlschrank                      | KT1730                 | Liebherr                 |
| Magnetrührer                     | Professional Serie     | VWR                      |
| Magnetrührer                     | RCT basic              | IKA                      |
| Mikrowelle                       | Micromat 135           | AEG                      |
| Mikrozentrifuge                  | Mini Star Silverline   | VWR                      |
| Netzteil                         | Power Pack P25         | Biometra                 |
| PC-Rechner                       | Elite Desk 800 G2 TWR  | HP                       |
| pH-Meter                         | MP 220                 | Mettler Toledo           |
| Power Blotter Station            | Invtrogen              | Thermo Fisher Scientific |
| Reagentenschüttler<br>(Vortexer) | 444-1372               | VWR                      |
| Sicherheitswerkbank              | SAFE 2020              | Thermo Scientific        |
| Taumelrollmischer                | RM5-30V                | CAT                      |
| UV/<br>Spektrophotometer         | Visible Ultrospec 1000 | Pharmacia Biotech        |
| Waage                            | KERN 572               | KERN                     |
| Wasseraufbereitung               | Milli Q                | Millipore                |
| Wasserbad                        | 3042                   | Köttermann               |
| Zentrifuge                       | Rotofix 32 A           | Hettich Zentrifugen      |

#### 1.1.4 Antikörper

Die in der immunbiochemischen Analyse für den Westernblot verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Antikörper**

| <b>Primärer Antikörper</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Quelle</b> | <b>Hersteller,<br/>Bestellnummer</b> |
|----------------------------|-------------------|---------------|--------------------------------------|
| anti PKC phospho S660      | 1:5000            | Kaninchen     | Abcam, #ab75837                      |
| Anti-Titin-pS11878         | 1:500             | Kaninchen     | ImmunoGlobe GmbH                     |
| Anti-Titin-pS12022         | 1:2000            | Kaninchen     | Eurogentec                           |
| Anti-Titin-pS4010          | 1:250             | Kaninchen     | ImmunoGlobe GmbH                     |

|                               |                   |               |                                      |
|-------------------------------|-------------------|---------------|--------------------------------------|
| p42/44 ERK 1/2                | 1:1000            | Kaninchen     | Cell Signaling, #9102                |
| phospho p42/44 MAPK (ERK 1/2) | 1:2000            | Kaninchen     | Cell Signaling, #4370                |
| PKC $\alpha$ total            | 1:5000            | Kaninchen     | Abcam, #ab32376                      |
| Troponin I                    | 1:1000            | Kaninchen     | Cell Signaling, #4002                |
| Troponin I phospho            | 1:2000            | Kaninchen     | Cell Signaling, #4004                |
| <b>Sekundärer Antikörper</b>  | <b>Verdünnung</b> | <b>Quelle</b> | <b>Hersteller,<br/>Bestellnummer</b> |
| Rabbit Immunglobulin G        | 1:3000            | Kaninchen     | CellSignalling,<br>#R1364HRP         |

## 3.1 Methoden

### 3.1.1 Probenherkunft und Behandlung

Die Proben wurden im Rahmen einer Kooperation durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Kleinbongard am Institut für Pathophysiologie der Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt. Die Organentnahmen, Behandlungen und Probenentnahmen erfolgten durch Dr. Helmut Raphael Lieder. Die Erlaubnis zur Organentnahme wurde durch das Kooperationslabor beantragt und ist für diese Projektarbeit gültig.

Die Lewis-Ratten (männlich, 200-380g, 2.5- 3.5 Monate) wurden durch Pentobarbital (800mg/kg; Nacoderm; cp-pharma, Burgdorf, Germany, zusammen mit unfraktioniertem Heparin 300IU/kg) narkotisiert, das über eine Kanüle in die Bauchhöhle gespritzt wurde. Nachdem der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurde die Ratte durch zervikale Dislokation getötet und das Herz entnommen.

Anschließend wurde das Herz in die Langendorff-Apparatur eingehängt. Eine Langendorff-Apparatur ist eine etablierte Methode, um isolierte Herzen von Kleintieren zu perfundieren und für eine begrenzte Zeit weiter schlagen zu lassen. Die Herzrate wurde durch einen Schrittmacher im rechten Vorhof auf 360 Schläge/Minute gehalten. Perfundiert wurden die isolierten Herzen mit Krebs-Henseleit Puffer (in mmol/L: NaCl 118.0, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 16.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, Glucose 5.6, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, *sodium pyruvate* 2.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0; *gassed with* 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> *in a pre-warmed reservoir*, pH 7.40) bei 37.5°C unter konstantem Druck von 65 –

70mmHg. Je nach Interventionsgruppe wurde dem Krebs-Henseleit-Puffer zusätzlich noch der unselektive muskarinerge Rezeptorblocker Atropin (100 nmol/L) und der nikotinerge Rezeptorblocker Hexamethonium (50µmol/L) zugesetzt. Vor der Intervention wurden die Herzen 30 Minuten an der Langendorff-Anlage belassen, um sich an die neuen Bedingungen anzupassen.

Die Herzen wurden an der Langendorff-Apparatur vier Interventionsgruppen unterzogen.

1. *Time-matched-Control* (K) Gruppe: die Herzen dieser Gruppe wurden keiner Intervention unterzogen und dem Perfusionspuffer wurde kein Hexamethonium und Atropin (HEX+AT) zugesetzt. Diese Gruppe bildet in der Versuchsreihe die Kontrollgruppe.

2. Ischämie/Reperfusion (I/R) Gruppe: die Herzen dieser Gruppe wurden einer lokalen Ischämie durch eine Gummiligatur um den proximalen Ramus interventricularis anterior (LAD) der linken Koronararterie für insgesamt 30 Minuten unterzogen. Nach den 30 Minuten lokaler Ischämie wurde die Okklusion durch die Ligatur gelöst und das unterversorgte Areal für 120 Minuten reperfundiert.

3. Interventionsgruppe Sham HEX+ AT: Herzen dieser Gruppe wurden keiner Intervention unterzogen, aber dem Krebs-Henseleit Puffer wurden sofort nach Anhängen an die Langendorff-Anlage HEX+AT zugesetzt.

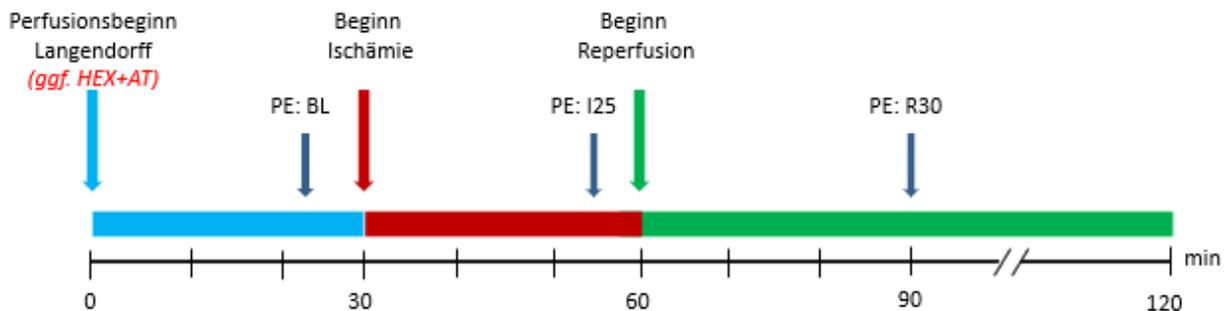
4. Interventionsgruppe I/R HEX+AT: Diese Herzen erhielten das gleiche I/R-Schema wie Interventionsgruppe 2. Ab dem Zeitpunkt, an dem die Herzen an die Langendorff-Anlage angehängen wurden, wurden dem Krebs-Henseleit Puffer HEX+AT zugesetzt.

Für jede Interventionsgruppe wurden fünf Versuchstiere präpariert. Die vitalen Zellen in dem unterversorgten Gebiet der I/R-Gruppen wurden durch Patentblau V blau angefärbt und somit von den bereits durch die Ischämie geschädigten Zellen unterschieden. Patentblau V ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der die vitalen Zellen blau anfärbt, ischämische Zellen aber nicht. Die Probenentnahmen wurden in einem nicht direkt von der Ischämie betroffenen Areal (remote Areal) mit vitalen Zellen durchgeführt. Die Probenentnahmen wurden zu drei Zeitpunkten durch einen modifizierten Zahnarztbohrer entnommen:

Die erste Probenentnahme erfolgte unmittelbar vor der Intervention als Baseline (BL).

Die zweite Probenentnahme erfolgte 25 Minuten nachdem die Ligatur um die LAD zugezogen wurde, d.h. 25 Minuten nach Ischämie (I25).

Die dritte Probenentnahme erfolgte 30 Minuten nach Aufheben der Okklusion der Ligatur, d.h. nach 30 Minuten Reperfusion (R30). In den K-Gruppen wurden die Proben zu den gleichen Zeitpunkten entnommen wie in den I/R-Gruppen (Siehe Abb. 9).



**Abb. 9: Zeitstrahl zur Erläuterung der Probenbehandlung.** PE (Probenentnahme); BL (Baseline); I25 (Ischämie nach 25 Minuten); R30 (Reperfusion nach 30 Minuten); min (Minuten). Der Interventionsgruppe Sham HEX+AT und der Interventionsgruppe I/R HEX+AT wurden das Hexamethonium und Atropin (HEX+AT) zu Perfusionsbeginn Langendorff dem Krebs-Henseleit Puffer zugesetzt. Die Ischämie wurde durch eine Ligatur um den *Ramus interventricularis anterior* gesetzt und nach 30 Minuten gelöst. Die PE wurde zu jedem Zeitpunkt aus dem Remote Areal des linken Ventrikels durchgeführt.

Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.2 Proteinbiochemie

Anhand der generierten Probengröße wurde für jede Interventionsgruppe ein N-Zahl=5 abgestrebt. Zur Proteinanalyse wurden die Gewebeproben zunächst solubilisiert. Hierzu wurden die Proteine der jeweiligen Biopsie in SDS-Probenpuffer mechanisch per Skalpell zerkleinert und für spätere Analysen aus ihren Zellmembranen herausgelöst. Die Proben wurden in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf Reaktionsgefäße, kurz Eppi) gefüllt und für 30 Minuten auf Eis gelegt. Nach 30 Minuten wurden die Proben für 3 Minuten auf  $98^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um sekundäre Proteinstrukturen aufzufalten.

Um jeweils gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen, wurde die Konzentration der Proteine in der solubilisierten Probe mittels Bradford Analyse bestimmt. Dazu wurden  $2\mu\text{l}$  der Probe in  $8\mu\text{l}$  destillierten Wassers pipettiert und vermischt. Von dieser Verdünnung wurden  $2\mu\text{l}$  in zwei weitere Eppis mit jeweils  $800\mu\text{l}$  destilliertem Wasser pipettiert und vermischt. In diesen wurden jeweils  $200\mu\text{l}$  des Bradford-Reagenz pipettiert. Im Bradford-Reagenz befindet sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Dieser Farbstoff bindet an Proteine und verschiebt das Absorptionsspektrum. Die Zunahme der Absorption ist dabei proportional zur

Proteinkonzentration in der Probe. Das Absorptionsspektrum der beiden Verdünnungen wurde photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ausgerechnet. Die Proteine der Proben wurden nach Größe zwischen 10 – 250kDa in konventioneller Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die 10% Gele wurden gegossen, indem außer APS alle Komponenten des Trenngels (siehe Tabelle 5) in ein 50ml-Falcon vermischt wurden. APS ist ein Radikalstarter und ist für die Auspolymerisation des Gels verantwortlich. Nachdem das APS hinzugefügt wurde, wurde die Mischung auf- und abpipettiert und zwischen zwei Glasplatten gefüllt. Die Mischung polymerisierte anschließend für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Vermeidung von Blasenbildung während der Polymerisation wurde die Mischung mit Isopropanol überbeschichtet. Nach einer Stunde wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel nach dem gleichen Schema wie das Trenngel (siehe Tabelle 5) gegossen. Damit sich während der anschließenden Polymerisation (30 min.) in dem Sammelgel separate Taschen zum Auftragen der solubilierten Proteinlösungen formen, wurde eine spezielle Silikonform in das Sammelgel eingesetzt.

**Tabelle 5: Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele / Sammelgele**

| <b>Lösung</b>                      | <b>Trenngel 10%</b> | <b>Sammelgel</b> |
|------------------------------------|---------------------|------------------|
| 30% Acrylamidlösung                | 5ml                 | 0,667ml          |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 6,25ml              | 3,025ml          |
| 4 x-SDS-Trenngelpuffer             | 3,75ml              | -                |
| 4 x-SDS-Sammelgelpuffer            | -                   | 1,25ml           |
| TEMED                              | 7,5 $\mu\text{l}$   | 15 $\mu\text{l}$ |
| APS                                | 75 $\mu\text{l}$    | 50 $\mu\text{l}$ |
| <b>Gesamtvolumen</b>               | <b>15ml</b>         | <b>5ml</b>       |

Für die Isolation des Sarkomerprotein Titin mit einer Größe von >3000kDa wurde eine agaroseverstärkte 2,2% Polyacrylamid-Konzentration SDS-PAGE (Titingele) verwendet. Zur Herstellung wurden zuerst alle Lösungen (siehe Tabelle 6) außer APS und Agarose in ein 50ml-Falcon vermischt und im Wasserbad auf 48°C erhitzt. Der erwärmten Mischung wurde zunächst der Radikalstarter APS zugefügt und anschließend die in der Mikrowelle verflüssigte Agarose hinzugegeben. Die Gelsuspension wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Probestaschen wurden hier durch

Einsetzen der Silikonform direkt in die Gelsuspension erzeugt. Die Polymerisation der agaroseverstärkten Gele erfolgte anschließend für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur.

**Tabelle 6: Pipettierschema für zwei 2,2% Titingele**

| <b>Lösung</b>                      | <b>Titingele 2,2%</b> |
|------------------------------------|-----------------------|
| 30% Acrylamidlösung                | 1,46ml                |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 6,61ml                |
| 4 x-SDS-Trenngelpuffer             | 5ml                   |
| SDS 20%                            | 100µl                 |
| TEMED                              | 11,5µl                |
| APS                                | 150µl                 |
| Agarose 1,5%                       | 6,67ml                |
| <b>Gesamtvolumen</b>               | <b>20ml</b>           |

Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-Twin System des Herstellers Biometra und Mini-Protean der Firma Biorad verwendet. Die flüssigen Proben wurden in die Probentaschen der Gele in gleicher Proteinmenge aufgetragen. Für die 10% SDS-PAGE wurden 15µg von jeder Probe in die Probentaschen aufgetragen. Auf die 2,2% agaroseverstärkte SDS-PAGE wurden 25µg von jeder Probe in die Probentaschen aufgetragen. Die Gele wurden in die Gelelektrophorese-Halterung eingespannt und in die Kammer gestellt. Die Gelelektrophorese-Halterung und die Kammer wurden mit 1 x-Laufpuffer komplett gefüllt. Die 10% SDS-PAGE lief auf durchschnittlich 25mA pro Gel für ca. 1,5 Stunden. Die 2,2% agaroseverstärkte SDS-PAGE lief auf durchschnittlich 7mA pro eingestelltes Gel für ca. 3 Stunden.

Für die immunbiochemische Analyse wurden die Proteine im SDS-Gel durch Western Blot auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Der Western Blot ist eine Methode, in der Proteine aus einem Gel über eine angelegte Spannung auf eine Membran übertragen werden. Hierfür wurde zunächst die Western Blot-Kammer vorbereitet. Diese besteht aus einer Kammer und einem Deckel, die jeweils Pole der angelegten Spannung bilden. Auf dem Boden der Kammer wurden Whatman-Papiere gelegt, die in Anodenpuffer getränkt wurden. Diese bildeten die positive Anode. Auf die Anode wurde die PVDF-Membran gelegt, auf die die Proteine übertragen werden sollten. Dafür wurden die Gele nach der Proteinauftrennung aus der Gelelektrophorese-Halterung entnommen und luftblasenfrei auf die Membran

platziert. Auf das obenliegende Gel wurde eine gleiche Anzahl Whatman-Papier wie auf dem Kammerboden gelegt. Diese wurden in Kathodenpuffer getränkt und bilden die negative Kathode. Die Kammer wurde über den Deckel fest verschlossen und in den Western Blot-Apparat eingesetzt. Die Western Blots der 10% SDS-PAGE wurden für 12 Minuten bei einer 1.5A Stromstärke unter 20V Spannung durchgeführt. Die Western Blots der 2,2% agaroseverstärkte SDS-PAGE wurde für 40 Minuten bei einer 1.0A Stromstärke unter 20V Spannung durchgeführt.

Nach dem Blotting-Vorgang wurde kontrolliert, ob die Übertragung der Proteine funktioniert hat. Zur Übertragungskontrolle wurde die Membran aus der Kammer für ca. 30 Sekunden in die Färbelösung PVDF-Stain gelegt. Um die angefärbten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran nach den 30 Sekunden in PVDF-Destain, eine Entfärbelösung, für ca. 3 Minuten auf den Schüttler gelegt. Nach der Entfärbung wurde die Essigsäure des PVDF-Destains in 1x-TBST von der Membran gewaschen. War die Übertragung erfolgreich, waren auf der Membran regelmäßige, blau angefärbte Proteinbanden sichtbar. An diese Proteinbanden können Antikörper zur Proteinanalyse binden. Um die Bindung an den freien Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für mindestens eine Stunde in 2%iger Rinderalbuminlösung (BSA) inkubiert.

### **3.1.3 Immunbiochemie**

Zur Proteinanalyse wurden Antikörper verwendet, die darauf schließen lassen, in welchem Ausmaß ein Protein an einer bekannten Stelle phosphoryliert wurde. Die durch 2%ige BSA blockierte Membran wurde hierbei für mindestens 12 Stunden mit einem Primärantikörper inkubiert, der in 3ml 0,5% BSA-Lösung verdünnt wurde (siehe Tabelle 4). Danach wurde die Membran durch mindestens drei 10-minütige Waschgänge in 1x-TBST gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Die gewaschenen Membranen wurden im nächsten Schritt in einer mit Sekundärantikörper beladenen 0,5% BSA-Lösung für mindestens 2,5 Stunden inkubiert. Nach den 2,5 Stunden wurde die Membran erneut durch 1x-TBST Lösung dreimal für 10 Minuten gewaschen. An dem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, ist eine Meerrettichperoxidase assoziiert. Diese reagiert mit dem Chemilumineszenzreagenz ECL (*Western blotting detection reagent*) 1 und 2, die in einem 1:1-Verhältnis gemischt wurden und die Membran vollständig bedecken, indem es ein Lichtsignal auslöst. Dieses Lichtsignal werden durch den Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) detektiert.

In diesem Projekt wurden Phosphosite-spezifische Antikörper verwendet. Diese Phosphosite-spezifische Antikörper sind polyklonal und wurden in Kaninchen generiert. Den Kaninchen wurden modifizierte Peptide bekannter Sequenz injiziert, gegen die die Kaninchen Antikörper gebildet haben. Die Peptide beinhalten phosphorylierte Sequenzen für phospho-Ser4010 (RTEEGK[pS]LSFPC) der N2-Bus-Region, phospho-Ser11878 (CEVVLK[pS]VLRKRP) und phospho-Ser12022 (KLRPG[pS]GGEKP) aus der PEVK-Region. Die Antikörper wurden aus den Seren der Kaninchen durch Affinitätschromatographie isoliert. Alle Antikörper wurden durch Immunoglobulin, Deutschland, hergestellt, mit Ausnahme des Anti-Titin-pS12022, der von Eurogentec, Belgien, hergestellt wurde. Die Spezifität der Antikörper wurde durch rekombinante Fragmente menschlicher N2-Bus und PEVK-Region durch Western Blot getestet (Kötter et al., 2013).

Um in den untersuchten Proben Änderungen der relativen Phosphorylierung zu bestimmen, wurden Total- und Phosphosite-spezifische Antikörper verwendet. Diese Antikörper wurden nacheinander auf die gleiche Membran aufgetragen und analysiert. Zuerst wurde der phosphorylierte Anteil der Proteine durch den Phosphosite-spezifische Antikörper bestimmt. Dieser Antikörper wurde durch mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetztem Stripping Buffer von den Proteinen auf der Membran gelöst. Diese Membran wurde erneut mit 2%iger BSA blockiert und der total-Antikörper entsprechend Tabelle 4 eingesetzt und analysiert. Einzig bei den agaroseverstärkten 2,2% SDS-PAGE wurde statt des Total-Antikörpers der PVDF-Stain als Bezugswert eingesetzt.

Die Signale des Phosphosite-spezifischen und des korrespondierenden Total-Antikörpers wurden durch das Programm Image J anhand der Intensität des gemessenen Lichtsignals als Pixeldichte quantifiziert. Die Signale von Phosphosite-spezifischen- und Totalantikörper, die nacheinander auf der gleichen Membran gebunden waren, wurden für die densitometrische Analyse zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnisse wurden auf den Mittelwert der Kontrollen auf der gleichen Membran normiert und sind daher als relative Werte angegeben.

#### **3.1.4 Software**

Für die Ergebnisauswertung und das Verfassen der Dissertation wurde zusätzlich zu den im Text aufgeführten Programmen folgende Software verwendet: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, ImageLab 2017, GraphPad Prism 9XML.

### 3.1.5 Datenanalytische Statistik

Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurden für die Anzahl an durchgeführten Western blots ( $n > 3$  Replikate) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9XML durch *one-way*-ANOVA und t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 5\%$  wurde die Nullhypothese abgelehnt und statistische Signifikanz angenommen.

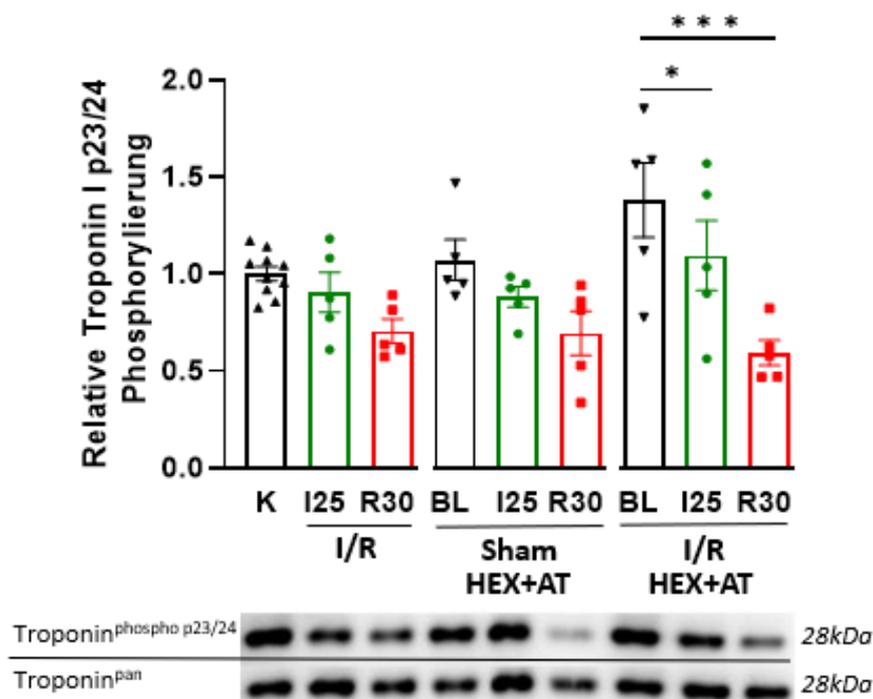
## 4. Ergebnisse

Um den Einfluss des N. vagus auf die Steifigkeit Titins zu evaluieren, wurden die Gewebeproben der Interventionsgruppen mittels Westernblot Verfahren immunbiochemisch durch sechs verschiedene Antikörper untersucht: ERK1/2, Troponin I, PKC $\alpha$ , S4010, S12022, S11878. Die kinasespezifischen Antikörper ERK1/2, Troponin I und PKC $\alpha$  binden an den jeweiligen Enzymen, die Titin phosphorylieren können. Dadurch kann auf die Enzymmenge und Aktivität innerhalb der untersuchten Probe geschlossen werden. Die titinspezifischen Antikörper S4010, S12022 und S11878 binden an spezifischen Stellen im Protein Titin, durch die eine relative Phosphorylierung an dieser Stelle durch ein bekanntes Enzym gemessen werden kann. Durch eine veränderte relative Phosphorylierung an den genannten Serinresten kann auf eine Anpassung der passiven Steifigkeit von Titin geschlossen werden. Die relative Titinphosphorylierung wird mit einer N-Zahl=3-4 quantifiziert, die Kinaseaktivitäten mit einer N-Zahl=5. Auf Grund der gleichen Probenbehandlung der *Time-matched Control*-Gruppe (K) und der BL der unbehandelten Interventionsgruppe vor Ischämie wurden die Ergebnisse der beiden Interventionsgruppen in den Diagrammen mit einer N-Zahl=10 zusammengefasst.

### 4.1 Troponinphosphorylierung sinkt stärker durch HEX+AT unter I/R als ohne Behandlung

Die PKA phosphoryliert die N2Bus von Titin an Position S4010, und vermittelt so eine Reduktion der passiven Steifigkeit (Krüger and Linke, 2006). Der direkte Nachweis der PKA-Aktivität ist schwierig und erforderte größere Mengen an Gewebe als hier verfügbar. Daher wurde hier die relative Phosphorylierung des Muskelproteins Troponin I (TnI) analysiert, einem Zielprotein der PKA. Anhand der Phosphorylierung des Troponins kann somit indirekt auf die Enzymaktivität der PKA geschlossen werden. Die relative Phosphorylierung von Troponin I in den untersuchten Gewebeproben ist in Abbildung 10 dargestellt. Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, ob durch die Blockade von ACh die Aktivität der PKA basal

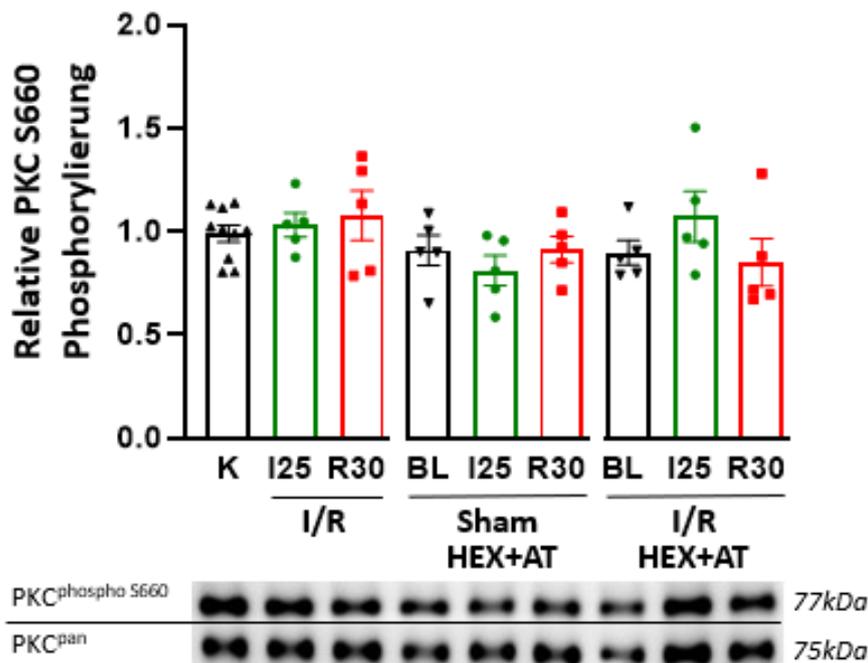
und nach I/R verändert war. In der unbehandelten Gruppe sinkt die relative Phosphorylierung von der Kontrolle vor Ischämie (K) ( $1,00 \pm 0,01$ ), über die Ischämie (I25 I/R) ( $0,91 \pm 0,03$ ) bis hin zu der Reperfusion (R30 I/R) ( $0,71 \pm 0,10$ ) leicht ab. Behandelt mit AT und HEX ohne Ischämie in der Sham-Gruppe sinkt die relative Phosphorylierung ähnlich zur unbehandelten Gruppe über alle Zeitpunkte ab. Hier liegt der Ausgangspunkt der Baseline der Shamgruppe unter HEX+AT (BL Sham HEX+AT) ähnlich der Kontrollgruppe bei 0,99. Nach Ischämie (I25 Sham HEX+AT) fällt die relative Phosphorylierung auf  $0,88 \pm 0,07$  ab, die nach Reperfusion (R30 Sham HEX+AT) weiter auf  $0,70 \pm 0,13$  gefallen ist. In der I/R-Gruppe mit AT und HEX sinkt die relative Phosphorylierung von TnI in der Reperfuionsgruppe (R30 I/R HEX+AT) ( $0,59 \pm 0,28$ ) sogar signifikant gegenüber der Baseline (BL I/R HEX+AT) ( $1,38$ ) ( $P = 0,0002$ ) ab. Einen leichten Abfall der relativen Phosphorylierung erkennt man bereits zur Ischämiegruppe (I25 I/R HEX+AT) ( $1,10 \pm 0,10$ ) ( $P = 0,0495$ ).



**Abb. 10: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung von Troponin I unter Hexamethonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung an Troponin I vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie(I25) und 30 Minuten nach Reperfusion (R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der relativen Phosphorylierung des Troponin I dar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Repräsentative Standardgele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

#### **4.2 PKC-Phosphorylierung zeigt in isolierten Herzen unter HEX+AT nach I/R keine signifikante Veränderung**

Die PKC $\alpha$  ist ein Enzym, das unter anderem in der Signalkette der muskarinergen Rezeptorsubtypen, z.B. den M<sup>3</sup>AChR, aktiviert bzw. gehemmt werden kann. Nach Aktivierung des Enzyms phosphoryliert es Aminosäuren innerhalb der PEVK-Proteinsequenz im Titinprotein und steigert dadurch dessen relative Steifigkeit. Die Aktivität der PKC $\alpha$  wurde durch relative Phosphorylierung an Position S660 abgeschätzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. In der I/R-Gruppe ohne medikamentöse ACh-Blockade bleiben sowohl die I25 ( $1,03 \pm 0,01$ ) als auch die R30-Proben ( $1,08 \pm 0,02$ ) auf dem ähnlichen Phosphorylierungslevel wie die Kontrollgruppe ( $0,99 \pm 0,02$ ). Hier ist kein Anstieg in der Enzymaktivität sichtbar. In der Sham-Gruppe ohne Ischämie unter HEX+AT-Behandlung zeigt sich auch keine Veränderung der Phosphorylierung von den BL ( $0,91$ ) über die I25 ( $0,81 \pm 0,04$ ) zu den R30-Proben ( $0,91 \pm 0,002$ ) und sind von dem Grad der Phosphorylierung vergleichbar mit der Kontrollgruppe. In der I/R-Gruppe, die mit HEX+AT behandelt wurden verhalten sich die BL ( $0,90$ ) und R30 ( $0,90 \pm 0,02$ ) ähnlich wie in der Sham-Gruppe ohne große Alterationen auf einem ähnlichen Phosphorylierungsgrad. Nur die I25-Gruppe zeigt eine leichte Steigerung zu der BL und der I25 ( $1,07 \pm 0,06$ ). Alles in allem verhalten sich die relativen Phosphorylierungen von PKC über alle untersuchten Proben konstant ohne auffällige Alterationen.

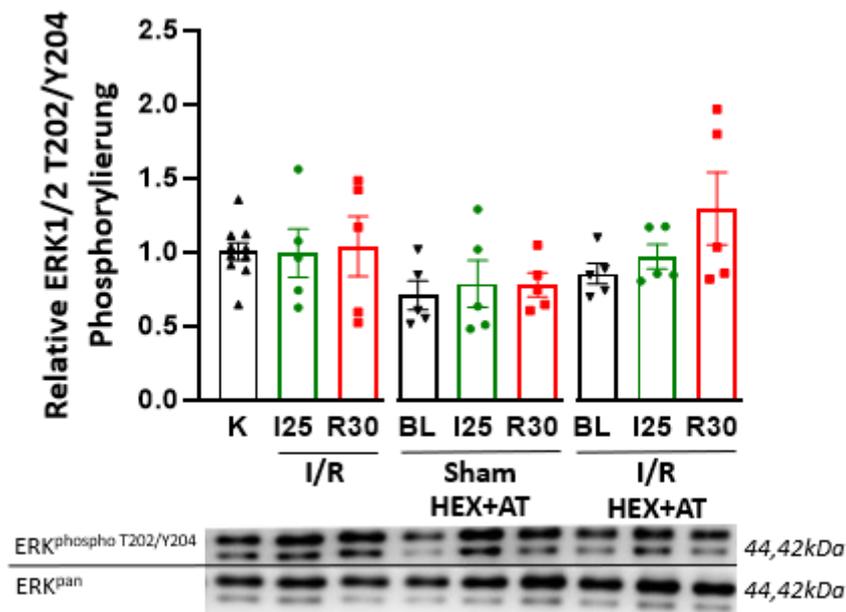


**Abb. 11: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung der PKC unter Hexamethonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung der PKC vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie (I25) und 30 Minuten nach Reperfusion (R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der relativen Phosphorylierung der PKC dar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Repräsentative Standardgele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

#### 4.3 ERK-Phosphorylierung zeigt in isolierten Herzen unter HEX+AT keine Veränderung, unter I/R-Bedingungen jedoch einen leichten Anstieg

ERK 1/2 ist eine Kinase, die unter anderem durch eine Phosphorylierung des S4010 innerhalb N2Bus eine Steifigkeitserniedrigung des Titinproteins erwirkt. Wie genau das Enzym eine Steifigkeitserhöhung auslöst, ist bis heute noch nicht verstanden. Die relative Phosphorylierung durch ERK1/2 ist in Abbildung 12 dargestellt. Die relative Phosphorylierung der I/R-Gruppe ohne HEX+AT bleibt über alle der Zeitpunkte unverändert. Sowohl die Kontrolle (1,0) als auch die I25 I/R ( $0,99 \pm 0,04$ ) und R30 I/R ( $1,03 \pm 0,05$ ) schwanken um den relativen Phosphorylierungsgrad 1,0. In der Sham-Gruppe unter HEX+AT zeigen sich auch keine wesentlichen Veränderungen innerhalb der Phosphorylierung. Die BL Sham HEX+AT hat einen relativen Phosphorylierungsgrad von 0,7, der bei der I25 Sham HEX+AT auf  $0,79 \pm 0,03$

und der R30 Sham HEX+AT ( $0,77 \pm 0,03$ ) ähnlich hoch verbleibt. Lediglich in der Interventionsgruppe I/R HEX+AT zeigt sich ein leichter Anstieg innerhalb der Proben. Die BL I/R HEX+AT startet bei einer relativen Phosphorylierung von 0,85. Diese verbleibt nach Ischämie in der I25 I/R HEX+AT auf  $0,97 \pm 0,04$  auf einem ähnlichen Wert. Nur in der R30 I/R HEX+AT kann ein leichter Anstieg der relativen Phosphorylierung auf  $1,29 \pm 0,16$  gesehen werden.

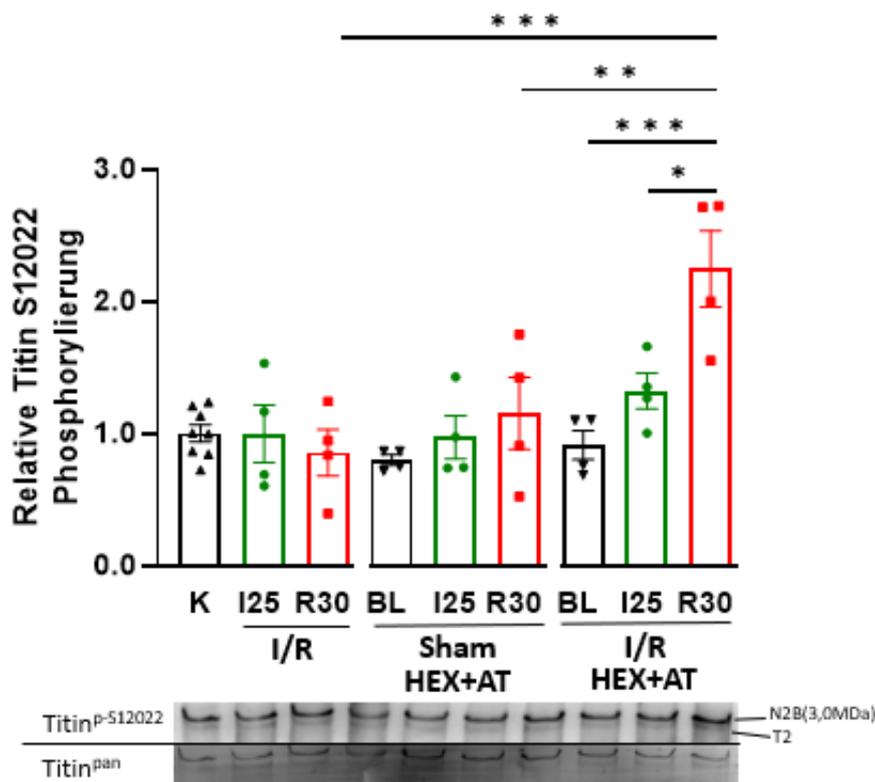


**Abb.12: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung durch ERK1/2 unter Hexamethonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung durch ERK1/2 vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie(I25) und 30 Minuten nach Reperfusion(R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der relativen Phosphorylierung durch ERK1/2 dar (Mittelwert ± Standardfehler). Repräsentative Standardgele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

#### 4.4 Die Phosphorylierung von p-S12022 steigt unter HEX+AT, unter I/R wird dieser Effekt signifikant verstärkt

S12022 ist eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der PEVK-Region des Titinproteins und unter anderem Substrat der Kinase  $PKC\alpha$ . Phosphorylierungen an S12022 steigert die passive Steifigkeit Titins. Die relative Phosphorylierung des Titinlocus p-S12022 ist in Abbildung 13 dargestellt. In der I/R-Gruppe ohne medikamentöse Acetylcholinblockade

verbleibt die relative Phosphorylierung unverändert um den Wert 1,0. Die Kontrollgruppe zusammen mit der BL I/R hat eine relative Phosphorylierung von 0,92. Dieser verbleibt unter I25 I/R bei  $1,00 \pm 0,03$  und bleibt nach R30 I/R bei  $0,86 \pm 0,08$  auf einem ähnlichen Niveau. In der Interventionsgruppe Sham HEX+AT steigt die relative Phosphorylierung leicht an. Die BL Sham startet bei einer relativen Phosphorylierung von 0,80. Diese steigert sich gering nach I25 Sham HEX+AT auf  $0,97 \pm 0,06$ . Die R30 Sham HEX+AT-Proben steigern auf einen Mittelwert von  $1,15 \pm 0,12$ . Die I/R HEX+AT-Interventionsgruppen zeigen im Gegensatz zu der Sham HEX+AT eine signifikante Steigerung der relativen Phosphorylierung. Der Ausgangswert BL I/R HEX+AT ist ähnlich der Kontrollgruppe bei 0,91. Nach I25 I/R HEX+AT steigert sich die relative Phosphorylierung leicht auf  $1,32 \pm 0,14$  bis sie nach R30 I/R HEX+AT ( $2,25 \pm 0,47$ ) signifikant gegenüber der I25 I/R ( $P = 0,0172$ ) und der BL ( $P = 0,0002$ ) der gleichen Interventionsgruppe steigert. Im Vergleich zu BL I/R HEX+AT hat sich die relative Phosphorylierung fast verdoppelt.

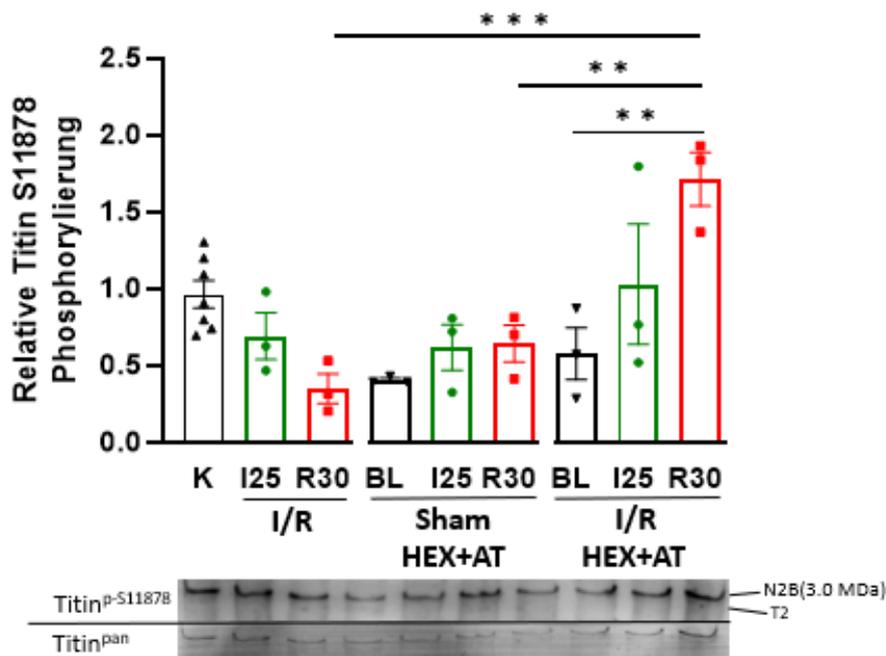


**Abb.130: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung des Titinlokus p-S12022 unter Hexamthonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung des Titinlokus p-S12022 in der PEVK-Region des Protein Titin vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie(I25) und 30 Minuten nach Reperfusion(R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der

relativen Phosphorylierung dar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Repräsentative Titingele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. N2B markiert hier eine Isoform des Titin, T2 ein proteolytisches Titinfragment. Die N2BA-Isoform kommt bei Ratten kaum vor, wird dementsprechend nicht dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

#### **4.5 Die relative Phosphorylierung von p-S11878 steigt leicht unter HEX+AT, mit I/R wird dieser Effekt verstärkt**

Der Titinlocus S11878 ist eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der PEVK und wird unter anderem von der Kinase PKC $\alpha$  phosphoryliert. Im phosphorylierten Zustand steigert S11878 die Steifigkeit des Titinproteins. Die relative Phosphorylierung des Titinlocus p-S11878 ist in Abbildung 14 dargestellt. Die relative Phosphorylierung der I/R-Gruppe sinkt ab. Über die Kontrollgruppe ( $0,99 \pm 0,03$ ) sinkt nach Ischämie die relative Phosphorylierung nach I25 I/R auf  $0,70 \pm 0,09$ , nach R30 I/R sogar auf  $0,35 \pm 0,21$ . Dieser Trend ändert sich unter HEX+AT. In der Sham HEX+AT-Gruppe erkennt man eine unwesentliche Steigerung der relativen Phosphorylierung. Die BL Sham HEX+AT liegt bei 0,41 niedriger als die BL ohne HEX+AT. Nach I25 Sham HEX+AT steigt die relative Phosphorylierung auf  $0,62 \pm 0,08$  an. Diese bleibt bei R30 Sham HEX+AT mit  $0,64 \pm 0,08$  auf einem ähnlichen Niveau wie die I25 Sham HEX+AT-Proben. Innerhalb der I/R HEX+AT steigt die relative Phosphorylierung sogar signifikant. Die BL I/R HEX+AT liegt bei 0,6. Nach I25 I/R HEX+AT steigt die relative Phosphorylierung auf  $1,03 \pm 0,15$ . Gegenüber der BL I/R HEX+AT steigt die R30 I/R HEX+AT auf einen Wert von  $1,71 \pm 0,39$  um fast das Dreifache signifikant an ( $P = 0,0037$ ).

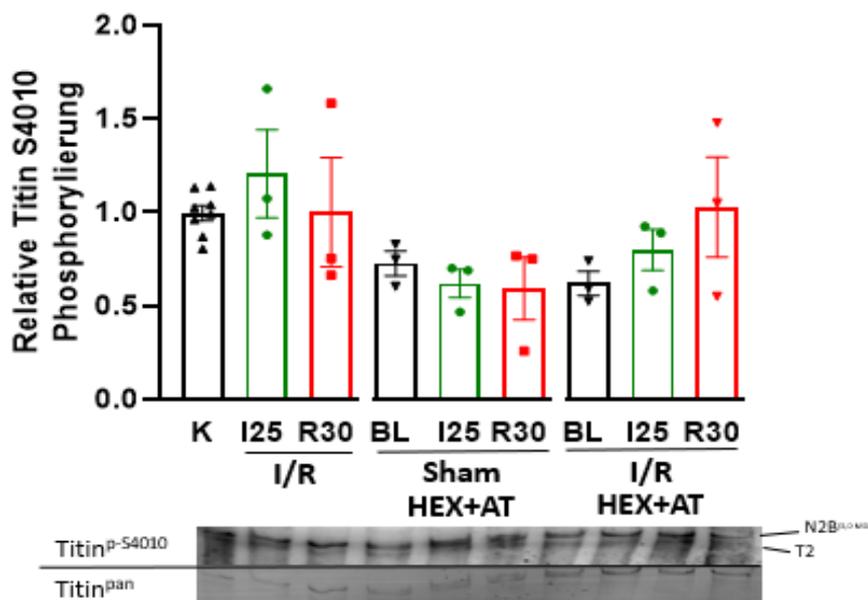


**Abb.14: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung des Titinlokus p-S11878 unter Hexamthonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung des Titinloki p-S11878 in der PEVK-Region des Protein Titin vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie(I25) und 30 Minuten nach Reperfusion(R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der relativen Phosphorylierung dar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Repräsentative Titingele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. N2B markiert hier eine Isoform des Titin, T2 ein proteolytisches Titinfragment. Die N2BA-Isoform kommt bei Ratten kaum vor, wird dementsprechend nicht dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

#### 4.6 Die relative Phosphorylierung von p-S4010 sinkt unter HEX+AT, unter I/R wird steigt diese jedoch an

S4010 ist ein Serinrest in der N2Bus-Region des Titinproteins und wird unter anderem von den Kinasen PKA und ERK1/2 phosphoryliert. Die N2Bus Region senkt im phosphorylierten Zustand die passive Steifigkeit Titins. Die relative Phosphorylierung des Titinlocus p-S4010 ist in Abbildung 15 dargestellt. Die relative Phosphorylierung der I/R-Gruppe ändert sich innerhalb der Proben kaum. Der Phosphorylierungsgrad der Kontrollgruppe liegt bei 0,99. Die I25 I/R-Proben weisen mit  $1,21 \pm 0,06$  eine leicht höhere Phosphorylierung als die Kontrollgruppe auf, die in der R30 I/R aber wieder auf  $1,00 \pm 0,02$  absinkt. Innerhalb der Sham HEX+AT-Gruppe zeigt sich ebenfalls keine signifikante Änderung der relativen Phosphorylierung. Die BL Sham

HEX+AT startet auf einem niedrigeren Phosphorylierungsgrad als die unbehandelte Gruppe bei 0,73. In der I25 Sham HEX+AT sinkt die relative Phosphorylierung auf  $0,62 \pm 0,04$  leicht ab und verbleibt bei R30 Sham HEX+AT bei  $0,59 \pm 0,05$  auf einem ähnlichen Niveau. Lediglich in der I/R HEX+AT-Interventionsgruppe erkennt man eine Steigerung in der relativen Phosphorylierung. Die BL I/R HEX+AT startet bei 0,62 ähnlich wie die BL Sham HEX+AT unter dem Niveau der Kontrollgruppe bei 0,62. In der I25 I/R HEX+AT-Gruppe steigt die relative Phosphorylierung auf  $0,80 \pm 0,06$  an. Diese Steigerung erkennt man deutlicher in der R30 I/R HEX+AT auf  $1,03 \pm 0,14$ .



**Abb.15: Einfluss von Ischämie und Reperfusion (I/R) auf die Phosphorylierung des Titinlokus p-S4010 unter Hexamthonium und Atropin (HEX+AT).** Graphische Darstellung der relativen Phosphorylierung des Titinloki p-S4010 in der N2Bus-Region des Protein Titin vor Ischämie (BL), 25 Minuten nach Ischämie(I25) und 30 Minuten nach Reperfusion(R30). Abgebildet ist die Kontrollgruppe (K) ohne Intervention, die Interventionsgruppe mit I/R, die Sham-Gruppe mit HEX+AT und die Gruppe mit I/R und HEX+AT. Die Säulendiagramme stellen den Grad der relativen Phosphorylierung dar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Repräsentative Titingele sind sortiert nach den Zeitpunkten auf der Abszisse aufgeführt. N2B markiert hier eine Isoform des Titin, T2 ein proteolytisches Titinfragment. Die N2BA-Isoform kommt bei Ratten kaum vor, wird dementsprechend nicht dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden durch *one-way-ANOVA* ermittelt und bei einem p-Wert  $<0,05$  angenommen (gekennzeichnet durch Asterisken: \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

## 5. Diskussion

Titin ist das bisher größte bekannte Protein des menschlichen Körpers. Als Strukturprotein, erfüllt Titin im Herzen eine Vielzahl an Funktionen. Eine dieser Funktionen ist die Erhaltung der Stabilität und der Herzfunktion durch die Regulation der passiven Steifigkeit. Nach ischämischem Schaden wurde eine Erhöhung der passiven Steifigkeit gemessen. Kötter et al. hat eine kurzfristig erhöhte Steifigkeit durch PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung in Mäusen nach Herzinfarkt festgestellt (Kötter et al., 2016). Es wird vermutet, dass die Erhöhung der passiven Steifigkeit initial nach ischämischem Schaden den Ventrikel stabilisiert und die Auswurfleistung des Ventrikels nach Herzinfarkt erhält. Die Signalwege, die zur Steifigkeitsmodulation Titins nach ischämischem Schaden führen, sind noch größtenteils unbekannt. Die Erforschung der Modulation der Titinsteifigkeit nach Herzinfarkt und dessen eventuell kardioprotektiven Funktionen erhöht das Verständnis der Anpassung des Herzens an die neuen mechanischen Bedingungen und kann die Therapie und das Outcome der Patienten nach Herzinfarkt verbessern.

Ein bisher nur wenig untersuchter Einflussfaktor auf die Modifikation der Titinsteifigkeit ist der N. vagus. Mehrere Studien belegen, dass eine gesteigerte Aktivität des N. vagus und erhöhte Konzentration seines Neurotransmitters Acetylcholin das Outcome von Patienten nach Herzinfarkt verbessert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 1.) lokale Ischämie/Reperfusion (I/R) auch im isolierten und Langendorff-perfundierten Rattenherzen zu einer PKC $\alpha$ -vermittelten Titinmodifikation im nicht-ischämischen Myokard führt, und 2.) inwiefern acetylcholinabhängige Signalwege und der N. vagus bei kardialer I/R die Titinmodifikation beeinflussen.

### **Im isolierten Herzen zeigt PKC $\alpha$ nach I/R keine gesteigerte Aktivität**

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass PKC $\alpha$  maßgeblich an der posttranslationalen Modifikation und den Signalwegen der Titinmodifikation beteiligt ist (Kötter et al., 2016, Hopf et al., 2018, Funk et al., 2022). PKC $\alpha$  ist eine Serin-Threonin-Kinase, die das Titinprotein an den Loci S12022 und S11878 Ca<sup>2+</sup>-abhängig phosphoryliert und dadurch kurzfristig die passive Steifigkeit des Titinfilaments erhöht (Hidalgo et al., 2009). Im Mausmodell mit I/R erhöht PKC $\alpha$  die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten in der *Remote Area* sehr kurzfristig nach Ischämie (Funk et al., 2022).

Im isolierten, Langendorff-perfundierten Rattenherzen konnte die erwartete Erhöhung der passiven Steifigkeit durch PKC $\alpha$  nach I/R dagegen nicht beobachtet werden und sowohl die aktivierende Phosphorylierung der PKC $\alpha$  als auch die relative PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung von Titin an Position S12022 blieben unverändert. Die relative Phosphorylierung von S11878 sinkt sogar, dass eher eine geringere Steifigkeit des Titinproteins ergibt. Somit scheint der zuvor beschriebene Mechanismus der ischämiebedingten Steifigkeitserhöhung über PKC $\alpha$ -vermittelte Titinphosphorylierung am isolierten Herzen nicht aktiviert zu werden. Der ausschlaggebende Unterschied der beiden Modelle könnte die fehlende vagale Verschaltung des *in vitro* isolierten Herzens sein. In mehreren Studien gilt der N. vagus als zentraler Bestandteil der kardioprotektiven Effekte nach Myokardinfarkt.

Der N. vagus repräsentiert als zehnter Hirnnerv die parasympathisch-vegetativen Innervation des Herzens und moduliert die Herzfunktion. Das balancierte Zusammenspiel des vegetativen Nervensystems (Sympathikus und Parasympathikus) ist zentral für die Herzfunktion und den Schutz vor strukturellen Schäden, die zu Herzversagen führen (Kishi, 2012). Eine Vielzahl an Studien belegt die kardioprotektive Wirkung des Parasympathikus. Erhöhte vagale Stimulation nach Okklusion der Koronararterien reduziert das Auftreten letaler Arrhythmien bei Katzen. Dieser Effekt bleibt unter acetylcholinerg Blockade durch Atropin aus (Rosenshtraukh et al., 1994). Auch in Hunden verhindert eine gezielte Stimulation des rechten N. vagus das Auftreten letaler Arrhythmien nach Ischämie (Schwartz et al., 1992). Lieder et al. zeigten in einem Infarktmodell der Göttinger Minipig Schweine, dass nach Vagotomie der kardioprotektive Effekt der *Remote Ischaemic Preconditioning* (RIP) ausblieb (Lieder et al., 2018). RIP ist ein Mechanismus, indem repetitiv über einen kurzen Zeitraum lokale Ischämien gesetzt werden, die die Toleranz gegenüber längeren ischämischen Schäden erhöhen (Murry et al., 1986). Dennoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Kardioprotektion durch den Parasympathikus bis heute nicht verstanden. Inwiefern das nicht-ischämische Areal des Myokards einer vagal-vermittelten Kardioprotektion unterliegen könnte, ist ebenfalls noch unklar.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass I/R im nicht-ischämischen Areal von *in vivo* Herzen kurzfristig eine Steifigkeitserhöhung im Titinprotein hervorruft, die vor allem auf die posttranslationale Modifikation der Titinloci S12022 und S11878 durch die PKC $\alpha$

zurückzuführen ist. Diese Steifigkeitserhöhung könnte das vitale Myokard kurzfristig nach Ischämie an die erhöhten mechanischen Belastungen anpassen und somit mechanisch stabilisieren (Kötter et al., 2016). Interessanterweise bleibt die Erhöhung der PKC $\alpha$ -Aktivität nach I/R am isolierten Herzen in der Remote Area aus. Dies ist am ehesten auf den Verlust des N. vagus zurückzuführen und spricht für die zentrale Rolle der vagalen Verschaltung für die kurzfristige Modifikation der Titinsteifigkeit.

### **Die Blockierung acetylcholinergere Rezeptoren hat unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die posttranslationale Modifikation am isolierten Herzen**

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, der im kardialen System von den parasympathischen Fasern des N. vagus als auch von dem intrinsischen acetylcholinergen System verwendet wird (Eglen, 2006, Wessler et al., 1998). Im hier verwendeten, isolierten Herzen haben die vagalen Afferenzen durch den nicht mehr vorhandenen N. vagus keinen Einfluss auf die Konzentration des ACh im Myokard. Das intrinsische acetylcholinerge System kann dagegen durch die autonome Acetylcholinsynthese den myokardialen ACh-Spiegel modulieren, auch ohne intaktes vagales Signaling. Das intrinsische acetylcholinerge System funktioniert über eine endogene Synthese von ACh innerhalb der Kardiomyozyten (Rana et al., 2010b). Durch diese Autosekretion von ACh aus der Zelle können die acetylcholinergere Rezeptoren aus zwei Quellen aktiviert werden: dem neuronalen System über den N. vagus und dem intrinsischen System aus den Kardiomyozyten, auch am isolierten Herzen. Um die Auswirkungen des Acetylcholins auf die posttranslationale Modifikation zu testen, wurde dem isolierten Herzen HEX+AT zugesetzt, um die nikotinerge und muskarinerge Signalweiterleitung zu unterbrechen und auch das intrinsische acetylcholinerge System zu blockieren.

Unter basalen Bedingungen mit Ischämie zeigte das isolierte Herz keine Alterationen in der Proteinaktivität von PKC $\alpha$ , ERK1/2 und der relativen Titinphosphorylierung. Dies könnte durch die fehlende Innervation durch den N. vagus erklärt werden. Aus diesen Daten lässt sich zusätzlich ableiten, dass das intrinsische acetylcholinerge System im isolierten Herzen unter basalen Bedingungen vermutlich auch keine maßgebliche Bedeutung bei der Regulation der Titin-vermittelten Kardiomyozytenfunktion hat. Auch in Herzen ohne Ischämie, aber mit acetylcholinergere Blockade durch HEX+AT konnten keine Veränderungen in der Titinphosphorylierung und den analysierten Kinaseaktivitäten gemessen werden. Dies zeigt, dass HEX+AT ohne Ischämie selbst die Kinaseaktivität nicht alterniert.

In Herzen mit I/R und HEX+AT zeigte sich dagegen eine deutlich signifikante Abnahme der Proteinphosphorylierung von Troponin I und eine Steigerung der relativen Titinphosphorylierung von S12022 und S11878. Im Hinblick auf die fehlende Veränderung der Proteinphosphorylierungen im isolierten Herzen ohne die ACh-Blockade ist diese Änderung unerwartet. Das Ausbleiben der Veränderung der Titinphosphorylierung und relativen Proteinaktivität in der Probengruppe mit I/R und ohne HEX+AT (I/R) lässt sich durch den fehlenden N. vagus erklären. Auch das intrinsische acetylcholinerge System scheint die Titinphosphorylierung unter basalen Bedingungen ohne vagale Innervation kaum zu beeinflussen, da es nach I/R ohne HEX+AT zu keiner Veränderung kommt. Dies zeigt auch die gleichbleibend unveränderte Enzymaktivität und Titinphosphorylierung in der Sham HEX+AT-Gruppe.

Es können mehrere Theorien vermutet werden, die diesen unerwarteten Anstieg erklären. Eine Möglichkeit wäre, dass HEX+AT die Effekte von ACh paradoxerweise verstärken und den Prozess der Phosphorylierung, anstatt zu blockieren, potenzieren.

Atropin ist ein unselektiver Inhibitor der muskarinergen Rezeptoren und stellt ein wichtiges Medikament in der Behandlung von u.a. Bradykardien dar (Pomeranz et al., 1985). Als unselektiver Muskarinrezeptorblocker gilt er als Parasympatholytikum und reduziert die Effekte durch Acetylcholin und dadurch die des N. vagus. Durch die Blockade der muskarinergen Rezeptoren der Kardiomyozyten müsste die relativen Enzymaktivitäten inklusive der Titinphosphorylierung abnehmen bzw. nicht auftreten. Allerdings sind unter Behandlung mit Atropin auch paradoxe Effekte wie Bradykardien, Arrhythmien und Übelkeiten bekannt (Schweitzer and Mark, 1980). Mehrere Studien belegen unterschiedliche Effekte durch Atropin, abhängig unter welchen Bedingungen es gegeben wird. In geringer Dosierung hat Atropin vornehmlich zentrale parasymphatische Effekte, die die Nervenkerne des N. vagus stimulieren, das die paradoxe kardiale Bradykardie unter Atropin erklärt. Auch eine hohe Dosis Atropin besitzt zentral parasymphomimetische Effekte, obwohl hier die periphere Rezeptorblockade dominiert und einen parasympholytische Wirkung am Effektororgan erzielt (Montano et al., 1998). In isolierten Kardiomyozyten wirkte Atropin zusätzlich zur muskarinergen Rezeptorblockade als allosterischer Phosphodiesterase-4 (PDE4)-Inhibitor, wenn er zusammen mit  $\beta$ -Adenorezeptoraktivatoren gegeben wird. Dies führt zu erhöhten cAMP-Spiegeln und PKA-Aktivität trotz muskarinerner Rezeptorblockade und erklärt

die arrhythmogenen Nebenwirkungen von Atropin. Atropin allein gegeben hat keine PDE4-inhibitorische Wirkung (Perera et al., 2017). Dies könnte den Anstieg der relativen S4010-Phosphorylierung erklären. Interessanterweise zeigt die I/R HEX+AT-Gruppe eine abnehmende TnI-Phosphorylierung, das gegen einen PDE4-hemmenden Effekt und eine Aktivitätssteigerung der PKA des Atropins spricht.

Eine andere Möglichkeit könnte ein zusätzlicher Einfluss anderer Proteinkinasen sein, die erst unter Blockade der ACh-Rezeptoren aktiviert werden. Neben der in dieser Studie untersuchten Kinasen PKC $\alpha$ , PKA und ERK1/2 kann Titin auch durch andere Kinasen phosphoryliert werden. So phosphoryliert auch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calmodulin-Kinase II in Kardiomyozyten Titin an den Stellen S11878 und S12022 (Hamdani et al., 2013) und weist kardioprotektive Effekte unter acetylcholinergen und vagalen Einfluss auf (Yang et al., 2021). Weitere Studien werden die Einflussfaktoren anderer Kinasen untersuchen, um die Möglichkeit von vagal-unabhängigen enzymgesteuerten Signalwegen zur posttranslationalen Modifikation nach Myokardinfarkt zu definieren.

### **Schlussfolgerung**

Die Mechanismen, die zur Steifigkeitserhöhung von Titin führen sind multimodal und in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden. Im *in vivo* Modell wurde zuvor gezeigt, dass das kardiale Titin nach globaler Ischämie unmittelbar eine signifikante Steifigkeitserhöhung erfährt. Zusätzlich konnte eine Erhöhung der PKC $\alpha$ -Aktivität und eine vermehrte Phosphorylierung der PKC $\alpha$ -abhängigen Titinloci S11878 und S12022 nachgewiesen werden (Kötter et al., 2016). Im Gegensatz dazu zeigten die hier untersuchten, denervierten Rattenherzen mit lokaler Ischämie unter basalen Bedingungen keine signifikanten Änderungen der Titinphosphorylierung oder der Enzymaktivitäten, einschließlich der PKC $\alpha$ . Das Fehlen der vagalen Signalverschaltung am isolierten Herzen könnte diesen diesen signifikanten Unterschied zum *in vivo* Modell erklären. Stimuliert hat der acetylcholinerge N. vagus kardioprotektive Wirkungen auf die Kardiomyozyten vor ischämischen Schäden. So reduziert elektrische vagale Stimulation die Infarktnarbe nach Myokardinfarkt und das Auftreten letaler Arrhythmien (Zhang et al., 2014, Zhao et al., 2021). Unter pharmakologischer Blockade oder mechanischer Trennung des N. vagus reduziert bzw. entfällt der kardioprotektive Effekt.

Da sich unter medikamentöser acetylcholinerg Blockade der isolierten Rattenherzen sich keine signifikanten Veränderungen in der Enzymaktivität und der Phosphorylierung der untersuchten Titinloci zeigten, kann vermutet werden, dass Acetylcholin unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Titin-vermittelte Sarkomerfunktion hat. Auch der Einfluss des intrinsischen acetylcholinergen Systems auf die Titinmodifikation ließ sich in isolierten/denervierten Rattenherzen unter basalen Bedingungen nicht nachweisen.

Kardiale I/R scheint dagegen im nicht-ischämischen Myokard Veränderungen in der Signaltransduktion hervorzurufen, die in großer Abhängigkeit von nicht-vagal regulierten Signalwegen stehen. Die relativen Phosphorylierungen der Titinloci S11878 und S12022 steigen unter I/R und medikamentöser ACh-Blockade von der BL bis zur R30 um fast das Doppelte an. Ob es sich bei diesen Effekten um spezifische und I/R abhängige Mechanismen handelt, oder die beobachteten Veränderungen möglicherweise durch eine paradoxe Effektsteigerung des Acetylcholins durch die eingesetzten Inhibitoren verursacht worden sind, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht klar beantworten und sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Auf die kurzfristige Modulation der passiven Steifigkeit kardialen Titins nehmen mehrere Mechanismen Einfluss. Neben einer neuronalen Komponente durch den N. vagus und humoralen Faktoren des Immunsystems (Kötter et al., 2016) wird zusätzlich noch die Aktivierung mechanisch-aktivierter Signalwege vermutet, die Einfluss auf die passive Steifigkeit des Titinproteins nehmen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der N. vagus einen großen Einfluss auf die posttranslationale Modifikation im Titinprotein nimmt. Ob spezifisch die Signaltransduktion über Acetylcholin oder andere Faktoren für den kurzfristigen Anstieg der passiven Steifigkeit verantwortlich ist, wird in weiteren Studien untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
2. BONNER, T. I. 1992. Domains of muscarinic acetylcholine receptors that confer specificity of G protein coupling. *Trends Pharmacol Sci*, 13, 48-50.
3. BRODDE, O.-E., BRUCK, H., LEINEWEBER, K. & SEYFARTH, T. 2001. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic research in cardiology*, 96, 528-538.
4. BURN, J. H. 1957. The physiological action of neuromuscular and ganglionic blocking agents. *Br J Anaesth*, 29, 242-8.
5. BURT, C. C. & GRAHAM, A. J. 1950. Pentamethonium and hexamethonium iodide in investigation of peripheral vascular disease and hypertension. *Br Med J*, 1, 455-60.
6. CAULFIELD, M. P. 1993. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. *Pharmacology & therapeutics*, 58, 319-379.
7. CAZORLA, O., WU, Y., IRVING, T. C. & GRANZIER, H. 2001. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res*, 88, 1028-35.
8. CHU, P. H., RUIZ-LOZANO, P., ZHOU, Q., CAI, C. & CHEN, J. 2000. Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev*, 95, 259-65.
9. CLEUTJENS, J. P., VERLUYTEN, M. J., SMITHS, J. F. & DAEMEN, M. J. 1995. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*, 147, 325-38.
10. DHEIN, S., VAN KOPPEN, C. J. & BRODDE, O.-E. 2001. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacological research*, 44, 161-182.
11. DVORAKOVA, M., LIPS, K. S., BRÜGGMANN, D., SLAVIKOVA, J., KUNCOVA, J. & KUMMER, W. 2005. Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res*, 319, 201-9.
12. EGMEN, R. M. 2006. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol*, 26, 219-33.
13. FRANGOGIANNIS, N. G. 2006. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1907-39.
14. FREDJ, S., BESCOND, J., LOUAULT, C., DELWAIL, A., LECRON, J. C. & POTREAU, D. 2005. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. *J Cell Physiol*, 204, 428-36.
15. FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
16. FUKUDA, N., WU, Y., NAIR, P. & GRANZIER, H. L. 2005. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*, 125, 257-71.
17. FUNK, F., KRONENBITTER, A., ISIĆ, M., FLOCKE, V., GORREßEN, S., SEMMLER, D., BRINKMANN, M., BECK, K., STEINHOFF, O., SRIVASTAVA, T., BARBOSA, D. M., VOIGT, K., WANG, L., BOTTERMANN, K., KÖTTER, S., GRANDOCH, M., FLÖGEL, U., KRÜGER, M. &

- SCHMITT, J. P. 2022. Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 173, 47-60.
18. FÜRST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. & WEBER, K. 1988. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
  19. GAVIOLI, M., LARA, A., ALMEIDA, P. W., LIMA, A. M., DAMASCENO, D. D., ROCHA-RESENDE, C., LADEIRA, M., RESENDE, R. R., MARTINELLI, P. M. & MELO, M. B. 2014. Cholinergic signaling exerts protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *PLoS one*, 9, e100179.
  20. GERGAŁOVA, G., LYKHMUS, O., KALASHNYK, O., KOVAL, L., CHERNYSHOV, V., KRYUKOVA, E., TSETLIN, V., KOMISARENKO, S. & SKOK, M. 2012. Mitochondria express  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors to regulate  $Ca^{2+}$  accumulation and cytochrome c release: study on isolated mitochondria. *PLoS one*, 7, e31361.
  21. GONZÁLEZ-SANTAMARÍA, J., VILLALBA, M., BUSNADIEGO, O., LÓPEZ-OLAÑETA, M. M., SANDOVAL, P., SNABEL, J., LÓPEZ-CABRERA, M., ERLER, J. T., HANEMAAIJER, R., LARA-PEZZI, E. & RODRÍGUEZ-PASCUAL, F. 2016. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*, 109, 67-78.
  22. GORDAN, R., GWATHMEY, J. K. & XIE, L.-H. 2015. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World journal of cardiology*, 7, 204.
  23. GRÄTER, F., SHEN, J., JIANG, H., GAUTEL, M. & GRUBMÜLLER, H. 2005. Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J*, 88, 790-804.
  24. HAMDANI, N., KOUIJ, V., VAN DIJK, S., MERKUS, D., PAULUS, W. J., REMEDIOS, C. D., DUNCKER, D. J., STIENEN, G. J. & VAN DER VELDEN, J. 2008. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*, 77, 649-58.
  25. HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRÜGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013. Crucial role for  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
  26. HARTZELL, H. C. 1988. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Progress in biophysics and molecular biology*, 52, 165-247.
  27. HEINEKE, J. & MOKKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 589-600.
  28. HELMES, M., TROMBITÁS, K. & GRANZIER, H. 1996. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 79, 619-26.
  29. HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
  30. HIGGINS, C. B., VATNER, S. F. & BRAUNWALD, E. 1973. Parasympathetic control of the heart. *Pharmacol Rev*, 25, 119-55.
  31. HIRANO, T., YASUKAWA, K., HARADA, H., TAGA, T., WATANABE, Y., MATSUDA, T., KASHIWAMURA, S., NAKAJIMA, K., KOYAMA, K., IWAMATSU, A. & ET AL. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-6.

32. HOPF, A. E., ANDRESEN, C., KÖTTER, S., ISÍĆ, M., ULRICH, K., SAHIN, S., BONGARDT, S., RÖLL, W., DROVE, F., SCHEERER, N., VANDEKERCKHOVE, L., DE KEULENAER, G. W., HAMDANI, N., LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2018. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*, 123, 342-355.
33. HOROWITS, R., MARUYAMA, K. & PODOLSKY, R. J. 1989. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J Cell Biol*, 109, 2169-76.
34. HOSHIJIMA, M. 2006. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H1313-25.
35. HURST, R., ROLLEMA, H. & BERTRAND, D. 2013. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther*, 137, 22-54.
36. JAMES, T. N. & SPENCE, C. A. 1966. Distribution of cholinesterase within the sinus node and AV node of the human heart. *Anat Rec*, 155, 151-61.
37. KADRMAS, J. L. & BECKERLE, M. C. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 920-31.
38. KAKINUMA, Y., AKIYAMA, T., OKAZAKI, K., ARIKAWA, M., NOGUCHI, T. & SATO, T. 2012. A non-neuronal cardiac cholinergic system plays a protective role in myocardium salvage during ischemic insults. *PLoS One*, 7, e50761.
39. KAKINUMA, Y., AKIYAMA, T. & SATO, T. 2009. Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *The FEBS journal*, 276, 5111-5125.
40. KAKINUMA, Y., TSUDA, M., OKAZAKI, K., AKIYAMA, T., ARIKAWA, M., NOGUCHI, T. & SATO, T. 2013. Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -related defense mechanisms. *Journal of the American Heart Association*, 2, e004887.
41. KATZ, B. 1956. The role of the cell membrane in muscular activity. *Br Med Bull*, 12, 210-3.
42. KAWADA, T., AKIYAMA, T., SHIMIZU, S., KAMIYA, A., UEMURA, K., LI, M., SHIRAI, M. & SUGIMACHI, M. 2009. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. *Life Sci*, 85, 597-601.
43. KISHI, T. 2012. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *J Cardiol*, 59, 117-22.
44. KISHIMOTO, T., AKIRA, S. & TAGA, T. 1992. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258, 593-7.
45. KNAPPEIS, G. G. & CARLSEN, F. 1968. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 38, 202-11.
46. KNÖLL, R., HOSHIJIMA, M., HOFFMAN, H. M., PERSON, V., LORENZEN-SCHMIDT, I., BANG, M. L., HAYASHI, T., SHIGA, N., YASUKAWA, H., SCHAPER, W., MCKENNA, W., YOKOYAMA, M., SCHORK, N. J., OMENS, J. H., MCCULLOCH, A. D., KIMURA, A., GREGORIO, C. C., POLLER, W., SCHAPER, J., SCHULTHEISS, H. P. & CHIEN, K. R. 2002. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111, 943-55.
47. KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MÜLLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2013. Differential changes

- in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
48. KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GÖDECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRÜGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
  49. KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
  50. KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
  51. KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2009. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 490-8.
  52. KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
  53. KULKE, M., FUJITA-BECKER, S., ROSTKOVA, E., NEAGOE, C., LABEIT, D., MANSTEIN, D. J., GAUTEL, M. & LINKE, W. A. 2001. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res*, 89, 874-81.
  54. LANGE, S., EHLER, E. & GAUTEL, M. 2006. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 16, 11-8.
  55. LARA, A., DAMASCENO, D. D., PIRES, R., GROS, R., GOMES, E. R., GAVIOLI, M., LIMA, R. F., GUIMARAES, D., LIMA, P. & BUENO JR, C. R. 2010. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Molecular and Cellular Biology*.
  56. LEE, S. M., TSUI, S. K., CHAN, K. K., GARCIA-BARCELO, M., WAYE, M. M., FUNG, K. P., LIEW, C. C. & LEE, C. Y. 1998. Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene*, 216, 163-70.
  57. LI, D. L., LIU, B. H., SUN, L., ZHAO, M., HE, X., YU, X. J. & ZANG, W. J. 2010. Alterations of muscarinic acetylcholine receptors-2, 4 and  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor expression after ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37, 1114-1119.
  58. LI, Y., LANG, P. & LINKE, W. A. 2016. Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Sci Rep*, 6, 24492.
  59. LIEDER, H. R., KLEINBONGARD, P., SKYSCHALLY, A., HAGELSCHUER, H., CHILIAN, W. M. & HEUSCH, G. 2018. Vago-Splenic Axis in Signal Transduction of Remote Ischemic Preconditioning in Pigs and Rats. *Circ Res*, 123, 1152-1163.
  60. LINKE, W. A. 2008. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77, 637-48.
  61. LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RÜEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
  62. LINKE, W. A., POPOV, V. I. & POLLACK, G. H. 1994. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J*, 67, 782-92.
  63. MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.

64. MANN, D. L. 2002. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*, 91, 988-98.
65. MASKREY, B. H., MEGSON, I. L., WHITFIELD, P. D. & ROSSI, A. G. 2011. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1001-6.
66. MAVROPOULOS, S. A., KHAN, N. S., LEVY, A. C. J., FALIKS, B. T., SISON, C. P., PAVLOV, V. A., ZHANG, Y. & OJAMAA, K. 2017. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated protection of the rat heart exposed to ischemia reperfusion. *Mol Med*, 23, 120-133.
67. MOIR, A. J., SOLARO, R. J. & PERRY, S. V. 1980. The site of phosphorylation of troponin I in the perfused rabbit heart. The effect of adrenaline. *Biochem J*, 185, 505-13.
68. MONTANO, N., COGLIATI, C., PORTA, A., PAGANI, M., MALLIANI, A., NARKIEWICZ, K., ABBOUD, F. M., BIRKETT, C. & SOMERS, V. K. 1998. Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. *Circulation*, 98, 1394-9.
69. MÜLLER, J., GORRESSEN, S., GRANDOCH, M., FELDMANN, K., KRETSCHMER, I., LEHR, S., DING, Z., SCHMITT, J. P., SCHRADER, J., GARBERS, C., HEUSCH, G., KELM, M., SCHELLER, J. & FISCHER, J. W. 2014. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 109, 440.
70. MURRY, C. E., JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74, 1124-36.
71. NACHMANSOHN, D. & MACHADO, A. L. 1943. THE FORMATION OF ACETYLCHOLINE. A NEW ENZYME: "CHOLINE ACETYLASE". *Journal of Neurophysiology*, 6, 397-403.
72. NAHORSKI, S. R., TOBIN, A. B. & WILLARS, G. B. 1997. Muscarinic M3 receptor coupling and regulation. *Life Sci*, 60, 1039-45.
73. NATHANSON, N. M. 1987. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci*, 10, 195-236.
74. NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
75. NUNTAPHUM, W., PONGKAN, W., WONGJAIKAM, S., THUMMASORN, S., TANAJAK, P., KHAMSEEKAEW, J., INTACHAI, K., CHATTIPAKORN, S. C., CHATTIPAKORN, N. & SHINLAPAWITTAYATORN, K. 2018. Vagus nerve stimulation exerts cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury predominantly through its efferent vagal fibers. *Basic Res Cardiol*, 113, 22.
76. OIKAWA, S., KAI, Y., MANO, A., OHATA, H., NEMOTO, T. & KAKINUMA, Y. 2017. Various regulatory modes for circadian rhythmicity and sexual dimorphism in the non-neuronal cardiac cholinergic system. *Journal of cardiovascular translational research*, 10, 411-422.
77. OLSHANSKY, B., SABBAH, H. N., HAUPTMAN, P. J. & COLUCCI, W. S. 2008. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*, 118, 863-871.
78. PARSONS, S. M., PRIOR, C. & MARSHALL, I. G. 1993. Acetylcholine transport, storage, and release. *Int Rev Neurobiol*, 35, 279-390.
79. PATON, W. D. & ZAIMIS, E. J. 1997. The pharmacological actions of polymethylene bistrimethylammonium salts. 1949. *Br J Pharmacol*, 120, 60-79; discussion 51-9.
80. PERERA, R. K., FISCHER, T. H., WAGNER, M., DEWENTER, M., VETTEL, C., BORK, N. I., MAIER, L. S., CONTI, M., WESS, J., EL-ARMOUCHE, A., HASENFUß, G. & NIKOLAEV, V. O. 2017. Atropine augments cardiac contractility by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase type 4. *Sci Rep*, 7, 15222.

81. PERKIN, J., SLATER, R., DEL FAVERO, G., LANZICHER, T., HIDALGO, C., ANDERSON, B., SMITH, J. E., 3RD, SBAIZERO, O., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2015. Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII $\delta$  Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J*, 109, 2592-2601.
82. PICKARD, J. M. J., BURKE, N., DAVIDSON, S. M. & YELLON, D. M. 2017. Intrinsic cardiac ganglia and acetylcholine are important in the mechanism of ischaemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 112, 11.
83. POMERANZ, B., MACAULAY, R. J., CAUDILL, M. A., KUTZ, I., ADAM, D., GORDON, D., KILBORN, K. M., BARGER, A. C., SHANNON, D. C., COHEN, R. J. & ET AL. 1985. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol*, 248, H151-3.
84. PYLE, W. G. & SOLARO, R. J. 2004. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*, 94, 296-305.
85. RANA, O. R., SCHAUERTE, P., KLUTTIG, R., SCHRÖDER, J. W., KOENEN, R. R., WEBER, C., NOLTE, K. W., WEIS, J., HOFFMANN, R. & MARX, N. 2010a. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Autonomic Neuroscience*, 156, 82-89.
86. RANA, O. R., SCHAUERTE, P., KLUTTIG, R., SCHRÖDER, J. W., KOENEN, R. R., WEBER, C., NOLTE, K. W., WEIS, J., HOFFMANN, R., MARX, N. & SAYGILI, E. 2010b. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Auton Neurosci*, 156, 82-9.
87. RASKIN, A., LANGE, S., BANARES, K., LYON, R. C., ZIESENISS, A., LEE, L. K., YAMAZAKI, K. G., GRANZIER, H. L., GREGORIO, C. C., MCCULLOCH, A. D., OMENS, J. H. & SHEIKH, F. 2012. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, 287, 29273-84.
88. RESUSCITATION, G. F. C. & CARE, E. C. 2000. Part 6: Advanced cardiovascular life support: Section 7: Algorithm approach to ACLS emergencies: Section 7A: Principles and practice of ACLS. American Heart Association in Collaboration with International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation*, 102, I136-I139.
89. ROCHA-RESENDE, C., ROY, A., RESENDE, R., LADEIRA, M. S., LARA, A., DE MORAIS GOMES, E. R., PRADO, V. F., GROS, R., GUATIMOSIM, C. & PRADO, M. A. 2012. Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 53, 206-216.
90. ROSENSHTRAUKH, L., DANILO, P., JR., ANYUKHOVSKY, E. P., STEINBERG, S. F., RYBIN, V., BRITTAIN-VALENTI, K., MOLINA-VIAMONTE, V. & ROSEN, M. R. 1994. Mechanisms for vagal modulation of ventricular repolarization and of coronary occlusion-induced lethal arrhythmias in cats. *Circ Res*, 75, 722-32.
91. ROY, A., DAKROUB, M., TEZINI, G. C., LIU, Y., GUATIMOSIM, S., FENG, Q., SALGADO, H. C., PRADO, V. F., PRADO, M. A. & GROS, R. 2016. Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. *The FASEB Journal*, 30, 688.
92. ROY, A., FIELDS, W. C., ROCHA-RESENDE, C., RESENDE, R. R., GUATIMOSIM, S., PRADO, V. F., GROS, R. & PRADO, M. A. 2013. Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. *The FASEB Journal*, 27, 5072.
93. SAW, E. L., KAKINUMA, Y., FRONIUS, M. & KATARE, R. 2018. The non-neuronal cholinergic system in the heart: A comprehensive review. *J Mol Cell Cardiol*, 125, 129-139.

94. SCHWARTZ, P. J., LA ROVERE, M. T. & VANOLI, E. 1992. Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation*, 85, 177-91.
95. SCHWEITZER, P. & MARK, H. 1980. The effect of atropine on cardiac arrhythmias and conduction. Part 2. *Am Heart J*, 100, 255-61.
96. SHEIKH, F., RASKIN, A., CHU, P. H., LANGE, S., DOMENIGHETTI, A. A., ZHENG, M., LIANG, X., ZHANG, T., YAJIMA, T., GU, Y., DALTON, N. D., MAHATA, S. K., DORN, G. W., 2ND, BROWN, J. H., PETERSON, K. L., OMENS, J. H., MCCULLOCH, A. D. & CHEN, J. 2008. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest*, 118, 3870-80.
97. SOLARO, R. J. 2008. Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem*, 283, 26829-33.
98. THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A. & WHITE, H. D. 2018. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, 138, e618-e651.
99. TIETJE, K. M., GOLDMAN, P. S. & NATHANSON, N. M. 1990. Cloning and functional analysis of a gene encoding a novel muscarinic acetylcholine receptor expressed in chick heart and brain. *J Biol Chem*, 265, 2828-34.
100. TROMBITÁS, K., GREASER, M., LABEIT, S., JIN, J. P., KELLERMAYER, M., HELMES, M. & GRANZIER, H. 1998. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 140, 853-9.
101. UITTERDIJK, A., YETGIN, T., TE LINTEL HEKKERT, M., SNEEP, S., KRABBENDAM-PETERS, I., VAN BEUSEKOM, H. M., FISCHER, T. M., CORNELUSSEN, R. N., MANINTVELD, O. C., MERKUS, D. & DUNCKER, D. J. 2015. Vagal nerve stimulation started just prior to reperfusion limits infarct size and no-reflow. *Basic Res Cardiol*, 110, 508.
102. WANG, H., HAN, H., ZHANG, L., SHI, H., SCHRAM, G., NATTEL, S. & WANG, Z. 2001. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol*, 59, 1029-36.
103. WANG, H., LU, Y. & WANG, Z. 2007. Function of cardiac M3 receptors. *Auton Autacoid Pharmacol*, 27, 1-11.
104. WESSLER, I., KIRKPATRICK, C. J. & RACKÉ, K. 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther*, 77, 59-79.
105. WILLIS, M. S., IKE, C., LI, L., WANG, D. Z., GLASS, D. J. & PATTERSON, C. 2007. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res*, 100, 456-9.
106. WITT, C. C., WITT, S. H., LERCHE, S., LABEIT, D., BACK, W. & LABEIT, S. 2008. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *Embo j*, 27, 350-60.
107. WITT, S. H., GRANZIER, H., WITT, C. C. & LABEIT, S. 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 350, 713-22.
108. YAMASAKI, R., WU, Y., MCNABB, M., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 90, 1181-8.
109. YANG, B., LIN, H., XU, C., LIU, Y., WANG, H., HAN, H. & WANG, Z. 2005. Choline produces cytoprotective effects against ischemic myocardial injuries: evidence for the role of

- cardiac m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Physiol Biochem*, 16, 163-74.
110. YANG, Y., LI, Y., WANG, J., HONG, L., QIAO, S., WANG, C. & AN, J. 2021. Cholinergic receptors play a role in the cardioprotective effects of anesthetic preconditioning: Roles of nitric oxide and the CaMKK $\beta$ /AMPK pathway. *Exp Ther Med*, 21, 137.
  111. YU, L., HUANG, B., PO, S. S., TAN, T., WANG, M., ZHOU, L., MENG, G., YUAN, S., ZHOU, X., LI, X., WANG, Z., WANG, S. & JIANG, H. 2017. Low-Level Tragus Stimulation for the Treatment of Ischemia and Reperfusion Injury in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Proof-of-Concept Study. *JACC Cardiovasc Interv*, 10, 1511-1520.
  112. ZHANG, R., WUGETI, N., SUN, J., YAN, H., GUO, Y., ZHANG, L., MA, M., GUO, X., JIAO, C., XU, W., LI, T., LIU, H. & MA, Y. 2014. Effects of vagus nerve stimulation via cholinergic anti-inflammatory pathway activation on myocardial ischemia/reperfusion injury in canine. *Int J Clin Exp Med*, 7, 2615-23.
  113. ZHANG, R., ZHAO, J., MANDVENO, A. & POTTER, J. D. 1995. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res*, 76, 1028-35.
  114. ZHANG, Y., CHEN, A., SONG, L., LI, M., LUO, Z., ZHANG, W., CHEN, Y. & HE, B. 2016. Low-Level Vagus Nerve Stimulation Reverses Cardiac Dysfunction and Subcellular Calcium Handling in Rats With Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *Int Heart J*, 57, 350-5.
  115. ZHAO, S., DAI, Y., NING, X., TANG, M., ZHAO, Y., LI, Z. & ZHANG, S. 2021. Vagus Nerve Stimulation in Early Stage of Acute Myocardial Infarction Prevent Ventricular Arrhythmias and Cardiac Remodeling. *Front Cardiovasc Med*, 8, 648910.
  116. ZOT, A. S. & POTTER, J. D. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 16, 535-59.
  117. ZOU, P., PINOTSIS, N., LANGE, S., SONG, Y. H., POPOV, A., MAVRIDIS, I., MAYANS, O. M., GAUTEL, M. & WILMANNNS, M. 2006. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature*, 439, 229-33.

## Danksagung

Im Laufe der Promotionsarbeit wird man von vielen Menschen begleitet, dass es eine ganze Arbeit füllen könnte. Dennoch möchte ich ganz besonders Frau Prof. Dr. Martina Krüger danken, die sofort meine Betreuung übernahm, mir in allen Fragen zur Seite stand und mir vieles mit herzlicher Geduld erklärt hat. Auch möchte ich Dr. David Barbossa danken, der mich nur einen kurzen Teil begleiten konnte, aber mir den Start in meine Laborarbeit ermöglicht hat, auch wenn zu Anfang einige Experimente nicht funktioniert haben. Ein Dank gilt Prof. Dr. Schmitt und dem Prüfungskomitee der Fakultät für die Prüfung meiner Arbeit, zusätzlich zu den Kooperationslaboren von Petra Kleinbongardt und Helmut Lieder, ohne deren Vorarbeiten mein Projekt gar nicht zustande gekommen wären. Ich danke auch ganz besonders Sabine Bongart für die sehr gute Einarbeitung in das Laborleben und die tatkräftige Unterstützung bei allen Problemen, vor allem aber für die Gespräche während der Experimente. Dazu gehört selbstverständlich Dr. Sebastian Kötter (Sepp) für die Tipps und Tricks der Experimente und das Erinnern an die Teammeetings jeden Freitag. Auch bei Sina bedanke ich mich, dass wir uns gegenseitig aushelfen konnten. In dem Punkt darf auch Helen nicht fehlen, die mir mit ihren Erfahrungen mit den Experimenten bestimmt so einige Frustration erspart hat. Generell bedanke ich mich bei der ganzen AG Krüger für das wunderbare Team und die großartige Stimmung, da vielen Dank an Martina, Sepp, Sabine, Sina, Helen, Leonie und Johanna.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken: Meinen Eltern, die mir diese Arbeit erst ermöglichen, meiner Schwester und meinem Bruder. Danke für die bedingungslose Unterstützung.