

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Diabetes-induzierte Veränderungen
der acetylcholinergen Rezeptorexpression
in kardialen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Hofebauer

2026

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

gez.:

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

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

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floss

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Das sarkomerische Protein Titin ist zusammen mit extrazellulärem Kollagen entscheidend für die passive Steifigkeit des Myokards. Posttranslationale Modifikationen, wie Hypo- oder Hyperphosphorylierungen, können die mechanischen Eigenschaften des Titins modifizieren, um so den Ansprüchen an die myokardiale Kontraktilität gerecht zu werden. Insbesondere die PKC α -vermittelte Hyperphosphorylierung der Aminosäure S11878 im Titinprotein und die daraus resultierende verstärkte passive Steifigkeit des Titins, wird nach Myokardinfarkt im nicht-ischämischen Myokard beobachtet. Dies wird als Anpassungsmöglichkeit des Herzens gesehen, eine adäquate Auswurfleistung aufrechtzuerhalten. Im Herzen von diabetischen (db/db) Mäusen ist die Hyperphosphorylierung der Aminosäure S11878 bereits im nicht-ischämischen Zustand nachzuweisen, sodass die Adaptationsfähigkeit im diabetischen Myokard nicht weiter ausgeschöpft werden kann. Unklar ist bisher, welcher Signalweg die Hyperphosphorylierung der Aminosäure S11878 vermittelt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass ein Zusammenspiel dreier acetylcholinergere Rezeptoren (M2R, M3R, α 7nR) eine verstärkte PKC α -Aktivität zur Folge haben könnte. Das vorgelegte Projekt hat zum Ziel, die Expression der drei Rezeptoren zu untersuchen und eine Bedeutung für das PKC α *Signalling* zu evaluieren.

Außerdem spielt eine dysregulierte acetylcholinerge Rezeptorexpression eine wichtige Rolle in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie. Es ist bekannt, dass diabetische db/db-Mäuse frühestens ab einem Alter von zwölf Wochen den Phänotyp einer diabetischen Kardiomyopathie entwickeln und sich eine veränderte Expression acetylcholinergere Rezeptoren nachweisen lässt. Unbekannt ist jedoch bisher, ob sich bereits vor Manifestation einer diabetischen Kardiomyopathie Anzeichen einer dysregulierten acetylcholinergen Rezeptorexpression nachweisen lassen. Auch dieser Fragestellung wird sich in der vorgelegten Dissertation genähert.

Zunächst wurde die mRNA-Expression der drei acetylcholinergen Rezeptoren mittels qPCR im Atrium und Ventrikel untersucht. Außerdem wurde die Expression der Proteine der drei Rezeptoren durch Immunfluoreszenzmikroskopie und *Western-Blot* analysiert.

Im Atrium konnte eine signifikant erhöhte Expression der mRNA aller drei Rezeptoren der db/db-Tiere im Vergleich zu db/+Tieren nachgewiesen werden. Diese übertrug sich jedoch nicht auf Ebene der Proteine. Im Ventrikel zeigte sich für die mRNA-Level keine signifikante Veränderung der drei Rezeptoren in den db/db-Tieren. Die Proteinexpression des M2R war jedoch signifikant reduziert und die des α 7nR signifikant erhöht gegenüber den db/+Tiere.

Anhand der Daten konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine verstärkte Expression aller drei Rezeptoren ursächlich für eine verstärkte Aktivität der PKC α im Myokard diabetischer Tiere ist. Die signifikant erhöhte mRNA-Expression der acetylcholinergen Rezeptoren im Atrium deutet darauf hin, dass es bereits deutlich vor Manifestation einer diabetischen Kardiomyopathie zu Veränderungen auf Ebene der mRNA kommt, sich diese jedoch noch nicht auf Proteinebene bzw. den Phänotyp übertragen.

Summary

The sarcomeric protein titin, together with extracellular collagen, is crucial for the passive stiffness of the myocardium. Post-translational modifications, such as hypo- or hyperphosphorylation, can modify the mechanical properties of titin to meet myocardial contractility requirements. In particular, PKC α -mediated hyperphosphorylation of the amino acid S11878 in the titin protein and the resulting increased passive stiffness of titin is observed after myocardial infarction in non-ischemic myocardium. This is seen as an adaptation of the heart to maintain an adequate ejection fraction. In the heart of diabetic (db/db) mice, hyperphosphorylation of S11878 can already be detected in the non-ischemic state, so that the adaptive capacity cannot be increased further in the diabetic myocardium. It is still unclear which signalling pathway mediates the hyperphosphorylation of S11878. Preliminary work by the research group suggests that the interaction of three acetylcholinergic receptors (M2R, M3R, α 7nR) could result in increased PKC α activity. The aim of this project is to investigate the expression of the three receptors and to evaluate their significance for PKC α signalling.

In addition, dysregulated acetylcholinergic receptor expression plays an important role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. It has been described that diabetic db/db mice develop the phenotype of diabetic cardiomyopathy from the age of twelve weeks at the earliest and that an altered expression of acetylcholinergic receptors can be detected. However, it is still unknown whether signs of dysregulated acetylcholinergic receptor expression can be detected even before the manifestation of diabetic cardiomyopathy. This question is also addressed in the dissertation presented here.

The expression of the mRNA of the three acetylcholinergic receptors was examined by qPCR in the atrium and ventricle. Subsequently, the expression of the receptor proteins was analyzed by immunofluorescence microscopy and Western blot.

In the atrium, a significantly increased expression of the mRNA of all three receptors of the db/db animals compared to db/+ animals was detected. However, this was not transferred to the protein stage. In the ventricle, there was no significant change at the mRNA level of the three receptors in the db/db animals, whereas the protein expression of the M2R was significantly reduced and the α 7nR was significantly increased compared to the db/+ animals.

Based on the data, it could not be demonstrated that increased expression of all three receptors results in increased PKC α activity or increased passive stiffness of titin. The significantly increased mRNA expression of the acetylcholinergic receptors in the atrium indicates that changes occur at the mRNA stage well before the manifestation of diabetic cardiomyopathy, but that these are not yet transferred to the protein level or the phenotype.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
α7nR	Alpha-7-nicotinerges-Rezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary-desoxyribonucleic-acid</i> (\triangleq komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Col1a	<i>Collagen-1-a</i> (\triangleq Kollagen-1-a)
Col3a	<i>Collagen-3-a</i> (\triangleq Kollagen-3-a)
DAG	Diacylglycerol
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DTT	Dithiothreitol
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (\triangleq G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GRK-Kanal	<i>G-protein activated inwardly rectifying K⁺ channels</i> (\triangleq G-Protein aktivierter, einwärts gerichteter K ⁺ Kanal)
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i> (\triangleq Hyperpolarisations-aktivierter zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal)
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I/R-Verletzung	Ischämie/Reperfusion-Verletzung
KHK	Koronare Herzerkrankung
Lox11	Lysyloxidase-L1

LoxI2	Lysyloxidase-L2
mRNA	<i>Messenger-ribonucleic-acid</i> (\triangleq Boten-Ribonukleinsäure)
NUDC	<i>Nuclear Distribution C, Dynein Complex Regulator-Gen</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschlusserkrankung
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase-A
PKC	Proteinkinase-C
PKCα	Proteinkinase-C- α
PLC	Phospholipase-C
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
M1R	Muskarin-1-Rezeptor
M2R	Muskarin-2-Rezeptor
M3R	Muskarin-3-Rezeptor
M5R	Muskarin-5-Rezeptor
mAChR	Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
NA	Noradrenalin
nAChR	Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor
NGS	<i>Normal-goat-serum</i>
NNCCS	<i>Non-neuronal cholinergic cardiac system</i> (\triangleq Nicht-neuronales cholinerges kardiales System)
PBS	<i>Phosphate-buffered-saline-Puffer</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (\triangleq quantitative Polymerasekettenreaktion)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
R	Rezeptor

ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (\triangleq Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (\triangleq Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (\triangleq Standardfehler)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBST	<i>TRIS buffered Saline + Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
VNS	Vegetatives Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Prävalenz des Diabetes mellitus	1
1.1.2	Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2.....	1
1.1.3	Klinisches Bild und Komorbiditäten des Diabetes mellitus Typ 2	2
1.1.4	Aktuelle Diagnostik und Therapie des Diabetes mellitus Typ 2	2
1.1.5	Mausmodelle in der Diabetes-mellitus-Typ-2-Forschung.....	3
1.2	Herzmuskulatur	5
1.2.1	Die Myofilamente und das Sarkomer.....	5
1.2.2	Das kardiale Titinfilament	7
1.3	Das menschliche Nervensystem.....	9
1.3.1	Rezeptoren des Parasympathikus.....	11
1.3.2	Der Muskarin-2-Rezeptor im Herzen.....	11
1.3.3	Der Muskarin-3-Rezeptor im Herzen.....	13
1.3.4	Der nicotinerge alpha-7-Rezeptor im Herzen	14
1.3.5	Bedeutung acetylcholinergere Rezeptoren für das Myofilament Titin	14
1.4	Kardiale Extrazellulärmatrix	16
1.4.1	Kollagen-Typ-1-a und Kollagen-Typ-3-a	16
1.4.2	Lysyloxidase-L1 und Lysyloxidase-L2	17
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	<i>Primer</i>	19
2.1.2	Antikörper.....	20
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.4	<i>Kits</i>	22
2.1.5	Puffer	23
2.1.6	Laborgeräte.....	24
2.2	Methoden	27
2.2.1	Tiere.....	27
2.2.2	qPCR-Analyse	28
2.2.3	<i>Western-Blot</i> -Analyse.....	31
2.2.4	Immunfluoreszenzanalyse.....	36
2.3	Software und Statistik	39
3	Ergebnisse	40

3.1 Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Expression kardialer acetylcholinergerezeptoren	40
3.1.1 Relative mRNA-Expression acetylcholinergerezeptoren im linken Ventrikel und in den Atrien	40
3.1.2 Relative Proteinexpression der acetylcholinergerezeptoren im <i>Western-Blot</i> im linken Ventrikel und in den Atrien	42
3.1.3 Relative Proteinexpression der acetylcholinergerezeptoren in der Immunfluoreszenzmikroskopie im linken Ventrikel	44
3.2 Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Expression von Bestandteilen der kardialen Extrazellulärmatrix	48
3.2.1 Relative Expression der Kollagen-mRNA im linken Ventrikel und in den Atrien	48
3.2.2 Relative Expression der Lysyloxidasen-mRNA im linken Ventrikel und in den Atrien.....	50
4 Diskussion.....	52
4.1 Bedeutung der drei acetylcholinergerezeptoren für die Chronotropie, Dromotropie und Inotropie	52
4.2 Bedeutung der drei acetylcholinergerezeptoren für die Kardioprotektion	55
4.3 Bedeutung des Muskarin-2-Rezeptors für das nicht-neuronale cholinerge kardiale System	57
4.4 Bedeutung der drei acetylcholinergerezeptoren für das PKC α - <i>Signalling</i>	58
4.5 Bedeutung der Kollagene und Lysyloxidasen für die passive Steifigkeit im nicht-ischämischen diabetischen Herzen	59
4.6 Limitationen	61
4.7 Schlussfolgerungen	62
5 Literaturverzeichnis	64
6 Anhang.....	77
6.1 Abbildungsverzeichnis	77
6.2 Tabellenverzeichnis	78

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Prävalenz des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) stellt eine der weltweit häufigsten chronisch verlaufenden Erkrankungen dar. Im Rahmen voranschreitender Urbanisierungsprozesse, des demographischen Wandels und veränderter Essgewohnheiten nimmt die Inzidenz Erkrankter stetig zu, was auch einen Anstieg der gesundheitsökonomischen Kosten zur Folge hat (Bommer et al. 2018). So waren weltweit im Jahr 2019 ca. 9,3% der erwachsenen Weltbevölkerung bzw. 463 Millionen Menschen an DM erkrankt und bis ins Jahr 2045 wird der Anteil derer um prognostizierte 51 % ansteigen, auf dann 700 Millionen erkrankte Erwachsene (Saeedi et al. 2019). Heutzutage beträgt der Anteil der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) 90% aller an DM Erkrankten (Chatterjee et al. 2017; Galicia-Garcia et al. 2020).

1.1.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2

Der DMT2 zeichnet sich vor allem durch abnorm erhöhte Glukosespiegel aus, welche durch gestörte Feedbackschleifen zwischen Insulinsekretion und -wirkung ausgelöst werden (Galicia-Garcia et al. 2020). Ursächlich für die gestörte Regulation sind zwei Hauptfaktoren. Auf der einen Seite ist eine inadäquate Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas ursächlich. So lassen sich zum Zeitpunkt der Diagnose bei ca. 50% der Typ-2-Diabetiker ein partieller Untergang der pankreatischen β -Zellen nachweisen (Chatterjee et al. 2017). Auf der anderen Seite kommt es zu einer unzureichenden Anpassung des Insulin-sensitiven Gewebes an Insulinstimulation, einer sogenannten peripheren Insulinresistenz (Galicia-Garcia et al. 2020). Neben diesen Hauptfaktoren hat der DMT2 eine starke genetische Komponente (Yki-Järvinen 2011). Darüber hinaus sind eine Adiponektin-Dysregulation, systemische Entzündungsprozesse, Fehlregulationen des

intestinalen Mikrobioms und des Immunsystems von Bedeutung für die Pathogenese des DMT2 (Galicia-Garcia et al. 2020).

1.1.3 Klinisches Bild und Komorbiditäten des Diabetes mellitus Typ 2

Der DMT2 ist eine Erkrankung, die sich meist in höherem Lebensalter in einem schleichenden Prozess manifestiert. Erste Symptome können Müdigkeit und Abgeschlagenheit sein, sowie im weiteren Verlauf Polydipsie (krankhaft erhöhte Trinkmenge), Polyurie (krankhaft erhöhte Urinausscheidung), nächtliche Wadenkrämpfe, Sehstörungen und Juckreiz (Dietel et al. 2012; Herold 2019). Therapeutisch wichtig sind die langfristigen Komplikationen, die aus einer chronischen Hyperglykämie und extremen Blutzuckerspitzen resultieren. Dazu werden auf der einen Seite makrovaskuläre Komplikationen (Erkrankungen der großen Gefäße) wie eine koronare Herzerkrankung (KHK), peripher arterielle Verschlusskrankung (pAVK) und arterielle Verschlusskrankung der Hirnarterien gezählt. Auf der anderen Seite fallen darunter auch mikrovaskuläre Komplikationen (Erkrankungen der kleinen Gefäße) wie eine Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie [Abschnitt zitiert nach (Dietel et al. 2012; Herold 2019)]. Besonders das Risiko für einen Herzinfarkt ist bei Patienten mit DMT2 erhöht. Männer und Frauen haben ein um mehr als das Doppelte erhöhtes Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden, als nicht-diabetische Patienten (Mulnier et al. 2008). Auch die Mortalität nach einem Herzinfarkt ist bei Patienten mit DMT2 signifikant um mehr als das Doppelte erhöht (Schernthaner 1996; Rawshani et al. 2017).

1.1.4 Aktuelle Diagnostik und Therapie des Diabetes mellitus Typ 2

Bei anamnestischem Verdacht auf DM setzt sich die Diagnostik aus Messung von mindestens zwei der folgenden Parameter zusammen: nüchterner Plasmaglukose, HbA_{1c} (Langzeitblutzuckerwert) und oralem Glukosetoleranztest. Bei zwei pathologisch veränderten Werten wird die Diagnose DM gestellt (Bundesärztekammer et al. 2023). Zur weiteren Differenzierung zwischen einem

DMT1 und DMT2 werden Laborparameter wie Autoantikörper oder das C-Peptid bestimmt und gemeinsam mit dem klinischen Bild des Patienten bewertet, um die endgültige Diagnose zu stellen. Therapeutisch wird angestrebt, die Blutzuckerwerte zu normalisieren, das Körpergewicht, den Blutdruck und die Blutfette zu senken, um akute, aber vor allem chronische Folgen des DMT2 zu verhindern. Die moderne Therapie des DMT2 setzt sich aus mehreren Säulen zusammen. Zuerst wird mittels Lebensstilmodifikation versucht, den Blutzucker und den Langzeitblutzucker zu senken. Bei unzureichendem Therapieerfolg kann die medikamentöse Therapie mit oralen bzw. subcutanen Antidiabetika (z.B. Metformin, SGLT2-Inhibitoren, DPP4-Inhibitoren, GLP1-Analoga) eingeleitet und als Ultima Ratio mit Insulin intensiviert werden (Bundesärztekammer et al. 2023).

1.1.5 Mausmodelle in der Diabetes-mellitus-Typ-2-Forschung

In der heutigen DMT2-Forschung werden vor allem Nagetiere wie Mäuse oder Ratten als Modelltiere genutzt. Dabei werden vier verschiedene Klassen der Modelltiere unterschieden: Modelltiere mit monogenetisch-induziertem Übergewicht, Exemplare mit polygenetisch-bedingtem Übergewicht, sowie welche mit diätetisch-bedingtem Übergewicht und die nicht-übergewichtigen DMT2-Modelle. Zu den monogenetisch bedingten Tiermodellen werden die ob/ob-Mäuse (Ingalls et al. 1950; Zhang et al. 1994), welche einen Defekt im Leptin-Gen aufweisen, die db/db-Mäuse (Hummel et al. 1966), welche einen Defekt im Leptinrezeptorgen haben, und die *Zucker fatty* Ratten (Zucker und Zucker 1961) gezählt. Bei den *Zucker fatty* Ratten prägt sich der diabetische Phänotyp infolge einer verstärkten β -Zell-Apoptose in den insulinproduzierenden Langerhans'schen Inseln des Pankreas aus (Chatzigeorgiou et al. 2009; King 2012). Neben den genannten monogenetisch-induzierten Tiermodellen, gibt es die polygenetisch-induzierten Tiermodelle. In dieser Klasse der DMT2-Tiermodelle entsteht der diabetische Phänotyp durch das Züchten von übergewichtigen Tieren über mehrere Generationen. Beispielhaft für diese Tiermodelle sind die KK/A^y-Mäuse (Kondo et al. 1957) oder die NZO-Mäuse (Bielschowsky und Bielschowsky M. 1956). Ein diabetischer Phänotyp kann auch diätetisch durch das Füttern von *high-fatty*- oder

high-glucose-Futter bedingt sein. Zu dieser Klasse zählen vor allem die *diet-induced obesity* Mäuse (Surwit et al. 1988). Die letzte Klasse der DMT2-Modelltiere sind die nicht-übergewichtigen Modelltiere, wozu unter anderem die GK-Ratte zählt (Goto et al. 1976). Diese Tiere werden ebenfalls über mehrere Generationen gezüchtet und weisen Defekte in der Glukosetoleranz oder im Insulin-Vorläuferprotein Präproinsulin auf. Dadurch entwickelt sich bei den Mäusen ein laborchemischer DMT2-Phänotyp ohne Übergewicht (Chatzigeorgiou et al. 2009; King 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde das db/db-Mausmodell verwendet. Bei diesem Tiermodell führt ein autosomal rezessiver Erbgang zu einer Punktmutation im Leptinrezeptorgen der Mäuse. Dadurch wird vorzeitig ein Stopcodon in das Rezeptorprotein eingebaut, welches die beinahe vollständige Wirkungslosigkeit des Rezeptors zur Folge hat. Leptin ist ein Hormon, welches in reifen, weißen Adipozyten, sowie in geringerem Ausmaß in braunem Fettgewebe, den Ovarien, der Plazenta und im Magen sezerniert wird. Seine Wirkung entfaltet das Hormon im Sinne einer negativen Rückkopplung. Wird Nahrung aufgenommen und wachsen die Fettzellen, wird vermehrt Leptin aus eben jenen Zellen sezerniert. Die Bindung an den hypothalamischen Leptinrezeptor hat zur Folge, dass weniger Nahrung aufgenommen und der Energieverbrauch gesteigert wird (Obradovic et al. 2021). Ist der Leptinrezeptor defekt, führt eine vermehrte Leptinsekretion nicht zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, sondern aufgrund des fehlenden Sättigungsgefühls entwickeln die Mäuse ein ungezügelt Fressverhalten. Die so ausgelöste Hyperphagie bewirkt bei den db/db-Mäusen bereits nach vier Wochen Lebenszeit eine deutliche Gewichtszunahme, die das Dreifache der Kontrolltiere betragen kann. Neben dem Übergewicht zeigen die db/db-Mäuse noch weitere Merkmale des diabetischen Phänotyps. So lassen sich nach zwei Wochen Lebenszeit eine stark ausgeprägte Hyperinsulinämie mit einhergehender Insulinresistenz beobachten und im weiteren Verlauf schwerwiegende Hyperglykämien. Zum Ende der Lebenszeit der db/db-Mäuse nach acht bis zehn Monaten lässt sich häufig eine β -Zell-Dysfunktion beobachten, die sich auch im Endstadium eines DMT2 nachweisen lässt (Chatzigeorgiou et al. 2009).

Zusammen mit dem ob/ob-Mausmodell ist das db/db-Mausmodell das am häufigsten in der DMT2-Forschung verwendete und am häufigsten evaluierte Tiermodell (King 2012; Bingxuan Wang et al. 2014). Es wird seit den 1960er Jahren

in der DMT2-Forschung verwendet (Hummel et al. 1966). Zudem ist die Pathogenese des diabetischen Phänotyps in db/db-Mäusen der Pathogenese des DMT2 bei Menschen sehr ähnlich (Joost et al. 2012). Für die vorgelegte Arbeit ist der kardiale Phänotyp des Tiermodells von besonderer Bedeutung. Bei den db/db-Mäusen lässt sich beobachten, dass sich frühestens nach zwölf Wochen Lebenszeit ein der diabetischen Kardiomyopathie ähnlicher kardialer Phänotyp entwickelt (Funk et al. 2022). Mittels echokardiographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Mäuse zuerst eine diastolische und mit der Zeit auch eine systolische Dysfunktion entwickeln. Insgesamt manifestiert sich auf diese Weise ein kardiales Kontraktionsdefizit ähnlich der humanen diabetischen Kardiomyopathie (Joost et al. 2012). Die kardiale Dysfunktion lässt sich zudem, ähnlich wie bei Patienten mit DMT2, durch Applikation von Antidiabetika positiv beeinflussen und ist im frühen Stadium teilweise reversibel (Joost et al. 2012).

1.2 Herzmuskulatur

Im menschlichen Körper werden drei verschiedene Arten der Muskulatur unterschieden. Einerseits existiert die quergestreifte, willkürlich innervierte Skelettmuskulatur und andererseits die nicht-willkürlich innervierte glatte Muskulatur, zu welcher die Gefäßmuskulatur und die Muskulatur der viszeralen Hohlorgane gezählt werden. Eine Sonderform stellt die Herzmuskulatur dar, welche eine spezialisierte Form der quergestreiften Muskulatur ist. Die Herzmuskulatur ist nicht willkürlich innerviert, weist jedoch die charakteristische mikroskopisch erkennbare Querstreifung auf [Abschnitt zitiert nach (Pape et al. 2014)].

1.2.1 Die Myofilamente und das Sarkomer

Auf funktioneller Ebene stellt das sogenannte Sarkomer die kleinste Funktionseinheit eines Muskels dar (s. Abb. 1). Hunderte in Reihe geschalteter Sarkomere bilden zusammen ein Myofilament, mehrere Myofilamente eine Muskelfaser und mehrere Muskelfasern ein Faserbündel.

Die lichtmikroskopisch erkennbare Querstreifung ist die Folge unterschiedlich stark lichtbrechender Eigenschaften der beiden großen Filamente des Sarkomers, dem Aktin- und Myosinfilament. Aufgrund der stärker lichtbrechenden Eigenschaften erscheint unter dem Lichtmikroskop der Bereich dunkler, in dem die dickeren Myosinfilamente dominieren. Diese Eigenschaft wird als anisotrop bezeichnet und dieser Abschnitt des Sarkomers dementsprechend als A-Band [Abschnitt zitiert nach (Pape et al. 2014)]. Demgegenüber stehen die weniger stark lichtbrechenden Bereiche, die vor allem durch dünnere Aktinfilamente gebildet werden. Im Gegensatz zu den anisotropen Bereichen werden diese weniger stark lichtbrechenden Bereiche als isotrope Bereiche bezeichnet und der Abschnitt im Sarkomer als I-Band. Die regelmäßige Abfolge der A- und I-Band-Regionen im Muskel führt zur charakteristischen Querstreifung der Skelett- und Herzmuskulatur (s. Abb. 1). Neben den beiden Band-Regionen eines Sarkomers lassen sich lichtmikroskopisch die Z-Scheibe und der M-Streifen innerhalb eines Sarkomers erkennen. In der Z-Scheibe (sog. Zwischen-Scheibe) sind die Aktinfilamente über α -Aktininmoleküle verankert. Die Myosinfilamente sind in der Mitte des Sarkomers über Myomesinmoleküle in der M-Scheibe (Bezeichnung leitet sich von den Myomesinmolekülen ab) fixiert (Lange et al. 2020).

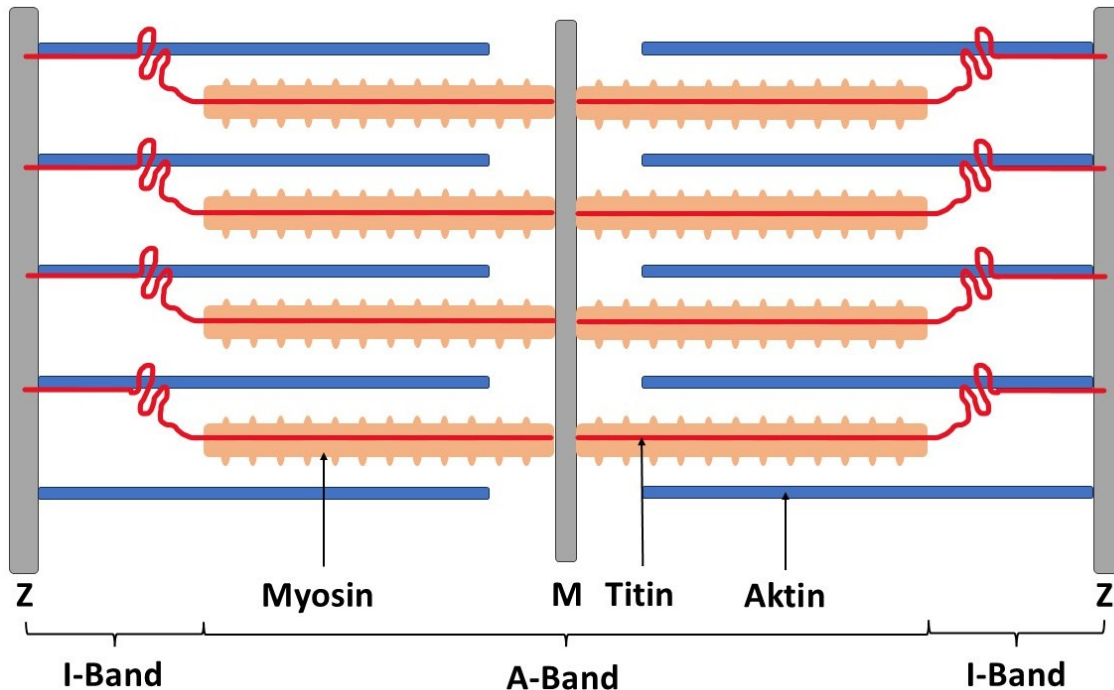


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers

Die drei Filamente Aktin, Myosin und Titin sind die zentralen Bestandteile eines Sarkomers. Aktin und Myosin bewirken durch Ineinandergleiten im Querbrückenzyklus die Verkürzung des Sarkomers. Titin ist durch seine passiven Eigenschaften u.a. an der Rückstellung der Myosin-Filamente nach einem Kontraktionszyklus beteiligt. Ein Titin-Protein durchzieht ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe (\triangleq Z) bis zur M-Linie (\triangleq M). Die Aktin-Moleküle sind in der Z-Scheibe verankert, wohingegen die Myosin-Moleküle in der M-Scheibe fixiert sind. I-Band (\triangleq isotropes Band); A-Band (\triangleq anisotropes Band); [Abb. 1 erstellt und modifiziert nach (Loescher et al. 2022)]

1.2.2 Das kardiale Titinfilament

Neben den Filamenten Aktin und Myosin ist das Titinfilament als drittes Filament am Aufbau des kardialen Sarkomers beteiligt. Ein einzelnes Titinmolekül durchzieht ein Halbsarkomer und ist mit dem C-Terminus in der Z-Scheibe und mit dem N-Terminus im M-Streifen verankert (Wang et al. 1991). Der C-Terminus ist über Nebulette, α -Aktinin und Telethonin in der Z-Scheibe und der N-Terminus über Myomesin in der M-Scheibe fixiert (Kötter et al. 2014; Loescher et al. 2022). Die nicht-elastische A-Band-Region des kardialen Titin-Proteins ist aus hochkonservierten *super-repeat*-Domänen, bestehend aus Fibronectin-3-*like*-Domänen und Immunglobulin-*like*-Domänen, aufgebaut (Loescher et al. 2022). Die elastische I-Band-Region des Titins ist aus proximalen Immunglobulin-*like*-Domänen, der N2B-*unique-sequence*, den mittleren Immunglobulin-*like*-Domänen, der PEVK-Domäne [hauptsächlich gebildet aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K)] sowie

der distalen Immunglobulin-*like*-Domäne zusammengesetzt (Kötter et al. 2014; Loescher et al. 2022).

Die aktive Kraft des Muskels wird durch ein gegenseitiges Verschieben und Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente hervorgerufen [s. Gleitfilamenttheorie nach (Huxley und Hanson 1954)]. Im Gegensatz dazu trägt das Titinfilament bei Dehnung des Sarkomers hauptsächlich zur passiven Kraftentwicklung der Kardiomyozyten bei. So wirkt Titin als molekulare Feder des Sarkomers und ist zusammen mit den Kollagenfasern der Extrazellulärmatrix verantwortlich für die passive Steifigkeit und Elastizität der Muskulatur (Granzier und Labeit 2004; Granzier et al. 2005; Kötter und Krüger 2022). Die Titin-vermittelte Steifigkeit lässt sich kurzfristig über posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Oxidationen, verändern und langfristig über das exprimierte Isoformenverhältnis der steiferen N2B- und der nachgiebigeren N2BA-Isoform anpassen (Kötter et al. 2014). Die passive Steifigkeit des Titins wird mittels posttranslationaler Modifikation vor allem in der elastischen I-Band-Domäne modifiziert. Phosphorylierungen des N2B-Segments (an Aminosäure S4010, S4099, S4185) führen zu einer Reduktion der Steifigkeit und eine Phosphorylierung der PEVK-Domäne (an Aminosäure S11878, S12020) zu einer erhöhten passiven Steifigkeit (Loescher et al. 2022).

Zudem zentriert Titin das Myosin im Sarkomer und verbessert die maximale Kraftentwicklung (Tskhovrebova und Trinick 2010). Außerdem weist Titin mechanosensorische Eigenschaften auf und ist für die längen-abhängige Kraftentwicklung des Sarkomers von Bedeutung. Auf diese Weise hat Titin eine wichtige Bedeutung für den Frank-Starling-Mechanismus und die Anpassung der systolischen Auswurfleistung des Herzens (Linke und Hamdani 2014).

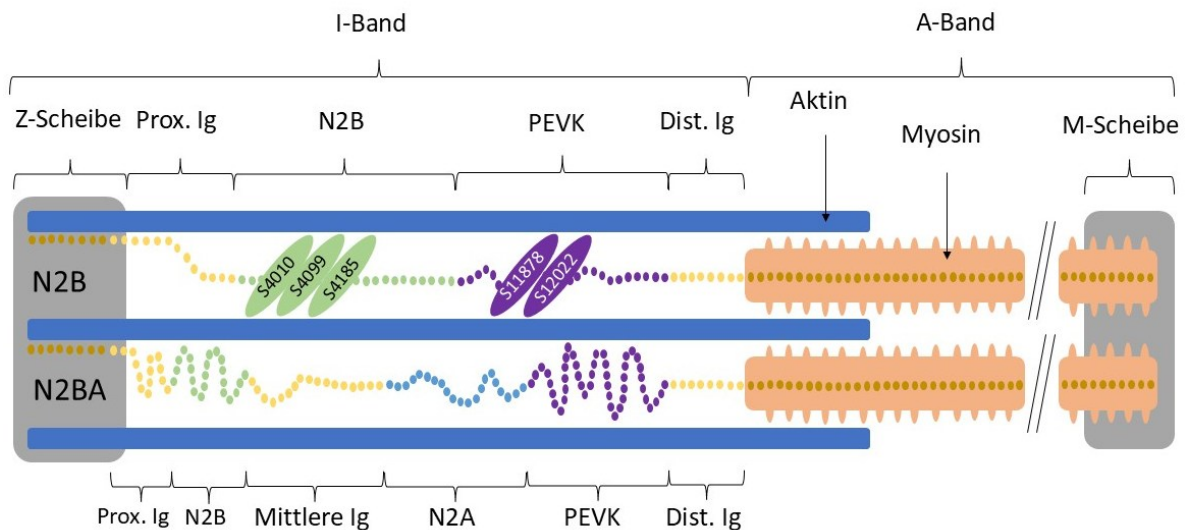


Abb. 2: Schematischer Aufbau der kardialen Titinisoformen N2B und N2BA im Halbsarkomer mit häufigen Phosphorylierungsstellen

Dargestellt ist ein kardiales Halbsarkomer (von der Z-Scheibe bis zur M-Bande). Unterschieden wird der Aufbau der N2B-Isoform und der N2BA-Isoform. Proximale (\cong prox. Ig.) und distale Immunglobulin-Domänen (\cong dist. Ig.) (gelb) (in Bezug auf die Z-Scheibe), die PEVK-Domäne (lila) und das herzspezifische N2B-Element (grün) kommen in beiden Isoformen vor. Die N2BA-Isoform enthält zusätzlich eine mittlere Immunglobulin-Domäne (\cong mittlere Ig.) (gelb) und das N2A-Segment (blau). Dargestellt sind zudem die Phosphorylierungsstellen an Aminosäure S4010, S4099, S4185, S11878 und S12022, die posttranslational modifiziert werden können. Aus Übersichtsgründen sind Phosphorylierungsstellen nur in der N2B-Isoform dargestellt, sie lassen sich aber auch in der N2BA-Isoform nachweisen. [Abb. 2 erstellt und modifiziert nach (Linke und Hamdani 2014; Loescher et al. 2022)]

1.3 Das menschliche Nervensystem

Das menschliche Nervensystem wird funktionell in das somatische und vegetative Nervensystem (VNS) unterteilt. Zum somatischen Nervensystem werden willkürlich innervierte Anteile, wie die Skelettmuskulatur, gezählt. Im Gegensatz dazu lassen sich die vom VNS innervierten Strukturen, wie das Herz, die Blutgefäße oder andere viszerale Organe, nicht willkürlich ansteuern. Beim VNS sind zwei antagonistische Systeme zu unterscheiden. Der aktivitätssteigernde Sympathikus versetzt den Körper in Leistungsbereitschaft und steigert z.B. die Herzfrequenz und die Kontraktionskraft des Herzens, während die gastro-intestinale Motilität reduziert wird. Demgegenüber steht der aktivitätssenkende Parasympathikus. Dieser ist vor allem in Ruhe- und Erholungsphasen aktiv. In diesen Phasen senkt er die Herzfrequenz und Kontraktionskraft, erhöht jedoch die gastro-intestinale Motilität.

Sowohl der Sympathikus als auch der Parasympathikus sind aus zwei nacheinander geschalteten Neuronen aufgebaut, dem vorausgehenden präganglionären und dem nachgeschalteten postganglionären Neuron, das die Zielstruktur innerviert (s. Abb. 3). Die beiden Systeme unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der Rezeptoren und Neurotransmitter. Die präganglionären sympathischen Rezeptoren sind nicotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR), postganglionär lassen sich adrenerge Rezeptoren finden. Dementsprechend ist Acetylcholin (ACh) der präganglionäre sympathische Neurotransmitter. Noradrenalin (NA) ist der Neurotransmitter an der postganglionären Synapse. Genau wie beim Sympathikus sind die präganglionären parasympathischen Rezeptoren nAChR. Die Rezeptoren an der postganglionären Synapse sind jedoch ebenfalls Acetylcholinrezeptoren. Allerdings handelt es sich bei diesen um muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (mAChR) und nicht um nAChR [Abschnitt zitiert nach (Benninghoff und Drenckhahn D. 2004)].

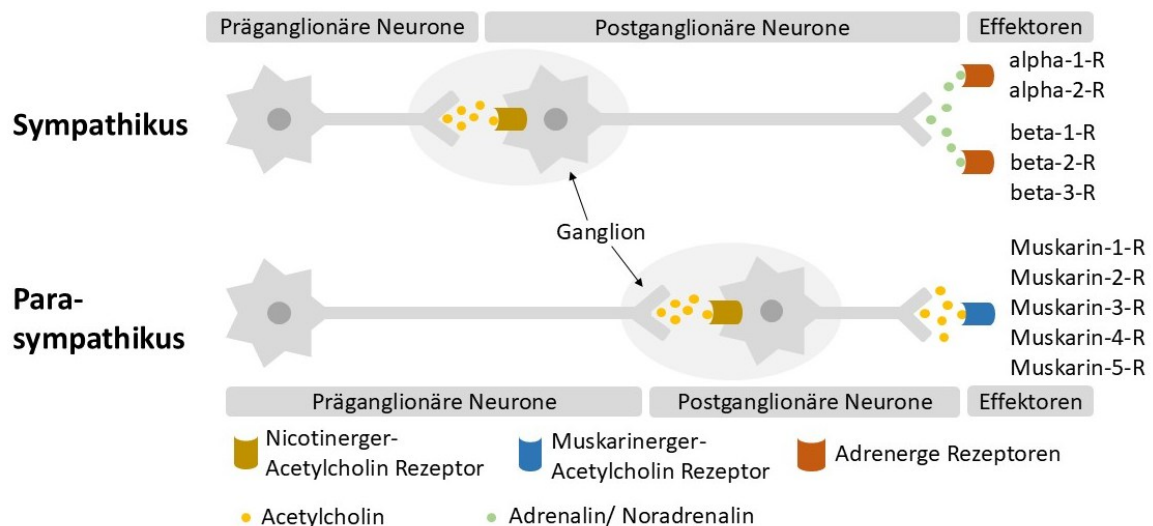


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptoren und Transmitter des vegetativen Nervensystems

Dargestellt ist der schematische Aufbau der beiden Anteile des vegetativen Nervensystems, des Sympathikus und des Parasympathikus. Sie sind beide jeweils aus einem präganglionären und einem postganglionären Neuron aufgebaut. Die präganglionäre Synapse ist bei beiden Anteilen jeweils aus nicotinergen Acetylcholinrezeptoren als Rezeptoren und Acetylcholin als Neurotransmitter aufgebaut. Die postganglionäre Synapse ist jeweils unterschiedlich aufgebaut. Beim Sympathikus bilden adrenerge Rezeptoren (alpha oder beta-Rezeptoren; R. $\hat{=}$ Rezeptor) zusammen mit Noradrenalin die Synapse. Auf Seiten des Parasympathikus besteht die Synapse aus muskarinergen Rezeptoren und Acetylcholin als Neurotransmitter. (Abb. modifiziert nach <https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/vegetatives-nervensystem/13542> und https://next.amboss.com/de/article/oo001S?q=vegetatives+nervensystem&m=PRYWMK&full_screen=true; zuletzt abgerufen am 17.04.2025)

1.3.1 Rezeptoren des Parasympathikus

Die präganglionären nAChR zählen zu den ionotropen bzw. Liganden-gekoppelten Rezeptoren. Bei Bindung des Liganden ACh an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung und die Kanalpore des Rezeptors öffnet sich. Dadurch strömen Na^+ -Ionen von extra- nach intrazellulär, das Ladungsverhältnis verschiebt sich im Sinne einer Depolarisation und die Erregung der Zelle ist die Folge (Heinrich et al. 2014). Bei den postganglionären AChR handelt es sich um mAChR. Im Gegensatz zu den nAChR sind dies keine ionotropen Rezeptoren, sondern metabotrope bzw. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Heinrich et al. 2014; Kruse et al. 2014). Die mAChR werden nach dem aktuellen Stand der Forschung nochmals in fünf Subtypen M1-M5 unterteilt. Die Wirkung der mAChR ist aufgrund multipler intrazellulärer GPCR-Signalkaskaden äußerst komplex und wird nachfolgend eingehender beschrieben.

1.3.2 Der Muskarin-2-Rezeptor im Herzen

Beim Muskarin-2-Rezeptor (M2R) handelt es sich um den prädominanten Muskarin-Rezeptor im menschlichen Herzen (Saternos et al. 2018). Neben dem M2R lassen sich im Herzen Muskarin-1-Rezeptoren (M1R) und Muskarin-3-Rezeptoren (M3R) nachweisen. Der M2R wird im menschlichen Herzen sowohl in den Atrien als auch in den Ventrikel exprimiert, wobei die Expression in den Atrien bis zu 2,5-fach höher ist als im ventrikulären Myokard (Saternos et al. 2018). Der M2R ist ein G_i gekoppelter Rezeptor, der bei Aktivierung mittels der G_α -Untereinheit (UE) das Enzym Adenylatcyclase inhibiert und dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel senkt (Haga 2013; Saternos et al. 2018). Infolgedessen wird die Proteinkinase A (PKA) weniger aktiviert und Proteinphosphorylierungen - am Herzen vor allem Phosphorylierungen der *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels* (HCN-Kanäle) - sind reduziert. Die verringerte Aktivierung dieser HCN-Kanäle führt zu einer verlangsamten Depolarisation der Zelle und damit zu einer verringerten Herzfrequenz ($\hat{=}$ negative Chronotropie) (Pape et al. 2014). Zusätzlich werden über die $G_{\beta\gamma}$ -UE in der Zellmembran der Kardiomyozyten *G-protein activated inwardly rectifying K^+ channels* (GRK-Kanäle) aktiviert. Dadurch kommt es

zu einem Ausstrom von K^+ -Ionen und die Zelle wird hyperpolarisiert, was wiederum zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials beiträgt. Die Zelle ist also „schwerer“ zu depolarisieren (\triangleq negative Dromotropie) (Pape et al. 2014). Des Weiteren hat die Aktivierung des M2R einen verringerten Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol während des Aktionspotentials und eine verringerte Ausschüttung von Noradrenalin zur Folge (Pape et al. 2014). Dadurch wirkt des M2R am Herzen zusätzlich verringern auf die Kontraktionskraft (\triangleq negative Inotropie). Zusammengenommen hat eine Aktivierung der M2R am Herzen eine negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Wirkung.

Neben den oben beschriebenen Funktionen spielt der M2R eine wichtige Rolle bei der Reduktion von Ischämie-/Reperfusionen-Verletzungen (I/R-Verletzungen) sowie der Kardioprotektion. Die Aktivierung des M2R hat protektive Einflüsse und kann die Auswirkungen einer ischämischen Verletzung bei Gefäßverengungen oder -verschlüssen am Herzen deutlich reduzieren (Intachai et al. 2018). Durch die M2R-Aktivierung wird die Phosphorylierung der *mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) moduliert und infolgedessen die Synthese des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) verringert. Dies hat eine geringere Nekrose des myokardialen Gewebes und einen kardioprotektiven Effekt zur Folge (Li et al. 2011). Zudem werden über eine muskarinerge Rezeptoraktivierung, vermutlich über M2R, mitochondriale Transkriptionsfaktoren (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; PPAR γ) aktiviert und schließlich die mitochondriale Biogenese angeregt (Sun et al. 2013). In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass eine gestörte mitochondriale Biogenese eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Herzinsuffizienz spielt (Garnier et al. 2003), der durch eine muskarinerge Stimulation bei I/R-Verletzungen entgegen gewirkt werden kann. Darüber hinaus kann die ACh-vermittelte Stimulation von M2R sowohl die mitochondriale als auch die zytosolische Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren. Die M2R-Aktivierung führt nach I/R-Verletzung im betroffenen Herzmuskel zu einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, der Xanthinoxidase und der NADPH-Oxidase, was eine Reduktion der ROS Menge zur Folge hat und zytoprotektiv wirkt (Miao et al. 2013).

Zusammenfassend hat eine Aktivierung des M2R negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Wirkungen am Herzen. Zudem vermittelt der M2R im Rahmen von I/R-Verletzungen wichtige kardioprotektive Effekte.

1.3.3 Der Muskarin-3-Rezeptor im Herzen

Der M3R lässt sich im menschlichen Herzen sowohl in den Atrien als auch in den Ventrikeln nachweisen, wobei die Expression im Ventrikel zehnfach höher ist, als in den Vorhöfen (Wang et al. 2007; Saternos et al. 2018). Ebenso wie beim M1R und Muskarin-5-Rezeptor (M5R) handelt es sich beim M3R um einen G_q gekoppelten GPCR (Saternos et al. 2018). Infolge einer Rezeptoraktivierung, bindet Guanosin triphosphat an das G_q -Protein, wodurch die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1, 4, 5-trisphosphat (IP3). Durch den Second-Messenger IP3 werden aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) Ca^{2+} -Ionen freigesetzt. Über die erhöhte Calcium-Konzentration beeinflusst der M3R vor allem die Regulation der Herzfrequenz sowie die kardiale Repolarisation und Modulation inotroper Effekte (Wang et al. 2007). Darüber hinaus geht man davon aus, dass über den M3R wichtige kardioprotektive Effekte nach I/R-Verletzungen vermittelt werden. Beispielsweise kann durch die Aktivierung des M3R die ischämisch bedingte Infarktgröße (Intachai et al. 2018) ebenso wie die Apoptose kardialer Zellen, die Proliferation kardialer Fibroblasten und die Kollagensekretion, signifikant reduziert werden. Verantwortlich dafür ist der *Transforming growth factor β* (TGF β) und die MAPK, welche das proliferative und apoptotische Signal verringern (Yang et al. 2005; Zhao et al. 2019). Zudem haben M3R einen protektiven Effekt gegenüber Ischämie-induzierten Arrhythmien (Wang et al. 2012). Somit lässt sich für den M3R zusammenfassend festhalten, dass auch dieser einen wichtigen kardioprotektiven Effekt bei I/R-Verletzungen hat.

1.3.4 Der nicotinerge alpha-7-Rezeptor im Herzen

Der alpha-7 nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor ($\alpha 7nR$) ist ein ionotroper Rezeptor. Dieser ist aus fünf α -UE mit einer zentralen Pore aufgebaut, welche vor allem für Ca^{2+} -Ionen permeabel ist (Corradi und Bouzat 2016; Ren et al. 2017; Bouzat et al. 2018). Die Klassifizierung des $\alpha 7nR$ als rein ionotroper Rezeptor wird mittlerweile kritisch angesehen, da in der weiteren Signalkaskade auch G-Proteine eine Rolle spielen und der Rezeptor auf diese Weise auch metabotrope Effekte hat (Corradi und Bouzat 2016). Der $\alpha 7nR$ wird kardial vorrangig in den Ventrikeln und in geringerer Menge auch in den Atrien exprimiert (Dvorakova et al. 2005). Auf zellulärer Ebene lässt sich der $\alpha 7nR$ in kardialen Neuronen, Fibroblasten und Kardiomyozyten nachweisen (Dvorakova et al. 2005). Nach heutigem Stand der Forschung weist der $\alpha 7nR$ vielfältige Wirkungen auf, wobei die einzelnen Signalkaskaden immer noch Bestandteil der aktuellen Forschung sind. Bekannt ist, dass der aktivierte Rezeptor die Infarktgröße nach I/R-Verletzungen reduzieren oder zumindest stabilisieren kann (Kiss et al. 2017). Insgesamt betrachtet lassen sich die kardialen Funktionen des $\alpha 7nR$ als anti-apoptotisch und anti-oxidativ beschreiben (Intachai et al. 2018). Zu diesen Wirkungen kommt es, indem das ROS- und p38-MAPK-Level reduziert werden (Mavropoulos et al. 2017) und über PI3K-/ Akt-/ STAT3-Signalkaskaden die Immunzellproliferation, T-Helfer-Zellproliferation und Antigenpräsentation moduliert werden (Ren et al. 2017). Vor allem über die Beeinflussung des STAT3-Signalweges, werden pro-apoptotische und pro-inflammatorische Zytokine wie $TNF\alpha$, Interleukin-6, $NF\kappa B$ und p65 gehemmt (Li et al. 2012). Schlussendlich kann durch Aktivierung des $\alpha 7nR$ nach I/R die Kontraktionskraft verstärkt werden, sodass die Auswurfleistung des Herzens verbessert aufrechterhalten werden kann (Mavropoulos et al. 2017).

1.3.5 Bedeutung acetylcholinergischer Rezeptoren für das Myofilament Titin

Intrazelluläre Kinasen (PKA, ERK, $PKC\alpha$) phosphorylieren das sarkomerische Protein Titin, wodurch die mechanischen Eigenschaften im Sinne einer Erhöhung oder Verringerung der passiven Steifigkeit akut oder chronisch verändert werden können (Hidalgo et al. 2009; Loescher et al. 2022). So wird beispielsweise vermutet,

dass nach einem Myokardinfarkt die Kontraktilität und Auswurfleistung des nicht-ischämischen Herzmuskels durch akute und transiente Phosphorylierungen von Titin unterstützt werden (Kötter et al. 2016).

Bei Mäusen mit einem DMT2-Phänotyp ist die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im Vergleich zu Mäusen ohne DMT2 dauerhaft signifikant erhöht (Funk et al. 2022). Diese erhöhte passive Steifigkeit ist Folge einer persistierenden Hyperphosphorylierung der Aminosäure S11878 im Titinprotein durch die Proteinkinase-C- α (PKC α) (Hopf et al. 2018; Funk et al. 2022). Aufgrund der basal erhöhten passiven Steifigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten bei DMT2-Mäusen, kann die kontraktile Funktion des Myokards beispielsweise nach Herzinfarkt nicht adäquat aufrechterhalten werden. Auf Grundlage dieses Wissens stellte sich die Frage, welcher Signalweg die PKC α vermittelte Hyperphosphorylierung bei DMT2 auslöst. Zudem ist bisher ebenso unklar, zu welchem Zeitpunkt der diabetischen Erkrankung die erhöhte Phosphorylierung des S11878 ausgelöst wird und welche Mechanismen dazu führen, dass diese Veränderungen dauerhaft sind.

Bisher nicht publizierte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Krüger deuten darauf hin, dass ein Zusammenspiel mehrerer Acetylcholin-abhängiger Rezeptoren (M2R, M3R, α 7nR) an der Titin-vermittelten Erhöhung der Kardiomyozytensteifigkeit beteiligt sein könnte (s. Abb. 4).

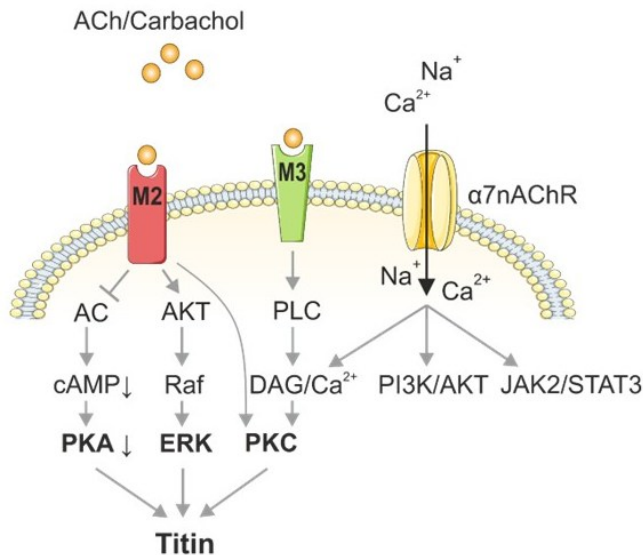


Abb. 4: Schema der möglichen ACh-Rezeptor-vermittelten Signalwege zur Modulation der Titin-basierten passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten

Die Abbildung zeigt die ACh-Signalwege inklusive der Kinasen, die die elastische I-Band Domäne phosphorylieren.

1.4 Kardiale Extrazellulärmatrix

1.4.1 Kollagen-Typ-1-a und Kollagen-Typ-3-a

Die kardiale Extrazellulärmatrix ist vor allem aus filamentären Proteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen aufgebaut (Del Monte-Nieto et al. 2020). Dabei macht Kollagen-Typ-1-a (Col1a) ca. 85% und Kollagen-Typ-3-a (Col3a) ca. 11% der kardialen Extrazellulärmatrix aus (Kong et al. 2014; Rodríguez und Martínez-González 2019), sodass diese die häufigsten kardialen Kollagentypen darstellen (Del Monte-Nieto et al. 2020). Am Herzen tragen die Kollagene v.a. zur Formgebung und Stabilität des Gewebes bei. Außerdem beeinflussen Kollagene die Proliferation, Migration und Differenzierung der umgebenden Zellen (v.a. Kardiomyozyten und Fibroblasten) (Heinrich et al. 2014) und sind ein wichtiges Reservoir für Signalmoleküle (Del Monte-Nieto et al. 2020). Des Weiteren sind die Kollagene der kardialen Extrazellulärmatrix zusammen mit dem sarkomerischen Protein Titin für die passive Steifigkeit und die diastolische Funktion der Herzmuskulatur von entscheidender Bedeutung (Granzier et al. 2005). Verstärkte Kollagenexpression kann eine kardiale Fibrose und diastolische Dysfunktion zur

Folge haben, die essentiell in der Entstehung einer diabetischen Kardiomyopathie ist (Giardinelli et al. 2024).

Bei Typ-2-diabetischen Mäusen konnte in bisherigen Studien zur kardialen Extrazellulärmatrix teilweise eine verstärkte Expression von Col1a (Hutchinson et al. 2013; Deng et al. 2022) und von Col3a (Funk et al. 2022; Deng et al. 2022) nachgewiesen werden. Außerdem konnte in vitro gezeigt werden, dass Kardiomyozyten diabetischer Mäuse bereits unter normoglykämischer Stoffwechsellage einen profibrotischen Phänotyp aufweisen (Hutchinson et al. 2013). Auch bei Menschen ist aus Metastudien bekannt, dass Patienten mit einem Diabetes mellitus einen höheren Grad myokardialer Fibrose aufweisen als Patienten ohne Diabetes mellitus (Salvador et al. 2022).

1.4.2 Lysyloxidase-L1 und Lysyloxidase-L2

Bei Lysyloxidasen handelt es sich um eine Gruppe von fünf kupferabhängigen Enzymen, welche die posttranslationale Quervernetzung von Kollagenfasern mit benachbarten Kollagenfasern katalysieren. Dabei oxidieren die Lysyloxidasen die Lysyl- und Hydroxyllysylgruppen der Kollagenfasern, woraufhin diese spontan mit Aminogruppen der benachbarten Kollagenfasern reagieren und stabile Querbrücken ausbilden können (Rodríguez und Martínez-González 2019).

Aus Tierexperimenten mit diabetischen Mäusen und humanen Daten ist bekannt, dass eine verstärkte Expression der Lysyloxidasen eine kardiale Fibrose sowie eine erhöhte Steifigkeit des linken Ventrikels begünstigt und zur Pathogenese einer diabetischen Kardiomyopathie beiträgt (Rodríguez und Martínez-González 2019).

Insbesondere die Lysyloxidase-L2 (Loxl2) spielt bei der Entwicklung einer kardialen Fibrose eine entscheidende Rolle (Rodríguez und Martínez-González 2019). Außerdem wird eine pathologisch verstärkte Expression von Loxl1 und Loxl2 mit Myokardinfarkten, negativem kardialen Remodelling, Hypertonie und Übergewicht in Verbindung gebracht (Martínez-González et al. 2019).

1.5 Zielsetzung

Vor dem in der Einleitung dargestellten Hintergrund hat die vorgelegte Arbeit folgendes Ziel: Es soll die Expression der drei acetylcholinergen Rezeptoren (M2R, M3R, $\alpha 7nR$) bei zehn bis zwölf Wochen alten Mäusen mit DMT2-Phänotyp (db/db-Mausmodell) und gleichaltrigen Mäusen ohne DMT2-Phänotyp (db/+Mausmodell) untersucht werden. In diesem Alter der Tiere lässt sich noch keine kardiale Funktionseinschränkung nachweisen. Zudem gilt es zu klären, inwiefern bereits in diesem frühen Krankheitsstadium Veränderungen in den ACh-abhängigen Signalwegen vorliegen, die an der PKC α -vermittelten Hyperphosphorylierung von Titin und dem Anstieg der passiven Zellsteifigkeit in diabetischen Herzen beteiligt sein könnten.

Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird die relative Genexpression des M2R, M3R und $\alpha 7nR$ in diabetischen und nicht-diabetischen Mäuseherzen verglichen. Zudem wird die Proteinexpression der acetylcholinergen Rezeptoren mittels immunhistochemischen Färbungen und *Western-Blot*-Analysen untersucht.

Um das Vorliegen von fibrotischen Veränderungen in den Geweben zu untersuchen, werden zudem die relative Genexpression von Col1a und Col3a und der Loxl1 und Loxl2 analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen soll zeigen, inwiefern zu einem so frühen Zeitpunkt der diabetischen Erkrankung eine veränderte Zusammensetzung der kardialen Extrazellulärmatrix vorliegt, die die Ventrikelfunktion beeinflussen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primer

Zur Durchführung der Experimente sind die in Tabelle 1 genannten *Primer* verwendet worden.

Tabelle 1: Primer

Primer-Target	Primer/Oligo Bezeichnung	Sequenz (in 5' – 3' Richtung)	Hersteller
Muskarinerges ACh-Rezeptor 2	FM1_Chrom2	AGTCAGTGACAGGTTTAAATG	Sigma-Aldrich
	BM1_Chrom2	GGACTGGTAATAGCCAAAC	
Muskarinerges ACh-Rezeptor 3	FM1_Chrom3	TCAGCAAAGGTACAATAAGG	
	BM1_Chrom3	TCTGACATAGTCCAAGGAAG	
Nicotinerges ACh-Rezeptor $\alpha 7$	FM1_Chrom7	CTGTCTTACTTTCTCTGACTG	
	BM1_Chrom7	GAAGTACTGTGCTATCAAGG	
<i>Nuclear Distribution C, Dynein Complex Regulator</i>	FM1_Nudc	AGAACTCCAAGCTATCAGAC	
	BM1_Nudc	CTTCAGGATTTCTGTTTCTTC	
Kollagen-1a	FM2_Col1a1	GATCTGTATCTGCCACAATG	
	BM2_Col1a1	TGGTGATACGTATTCTTCCG	
Kollagen-3a	FM1_Col3a1	ACTCAAGAGTGGAGAATACTG	
	RM1_Col3a1	AACATGTTTCTTCTCTGCAC	
Lysyloxidase-L1	FM1_Loxl1	CAAGTACATTGTTCTGGAGTC	
	RM1-Loxl1	CTTTTCAAGGAGAGACAAGG	

Lysyloxidase-L2	FM1_LoxI2	AGACTGCAAATTCAACACAG	
	RM1_LoxI2	CATTTCTCTCTGTTAGCACC	

2.1.2 Antikörper

Zur Durchführung der Experimente sind die in Tabelle 2 genannten Primär- und Sekundärantikörper verwendet worden.

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper:	
Antikörper	Hersteller
<i>α-Actinin-Antibody</i>	Cell Signaling
<i>Anti-Muscarinic Acetylcholine Receptor 2/ CM2 antibody [EPR4568] (ab109226)</i>	Abcam
<i>Anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha-7 antibody (ab216485)</i>	Abcam
<i>CHRM3 Polyclonal Antibody (anti-muscarinic Acetylcholine Receptor 3 antibody)</i>	Invitrogen
Sekundärantikörper:	
Antikörper	Hersteller
<i>Anti-Rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor (R) 555 Molecular Probes</i>	Cell Signaling Technology
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	Cell Signaling Technology
WGA-Alexa-488 (grün)	Molecular Probes

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Zur Durchführung der Experimente sind die in Tabelle 3 genannten Chemikalien verwendet worden.

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung der Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Rotiphorese Gel 30	Roth
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Wacker
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific
<i>Bradford-Reagent</i>	Sigma
Chloroform	Merck
DAPI-Fluoromount G ®	Southern Biotech
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol (absolut)	vWR-Chemicals
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Harnstoff	Millipore
Immersionsöl	Roth
<i>Immobilion ECL Ultra Western HRP Substrate HRP Solution A und B</i>	Merck
Isopropanol	vWR-Chemicals
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma
Methylbutan (C ₅ H ₁₂)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Merck

Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS \triangleq <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	Roth
<i>Normal-Goat-Serum</i> (NGS)	Jackson-Immuno-Research
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Polysorbat 20 (<i>Tween 20</i>)	Sigma
<i>Protein Ladder (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder)</i>	Thermo Scientific
RNase-freies Wasser	Qiagen
Saponin (tanninfrei)	Roth
Serva <i>Blue-R</i> (Coomassie-Brillantblau)	Serva
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	ITW Reagents
Thioharnstoff	Sigma
Tricin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Trizol	Ambion

2.1.4 Kits

Zur Durchführung der Versuche sind die in Tabelle 4 genannten *Kits* verwendet worden.

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung des Kit	Hersteller
<i>GoScript™ Reverse Transcription System</i>	Promega

GoTaq® qPCR Master Mix	Promega
------------------------	---------

2.1.5 Puffer

Zur Durchführung der Experimente sind die in Tabelle 5 genannten Puffer verwendet worden.

Tabelle 5: Puffer

Bezeichnung des Puffers	Zusammensetzung
Anodenpuffer für <i>Semi-Dry Blot</i>	300mM TRIS/ HCl pH 8,8 100mM Tricin
Entfärbelösung für PVDF-Membranen (PVDF- <i>Destain</i>)	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung für PVDF-Membranen (PVDF- <i>Stain</i>)	0,075% (v/v) <i>Serva-Blue</i> in Methanol
Kathodenpuffer für <i>Semi-Dry Blot</i>	30mM TRIS/ HCl pH 8,7 300mM Aminocaprinsäure
10x-Natriumdodecylsulfat (SDS)- Laufpuffer	250mM TRIS 2M Glycin 1% (w/v) SDS
1x <i>Phosphate-Buffered-Saline-Buffer</i> (PBS)	0,2g Kaliumchlorid (KCl) 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 8,0g Natriumchlorid (NaCl) 1,17g Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) pro 1 Liter Wasser

SDS-Probenpuffer (\cong Titinprobenpuffer)	50mM TRIS/ HCl, pH 6,8 8M Harnstoff 2M Thioharnstoff 3% SDS 0,035% Serva-Blue 10% Glycerol
4x SDS-Sammelgelpuffer	500mM TRIS/ HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
4x SDS-Trenngelpuffer	1,4M TRIS/ HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
10x TRIS <i>buffered Saline</i> + Tween (TBST)	200mM TRIS/ HCl 1,5M NaCl 1% (v/v) Tween 20

2.1.6 Laborgeräte

Zur Durchführung der Experimente sind die in Tabelle 6 genannten Laborgeräte verwendet worden.

Tabelle 6: Laborgeräte

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Hersteller
96-Well-PCR-Platte		Applied Biosystems
Autoklave	Autoklav VX-100	Systec
Chemilumineszenz <i>Imager</i>	Imager Fusion FX	Vilber and Lourmat
Heizblock	<i>Dry Block Heater</i>	IKA
	Thermomixer 5437	Eppendorf

Homogenisator	<i>Tissue Ruptor</i>	Qiagen
Homogenisatorspitzen	<i>Tissue Ruptor Spitzen (Disposable Probes)</i>	Qiagen
Klebefolie für 96-Well PCR-Platte		Applied Biosystems
Kombischüttler	SM-30	Edmund Bühler
Kryostat	Leica CM 1850	Leica
Küvetten	Photometer Küvetten	Sarstedt
Mikroskop	Keyence DME	Keyence
PCR-Cycler	<i>Master cycler Nexus gradient</i>	Eppendorf
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech
	Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	PeqLab
<i>Power Pack</i>	Standard P25T	Biometra
PVDF-Membran	Roti-PVDF, Porengröße 0,45µm	Roth
qPCR-System	StepOne Plus	Applied Biosystems
Rollenmischer		CAT
Sammelröhrchen	1,0mL; 1,5mL; 2,0mL	Eppendorf
Thermometer	TD 130; <i>High Precision Thermometer</i>	vWR Insturemts
<i>Tissue Tek</i>	<i>OCT Embedding Matrix for Frozen Sections</i>	Cell Path
Tischzentrifuge	Mini Star Silverline	vWR
Vortex	Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG
	Reax Control	Heidolph

Waage	ADB 200-4	Kern&Sohn
<i>Western Blot Transfer System</i>	<i>Western Blot</i> Trans-Blot Turbo	Biorad
<i>Whatman Paper</i>		Whatman
Zentrifuge	<i>Centrifuge</i> 5430R	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

2.2.1.1 Versuchstiere

Bei den für die Experimente verwendeten Versuchstieren handelte es sich um zehn bis zwölf Wochen alte männliche, homozygote db/db-Tiere, deren heterozygoten db/+Geschwistertiere als Kontrollgruppe genutzt wurden (db/db Mice (JAX® Mice Strain), BKS.Cg-*Dock7^m+/+Lepr^{db}J*). Die Tiere wurden im Alter von acht bis neun Wochen vom Züchter (Charles River *Laboratories*) geliefert und haben sich mindestens zwei Wochen an die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angepasst.

2.2.1.2 Tierversuche

Bereits die Haltung der db/db- und db/+-Tiere ist nach geltender Jurisdiktion ein Tierversuch. Weitere Eingriffe oder Tierversuche wurden nicht durchgeführt. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzausschuss der zuständigen Behörde (Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, LANUV) durchgeführt, das die experimentellen Protokolle evaluierte und genehmigte (Az. 84-02.04.2017.A145; Az. 81-02.04.2023.A117). Die in dieser Dissertation verwendeten Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf gehalten, bei konstanter Temperatur von 22°C, alternierenden Lichtverhältnissen (12h/12h Tag-Nacht-Zyklus) sowie mit dauerhaftem und unlimitiertem Zugang zu Wasser und Standard-Futter. Die Tiertötungen mittels zervikaler Dislokation und Organentnahmen wurden von Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger, Herr Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Kötter, Frau Katharina Voigt M.Sc. und Frau Sabine Bongard durchgeführt, die über die benötigte Sachkenntnis gemäß §11 TSchG verfügen. Die entnommenen Herzen wurden auf Eis gelagert und getrennt in linken Ventrikel, rechten Ventrikel und Atrienebene. Anschließend wurden die Herzen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 qPCR-Analyse

2.2.2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus Gewebe kam das Trizol-Reagenz der Firma Ambion zur Anwendung. Zuerst musste das zu untersuchende Gewebestück in 1mL Trizol-Reagenz mittels *Tissue-Ruptor* homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur (RT) für drei bis fünf Minuten inkubiert werden. Danach wurde pro Milliliter Trizol 0,2mL Chloroform hinzugegeben, das Sammelröhrchen zehn Mal invertiert und nochmals für zwei bis drei Minuten bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Probe für zehn Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, wodurch eine drei-schichtige Phasentrennung entstand. Die obere wässrige Phase konnte abgenommen und in ein neues Sammelröhrchen überführt werden. Diese Phase wurde mit 500µL Isopropanol pro Milliliter Trizol versetzt, erneut zehn Minuten bei RT inkubiert und nochmals für zehn Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das entstandene Pellet mit 75% Ethanol resuspendiert. Das Sammelröhrchen wurde anschließend gevortext, um das Pellet vollständig vom Boden abzulösen. Dem folgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 7.500 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT vollständig getrocknet. Schließlich wurde das getrocknete Pellet mit 30µL RNase-freiem Wasser resuspendiert und zur vollständigen Lösung des Pellets für zehn Minuten bei 55°C im Heizblock erwärmt.

Nun lag die isolierte RNA in RNase-freiem Wasser vor und wurde entweder sofort weiterverarbeitet, oder längerfristig bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Spektrophotometrie zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA

Um aus der isolierten RNA im nächsten Schritt cDNA (*complementary-desoxyribonucleic-acid*) zu synthetisieren, musste mittels Spektrophotometer (*ND-1000 Spectrophotometer*) die Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt werden. Zuerst wurde die Messstelle des Spektrophotometers mit 1µL destilliertem und autoklaviertem Wasser kalibriert. Anschließend wurden das Spektrophotometer

jeweils mit 1µL der zu untersuchenden RNA beladen und die Konzentration [ng/µL] sowie der 260/280-Quotient bestimmt. Eine Konzentration von mindestens 100ng/µL wurde angestrebt. Aufgrund des hohen Phenolanteils bei der Isolation mittels Trizol wurde ein 260/280-Quotient von 1,7-2,2 als ausreichend rein akzeptiert (Wilfinger et al. 1997).

2.2.2.3 Synthese von cDNA aus RNA

Die Synthese der cDNA aus RNA wurde mittels des *GoScript™ Reverse Transcription System* der Firma Promega anhand des *Quick Protocol GoScript™ Reverse Transcription System* – Promega – 2010 des Herstellers durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst 1000ng der isolierten RNA mit 1µL *Oligo (dT)₁₅-Primern* vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein finales Volumen von 5µL aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Ansatz für fünf Minuten bei 70°C im *PCR-Cycler (Master cycler Nexus gradient)* der Firma Eppendorf aufgeheizt. Danach wurden zu jeder zu transkribierenden Probe 4µL *GoScript™ Reaction Buffer*, 2µL MgCl₂, 1µL *PCR Nucleotide Mix*, 0,5µL *Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor* und 1µL *GoScript™ Reverse Transcriptase* hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde auf ein finales Volumen von 15µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Im *PCR-Cycler* wurden diese Proben zum *Annealing* für fünf Minuten bei 25°C erwärmt und anschließend zur Elongation für eine Stunde bei 42°C erhitzt. Zuletzt wurde die Reaktionsmischung auf 70°C für 15 Minuten aufgeheizt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und die Proben in die qPCR überführen zu können. Die synthetisierte cDNA wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 qPCR

Die qPCR wurde mit dem *GoTaq® qPCR Master Mix* der Firma Promega und dem qPCR-System *StepOne Plus* der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Zuerst wurden *Primer*-Stocklösungen der zu untersuchenden Gene in einer Konzentration von 2,5µM angesetzt. Nachfolgend wurden 20µL der synthetisierten cDNA mit 100µL RNase-freiem Wasser versetzt. Die cDNA-Verdünnung wies eine Konzentration von 1000ng/120µL auf. Danach wurde pro *Well* folgendes pipettiert:

Tabelle 7: Pipettierschema der qPCR

Substanz	Volumen
cDNA	2,5µL
<i>GoTaq® qPCR Master Mix</i>	10µL
<i>CXR Reference Dye</i> (entspricht ROX)	0,2µL
RNase-freies Wasser	4,8µL
<i>Primer Mix</i>	2,5µL
Gesamtvolumen pro <i>Well</i>	20µL

Zudem wurden Nullproben pipettiert, bei welchen die Menge cDNA durch die entsprechende Menge RNase-freien Wassers ersetzt wurde. Um die Aussagekraft der qPCR zu erhöhen, wurden stets Triplikate pipettiert, zwischen denen eine maximale Abweichung von 0,5 Zyklen akzeptiert wurde. Als *Housekeeping*-Gen wurde bei den ventrikulären und atrialen Proben das *Nuclear Distribution C, Dynein Complex Regulator*-Gen (NUDC) verwendet. Abschließend wurde die 96-*Well* Platte mittels der vorprogrammierten Einstellungen (inklusive Schmelzkurvenanalyse) im *StepOne Plus* System analysiert und nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, wie folgt, ausgewertet:

Von den Mittelwerten der Triplikate wurde der Mittelwert des jeweiligen NUDC-*Housekeeping*-Gens abgezogen, sodass $\Delta\text{Ct}(\text{NUDC})$ berechnet werden konnte. Von jedem $\Delta\text{Ct}(\text{NUDC})$ wurde der ΔCt -Mittelwert der Kontrolle [der db/+Tiere; $\Delta\text{Ct}(\text{NUDC}) - \Delta\text{Ct}_{\text{mean}}(\text{db}/+)$] subtrahiert, sodass man $\Delta\Delta\text{Ct}$ berechnen konnte. Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert wurde dann zur Basis 2 gesetzt [$2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$] und, um die $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ -Werte statistisch auszuwerten, wurde von jedem $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ -Wert der $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ -Mittelwert der Kontrolle [$2^{-(\Delta\Delta\text{Ct}(\text{mean db}/+))}$] subtrahiert. Die Werte wurden dann mit dem Programm

GraphPad Prism mit dem *Student's t-Test* auf statistische Signifikanz analysiert und grafisch dargestellt.

2.2.3 Western-Blot-Analyse

2.2.3.1 Gewebe Solubilisierung

Ein Uhrglas wurde mit Trockeneis heruntergekühlt und die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden darauf platziert. Anschließend wurden mit einem Skalpell möglichst dünne Scheiben von den Geweben abgetrennt, wobei darauf zu achten war, dass das Gewebe nicht auftaute. Dann wurden 130µL Titin-Proben-Puffer + 50mM Dithiothreitol (DTT) auf die abgetrennten Gewebeproben gegeben und die Gewebestücke mit zwei Skalpellensolubilisiert, bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Proben für drei Minuten bei 96°C erhitzt, für drei Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der entstandene Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die solubilisierten Gewebeproben wurden dann entweder auf Eis gelagert, um direkt weiterverarbeitet zu werden, oder bei -20°C längerfristig aufbewahrt.

2.2.3.2 Modifizierter *Bradford Assay*

Damit eine einheitliche Proteinmenge in der Gelelektrophorese eingesetzt werden konnte, wurde die Proteinmenge der solubilisierten Gewebeproben mittels modifiziertem *Bradford Assay* bestimmt. Dafür wurden die solubilisierten Proben für drei Minuten bei 96°C erhitzt, für weitere drei Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der entstandene Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Danach wurden zwei 1:2500 Verdünnungen (s. Abb. 5) der solubilisierten Proben mit destilliertem Wasser angesetzt, um eine Doppelbestimmung der Proteinmenge durchzuführen.

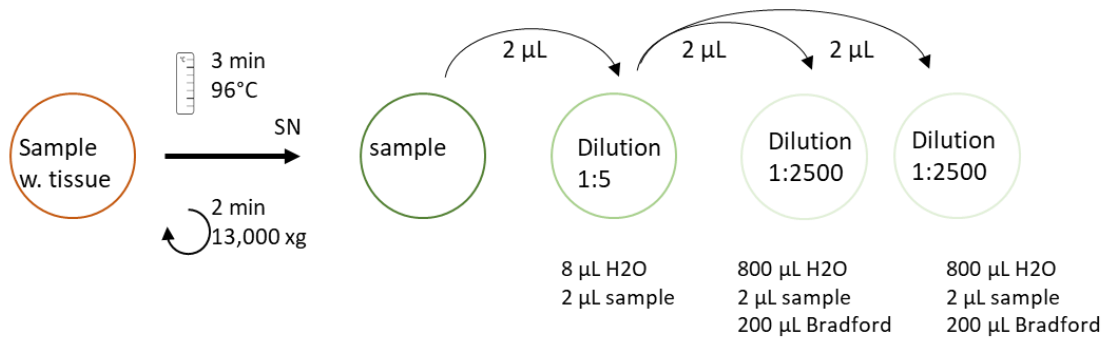


Abb. 5: Verdünnungsschritte für zwei 1:2500 Verdünnungen der Bradford Assays

2µL der solubilisierten Proben wurden mit 8µL destilliertem Wasser versetzt, um eine 1:5-Verdünnung zu erreichen. Zweimal 2µL dieser 1:5 Verdünnung wurden danach mit 800µL destilliertem Wasser und 200µL *Bradford Reagent* versetzt, um eine 1:2500 Verdünnung zu erreichen. Mit den beiden 1:2500 Verdünnungen wurde dann der *Bradford Assay* durchgeführt. (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Katharina Voigt, MSc.)

Das Photometer Ultrospec 1000 der Firma Pharmacia Biotech wurde zunächst mit einer Nullprobe bei $\lambda=595\text{nm}$ kalibriert. Anschließend konnten die Absorptionswerte der jeweiligen Proben bestimmt werden. Aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung ergab sich dann die zu beladende Proteinmenge, wobei stets 20µg Protein jeder Probe eingesetzt wurden.

2.2.3.3 Basis der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (\triangleq *Sodium Dodecyl-sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* \triangleq SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Abhängig vom Anteil des Acrylamids am Gel, können Proteine unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Für diese Dissertation wurde mittels SDS-PAGE die Expression dreier acetylcholinergere Rezeptoren, Muskarin-2-Rezeptor (M2R), Muskarin-3-Rezeptor (M3R) und α -7-nicotinergere-Rezeptor (α 7nR), untersucht. Die erwarteten Molekulargewichte der Rezeptoren wurden für den M2R mit 52kDa, für den M3R mit 70kDa und für den α 7nR mit 56kDa angegeben. Es wurden Gele mit einem 7,5%-Anteil Acrylamid gegossen, da diese in dem gewünschten Molekulargewichtsbereich eine gute Bandenauftrennung zeigen. Als Größenmarker wurde die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* der Firma Thermo Scientific verwendet.

Die Standard-Gele bestanden aus zwei Anteilen, einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel, welche nach folgendem Pipettierschema gegossen wurden:

Tabelle 8: Pipettierschema für zwei 7,5% SDS-Standardgele

Bestandteil	7,5% Trenngel	4% Sammelgel
30% Acrylamid	3,75mL	0,667mL
H ₂ O bidest.	7,5mL	3,025mL
4x SDS-Trenngelpuffer	3,75mL	-
4x SDS Sammelgelpuffer	-	1,25mL
TEMED 1:333	7,5µL	15µL
APS	75µL	50µL
Gesamtvolumen	15,0825mL	5,007mL

2.2.3.4 SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese wurde mit dem Gelelektrophorese-System *Mini-Protean® Tetra System* der Firma Biorad durchgeführt. Die Gele wurden in die Laufkammern eingespannt und diese mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Geltaschen mit den berechneten Probenmengen beladen. Pro Gel wurde eine Spannung von 40mA angelegt.

2.2.3.5 Western-Blotting

Durch das *Blotting*-Verfahren wurden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen, wofür das *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* der Firma Biorad zur Anwendung

kam. Es wurde jeweils eine *Blotting*-Kammer wie folgt vorbereitet und mit dem Protokoll für Standard-Gele (20V, 1,5A, 12 Minuten) laufen gelassen:

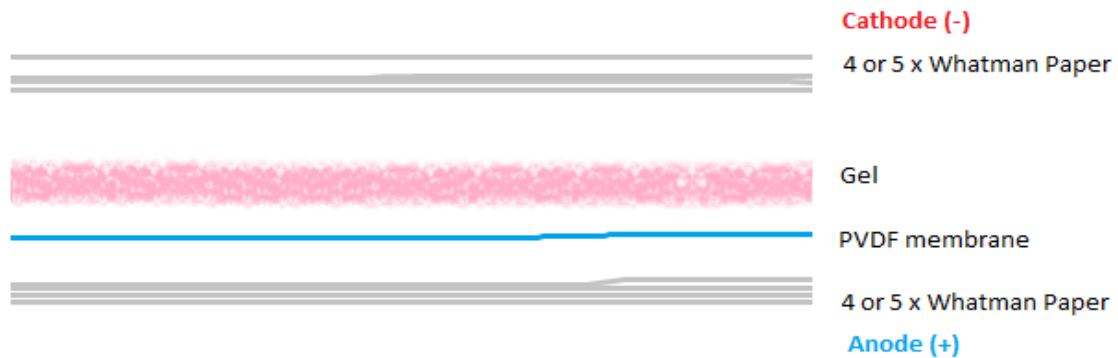


Abb. 6: Vorbereitung einer *Blotting*-Kammer

Auf den Boden der *Blotting*-Kammer, welche als Anode fungiert hat, wurden vier zuvor in Anodenpuffer für *Semi-Dry Blot* eingelegte *Whatman Paper* platziert. Darauf kam eine PVDF-Membran, welche zuvor in Ethanol eingelegt wurde. Auf die Membran wurde das SDS-PAGE Gel gelegt und anschließend wurden vier zuvor in *Kathodenpuffer* für *Semi-Dry Blot* eingelegte *Whatman Paper* darauf platziert. Die *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*-Kammer wurde mit dem Deckel verschlossen, welcher als Kathode fungierte. (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Katharina Voigt, MSc)

Anschließend wurden zur Kontrolle eines adäquaten Proteintransfers die Membranen reversibel für eine Minute mit PVDF-*Stain* gefärbt, für drei bis fünf Minuten in PVDF-*Destain* eingelegt und dreimal für jeweils zehn Minuten in *TRIS buffered Saline plus Tween Buffer* (TBST) gewaschen.

Nachfolgend wurden die nicht durch den Proteintransfer abgedeckten Bindungsstellen der PVDF-Membran mit 2% *Bovine Serum Albumin* (*BSA*) für zwei Stunden auf dem Rollenmischer blockiert. Nachdem das *BSA* verworfen wurde, wurden die Membranen mit den Primärantikörpern in 0,5% *BSA* in TBST nach den folgenden Verdünnungen versetzt:

Tabelle 9: Verdünnungen der Primärantikörper für das *Western-Blotting*

Primär Antikörper	Verdünnung
M2R	1:10000
M3R	1:3000
α 7nR	1:1000
α -Actinin	1:5000

Nach Inkubation auf dem Rollenmischer bei RT über Nacht wurden die Membranen erneut dreimal für je zehn Minuten mit TBST gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper im Verhältnis von 1:5000 in 0,5% BSA in TBST hinzugegeben und nochmals für zwei Stunden bei RT auf dem Rollenmischer inkubiert. Der verwendete Sekundärantikörper war zudem mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* \triangleq HRP) gekoppelt, welche für die später folgende Detektion mittels Chemilumineszenz von Bedeutung war. Darauf schlossen sich nochmals drei jeweils 15-minütige Waschschriffe mit TBST an.

2.2.3.8 *Imaging*

Die Membranen wurden anschließend mit *Immobilion® ECL Ultra Western HRP Substrat HRP*, einem Chemilumineszenzsubstrat der Firma Merck, versetzt. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase hat die Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Mittels des Chemilumineszenz *Imager Fusion FX* der Firma Vilber und Lourmat wurden die Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung der *Western-Blots* erfolgte, indem die berechnete Intensität des Rezeptors ins Verhältnis zur Intensität von α -Aktinin derselben Probe gesetzt wurde. Auf diese Weise wurden relative Proteinexpressionsmengen berechnet.

Die *Western-Blots* wurden mindestens dreimal pro solubilisiertem Gewebe durchgeführt und die Daten der jeweiligen Gewebe wurden gemittelt.

2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse

2.2.4.1 Einblocken von Herzen

Von jeweils fünf männlichen db/+ und db/db-Tieren wurden die Herzen entnommen und in *Tissue Tek* eingebettet, um diese für histologische Schnitte zu verwenden.

Methylbutan wurde mit Trockeneis/flüssigem Stickstoff auf -30°C bis -40°C heruntergekühlt. Eine vorgefertigte Form aus Aluminiumfolie wurde auf dem Boden mit *Tissue Tek* befüllt und das Herz wurde mit dem *Apex* nach oben in die Aluminiumform platziert. Danach wurde diese mit *Tissue Tek* aufgefüllt, sodass das Herz vollständig darin eingebettet war. Zum Aushärten des *Tissue Tek* wurde die befüllte Aluminiumform in Methylbutan gelegt, wobei präzise darauf geachtet wurde, dass die Temperatur des Methylbutans zwischen -30°C und -40°C lag. Die eingeblockten Herzen wurden dann bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Schneiden der Herzen

Mittels des Kryostats Leica CM 1850 der Firma Leica wurden $8\mu\text{m}$ dicke Schnitte der Herzen angefertigt und auf Objektträgern platziert. Um die Feuchtigkeit der Kryoschnitten zu verringern, wurden die Schnitte geföhnt. Abschließend wurden die nicht-fixierten Schnitte für maximal 14 Tage bei 4°C aufbewahrt. Für eine längere Aufbewahrung wurden sie bei -20°C eingefroren gelagert.

2.2.4.3 Färben der Schnitte

Die nicht-fixierten Kryoschnitte der Ventrikel wurden für mindestens zwei Stunden aus dem -20°C -Gefrierschrank in den 4°C -Kühlschrank gelegt und eine Stunde vor Beginn der Färbungen aus dem 4°C -Kühlschrank genommen, um RT zu erlangen.

Dann wurden die Schnitte mit jeweils $250\mu\text{L}$ 4% Paraformaldehyd (PFA) für zehn Minuten unter dem Abzug fixiert. In den folgenden Waschschrritten wurden die Schnitte einmal kurz mit *Phosphate-Buffered-Saline*-Puffer (PBS) abgewaschen und zweimal zehn Minuten mit PBS in einer Küvette auf einem Schüttler

gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 10% *Normal Goat Serum* (NGS) in 0,2% PBS in Saponin für zwei Stunden bei RT blockiert. Daran schloss sich die Färbung mit dem Primärantikörper nach den folgenden Verdünnungen in 0,2% PBS in Saponin und 2% NGS bei 4°C über Nacht an:

Tabelle 10: Verdünnungen der Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Primär Antikörper	Verdünnung
M2R	1:250
M3R	1:100
α7nR	1:500

Die Schnitte wurden mit jeweils 100µL der verdünnten Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgten erneut drei Waschschrte. Die Schnitte wurden einmal kurz mit PBS abgewaschen und zweimal zehn Minuten mit PBS in einer Küvette auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurden die sekundären Antikörper nach den folgenden Verdünnungen in 0,2% PBS in Saponin und 2% NGS für drei Stunden bei Dunkelheit und RT auf die Schnitte aufgebracht:

Tabelle 11: Verdünnungen der Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Sekundär Antikörper	Verdünnung
<i>Anti-Rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor (R) 555 Molecular Probes</i>	1:500
WGA-Alexa-488 (grün)	1:200

Darauf schlossen sich erneut mehrere Waschschrte an. Die Schnitte wurden einmal kurz mit PBS abgewaschen und dreimal für 15 Minuten in einer Küvette bei Dunkelheit auf dem Schüttler mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die vollständig gefärbten Schnitte mit *Fluoromount G®* mit DAPI und Deckgläschen

eingedeckt und bei 4°C über Nacht getrocknet. Zur Fixierung wurden die Deckgläschen am nächsten Tag mit Nagellack umrandet.

Es wurden anschließend mit dem Keyence DME Mikroskop bei 60-facher-Vergrößerung mit Immersionsöl aus der linksventrikulären Region zehn *Regions of Interest (ROI)* aufgenommen und für die Auswertung herangezogen. Dabei wurden die Aufnahmen jedes Rezeptors mit exakt derselben Belichtungszeit (s. Tabelle 12) aufgenommen.

Tabelle 12: Belichtungszeiten der Rezeptoraufnahmen

	Rezeptor (rot)	WGA (grün)
M2R	0,833 s	0,333 s
M3R	0,143 s	0,333 s
α 7nR	0,500 s	0,333 s

Aus zehn *ROIs* wurde die Anzahl der Rezeptoren pro untersuchtem acetylcholinergem Rezeptor nach folgenden Makros (s. Abb. 7, s. Abb. 8, s. Abb. 9) analysiert. Aus zehn Rezeptorwerten bestimmten sich die Mittelwerte. Für die statistische Auswertung wurde jeweils ein *Student's t-Test* mittels *GraphPad Prism* durchgeführt und grafisch dargestellt.

2.2.4.4 Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Programm *BZ-II Viewer* aufgenommen, mit dem Programm *BZ-II Analyzer* verarbeitet und anschließend mit *ImageJ* nach den folgenden Makros ausgewertet:

```

1 | run("Split Channels");
2 | close();
3 | close();
4 |
5 | run("Subtract Background...", "rolling=20");
6 | run("Enhance Contrast...", "saturated=0.001 normalize");
7 |
8 | run("Find Maxima...", "prominence=20000 exclude output=Count");|

```

Abb. 7: Makro zur Auswertung der M2R-Immunfluoreszenzaufnahmen mit *ImageJ*

```

1 | run("Split Channels");
2 | close();
3 | close();
4 |
5 | run("Subtract Background...", "rolling=50");
6 | run("Enhance Contrast...", "saturated=0.001 normalize");
7 | run("Find Maxima...", "prominence=25000 output=Count");|

```

Abb. 8: Makro zur Auswertung der M3R-Immunfluoreszenzaufnahmen mit *ImageJ*

```

1 | run("Split Channels");
2 | close();
3 | close();
4 | run("Subtract Background...", "rolling=20");
5 | run("Enhance Contrast...", "saturated=0.001 normalize");
6 | run("Find Maxima...", "prominence=20000 exclude output=Count");|

```

Abb. 9: Makro zur Auswertung der α 7nR-Immunfluoreszenzaufnahmen mit *ImageJ*

2.3 Software und Statistik

Für die Spektrophotometrie der RNA wurde das Programm ND-1000 V3.8.1 verwendet. Die Beladung der qPCR-96-Well Platten wurden mit dem Programm *StepOne Software v2.3* entworfen, die qPCR wurde mit eben jenem Programm durchgeführt und anschließend mit *Microsoft Excel* analysiert.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Programm *BZ-II Viewer* aufgenommen und mit dem Programm *BZ-II Analyzer* verarbeitet und anschließend mit *ImageJ* ausgewertet.

Die Aufnahmen der *Western-Blots* wurden mit dem Programm *Evolution-Capt Edge* durchgeführt, mit *Adobe Photoshop v24.0* bearbeitet und mit *ImageJ* analysiert.

Zur statistischen Analyse wurde mit *GraphPad Prism* jeweils ein *Student's t-Test* durchgeführt und grafisch dargestellt, bei welchem stets die Interventionsgruppe der db/db-Mäuse mit der Kontrollgruppe der db/+Mäuse verglichen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Expression kardialer acetylcholinergischer Rezeptoren

Um die Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) auf die Expression kardialer acetylcholinergischer Rezeptoren zu analysieren, wurden die mRNA-Expressions- und Proteinexpressionslevel des Muskarin-2-Rezeptors (M2R), des Muskarin-3-Rezeptors (M3R) und des α -7-nicotinischen-Rezeptors (α 7nR) in nicht-diabetischen db/+ -Mäusen im Vergleich zu Typ-2 diabetischen db/db -Mäusen untersucht. Die mRNA-Expressions-Level wurden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt und die Proteinexpressionslevel durch *Western-Blot*-Analysen und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen quantifiziert. Die in den qPCR-Analysen ermittelten mRNA-Mengen wurden auf die mRNA-Level des *Nuclear Distribution C, Dynein Complex Regulator Gens (NUDC)* normiert und die in den *Western-Blot*-Analysen ermittelten Proteinmengen wurden auf die Proteinlevel des α -Aktinin-Proteins genormt. Ein Graph stellt jeweils die relative Expression der mRNA- bzw. Proteinlevel von nicht-diabetischen Mäusen (db/+) im Vergleich zu Typ-2-diabetischen Mäusen (db/db) im linken Ventrikel oder in den Atrien dar.

3.1.1 Relative mRNA-Expression acetylcholinergischer Rezeptoren im linken Ventrikel und in den Atrien

In Abb. 10 zeigen sich die mRNA-Expressionslevel der oben genannten acetylcholinergen Rezeptoren im linken Ventrikel und in den Atrien der nicht-diabetischen und diabetischen Mäuse. Im linken Ventrikel der db/db-Mäuse ließen sich keine signifikant veränderten relativen Expressionslevel der mRNA im Vergleich zu db/+ -Mäusen der drei acetylcholinergen Rezeptoren nachweisen (db/+ M2R: $1,00 \pm 0,21$ -Fache, db/db M2R: $1,09 \pm 0,35$ -Fache, $p=0,8329$; db/+ M3R: $1,00 \pm 0,31$ -Fache, db/db M3R: $0,74 \pm 0,19$ -Fache, $p=0,4819$; db/+ α 7nR: $1,00 \pm 0,21$ -Fache; db/db α 7nR: $0,94 \pm 0,21$ -Fache, $p=0,8591$; s. Abb. 10 A-C). Von den linksventrikulären Daten der mRNA-Expression lässt sich keine veränderte

Expression respektive ein verändertes *Signalling* der acetylcholinergen Rezeptoren ableiten.

In den Atrien der db/db-Mäuse ließen sich für alle untersuchten Rezeptoren signifikant erhöhte relative Expressionslevel der mRNA im Vergleich zu db/+ Mäusen messen. Der M2R zeigte sich in den db/db-Tieren um das $1,69 \pm 0,12$ -Fache signifikant erhöht (db/+ M2R: $1,00 \pm 0,07$ -Fache; $p=0,0006$; s. Abb. 10 D). Ähnliches ließ sich beim M3R beobachten, dessen mRNA signifikant um das $2,19 \pm 0,26$ -Fache stärker exprimiert war als in der db/+-Vergleichsgruppe (db/+ M3R: $1,00 \pm 0,19$ -Fache, $p=0,0014$; s. Abb. 10 E). Auch beim $\alpha 7nR$ war die atriale mRNA der db/db-Tiere gegenüber den nicht-diabetischen Tieren signifikant um das $1,72 \pm 0,23$ -Fache stärker exprimiert (db/+ $\alpha 7nR$: $1,00 \pm 0,15$ -Fache, $p=0,0237$; s. Abb. 10 F). Aus den Daten der atrialen mRNA-Expression lässt sich möglicherweise eine verstärkte Expression der drei acetylcholinergen Rezeptoren ableiten und somit möglicherweise auch ein verstärktes *Signalling* jener Rezeptoren.

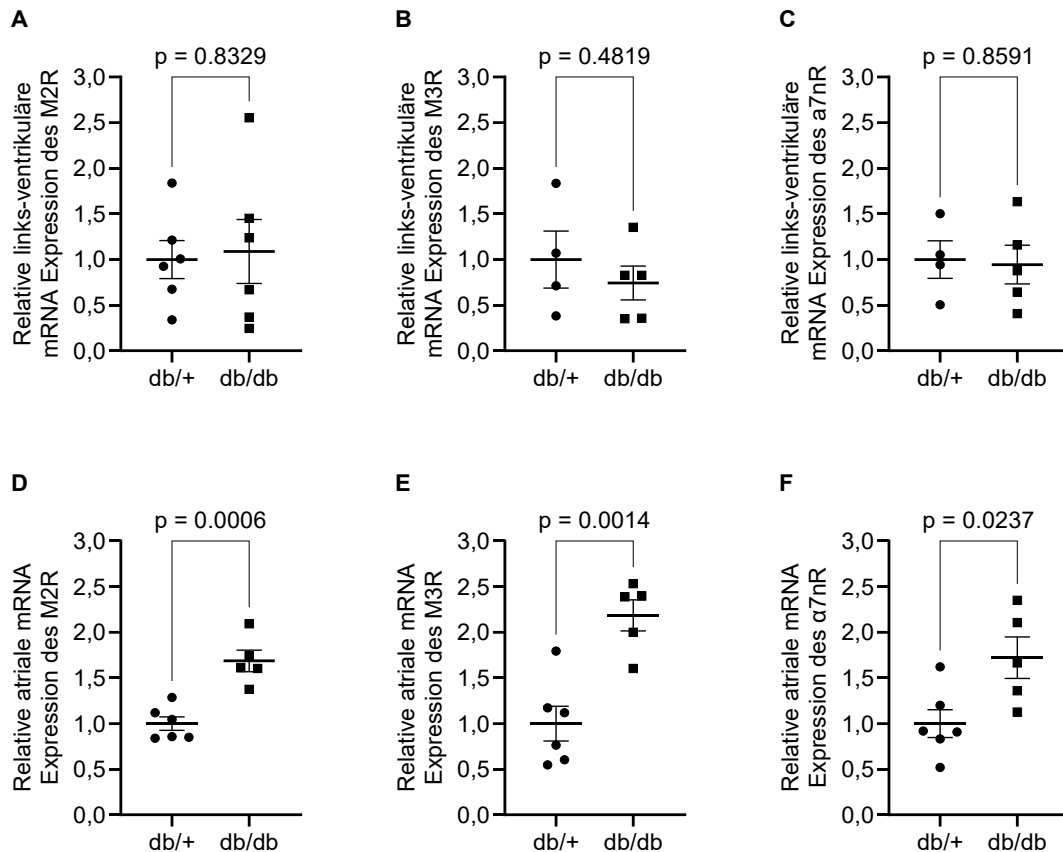


Abb. 10: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und $\alpha 7nR$ -mRNA-Expression im linken Ventrikel und den Atrien

Dargestellt sind qPCR-Analysen zur Bestimmung der mRNA-Expression des M2R (**A, D**), des M3R (**B, E**) und des $\alpha 7nR$ (**C, F**) in linksventrikulären (**A-C**) und atrialen (**D-F**) Gewebeproben von nicht-diabetischen (db/+) Mäusen im Vergleich zu Typ-2 diabetischen (db/db) Mäusen. n=4-6. Jeder Punkt bzw. Quadrat stellt ein n dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) angegeben und normiert auf den Mittelwert der jeweiligen db/+Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse wurden *Student's t-tests* durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3.1.2 Relative Proteinexpression der acetylcholinergen Rezeptoren im *Western-Blot* im linken Ventrikel und in den Atrien

Zunächst wurde die relative Expression der acetylcholinergen Rezeptorproteine per *Western-Blot*-Analyse bestimmt. Dabei deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die relative Expression des M2R-Proteins linksventrikulär tendenziell um das $0,85 \pm 0,03$ -Fache geringer war, im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren (db/+ M2R: $1,00 \pm 0,07$ -Fache, $p=0,0759$; s. Abb. 11 A). Beim M3R-Protein ließ sich linksventrikulär keine signifikant veränderte Expression nachweisen (db/+ M3R: $1,00 \pm 0,05$ -Fache, db/db M3R: $1,12 \pm 0,05$ -Fache, $p=0,1312$; s. Abb. 11 B). Ein

Trend zu einer erhöhten Proteinexpression ließ sich beim $\alpha 7nR$ -Protein beobachten. Dies war bei db/db-Mäusen um das $1,16 \pm 0,06$ -Fache erhöht, im Vergleich zu db/+ -Mäusen (db/+ $\alpha 7nR$: $1,00 \pm 0,04$ -Fache, $p=0,0552$; s. Abb. 11 C). Aus den Daten der ventrikulären Rezeptorproteinexpression lässt sich ein uneinheitliches Bild ableiten. Die Rezeptorexpression des M2R und eventuell das daraus resultierende ventrikuläre *Signalling* scheint bei diabetischen Mäusen verringert zu sein. Die Rezeptorexpression des M3R scheint unverändert und die Expression des $\alpha 7nR$ im linksventrikulären Myokard scheint erhöht zu sein.

Nach der Bestimmung der relativen linksventrikulären Proteinexpression der acetylcholinergen Rezeptoren erfolgte die Bestimmung aus den atrialen Proben. Dabei ließ sich für keine der drei acetylcholinergen Rezeptoren eine signifikante Veränderung der relativen Proteinexpression nachweisen (db/+ M2R: $1,00 \pm 0,07$ -Fache, db/db M2R: $1,15 \pm 0,13$ -Fache, $p=0,3775$; db/+ M3R: $1,00 \pm 0,03$ -Fache, db/db M3R: $1,00 \pm 0,04$ -Fache, $p=0,9780$; db/+ $\alpha 7nR$: $1,00 \pm 0,13$ -Fache, db/db $\alpha 7nR$: $1,20 \pm 0,14$ -Fache, $p=0,3514$; s. Abb. 11 D-F). Aus den Daten der atrialen Proteinexpression lässt sich keine veränderte Rezeptorexpression der acetylcholinergen Rezeptoren schlussfolgern oder ein daraus resultierendes verändertes *Signalling*.

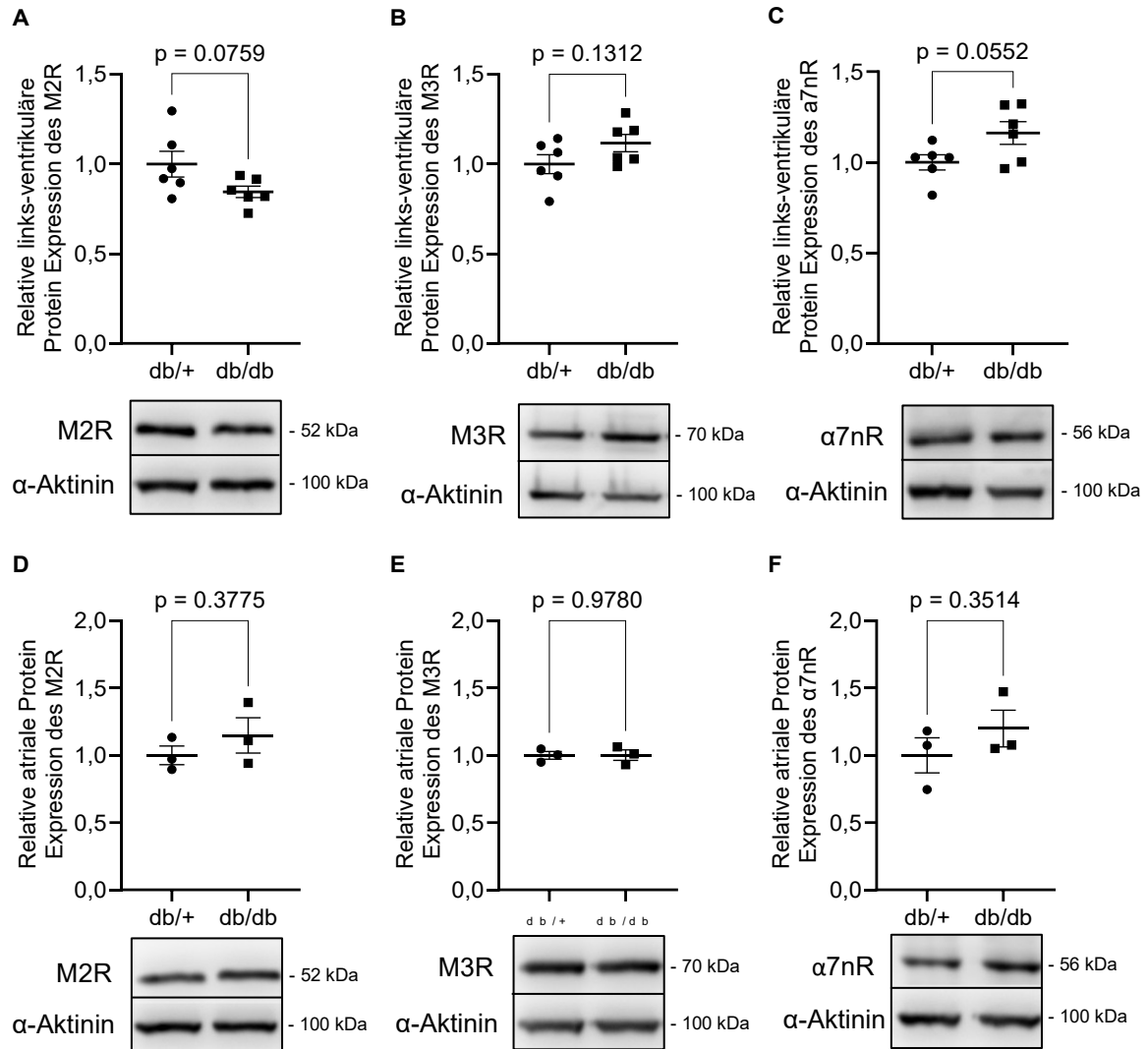


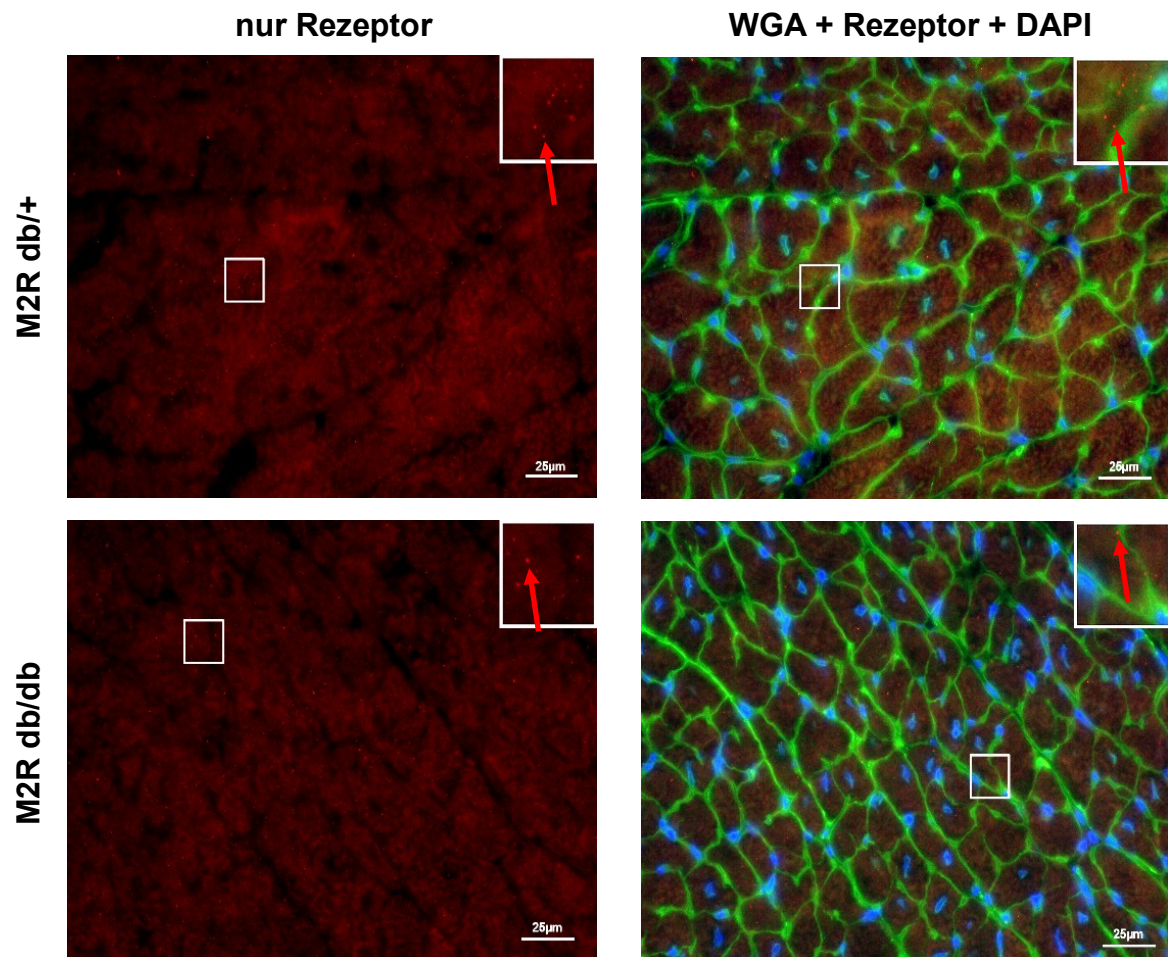
Abb. 11: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und $\alpha 7nR$ -Proteinexpression in *Western-Blot*-Analysen im linken Ventrikel und in den Atrien

Dargestellt sind *Western-Blot*-Analysen zur Bestimmung der relativen Expression des M2R-Proteins (**A**), des M3R-Proteins (**B**) und des $\alpha 7nR$ -Proteins (**C**) in linksventrikulären Gewebeproben von db/+ Mäusen im Vergleich zu db/db-Mäusen in Relation zur Expression des α -Aktinin-Proteins. Dieselben Analysen des M2R-Proteins (**D**), des M3R-Proteins (**E**) und des $\alpha 7nR$ -Proteins (**F**) wurden auch aus atrialen Gewebeproben durchgeführt. Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten *Western-Blots* dargestellt. $n=3-6$. Jeder Punkt bzw. Quadrat stellt ein n dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben und normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse wurden *Student's t-tests* durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3.1.3 Relative Proteinexpression der acetylcholinergen Rezeptoren in der Immunfluoreszenzmikroskopie im linken Ventrikel

Im nächsten Schritt wurde per Immunfluoreszenzmikroskopie die Expression des M2R-Proteins, des M3R-Proteins und des $\alpha 7nR$ -Proteins im linken Ventrikel

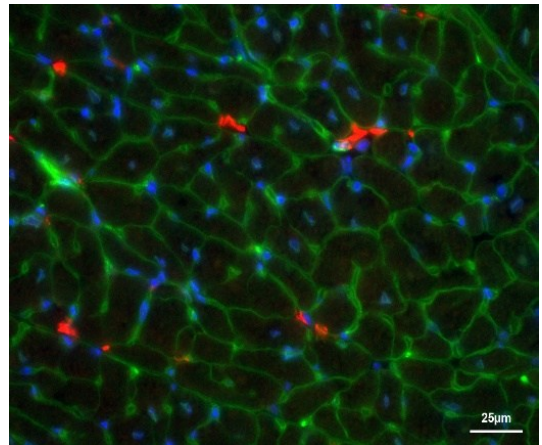
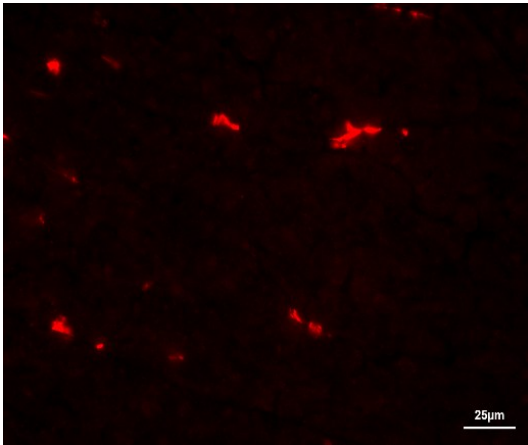
analysiert (s. Abb. 12). Aufgrund nicht ausreichender Proteinmengen konnten keine immunhistochemischen Färbungen der Atrien durchgeführt werden. Es wurde untersucht, inwiefern sich die veränderten mRNA- und Proteinlevel der nicht-diabetischen und diabetischen Mäuse auf die Proteinverteilung im Gewebe übertragen lassen. In den Aufnahmen sind die Rezeptorproteine jeweils rot, das Kollagene-Bindegewebe grün und die Zellkerne blau gefärbt. Im Folgenden sind beispielhafte Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt (s. Abb. 12):



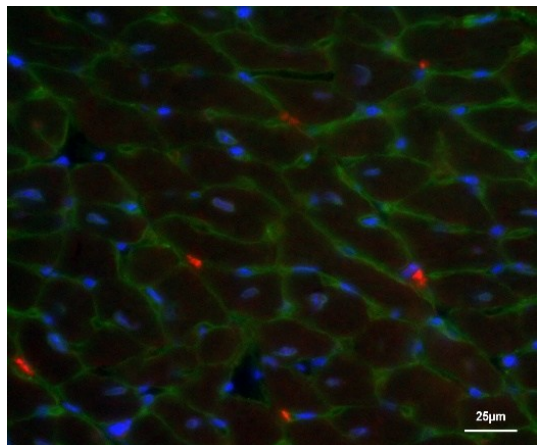
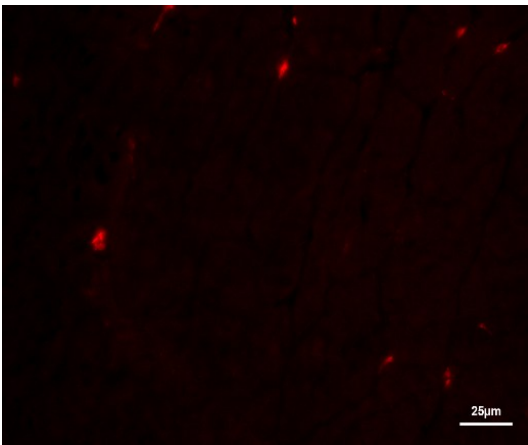
nur Rezeptor

WGA + Rezeptor + DAPI

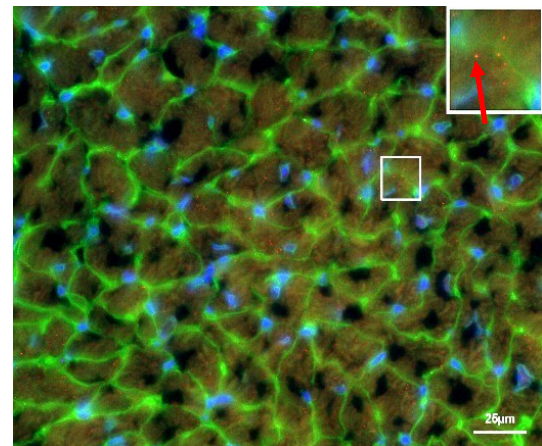
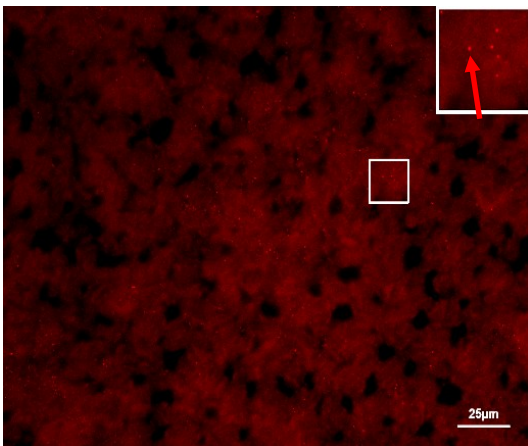
M3R db/+



M3R db/db



$\alpha 7nR$ db/+



$\alpha 7nR$ db/db

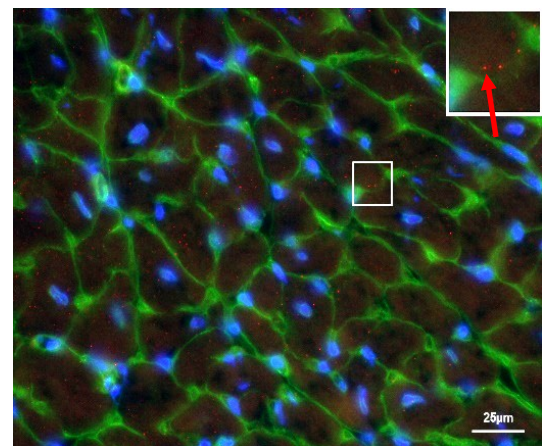
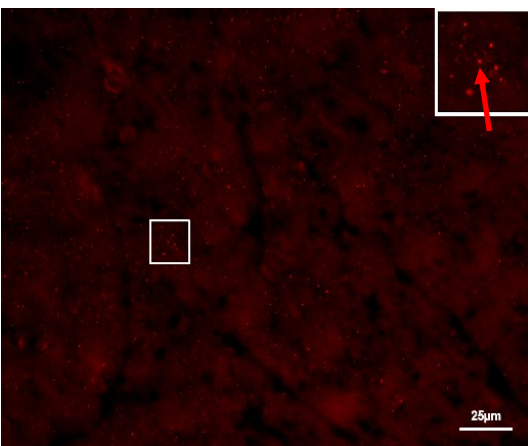


Abb. 12: Beispielbilder der Immunfluoreszenzmikroskopie des M2R, M3R und $\alpha 7nR$ im linken Ventrikel

Beispielhaft sind hier Bilder der drei untersuchten acetylcholinergen Rezeptoren (M2R, M3R und $\alpha 7nR$) dargestellt. Bei den Bildern handelt es sich um 60x-Vergrößerungen, welche mit Immersionsöl aufgenommen wurden. Pro untersuchter Gruppe (db/+ und db/db) ist jeweils eine Aufnahme der Rezeptoren in rot und eine kombinierte Aufnahme dargestellt. Bei der kombinierten Aufnahme sind zusätzlich die Zellwände in grün (WGA-Färbung) und die Zellkerne in blau (DAPI-Färbung) angefärbt. Zur besseren Beurteilung sind Ausschnitte der Aufnahmen des M2R und des $\alpha 7nR$ vergrößert dargestellt worden und zur besseren Sichtbarkeit der Rezeptorsignale wurde die Helligkeit der Bilder nachträglich erhöht. Balken \triangleq Größenstandard (25 μ m).

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mittels der im Methodenteil beschriebenen Makros mit *ImageJ* analysiert und die anschließend gezeigten Graphen stellen die Auswertung dar (s. Abb. 13 A-C). Die relative Expression des M2R-Proteins war signifikant um das $1,26 \pm 0,08$ -Fache erhöht (db/+ M2R: $1,00 \pm 0,07$ -Fache, $p=0,0489$; s. Abb. 13 A). Dem gegenüber war die relative Expression des M3R-Proteins signifikant um das $0,58 \pm 0,07$ -Fache geringer (db/+ M3R: $1,00 \pm 0,07$ -Fache, $p=0,0030$; s. Abb. 13 B). Die relative Expression des $\alpha 7nR$ zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede in den beiden Untersuchungsgruppen (db/+ $\alpha 7nR$: $1,00 \pm 0,05$ -Fache, db/db $\alpha 7nR$: $0,92 \pm 0,16$ -Fache, $p=0,6676$; s. Abb. 13 C). Aus den ventrikulären Daten lassen sich am ehesten eine erhöhte Rezeptorexpression des M2R, eine verringerte Expression des M3R und eine unveränderte Expression des $\alpha 7nR$ ableiten und ein dementsprechend verändertes *Signalling* der Rezeptoren.

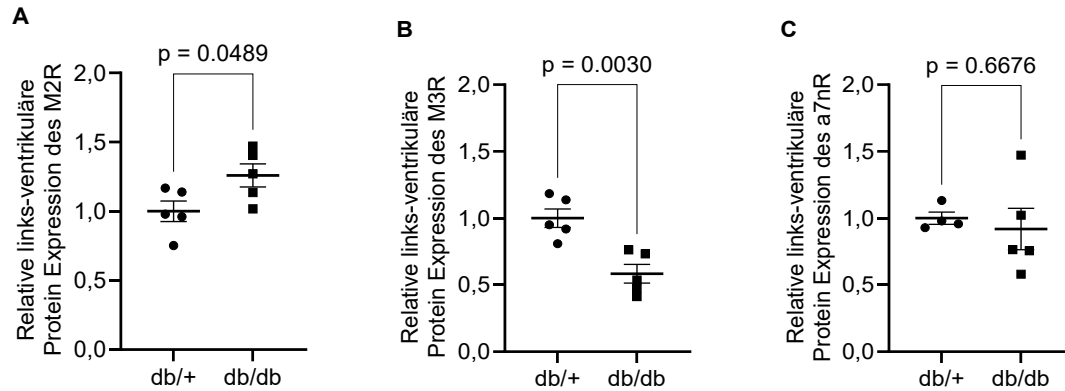


Abb. 13: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und $\alpha 7nR$ -Proteinexpression im linken Ventrikel mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Dargestellt sind immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zur Bestimmung der relativen Anzahl des M2R-Proteins (**A**), des M3R-Proteins (**B**) und des $\alpha 7nR$ -Proteins (**C**) in linksventrikulären Kryoschnitten von db/+ -Mäusen im Vergleich zu db/db -Mäusen. $n=4-5$. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat stellt ein n dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben und normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse sind *Student's t-tests* durchgeführt worden. Statistische Signifikanz ist bei $p < 0,05$ angenommen worden.

3.2 Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Expression von Bestandteilen der kardialen Extrazellulärmatrix

Um mögliche Veränderungen der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bei DMT2 zu analysieren, wurden per qPCR-Analyse die relative Expression der mRNA der am häufigsten vorkommenden kardialen Kollagentypen (Typ Kollagen-I-a und Typ Kollagen-3-a) analysiert. Zudem wurden die relativen Expressionslevel zweier Enzyme, welche die Quervernetzung der Kollagenstränge katalysieren, der Lysyloxidase-L1 (Loxl1) und der Lysyloxidase-L2 (Loxl2) bestimmt.

3.2.1 Relative Expression der Kollagen-mRNA im linken Ventrikel und in den Atrien

Im linken Ventrikel ließ sich keine signifikante Veränderung der relativen mRNA-Expression des Kollagen Typ-1-a (Col1a) nachweisen (db/+ Col1a: $1,00 \pm 0,58$ -Fache, db/db Col1a: $0,19 \pm 0,07$ -Fache; $p=0,1232$; s. Abb. 14 A). Demgegenüber

konnte eine signifikant verringerte Expression der mRNA des Kollagen Typ-3-a (Col3a) im linken Ventrikel bestimmt werden. Kollagen Typ-3-a war um das $0,69 \pm 0,03$ -Fache geringer exprimiert im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen (db/+ Col3a: $1,00 \pm 0,08$ -Fache, $p=0,0066$; s. Abb. 14 B). Das Verhältnis der beiden Kollagene zueinander verschiebt sich somit zu Col1a, sodass die passive Steifigkeit des ventrikulären Myokards zuzunehmen scheint.

Anschließend wurden die Kollagen-mRNA-Level in den Vorhöfen der db/+ und db/db-Mäuse untersucht. Für Col1a ließ sich in atrialen Gewebeproben eine signifikant höhere Expression bei diabetischen Mäusen nachweisen ($p=0,0113$; s. Abb. 14 C). Col1a war um das $2,40 \pm 0,32$ -Fache stärker exprimiert (db/+ Col1a: $1,00 \pm 0,27$ -Fache). Für Col3a ließ sich demgegenüber eine signifikant verringerte mRNA-Expression in atrialen Proben beobachten ($p=0,0019$; s. Abb. 14 D). In diabetischen Mäusen war die mRNA von Col3a in den Atrien um das $0,65 \pm 0,06$ -Fache geringer exprimiert (db/+ Col3a: $1,00 \pm 0,06$ -Fache). Insgesamt scheint in den Atrien das Verhältnis der Kollagene zu Col1a verschoben zu sein. Somit ist, wie auch im Ventrikel, am ehesten eine erhöhte passive Steifigkeit des atrialen Myokards anzunehmen.

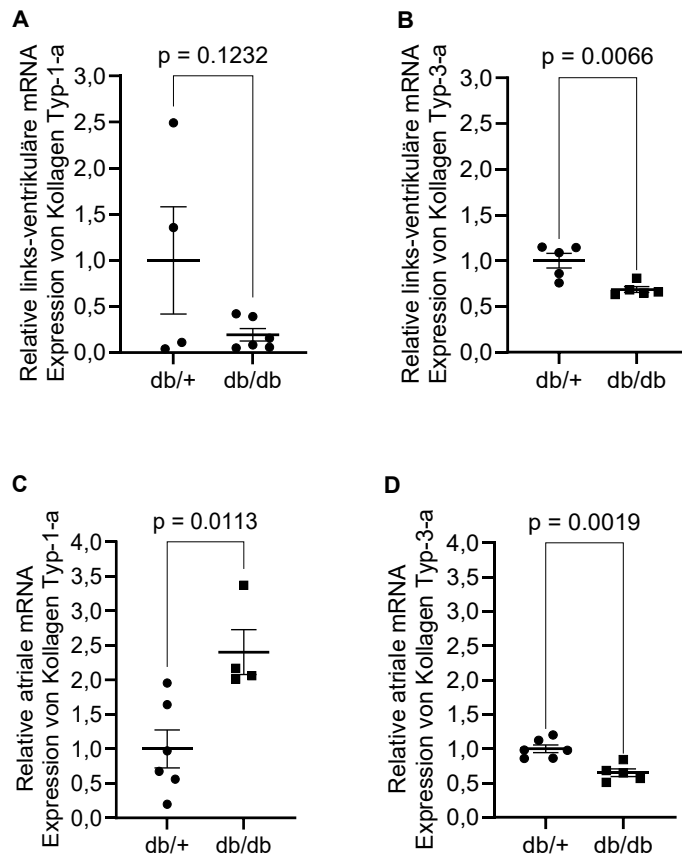


Abb. 14: Ergebnisse der relativen Kollagen-Typ-1-a und -Typ-3-a mRNA-Expression im linken Ventrikel und in den Atrien

Dargestellt sind qPCR-Analysen zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression von Kollagen-Typ-1-a (**A**) und Kollagen-Typ-3-a (**B**) in linksventrikulären Gewebeproben und von Kollagen-Typ-1-a (**C**) und Kollagen-Typ-3-a (**D**) in atrialen Gewebeproben von db/+ -Mäusen im Vergleich zu db/db-Mäusen. n=4-6. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat stellt ein n dar. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben und normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse sind Student's *t*-tests durchgeführt worden. Statistische Signifikanz ist bei $p < 0,05$ angenommen worden.

3.2.2 Relative Expression der Lysyloxidasen-mRNA im linken Ventrikel und in den Atrien

Nach der Untersuchung der mRNA-Expressions der Kollagen-Typen wurden zusätzlich die mRNA-Expression zweier Lysyloxidasen analysiert. Die Lox11 war mit einem Trend zur Signifikanz geringer in linksventrikulären Proben diabetischer Mäuse exprimiert (db/+ Lox11: $1,00 \pm 0,08$ -Fache, db/db Lox11: $0,69 \pm 0,12$ -Fache; $p=0,0694$; s. Abb. 15 A). Dabei deuten die Daten darauf hin, dass die mRNA der Lox11 um das $0,69 \pm 0,12$ -Fache geringer exprimiert ist. Für die Lox12 ließ sich keine signifikante Reduktion der mRNA-Expression linksventrikulär nachweisen (db/+ Lox12 $1,00 \pm 0,26$ -Fache, db/db Lox12: $0,49 \pm 0,06$ -Fache $p=0,1380$; s. Abb. 15 B).

Die Daten legen nahe, dass die Quervernetzung der Kollagene im linken Ventrikel diabetischer Mäuse im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen vermindert ist.

Weiterhin wurden auch in den atrialen Gewebeproben der Mäuse die mRNA-Expressionslevel der Loxl1 und Loxl2 bestimmt. Die Loxl1 mRNA-Menge war in atrialen Proben signifikant um das $0,79 \pm 0,04$ -Fache geringer exprimiert (db/+ Loxl1: $1,00 \pm 0,06$ -Fache, $p=0,0209$; s. Abb. 15 C). Die Loxl2 mRNA-Expression war im Vergleich von nicht-diabetischen zu diabetischen Mäusen nicht signifikant verändert (db/+ Loxl2: $1,00 \pm 0,19$ -Fache, db/db Loxl2: $1,03 \pm 0,10$ -Fache, $p=0,9024$; s. Abb. 15 D). Dies weist darauf hin, dass die Quervernetzung der Kollagene im Atrium diabetischer Tiere verringert ist.

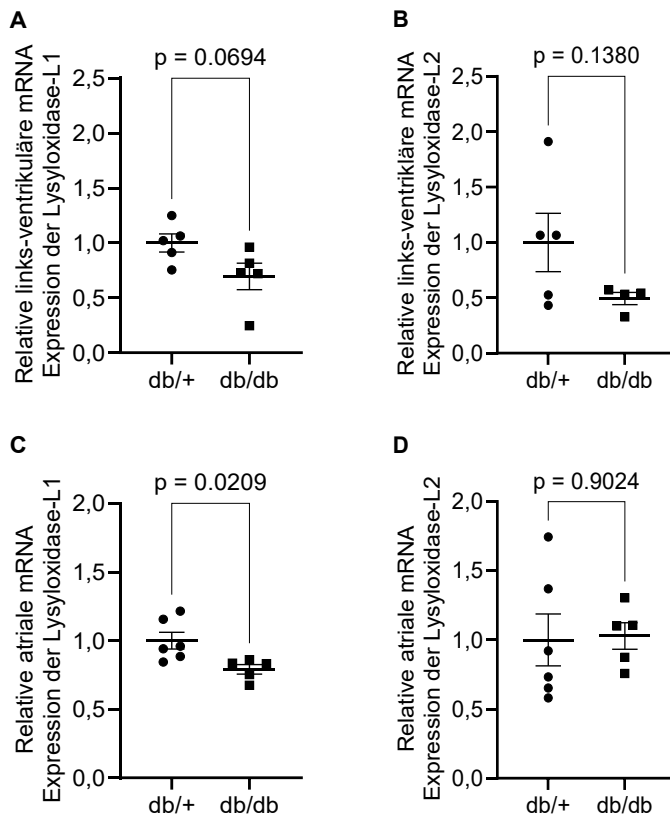


Abb. 15: Ergebnisse der relativen Lysyloxidase-L1- und -L2-mRNA-Expression im linken Ventrikel und in den Atrien

Dargestellt sind qPCR-Analysen zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression von Lysyloxidase-L1 (**A**) und Lysyloxidase-L2 (**B**) in linksventrikulären Gewebeproben und von Lysyloxidase-L1 (**C**) und Lysyloxidase-L2 (**D**) in atrialen Gewebeproben von db/+Mäusen im Vergleich zu db/db-Mäusen. $n=4-6$. Jeder Punkt bzw. jedes Quadrat stellt ein n dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben und normiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe. Zur statistischen Analyse sind *Student's t-tests* durchgeführt worden. Statistische Signifikanz ist bei $p < 0,05$ angenommen worden.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der drei acetylcholinergen Rezeptoren für die Chronotropie, Dromotropie und Inotropie

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Expression der drei acetylcholinergen Rezeptoren auf atrialer mRNA-Ebene der db/db-Mäuse im Vergleich zu db/+-Mäusen signifikant verstärkt ist. In *Western-Blot*-Analysen der atrialen Gewebeproben kann hingegen keine signifikant veränderte Expression der jeweiligen Rezeptorproteine nachgewiesen werden. In linksventrikulärem Gewebe zeigt sich auf Ebene der mRNA kein signifikanter Unterschied der drei acetylcholinergen Rezeptoren. Die Ergebnisse der linksventrikulären *Western-Blots* deuten auf eine tendenziell verringerte Expression des M2R und eine tendenziell erhöhte Expression des $\alpha 7nR$ hin.

Die diabetischen db/db-Mäuse entwickeln frühestens im Alter von zwölf Wochen den Phänotyp einer beginnenden diabetischen Kardiomyopathie mit diastolischer Dysfunktion und Kontraktionsdefizit (Semeniuk et al. 2002; Joost et al. 2012; Funk et al. 2022). In weiter fortgeschrittenem Alter entwickeln db/db-Mäuse eine systolische Dysfunktion und eine myokardiale Fibrose als Anzeichen einer späten diabetischen Kardiomyopathie (Joost et al. 2012; Giardinelli et al. 2024). Deswegen ist anzunehmen, dass die beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit bei zehn bis zwölf Wochen alten diabetischen Mäusen am ehesten Folge einer hyperglykämischen und hyperinsulinämischen Stoffwechsellage und nicht bereits Folge einer manifesten diabetischen Kardiomyopathie sind.

Wie in der Einleitung erwähnt führt die Aktivierung des M2R im rechten Vorhof zu einer verlängerten Dauer der spontanen diastolischen Depolarisation (\triangleq negative Chronotropie) und zu einer verlängerten Überleitungszeit im AV-Knoten (\triangleq negative Dromotropie) (Haga 2013; Pape et al. 2014; Saternos et al. 2018). Ebenso hat die Aktivierung des M3R eine negative Chronotropie zur Folge (Abramochkin et al. 2012; Wang et al. 2012). Somit führt die Aktivierung der beiden acetylcholinergen Rezeptoren zu einer verringerten Herzfrequenz.

Bisher untersuchten verschiedene Studien die Herzfrequenz von db/+ im Vergleich zu db/db-Mäusen. Die Mehrheit dieser Studien beschrieb bei Tieren im Alter von

sechs bis 14 Wochen eine signifikant reduzierte Herzfrequenz (Darrell D. Belke et al. 2000; Semeniuk et al. 2002; Greer et al. 2006). Um diese reduzierte Herzfrequenz diabetischer db/db-Tiere anhand der Wirkung der beiden muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren zu erklären, müssten sich erhöhte Expressionslevel der Rezeptorproteine im rechten Vorhof bzw. im Sinusknoten nachweisen lassen. Im Vorhof von db/db-Mäusen wird in den Daten dieser Arbeit keine signifikante Veränderung der Proteinmenge der beiden Rezeptoren nachgewiesen. Diese Daten werden durch Ergebnisse von Liu et al. gestützt, welche im Sinusknoten von minimal älteren db/db-Mäusen ebenfalls keine Veränderung der Expression des M2R-Proteins zeigen (Liu et al. 2021). Somit ist davon auszugehen, dass die verringerte Herzfrequenz bei diabetischen Tieren zu diesem Zeitpunkt nicht auf eine veränderte quantitative Expression der acetylcholinergen Rezeptoren zurückzuführen ist. Interessanterweise lässt sich jedoch auf mRNA-Ebene im Atrium sowohl eine hoch-signifikant verstärkte Expression der M2R-mRNA als auch eine hoch-signifikant erhöhte Expression der M3R-mRNA nachweisen. Demensprechend scheint es durchaus Veränderungen im Genotyp der diabetischen db/db-Mäuse zu geben. Möglicherweise manifestiert sich der veränderte Genotyp erst in einem fortgeschrittenen Stadium der diabetischen Kardiomyopathie im kardialen Phänotyp und ist für die langfristig verringerte Herzfrequenz diabetischer Mäuse von Bedeutung (Semeniuk et al. 2002; Greer et al. 2006).

Die in der Mehrheit der Studien beschriebene Abnahme der Herzfrequenz bei jungen db/db-Mäusen ist vermutlich auf andere Faktoren zurückzuführen. Der wichtigste Faktor scheint ein dysreguliertes vegetatives Nervensystem bei diabetischen Mäusen zu sein. Hinweisend dafür ist eine signifikant verringerte Abnahme der Herzfrequenz von db/db-Mäusen auf den Muskarinrezeptoragonisten Carbachol (Liu et al. 2021) als auch eine signifikant verringerte Erhöhung der Herzfrequenz auf den Muskarinrezeptorantagonisten Atropin im Vergleich zu nicht-diabetischen db/+ -Mäusen (Da Goncalves et al. 2009). Dies deutet auf eine verringerte Sensitivität der acetylcholinergen Rezeptoren im Atrium diabetischer Mäuse hin. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ein verändertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, eine veränderte Ansprechbarkeit zentraler Adrenozeptoren, ein reduzierter Tonus des Parasympathikus und eine reduzierte

körperliche Aktivität diabetischer Mäuse eine Rolle bei der verringerten Herzfrequenz diabetischer db/db-Mäuse haben (Da Goncalves et al. 2009; Senador et al. 2009).

Der M2R hat im Herzen außerdem direkt und indirekt eine verringerte Kontraktionskraft (\cong negativer Inotropie) zur Folge. Direkt hemmt der M2R die Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen, sodass der Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol während des Aktionspotentials verringert und letztendlich die Kontraktionskraft reduziert wird (Saternos et al. 2018). Indirekt führt der M2R am Herzen zu einer verringerten Kontraktionskraft, indem die Ausschüttung von Noradrenalin am Herzen reduziert wird (Pape et al. 2014). Dem gegenüber postulieren Mavropolous et al., dass der $\alpha 7\text{nR}$ die Kontraktionskraft aufrechterhalten, wenn nicht steigern, kann indem das mitochondriale Membranpotential stabilisiert, der intrazelluläre ATP-Gehalt aufrechterhalten und die intrazelluläre ROS Menge verringert werden (Mavropoulos et al. 2017). Zudem ist bekannt, dass der $\alpha 7\text{nR}$ neuronal die Ca^{2+} -Freisetzung steigert und somit möglicherweise auch durch vegetative Afferenzen am Herzen die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung steigern und positiv inotrop wirken kann (Natarajan et al. 2020). An db/db-Mäusen wurde mehrfach die Kontraktionskraft der Ventrikel untersucht. Belke et al. stellen in acht Wochen alten db/db-Mäusen eine signifikant reduzierte Kontraktionskraft des Herzens fest (Belke et al. 2004). Auch Semeniuk et al. beschreiben eine verringerte Kontraktionskraft der Herzen diabetischer db/db-Mäusen (Semeniuk et al. 2002). Den Daten der vorliegenden Arbeit nach ist das M2R-Protein im linken Ventrikel mit einem Trend zu Signifikanz verringert und das $\alpha 7\text{nR}$ -Protein mit einem Trend zur Signifikanz verstärkt exprimiert. Somit weisen die Daten zum $\alpha 7\text{nR}$ zunächst eher auf eine verstärkte kardiale Kontraktionskraft diabetischer Mäuse hin. Berücksichtigt man jedoch, dass der M2R mit Abstand der häufigste Rezeptor des parasympathischen Nervensystems am Herzen ist (Dhein et al. 2001; Krejci et al. 2004; Kitazawa et al. 2009), scheinen die Daten einen Erklärungsansatz für die beschriebene verringerte Kontraktionskraft im Herzen diabetischer Mäuse zu bieten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Abnahme der Herzfrequenz bei db/db-Mäusen nicht die Folge einer Abnahme der Expression des atrialen M2R und M3R ist, sondern eher auf andere, oben beschriebene Gründe zurückzuführen ist.

Betrachtet man jedoch die Abnahme der Kontraktionskraft im Ventrikel von db/db-Mäusen, scheint sich diese durch die tendenzielle Abnahme der ventrikulären M2R erklären zu lassen.

4.2 Bedeutung der drei acetylcholinergen Rezeptoren für die Kardioprotektion

Neben den Effekten auf Chronotropie, Dromotropie und Inotropie, haben der M2R, M3R und $\alpha 7nR$ im Ventrikel noch weitere Funktionen. Der M2R vermittelt darüber hinaus kardioprotektive Effekte, indem er die anfallende Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verringert (Miao et al. 2013) und die Synthese des pro-inflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ reduziert (Li et al. 2011). Dies kann die Verringerung von Ischämie und Reperfusionen-Verletzungen (I/R-Verletzungen) bzw. Schäden zur Folge haben (LaCroix et al. 2008; Intachai et al. 2018).

Es ist bekannt, dass die Adaptationsfähigkeit des diabetischen ventrikulären Myokards an Stress sowie I/R-Verletzungen aufgrund einer Dysregulation der kardiomyozytären Ca^{2+} -Homöostase, einer bereits basal erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität und Titin-basierten Steifigkeit, verringert ist (Funk et al. 2022). Die in den vorliegenden Daten beschriebene tendenziell signifikante Reduktion der ventrikulären Proteinexpression des M2R und die damit einhergehende Abnahme der kardioprotektiven Effekte (wie Verringerung der zytosolischen ROS-Menge oder Abnahme der $TNF\alpha$ -Expression) könnten eine weitere Ursache der reduzierten Anpassungsfähigkeit des diabetischen ventrikulären Myokards darstellen.

Neben dem M2R vermittelt auch der M3R kardioprotektive Effekte. Der M3R aktiviert die anti-apoptotischen Bcl-2- und ERK-Kaskade, reduziert die pro-apoptotischen Mediatoren Fas und p38-MAPK, verringert die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung und erhöht die endogene antioxidative Reserve (Yang et al. 2005; Intachai et al. 2018). Die Expression des ventrikulären M3R ist jedoch nicht signifikant verändert, sodass eine Bedeutung für die Anpassungsfähigkeit des diabetischen ventrikulären Myokards anhand der Daten nicht angenommen werden kann. Neben den beiden muskarinergen AChR vermittelt auch der $\alpha 7nR$

kardioprotektive Funktionen. Es ist bekannt, dass dieser vor allem anti-apoptische und anti-oxidative Eigenschaften hat, indem er die ROS-Level reduziert und zudem die Aktivierung pro-apoptischer Signalwege wie p38, MAPK, PI3K, Akt und STAT3 verringert (Intachai et al. 2018). Darüber hinaus hemmt der $\alpha 7nR$ pro-inflammatorische Zytokine wie $TNF\alpha$, Interleukin-6, $NF\kappa B$ und p65 (Mavropoulos et al. 2017). Diese Funktionen führen insbesondere nach I/R-Verletzungen zu einem verringerten Ausmaß der Ischämie und Apoptose. Anders als der M2R ist das Protein des $\alpha 7nR$ mit einem Trend zur Signifikanz verstärkt im ventrikulären Myokard exprimiert. Somit scheint es möglich, dass es in Folge der erhöhten Expression des $\alpha 7nR$ -Proteins zu verstärkten anti-apoptischen und anti-oxidativen Effekten im Myokard kommt, was für eine bessere Anpassungsfähigkeit des diabetischen Myokards sprechen würde. Zieht man jedoch in Betracht, dass der M2R mit mehr als 99% der am häufigsten im Ventrikel exprimierte Rezeptor des vegetativen Nervensystems ist (Dhein et al. 2001; Krejci et al. 2004; Kitazawa et al. 2009), überwiegen die verringerten kardioprotektiven Effekte des M2R vermutlich die verstärkten kardioprotektiven Effekte des $\alpha 7nR$ deutlich. Trotz gewisser Einschränkungen geht die Annahme verringerter kardioprotektiver Effekte im diabetischen Myokard mit bisherigen Studien zur Menge der kardialen ROS-Menge in db/db-Tieren einher. Boudina et al. beschreiben bei zehn Wochen alten db/db-Mäusen im Vergleich zu nicht diabetischen Wildtyp-Mäusen eine erhöhte frei zirkulierende ROS-Menge (Boudina et al. 2007). Zwei weitere Studien kommen im Vergleich von db/db-Mäusen mit heterozygoten db/+ -Mäusen zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Mariappan et al. 2010; Tocchetti et al. 2012).

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die tendenzielle Abnahme des M2R eine weitere Erklärung der verringerten Anpassungsfähigkeit des diabetischen Myokards an Stress und I/R-Verletzungen darstellt.

4.3 Bedeutung des Muskarin-2-Rezeptors für das nicht-neuronale cholinerge kardiales System

In der aktuellen Forschung gewinnt das sogenannte nicht-neuronale cholinerge kardiales System (NNCCS) immer mehr an Bedeutung. Mittlerweile ist belegt, dass ACh im Herzen nicht nur von Zellen des vegetativen Nervensystems synthetisiert, sondern auch von Kardiomyozyten und Endothelzellen bereitgestellt wird (Saw et al. 2018; Saw et al. 2024). Man nimmt an, dass das NNCCS eine protektive Rolle in Bezug auf eine kardiales autonome Neuropathie und eine ischämische Herzerkrankung hat (Saw et al. 2018). Im Gegensatz dazu scheint ein dysreguliertes NNCCS von Bedeutung in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie zu sein (Saw et al. 2021). Saw et al. weisen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten bei db/db-Mäusen eine signifikant verringerte Expression des M2R-Proteins nach (Saw et al. 2021). Diese Annahmen werden durch Daten der vorliegenden Arbeit bekräftigt. Zu einem noch früheren Zeitpunkt (10-12 Wochen) als Saw et al. konnte im Ventrikel diabetischer Mäuse bereits eine tendenziell reduzierte Expression des M2R-Proteins nachgewiesen werden (Saw et al. 2021). Dies lässt vermuten, dass sich bereits zu einem noch früheren Zeitpunkt als bisher bekannt eine Dysregulation des NNCCS bei Typ-2 diabetischen Mäusen nachweisen lässt. Die anderen AChR werden zum aktuellen Zeitpunkt nicht als Bestandteil des NNCCS angesehen (Saw et al. 2024).

Mittlerweile ist zudem aus Tierversuchen ein Aktivator des NNCCS bekannt (S-Nitroso-N-Pivaloyl-D-Penicillamine), welcher vielversprechende Hinweise auf eine signifikant verbesserte systolische und diastolische Funktion des diabetischen Herzens zeigt (Oikawa et al. 2020).

Es lässt sich somit feststellen, dass es im Herzen diabetischer db/db-Tiere früher als bisher bekannt Hinweise auf ein dysreguliertes NNCCS gibt. Dies lässt vermuten, dass der veränderten Expression der acetylcholinergen Rezeptoren eine noch entscheidendere Rolle in der Genese der diabetischen Kardiomyopathie zukommt als bisher angenommen.

4.4 Bedeutung der drei acetylcholinergen Rezeptoren für das PKC α -Signalling

In Herzen diabetischer Mäuse mit etabliertem diabetischem Phänotyp ist nachgewiesen, dass die Titin-basierte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen signifikant erhöht ist (Funk et al. 2022). Diese verstärkte Titin-basierte passive Steifigkeit ist am ehesten Folge einer ebenfalls in isolierten Kardiomyozyten von diabetischen Mäusen nachgewiesenen verstärkten Aktivierung der Protein-Kinase-C- α (PKC α) (Funk et al. 2022). Aktuell sind mindestens 13 verschiedene Isoformen der Proteinkinase-C (PKC) bekannt, wovon vor allem die PKC α , PKC β , PKC δ , PKC ϵ und PKC λ im Herzen exprimiert werden (Singh et al. 2017). Die PKC α wird durch den *second messenger* Diacylglycerol und durch Ca²⁺ aktiviert, sodass nachgeschaltete Signalproteine ihre Funktion vermitteln (Liu und Molkentin 2011; Singh et al. 2017). Im Herzen wird durch die Kinaseaktivität der PKC α die elastische I-Bande des Titin-Proteins u.a. an Aminosäure S11878 verstärkt phosphoryliert. Dadurch ändert sich das Dehnungsverhalten des Proteins und die Kardiomyozyten weisen eine erhöhte Titin-basierte passive Steifigkeit auf (Hidalgo et al. 2009). Unbeantwortet bleibt bisher jedoch die Frage, über welche Rezeptorsignalkaskade bei diabetischer Stoffwechsellage diese verstärkte PKC α -Aktivität verursacht wird. In unpublizierten Voruntersuchungen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Kötter zeigte sich, dass die verstärkte PKC α -Aktivität möglicherweise durch acetylcholinerge Rezeptoren (M2R, M3R und α 7nR) vermittelt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde eine tendenziell reduzierte linksventrikuläre Expression des M2R-Proteins, eine nicht-signifikant veränderte Expression des M3R-Proteins und ein tendenziell verstärkt exprimiertes α 7nR-Protein bei db/db-Tieren nachgewiesen. Ein Zusammenhang der untersuchten acetylcholinergen Rezeptoren, welcher eine verstärkte PKC α -Aktivität in diabetischen Mäusen erklären würde, konnte anhand der Daten nicht eindeutig festgestellt werden.

Hervorzuheben ist, dass die mRNA-Expression aller drei acetylcholinergen Rezeptoren atrial bereits signifikant erhöht ist. Somit scheint es bereits zu Adaptionen der Transkriptions-Translations-Kaskade zu kommen, welche sich zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch noch nicht auf die Proteinebene auswirken.

Möglicherweise lassen sich die Veränderungen erst zu einem späteren Zeitpunkt auf Proteinebene nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorgelegten Daten keinen eindeutigen Hinweis auf die Ursache des veränderten PKC α -*Signallings* im diabetischen Herzen darstellen.

4.5 Bedeutung der Kollagene und Lysyloxidasen für die passive Steifigkeit im nicht-ischämischen diabetischen Herzen

In der vorgelegten Dissertation wurde darüber hinaus die mRNA-Expression von Kollagen-Typ-1-a (Col1a) und Kollagen-Typ-3-a (Col3a) getrennt in den Atrien und Ventrikeln untersucht. Die Expression von Col1a war im linken Ventrikel unverändert, die Expression von Col1a im Atrium war signifikant erhöht. Die Expression von Col3a war sowohl im linken Ventrikel als auch im Atrium signifikant reduziert.

Die passive Steifigkeit des Herzens beschreibt die Kräfte, welche von nicht-kontraktilelementen des Myokards (v.a. Titin und Kollagen), insbesondere während der Diastole, aufgebaut werden (H.L. Granzier und T.C. Irving 1995; Loescher et al. 2022). Ändern sich die mechanischen Eigenschaften des kardialen Titins oder der Kollagene, beeinflusst dies die diastolischen Eigenschaften des Herzens. Die Kollagene modulieren die passive Steifigkeit über das Verhältnis des steiferen Col1a zum elastischeren Col3a (Wittig und Szulcek 2021). Verschiedene kardiale Erkrankungen können ein verändertes Verhältnis von Col1a zu Col3a zur Folge haben. Im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung, eines Vorhofflimmerns oder des physiologischen Alterungsprozesses verschiebt sich das Verhältnis stärker zu Col1a, sodass die passive Steifigkeit des Myokards zunimmt (Wittig und Szulcek 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Expression der Kollagene untersucht. Anhand dieser Daten lässt sich nicht auf absolute Veränderungen der Kollagenmenge schließen, näherungsweise lässt sich jedoch eine Veränderung des Verhältnisses von Col1a zu Col3a annehmen und damit eine Zu- oder Abnahme

der passiven Steifigkeit. Die ventrikulären Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Col1a Expression nicht signifikant verändert ist, während die Expression des Col3a signifikant reduziert ist. Dementsprechend verschiebt sich das Verhältnis im linken Ventrikel diabetischer Tiere näherungsweise in Richtung des steiferen Col1a. Dies lässt den Schluss zu, dass die passive Steifigkeit des ventrikulären Myokards zunimmt.

Col1a ist im Atrium um das 2,4-Fache stärker exprimiert, Col3a ist jedoch um das 0,65-Fache geringer exprimiert. Es ist bekannt, dass Col1a ca. 85% des kardialen Gesamtkollagens ausmacht (Kong et al. 2014; Rodríguez und Martínez-González 2019), sodass davon auszugehen ist, dass das Gesamtverhältnis auch im Atrium in Richtung des steiferen Col1a verschoben ist. Chronisch kann diese Veränderung zu einem erhöhten end-diastolischen-Volumen bzw. end-diastolischen-Druck führen und eine diastolische Herzinsuffizienz begünstigen. Ob sich die mRNA-Daten auch auf Proteinebene übertragen lassen, kann anhand der Daten nicht abschließend geklärt werden. Auffällig ist jedoch, dass sich zu einem Zeitpunkt des diabetischen Phänotyps, zu welchem noch keine kardialen Funktionseinschränkungen bestehen, bereits Veränderungen der Kollagene auf mRNA-Ebene zeigen. Das auf mRNA-Ebene dargestellte verschobene Verhältnis der Kollagene zu Col1a lässt sich im Endstadium einer diabetischen Kardiomyopathie auch auf Proteinebene nachweisen (Jia et al. 2018; Pan et al. 2023). So lässt sich mutmaßen, dass der Grundstein für die späteren typischen Veränderungen einer diabetischen Kardiomyopathie bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt auf mRNA-Ebene gelegt wird.

Bemerkenswerterweise wird in anderen Publikationen eine Zunahme der ventrikulären Col1a-mRNA-Menge beschrieben und keine Abnahme der Col3a-mRNA-Menge (Hutchinson et al. 2013; Wang et al. 2015). Funktional hat dies, ebenso wie bei den hier beschriebenen Daten, eine Verschiebung des Kollagenverhältnisses zum steiferen Col1a zur Folge. Mechanistisch betrachtet führt dies ebenfalls zu einer höheren passiven Steifigkeit des diabetischen Myokards. Die Daten legen nahe, dass die erhöhte passive Steifigkeit des diabetischen Myokards nicht nur Folge einer erhöhten Col1a-Expression, sondern auch einer verringerten Col3a-Expression sein kann. In beiden Fällen verschiebt sich das Verhältnis der Kollagene zum steiferen Col1a.

Lysyloxidasen sind Enzyme, welche die Quervernetzung von Kollagenen untereinander katalysieren (Rodríguez und Martínez-González 2019). Damit sind die Lysyloxidasen essentiell für die Stabilität der kardialen Extrazellulärmatrix und die mechanischen Eigenschaften des Myokards (Rodríguez und Martínez-González 2019). Dysregulationen der Lysyloxidasen können kardialen Pathologien wie eine Fibrose oder Herzinsuffizienz begünstigen (Rodríguez und Martínez-González 2019). Die mRNA-Expression der Lysyloxidase-L1 (Loxl1) war sowohl im Atrium als auch im Ventrikel signifikant reduziert. Die Expression der mRNA der Lysyloxidase-L2 (Loxl2) war weder atrial noch ventrikulär signifikant verändert. Die Daten weisen darauf hin, dass die Quervernetzung der Kollagene im Herzen diabetischer Mäuse verringert ist, sodass vermeintlich die passive Steifigkeit des Myokards im Herzen reduziert ist. Mit dem oben beschriebenen Wissen zur Kollagenexpression im Herzen diabetischer Mäuse ist dies ein überraschendes und unerwartetes Ergebnis. Die bisherige Studienlage zur Expression von Loxl im Ventrikel diabetischer Mäuse legt demgegenüber eine signifikant erhöhte Expression der Lysyloxidasen nahe (Johnson et al. 2020; Funk et al. 2022). Die Bedeutung einer verringerten Expression der Loxl1 im Herzen diabetischer Mäuse lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend aufklären und bedarf weiterer Forschung.

4.6 Limitationen

Für die vorgelegten Daten wurde die Proteinexpression der acetylcholinergen Rezeptoren sowohl mittels *Western-Blot* als auch per Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. In der Auswertung stellten sich teilweise konträre Expressionswerte der jeweiligen Rezeptoren dar (z.B.: *Western-Blot* M2R linksventrikulär: $-0,85 \pm 0,03$ -Fache, $p=0,0759$; Immunfluoreszenz M2R linksventrikulär: $+1,26 \pm 0,08$ -Fache, $p=0,0489$). Während der Anfertigung und Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie ließen sich mehrere Auffälligkeiten feststellen. Zum einen wurde bei den Färbungen der drei acetylcholinergen Rezeptoren eine deutliche Hintergrundfluoreszenz detektiert. Bei dieser könnte es sich um unspezifische Bindungen oder um eine Autofluoreszenz gehandelt haben (Loughran et al. 2022), wodurch die automatisierte Auswertung (mittels *ImageJ*) der

einzelnen Rezeptorproteine erschwert gewesen sein könnte. Zudem konnten Rezeptorproteine intrazellulär nachgewiesen werden, obwohl es sich bei allen drei acetylcholinergen Rezeptoren um membranständige Rezeptoren handelt. Ursprünglich wurden die intrazellulären Signale als entweder in Golgi-Vesikeln umhüllte Rezeptorproteine oder als schnittbedingte intrazelluläre Signale interpretiert. Die Möglichkeit, dass Teile der Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie durch Färbeartefakte verfälscht waren, kann bei der vorliegenden Datenlage nicht ausgeschlossen werden. In der Diskussion wurden daher die Daten der *Western-Blot* Analysen herangezogen, welche zusätzlich durch Daten von Saw et al. unterstützt werden (Saw et al. 2021).

4.7 Schlussfolgerungen

Durch unpublizierte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Krüger gibt es Hinweise, dass ein verstärktes PKC α -*Signalling* in diabetischen Kardiomyozyten, respektive eine verstärkte passive Steifigkeit des kardialen Titinproteins, durch ein Zusammenwirken dreier acetylcholinergere Rezeptoren (M2R, M3R, α 7nR) ausgelöst sein könnte. Ein Zusammenspiel der drei acetylcholinergen Rezeptoren, das das verstärkte PKC α -*Signalling* erklären könnte, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht verifiziert werden. Es scheint jedoch andere mögliche Ursachen zu geben, die das veränderte PKC α -*Signalling* im diabetischen Herzen erklären könnten. Diese sind in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht worden. Zum einen könnte eine veränderte Sensitivität der acetylcholinergen Rezeptoren ursächlich sein, wofür es bereits erste Hinweise gibt (Hidalgo et al. 2009; Liu et al. 2021). Außerdem könnte auch eine veränderte präsynaptische Ausschüttung von Acetylcholin der Grund für das veränderte PKC α -*Signalling* sein. Als mögliche weitere Ursachen wird außerdem eine verstärkte Entzündungsreaktion im diabetischen Herzen diskutiert (Tan et al. 2020; Funk et al. 2022).

Aus der vorliegenden Arbeit lassen sich außerdem neue Erkenntnisse für das NNCCS ableiten. So ist die Dysregulation des NNCCS früher als bisher bekannt im

Ventrikel diabetischer Mäuse nachzuweisen und beeinflusst möglicherweise langfristig die Genese einer diabetischen Kardiomyopathie.

Bemerkenswerterweise lassen sich bei db/db-Mäusen im Atrium Veränderungen der acetylcholinergen Rezeptoren auf mRNA-Ebene belegen, obwohl sich im Alter von zehn bis zwölf Wochen noch keine Veränderungen der kardialen Funktion nachgewiesen werden können. Ähnliches lässt sich auch für das Verhältnis der mRNA von Kollagen-Typ-1a zu Kollagen-Typ-3a im Ventrikel und Atrium aufzeigen. Dies legt den Schluss nahe, dass sich bereits deutlich vor Manifestation kardialer Funktionseinschränkungen und dem Vollbild einer diabetischen Kardiomyopathie typische Veränderungen auf mRNA-Ebene im diabetischen Herzen einstellen. Möglicherweise stellt das dysregulierte acetylcholinerge System eine frühzeitige Interventionsmöglichkeit zur therapeutischen Behandlung einer diabetischen Kardiomyopathie dar.

5 Literaturverzeichnis

- Abramochkin, Denis V./Tapilina, Svetlana V./Sukhova, Galina S./Nikolsky, Eugen E./Nurullin, Leniz F. (2012). Functional M3 cholinoreceptors are present in pacemaker and working myocardium of murine heart. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 463 (4), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1075-1>.
- Belke, D. D./Swanson E. A./Dillmann W. H. (2004). Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic dbdb mouse heart. *Diabetes*, 3201–3208. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3201>.
- Benninghoff, A./Drenckhahn D. (2004). *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie - Band 2*. 16. Aufl. Urban & Fischer Verlag.
- Bielschowsky, F./Bielschowsky M. (1956). The New Zealand strain of obese mice; their response to stilboestrol and to insulin. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 34 (3), 181–198. <https://doi.org/10.1038/icb.1956.22>.
- Bingxuan Wang/Chandrasekera, P. C./Pippin, J. J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews* (10), 131–145. <https://doi.org/10.2174/1573399810666140508121012>.
- Bommer, Christian/Sagalova, Vera/Heesemann, Esther/Manne-Goehler, Jennifer/Atun, Rifat/Bärnighausen, Till/Davies, Justine/Vollmer, Sebastian (2018). Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes care* 41 (5), 963–970. <https://doi.org/10.2337/dc17-1962>.
- Boudina, Sihem/Sena, Sandra/Theobald, Heather/Sheng, Xiaoming/Wright, Jordan J./Hu, Xia Xuan/Aziz, Salwa/Johnson, Josie I./Bugger, Heiko/Zaha, Vlad G./Abel, E. Dale (2007). Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56 (10), 2457–2466. <https://doi.org/10.2337/db07-0481>.
- Bouzat, Cecilia/Lasala, Matías/Nielsen, Beatriz Elizabeth/Corradi, Jeremías/Del Esandi, María Carmen (2018). Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as

drug targets. *The Journal of physiology* 596 (10), 1847–1861.
<https://doi.org/10.1113/JP275101>.

Bundesärztekammer/Kassenärztliche Bundesvereinigung/Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2023). Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Langfassung, Version 3.0.

Chatterjee, Sudesna/Khunti, Kamlesh/Davies, Melanie J. (2017). Type 2 diabetes. *Lancet* (London, England) 389 (10085), 2239–2251.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2).

Chatzigeorgiou, Antonios/Halapas, Antonios/Kalafatakis, Konstantinos/Kamper, Elli (2009). The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *in vivo*, 245–258.

Corradi, Jeremías/Bouzat, Cecilia (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Molecular pharmacology* 90 (3), 288–299.
<https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>.

Da Goncalves, Andrey C. Costa/Tank, Jens/Diedrich, André/Hilzendeger, Aline/Plehm, Ralph/Bader, Michael/Luft, Friedrich C./Jordan, Jens/Gross, Volkmar (2009). Diabetic hypertensive leptin receptor-deficient db/db mice develop cardiorespiratory autonomic dysfunction. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979) 53 (2), 387–392.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124776>.

Darrell D. Belke/Terje S. Larsen/E. Michael Gibbs/and David L. Severson (2000). Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 1104–1113. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1104>.

Del Monte-Nieto, Gonzalo/Fischer, Jens W./Gorski, Daniel J./Harvey, Richard P./Kovacic, Jason C. (2020). Basic Biology of Extracellular Matrix in the Cardiovascular System, Part 1/4: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology* 75 (17), 2169–2188.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.024>.

Deng, Ya-Wen/Liu, Fei/Li, Zhi-Tong/Gao, Jing-Han/Zhao, Yong/Yang, Xiao-Lei/Xia, Yun-Long (2022). Hyperglycemia promotes myocardial dysfunction via the

ERS-MAPK10 signaling pathway in db/db mice. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 102 (11), 1192–1202. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00819-2>.

Dhein, S./van Koppen, C. J./Brodde, O. E. (2001). Muscarinic receptors in the mammalian heart. Pharmacological research 44 (3), 161–182. <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0835>.

Dietel, Manfred/Suttorp, Norbert/Zeitz, Martin (2012). Harrisons Innere Medizin. Band 3. 18. Aufl. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH.

Dvorakova, Magdalena/Lips, Katrin S./Brüggmann, Dörthe/Slavikova, Jana/Kuncova, Jitka/Kummer, Wolfgang (2005). Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. Cell and tissue research 319 (2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1008-1>.

Funk, Florian/Kronenbitter, Annette/Isić, Malgorzata/Flocke, Vera/Gorreßen, Simone/Semmler, Dominik/Brinkmann, Maximilian/Beck, Katharina/Steinhoff, Oliver/Srivastava, Tanu/Barbosa, David Monteiro/Voigt, Katharina/Wang, Luzhou/Bottermann, Katharina/Kötter, Sebastian/Grandoch, Maria/Flögel, Ulrich/Krüger, Martina/Schmitt, Joachim P. (2022). Diabetes disturbs functional adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. Journal of molecular and cellular cardiology 173, 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.09.002>.

Galicia-Garcia, Unai/Benito-Vicente, Asier/Jebari, Shifa/Larrea-Sebal, Asier/Siddiqi, Haziq/Uribe, Kepa B./Ostolaza, Helena/Martín, César (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. International journal of molecular sciences 21 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.

Garnier, A./Fortin, D./Deloménie, C./Momken, I./Veksler, V./Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. The Journal of physiology 551 (2), 491–501. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045104>.

Giardinelli, Silvia/Meliota, Giovanni/Mentino, Donatella/D'Amato, Gabriele/Faienza, Maria Felicia (2024). Molecular Basis of Cardiomyopathies in Type 2 Diabetes. International journal of molecular sciences 25 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms25158280>.

- Goto, Y./Kakizaki, M./Masaki, N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 85–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.119.85>.
- Granzier, Henk L./Labeit, Siegfried (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circulation research* 94 (3), 284–295. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8>.
- Granzier, Henk/Wu, Yiming/Labeit, Siegfried/LeWinter, Martin (2005). Titin: Physiological Function and Role in Cardiomyopathy and Failure. *Heart Failure Reviews* 10, 211–233. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-5251-7>.
- Greer, James J. M./Ware, Derek P./Lefer, David J. (2006). Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290 (1), H146-53. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00583.2005>.
- H.L. Granzier/T.C. Irving (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical Journal*, 1027–1044. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80278-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80278-X).
- Haga, Tatsuya (2013). Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 89 (6), 226–256. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.226>.
- Heinrich, Peter C./Müller, Matthias/Graeve, Lutz (2014). *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. vollständig überarbeitete Auflage. 9. Aufl. Springer-Verlag.*
- Herold, Gerd (2019). *Innere Medizin - 2019. Köln, Herold.*
- Hidalgo, Carlos/Hudson, Bryan/Bogomolovas, Julius/Zhu, Yi/Anderson, Brian/Greaser, Marion/Labeit, Siegfried/Granzier, Henk (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circulation research* 105 (7), 631-8, 17 p following 638. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>.
- Hopf, Anna-Eliane/Andresen, Christian/Kötter, Sebastian/Isić, Małgorzata/Ulrich, Kamila/Sahin, Senem/Bongardt, Sabine/Röll, Wilhelm/Drove, Felicitas/Scheerer, Nina/Vandekerckhove, Leni/Keulenaer, Gilles W. de/Hamdani, Nazha/Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2018). *Diabetes-*

- Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circulation research* 123 (3), 342–355. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312166>.
- Hummel, K. P./Dickie, M. M./Coleman, D.L (1966). Diabetes, a New Mutation in the Mouse. *Science*, 1127–1128. <https://doi.org/10.1126/science.153.3740.1127>.
- Hutchinson, Kirk R./Lord, C. Kevin/West, T. Aaron/Stewart, James A. (2013). Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes. *PloS one* 8 (8), e72080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072080>.
- Huxley, Hugh/Hanson, Jean (1954). Changes in the Cross-Striation of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature*, 973–976. <https://doi.org/10.1038/173973a0>.
- Ingalls, A. M./Dickie, M. M./Snell, G. D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *Journal of Heredity*, 317–318. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106073>.
- Intachai, Kannaporn/C Chattipakorn, Siriporn/Chattipakorn, Nipon/Shinlapawittayatorn, Krekwit (2018). Revisiting the Cardioprotective Effects of Acetylcholine Receptor Activation against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *International journal of molecular sciences* 19 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092466>.
- Jia, Guanghong/Hill, Michael A./Sowers, James R. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circulation research* 122 (4), 624–638. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311586>.
- Johnson, Rabia/Nxele, Xolisa/Cour, Martin/Sangweni, Nonhlakanipho/Jooste, Tracey/Hadebe, Nkanyiso/Samodien, Ebrahim/Benjeddou, Mongi/Mazino, Mikateko/Louw, Johan/Lecour, Sandrine (2020). Identification of potential biomarkers for predicting the early onset of diabetic cardiomyopathy in a mouse model. *Scientific reports* 10 (1), 12352. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69254-x>.

- Joost, Hans-Georg/AI-Hasani, Hadi/Schürmann, Annette (2012). *Animal Models in Diabetes Research*. Totowa, NJ, Humana Press.
- King, Aileen J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology* 166 (3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>.
- Kiss, A./Tratsiakovich, Y./Mahdi, A./Yang, J./Gonon, A. T./Podesser, B. K./Pernow, J. (2017). Vagal nerve stimulation reduces infarct size via a mechanism involving the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor and downregulation of cardiac and vascular arginase. *Acta physiologica (Oxford, England)* 221 (3), 174–181. <https://doi.org/10.1111/apha.12861>.
- Kitazawa, Takio/Asakawa, Koichi/Nakamura, Tatsuro/Teraoka, Hiroki/Unno, Toshihiro/Komori, Sei-Ichi/Yamada, Masahisa/Wess, Jürgen (2009). M3 muscarinic receptors mediate positive inotropic responses in mouse atria: a study with muscarinic receptor knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330 (2), 487–493. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.153304>.
- Kondo, K./Nozawa, K./Tomita, T./Ezaki, K. (1957). Inbred strains resulting from Japanese mice. *Bulletin of the Experimental Animals*, 107–112.
- Kong, Ping/Christia, Panagiota/Frangogiannis, Nikolaos G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (4), 549–574. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>.
- Kötter, S./Kazmierowska, M./Andresen, C./Bottermann, K./Gorresen, 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. *Circulation research*, 1017–1029. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685>.
- Kötter, Sebastian/Andresen, Christian/Krüger, Martina (2014). Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biological chemistry* 395 (11), 1341–1352. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0178>.
- Kötter, Sebastian/Krüger, Martina (2022). Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development.

Frontiers in physiology 13, 914296.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.914296>.

- Krejci, A./Michal, P./Jakubik, J./Ricny, J./Dolezal, V. (2004). Regulation of Signal Transduction at M2 Muscarinic Receptor. *Physiological Research*, 231–240.
- Kruse, Andrew C./Li, Jianhua/Hu, Jianxin/Kobilka, Brian K./Wess, Jürgen (2014). Novel insights into M3 muscarinic acetylcholine receptor physiology and structure. *Journal of molecular neuroscience : MN* 53 (3), 316–323.
<https://doi.org/10.1007/s12031-013-0127-0>.
- LaCroix, Carly/Freeling, Jessica/Giles, Alese/Wess, Jürgen/Li, Yi-Fan (2008). Deficiency of M2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294 (2), H810-20.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00724.2007>.
- Lange, Stephan/Pinotsis, Nikos/Agarkova, Irina/Ehler, Elisabeth (2020). The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867 (3), 118440.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.003>.
- Li, Dong-Ling/Liu, Jin-Jun/Liu, Bing-Hang/Hu, Hao/Sun, Lei/Miao, Yi/Xu, Hai-Fei/Yu, Xiao-Jiang/Ma, Xin/Ren, Jun/Zang, Wei-Jin (2011). Acetylcholine inhibits hypoxia-induced tumor necrosis factor- α production via regulation of MAPKs phosphorylation in cardiomyocytes. *Journal of cellular physiology* 226 (4), 1052–1059. <https://doi.org/10.1002/jcp.22424>.
- Li, Hui/Zhang, Zong-Ze/Zhan, Jia/He, Xiang-Hu/Song, Xue-Min/Wang, Yan-Lin (2012). Protective Effect of PNU-120596, a Selective Alpha7 Nicotinic Receptor - positive Allosteric Modulator, on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 507–513.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31824c86c3>.
- Linke, Wolfgang A./Hamdani, Nazha (2014). Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circulation research* 114 (6), 1052–1068.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301286>.

- Liu, Qinghang/Molkentin, Jeffery D. (2011). Protein kinase C α as a heart failure therapeutic target. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51 (4), 474–478. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.004>.
- Liu, Yingjie/Jansen, Hailey J./Krishnaswamy, Pooja S./Bogachev, Oleg/Rose, Robert A. (2021). Impaired regulation of heart rate and sinoatrial node function by the parasympathetic nervous system in type 2 diabetic mice. *Scientific reports* 11 (1), 12465. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91937-2>.
- Loescher, Christine M./Hobbs, Anastasia J./Linke, Wolfgang A. (2022). Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance. *Cardiovascular research* 118 (14), 2903–2918. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab328>.
- Loughran, Patricia A./Ross, Mark A./St Croix, Claudette M. (2022). Immunohistochemistry. *Current protocols* 2 (9), e549. <https://doi.org/10.1002/cpz1.549>.
- Mariappan, Nithya/Elks, Carrie M./Sriramula, Srinivas/Guggilam, Anuradha/Liu, Zhizhen/Borkhsenious, Olga/Francis, Joseph (2010). NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovascular research* 85 (3), 473–483. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp305>.
- Martínez-González, José/Varona, Saray/Cañes, Laia/Galán, María/Briones, Ana M./Cachofeiro, Victoria/Rodríguez, Cristina (2019). Emerging Roles of Lysyl Oxidases in the Cardiovascular System: New Concepts and Therapeutic Challenges. *Biomolecules* 9 (10). <https://doi.org/10.3390/biom9100610>.
- Mavropoulos, Spyros A./Khan, Nayaab S./Levy, Asaph C. J./Faliks, Bradley T./Sison, Cristina P./Pavlov, Valentin A./Zhang, Youhua/Ojamaa, Kaie (2017). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated protection of the rat heart exposed to ischemia reperfusion. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 23, 120–133. <https://doi.org/10.2119/molmed.2017.00091>.
- Miao, Yi/Zhou, Jun/Zhao, Mei/Liu, Jinjun/Sun, Lei/Yu, Xiaojiang/He, Xi/Pan, Xiaoyue/Zang, Weijin (2013). Acetylcholine attenuates hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial and cytosolic ROS formation in H9c2 cells via M2 acetylcholine receptor. *Cellular physiology and biochemistry* :

international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 31 (2-3), 189–198. <https://doi.org/10.1159/000343360>.

Mulnier, H. E./Seaman, H. E./Raleigh, V. S./Soedamah-Muthu, S. S./Colhoun, H. M./Lawrenson, R. A./Vries, C. S. de (2008). Risk of myocardial infarction in men and women with type 2 diabetes in the UK: a cohort study using the General Practice Research Database. *Diabetologia* 51 (9), 1639–1645. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1076-y>.

Natarajan, Kathiresan/Mukhtasimova, Nuriya/Corradi, Jeremías/Lasala, Matías/Bouzat, Cecilia/Sine, Steven M. (2020). Mechanism of calcium potentiation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *The Journal of general physiology* 152 (9). <https://doi.org/10.1085/jgp.202012606>.

Obradovic, Milan/Sudar-Milovanovic, Emina/Soskic, Sanja/Essack, Magbubah/Arya, Swati/Stewart, Alan J./Gojobori, Takashi/Isenovic, Esmā R. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in endocrinology* 12, 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>.

Oikawa, Shino/Kai, Yuko/Mano, Asuka/Nakamura, Shigeo/Kakinuma, Yoshihiko (2020). S-Nitroso-N-Pivaloyl-D-Penicillamine, a novel non-neuronal ACh system activator, modulates cardiac diastolic function to increase cardiac performance under pathophysiological conditions. *International immunopharmacology* 84, 106459. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106459>.

Pan, Kuo-Li/Hsu, Yung-Chien/Chang, Shih-Tai/Chung, Chang-Min/Lin, Chun-Liang (2023). The Role of Cardiac Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy: From Pathophysiology to Clinical Diagnostic Tools. *International journal of molecular sciences* 24 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms24108604>.

Pape, Hans-Christian/Kurtz, Armin/Silbernagl, Stefan (2014). *Physiologie*. 7. Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

Rawshani, Aidin/Rawshani, Araz/Franzén, Stefan/Eliasson, Björn/Svensson, Ann-Marie/Miftaraj, Mervete/McGuire, Darren K./Sattar, Naveed/Rosengren, Annika/Gudbjörnsdóttir, Soffia (2017). Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 376 (15), 1407–1418. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608664>.

- Ren, Chao/Tong, Ya-Lin/Li, Jun-Cong/Lu, Zhong-Qiu/Yao, Yong-Ming (2017). The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism. *International journal of biological sciences* 13 (1), 46–56. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16404>.
- Rodríguez, Cristina/Martínez-González, José (2019). The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling. *Cells* 8 (12). <https://doi.org/10.3390/cells8121483>.
- Saeedi, Pouya/Petersohn, Inga/Salpea, Paraskevi/Malanda, Belma/Karuranga, Suvi/Unwin, Nigel/Colagiuri, Stephen/Guariguata, Leonor/Motala, Ayesha A./Ogurtsova, Katherine/Shaw, Jonathan E./Bright, Dominic/Williams, Rhys (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes research and clinical practice* 157, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.
- Salvador, Dante B./Gamba, Magda R./Gonzalez-Jaramillo, Nathalia/Gonzalez-Jaramillo, Valentina/Raguindin, Peter Francis N./Minder, Beatrice/Gräni, Christoph/Wilhelm, Matthias/Stettler, Christoph/Doria, Alessandro/Franco, Oscar H./Muka, Taulant/Bano, Arjola (2022). Diabetes and Myocardial Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JACC. Cardiovascular imaging* 15 (5), 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2021.12.008>.
- Saternos, Hannah C./Almarghalani, Daniyah A./Gibson, Hayley M./Meqdad, Mahmood A./Antypas, Raymond B./Lingireddy, Ajay/AbouAlaiwi, Wissam A. (2018). Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiological genomics* 50 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2017>.
- Saw, Eng Leng/Fronius, Martin/Katare, Rajesh/Kakinuma, Yoshihiko (2024). Mini Review: the non-neuronal cardiac cholinergic system in type-2 diabetes mellitus. *Frontiers in cardiovascular medicine* 11, 1425534. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1425534>.
- Saw, Eng Leng/Kakinuma, Yoshihiko/Fronius, Martin/Katare, Rajesh (2018). The non-neuronal cholinergic system in the heart: A comprehensive review. *Journal of molecular and cellular cardiology* 125, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.013>.

- Saw, Eng Leng/Pearson, James T./Schwenke, Daryl O./Munasinghe, Pujika Emani/Tsuchimochi, Hirotugu/Rawal, Shruti/Coffey, Sean/Davis, Philip/Bunton, Richard/van Hout, Isabelle/Kai, Yuko/Williams, Michael J. A./Kakinuma, Yoshihiko/Fronius, Martin/Katare, Rajesh (2021). Activation of the cardiac non-neuronal cholinergic system prevents the development of diabetes-associated cardiovascular complications. *Cardiovascular diabetology* 20 (1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12933-021-01231-8>.
- Schernthaner, G. (1996). Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 3–13. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(96\)01224-7](https://doi.org/10.1016/0168-8227(96)01224-7).
- Semeniuk, Lisa M./Kryski, Albert J./Severson, David L. (2002). Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283 (3), H976-82. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00088.2002>.
- Senador, Danielle/Kanakamedala, Keerthy/Irigoyen, Maria Claudia/Morris, Mariana/Elased, Khalid M. (2009). Cardiovascular and autonomic phenotype of db/db diabetic mice. *Experimental physiology* 94 (6), 648–658. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.046474>.
- Singh, Raphael M./Cummings, Emanuel/Pantos, Constantinos/Singh, Jaipaul (2017). Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart Failure Reviews* 22 (6), 843–859. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9634-3>.
- Sun, Lei/Zhao, Mei/Yu, Xiao-Jiang/Wang, Hao/He, Xi/Liu, Jian-Kang/Zang, Wei-Jin (2013). Cardioprotection by acetylcholine: a novel mechanism via mitochondrial biogenesis and function involving the PGC-1 α pathway. *Journal of cellular physiology* 228 (6), 1238–1248. <https://doi.org/10.1002/jcp.24277>.
- Surwit, R. S./Kuhn, C. M./Cochrane, C./McCubbin, J. A./Feinglos M.N. (1988). Diet induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 1163–1167. <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>.
- Tan, Yi/Zhang, Zhiguo/Zheng, Chao/Wintergerst, Kupper A./Keller, Bradley B./Cai, Lu (2020). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nature reviews. Cardiology* 17 (9), 585–607. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0339-2>.

- Tocchetti, Carlo G./Caceres, Viviane/Stanley, Brian A./Xie, Chaoqin/Shi, Sa/Watson, Walter H./O'Rourke, Brian/Spadari-Bratfisch, Regina C./Cortassa, Sonia/Akar, Fadi G./Paolocci, Nazareno/Aon, Miguel A. (2012). GSH or palmitate preserves mitochondrial energetic/redox balance, preventing mechanical dysfunction in metabolically challenged myocytes/hearts from type 2 diabetic mice. *Diabetes* 61 (12), 3094–3105. <https://doi.org/10.2337/db12-0072>.
- Tskhovrebova, Larissa/Trinick, John (2010). Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 612482. <https://doi.org/10.1155/2010/612482>.
- Wang, H./Lu, Y./Wang, Z. (2007). Function of cardiac M3 receptors. *Autonomic & autacoid pharmacology* 27 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2006.00381.x>.
- Wang, Hui/Bei, Yihua/Lu, Yan/Sun, Wei/Liu, Qi/Wang, Yalong/Cao, Yujie/Chen, Ping/Xiao, Junjie/Kong, Xiangqing (2015). Exercise Prevents Cardiac Injury and Improves Mitochondrial Biogenesis in Advanced Diabetic Cardiomyopathy with PGC-1 α and Akt Activation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35 (6), 2159–2168. <https://doi.org/10.1159/000374021>.
- Wang, Seu-Mei/Sun, Mu-Chien/Jeng, Chung-Jiuan (1991). Location of the C-Terminus of Titin at the Z-Line Region in the Sarcomere. *Biochemical and biophysical research communications* (176), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90907-o](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90907-o).
- Wang, Shu/Han, Hong-Mei/Jiang, Ya-Nan/Wang, Chao/Song, Hao-Xin/Pan, Zhen-Yu/Fan, Kai/Du, Juan/Fan, Yu-Hua/Du, Zhi-Min/Liu, Yan (2012). Activation of cardiac M3 muscarinic acetylcholine receptors has cardioprotective effects against ischaemia-induced arrhythmias. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 39 (4), 343–349. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2012.05672.x>.
- Wilfinger, W. W./Mackey, K./Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22 (3), 474-6, 478-81. <https://doi.org/10.2144/97223st01>.

- Wittig, Corey/Szulcek, Robert (2021). Extracellular Matrix Protein Ratios in the Human Heart and Vessels: How to Distinguish Pathological From Physiological Changes? *Frontiers in physiology* 12, 708656. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.708656>.
- Yang, Baofeng/Lin, Huixian/Xu, Chaoqian/Liu, Yan, Wang, Huizhen/Han, Hong/Wang, Zhiguo (2005). Choline Produces Cytoprotective Effects Against Ischemic Myocardial Injuries: Evidence for the Role of Cardiac M3 Subtype Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 163–174. <https://doi.org/10.1159/000089842>.
- Yki-Järvinen, Hannele (2011). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. In: Hannele Yki-Järvinen (Hg.). *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press, 1740–1748.
- Zhang, Y./Proenca, R./Maffel, M./Barone, M./Leopold, L./Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhao, Lihui/Chen, Tingting/Hang, Pengzhou/Li, Wen/Guo, Jing/Pan, Yang/Du, Jingjing/Zheng, Yuyang/Du, Zhimin (2019). Choline Attenuates Cardiac Fibrosis by Inhibiting p38MAPK Signaling Possibly by Acting on M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Frontiers in pharmacology* 10, 1386. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01386>.
- Zucker, L. M./Zucker, T. F. (1961). Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity*, 275–278. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107093>.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers	7
Abb. 2: Schematischer Aufbau der kardialen Titinisoformen N2B und N2BA im Halbsarkomer mit häufigen Phosphorylierungsstellen	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptoren und Transmitter des vegetativen Nervensystems	10
Abb. 4: Schema der möglichen ACh-Rezeptor-vermittelten Signalwege zur Modulation der Titin-basierten passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten	16
Abb. 5: Verdünnungsschritte für zwei 1:2500 Verdünnungen der <i>Bradford Assays</i>	32
Abb. 6: Vorbereitung einer <i>Blotting</i> -Kammer	34
Abb. 7: Makro zur Auswertung der M2R-Immunfluoreszenzaufnahmen mit <i>ImageJ</i>	39
Abb. 8: Makro zur Auswertung der M3R-Immunfluoreszenzaufnahmen mit <i>ImageJ</i>	39
Abb. 9: Makro zur Auswertung der α 7nR-Immunfluoreszenzaufnahmen mit <i>ImageJ</i>	39
Abb. 10: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und α 7nR-mRNA-Expression im linken Ventrikel und den Atrien	42
Abb. 11: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und α 7nR-Proteinexpression in <i>Western-Blot</i> -Analysen im linken Ventrikel und in den Atrien.....	44
Abb. 12: Beispielbilder der Immunfluoreszenzmikroskopie des M2R, M3R und α 7nR im linken Ventrikel.....	47
Abb. 13: Ergebnisse der relativen M2R-, M3R- und α 7nR-Proteinexpression im linken Ventrikel mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	48
Abb. 14: Ergebnisse der relativen Kollagen-Typ-1-a und -Typ-3-a mRNA-Expression im linken Ventrikel und in den Atrien	50
Abb. 15: Ergebnisse der relativen Lysyloxidase-L1- und -L2-mRNA-Expression im linken Ventrikel und in den Atrien	51

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Primer</i>	19
Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper	20
Tabelle 3: Chemikalien	21
Tabelle 4: <i>Kits</i>	22
Tabelle 5: Puffer	23
Tabelle 6: Laborgeräte	24
Tabelle 7: Pipettierschema der qPCR.....	30
Tabelle 8: Pipettierschema für zwei 7,5% SDS-Standardgele.....	33
Tabelle 9: Verdünnungen der Primärantikörper für das <i>Western-Blotting</i>	35
Tabelle 10: Verdünnungen der Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen	37
Tabelle 11: Verdünnungen der Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen	37
Tabelle 12: Belichtungszeiten der Rezeptoraufnahmen	38

7 Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird in der Online-Version der Dissertation auf die Veröffentlichung der Danksagung verzichtet.