

Aus dem Institut für Herz-Kreislaufphysiologie
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

**Titin-Veränderungen in diabetischen und nicht-
diabetischen humanen Herzen nach
Myokardinfarkt**

Dissertation

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

Vorgelegt von
Jean-Pierre Hoffmeister

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Für meinen Opa.

„Truly wonderful the mind of a child is“
aus dem Film „Star Wars: Episode II – Angriff der Klonkrieger“
von George Walton Lucas

Zusammenfassung

Koronare Herzkrankheiten zählen weltweit zu den führenden Todesursachen. Der Myokardinfarkt, Deutschlands zweithäufigste Todesursache, führt durch Blockade der Koronararterien zu hypoxischen Myokardschädigungen und folgendem Gewebs- und Funktionsverlust. Auch im nicht direkt von der Ischämie betroffenen (*remote*) Myokard, finden pathophysiologische Umbauprozesse statt. Erste Untersuchungen am Tiermodell zeigten, dass Ischämie/Reperfusion im *remote* Myokard zu einer erhöhten Steifigkeit des 3-3,7MDa großen Titins führen, welches neben den Aktin- und Myosinfilamenten, das dritte Filament der kleinsten kontraktilen Einheit der Skelettmuskulatur, dem Sarkomer darstellt. Hieraus resultiert eine erhöhte passive Kardiomyozyten-Steifigkeit, welche insbesondere durch die PKC α vermittelte Phosphorylierung des elastischen Titin-I-Bandes induziert wird.

Da Myokardinfarkt und Diabetes mellitus die passive Titin-Steifigkeit beeinflussen, untersuchte diese Arbeit die molekularen Veränderungen des elastischen Sarkomerproteins Titin in humanen Herzmuskelzellen maximal 21 Tage nach Myokardinfarkt oder bei Diabetes mellitus. Der Fokus lag hierbei auf überlebenden Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokardbereich. Weiterhin war es Ziel, vorherige Ergebnisse der Tiermodelle auf das humane Modell zu projizieren. Am Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass es im *remote* Myokard durch Diabetes mellitus, sowie unmittelbar nach Ischämie/Reperfusion zu posttranslationalen Modifikationen des Titins kommt, wodurch die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten ansteigt. Daraus entstand die Hypothese, dass die Versteifung eine vorübergehende stabilisierende Wirkung auf das überlebende Myokard hat und die Funktion bis zur Ausbildung der intakten, fibrotischen Narbe aufrechterhält. Um zu prüfen, ob diese stabilisierende Wirkung auch in humanen Herzen auftritt und somit prinzipiell für die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes in Frage käme, wurden die posttranslationalen Modifikationen nach Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus, sowie der Einfluss verschiedener Komorbiditäten wie COPD oder arterieller Hypertonie untersucht, da auch diese die Anpassungsreaktion nach Myokardinfarkt beeinflussen könnten.

Hierzu wurden rechte Vorhofproben von Patientinnen und Patienten im Rahmen von elektiven Bypass-Operationen maximal 21 Tage nach Myokardinfarkt gewonnen. Mittels Gelelektrophorese und Western-Blot erfolgte die Analyse zentraler posttranslationaler Modifikationen, wie der PKC α -vermittelten Phosphorylierung des Serinrestes Ser11878 in der Titin-PEVK-Region, der Phosphorylierung des Serinrestes Ser4099 der N2Bus-Region, sowie der relativen PKC α -Phosphorylierung und der Phosphorylierung von Troponin I als Marker der kalziumabhängigen Kontraktionsregulation. Zudem wurde die Ubiquitinierung und das Isoformen-Expressionsverhältnis untersucht.

In dieser Arbeit konnten, anders als in den Tiermodellen, keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung der N2Bus beziehungsweise der PEVK-Region unter Einfluss eines Myokardinfarkts nachgewiesen werden. Dennoch wurden leichte Trends sichtbar, wie eine erhöhte PKC α -Phosphorylierung und eine verminderte Ser4099-Phosphorylierung, die auch in den Diabetesproben beobachtet wurde. Die diabetischen Proben wiesen darüber hinaus eine erhöhte PEVK-Phosphorylierung auf. Zudem wurden signifikante Modulationen durch Komorbiditäten ebenfalls detektiert, wie eine erhöhte Ser11878-Phosphorylierung bei arterieller Hypertonie und eine erhöhte Troponin-I-Phosphorylierung bei COPD.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch humane Proben ähnliche Tendenzen wie Tiermodelle aufweisen und dass ein Myokardinfarkt, so wie der Diabetes mellitus potenziell zur Versteifung des Titins beitragen können. Zudem wird deutlich, dass Komorbiditäten relevante Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus von Titin und den anderen Sarkomerproteinen besitzen. Insgesamt liefert die Arbeit erste Hinweise darauf, dass die in Tiermodellen beschriebene temporäre Stabilisierung des *remote* Myokards durch Titin-Modifikationen auch im humanen Herzen stattfinden könnte und somit ein mögliches therapeutisches Angriffsziel darstellt.

Summary

Coronary heart disease is one of the leading causes of death worldwide. Myocardial infarction, the second leading cause of death in Germany, leads to hypoxic myocardial damage and subsequent tissue and functional loss due to blockage of the coronary arteries. Pathophysiological remodeling processes also occur in the myocardium that is not directly affected by ischemia (remote myocardium). Initial studies in animal models have shown that ischemia/reperfusion in the remote myocardium leads to increased stiffness of the 3-3.7MDa titin, which, alongside actin and myosin filaments, is the third filament of the smallest contractile unit of skeletal muscle, the sarcomere. This results in increased passive cardiomyocyte stiffness, which is induced in particular by PKC α -mediated phosphorylation of the elastic titin I band.

Since myocardial infarction and diabetes mellitus influence passive titin stiffness, this study investigated the molecular changes in the elastic sarcomere protein titin in human heart muscle cells a maximum of 21 days after myocardial infarction or in diabetes mellitus. The focus was on surviving cardiomyocytes from the remote myocardial area. A further aim was to project previous results from animal models onto the human model. The mouse model has already shown that diabetes mellitus and immediate ischemia/reperfusion lead to post-translational modifications of titin in the remote myocardium, thereby increasing the passive stiffness of cardiomyocytes. This led to the hypothesis that stiffening has a temporary stabilizing effect on the surviving myocardium and maintains function until the intact, fibrotic scar has formed. In order to test whether this stabilizing effect also occurs in human hearts and could therefore in principle be considered for the development of a therapeutic approach, posttranslational modifications after myocardial infarction or diabetes mellitus were investigated, as well as the influence of various comorbidities such as COPD or arterial hypertension, since these could also influence the adaptive response after myocardial infarction.

For this purpose, right atrial samples were obtained from patients undergoing elective bypass surgery a maximum of 21 days after myocardial infarction. Gel electrophoresis and Western blotting were used to analyze key post-translational modifications, such as PKC α -mediated phosphorylation of the serine residue Ser11878 in the titin PEVK region, phosphorylation of the serine residue Ser4099 of the N2Bus domain, and phosphorylation of the serine residue Ser11878 in the N2Bus domain. -mediated phosphorylation of the serine residue Ser11878 in the titin PEVK region, the phosphorylation of the serine residue Ser4099 in the N2Bus region, as well as relative PKC α phosphorylation and the phosphorylation of troponin I as a marker of calcium-dependent contraction regulation. In addition, ubiquitination and the isoform expression ratio were investigated.

In contrast to animal models, this study did not reveal any significant differences in the phosphorylation of the N2Bus or PEVK region under the influence of myocardial infarction. Nevertheless, slight trends were visible, such as increased PKC α phosphorylation and decreased Ser4099 phosphorylation, which was also observed in the diabetes samples. The diabetic samples also showed increased PEVK phosphorylation. In addition, significant modulations due to comorbidities were also detected, such as increased Ser11878 phosphorylation in arterial hypertension and increased troponin I phosphorylation in COPD.

These results show that human samples exhibit similar trends to animal models and that myocardial infarction, like diabetes mellitus, can potentially contribute to titin stiffening. It also becomes clear that comorbidities have a relevant impact on the phosphorylation status of titin and other sarcomere proteins. Overall, this work provides initial evidence that the temporary stabilization of the remote myocardium described in animal models through titin modifications could also occur in the human heart and thus represents a potential therapeutic target.

Abkürzungsverzeichnis

Acta	<i>a smooth muscle actin</i>
AH	Arterielle Hypertonie Gruppe
a.u.	arbitrary units
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca²⁺	Kalzium
CaMKII	Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
cTnI	Kardiales Troponin I
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
D+	Diabetes-Gruppe
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	Western blotting detection reagent
eNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
GLUT	Glucosetransporter
GSSG	Glutathiondisulfid
H+	Wasserstoff
H₂O	Wasser
HCL	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

IABP	Intraaortale Ballonpumpe
I	Infarktgruppe
ID	Infarkt-Diabetes-Gruppe
I/R	Ischämie/Reperfusion
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-receptor
K	Kontrollgruppe
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDA	längenabhängige Aktivierung
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVOT	Linksventrikulärer Ausflusstrakt
MDa	Megadalton
MerTK	<i>myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase</i>
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
MyBP-C	<i>myosin-binding-protein C</i>
Na⁺	Natrium
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PCI	Perkutane Koronarintervention
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
Pi	anorganisches Phosphat
PTP	Phosphat Transporter

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	<i>salvage activating factor enhancement</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin(rest)
SHR	spontan hypertensive Ratten
S-S-Brücke	Disulfidbrücke
T2	Degradationsbande von Titin
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
T-CAP	Telethonin (<i>titin cap protein</i>)
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>tumor growth factor</i>
Thr	Threonin
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TnC	Kalzium bindende Troponin-Untereinheit
TNF	Tumornekrosefaktor
TnI	Inhibitorische Troponin-Untereinheit
TnT	Tropomyosin verknüpfende Troponin-Untereinheit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Titin
us	<i>unique sequence</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Myokardinfarkt	1
1.1.1	Epidemiologische und ätiologische Relevanz.....	1
1.1.2	Pathomechanismus im infarzierten Myokard.....	3
1.1.3	Remote Myokard	7
1.1.4	Therapie des Myokardinfarkts	8
1.1.5	Therapiekomplikation – Reperfusionsschaden.....	9
1.2	Komorbiditäten des Myokardinfarkts	11
1.2.1	Diabetes mellitus.....	11
1.2.2	Arterielle Hypertonie	13
1.3	Sarkomer.....	14
1.3.1	Aufbau und Funktion.....	14
1.3.2	Querbrückenzyklus.....	15
1.4	Titin	16
1.4.1	Aufbau und Funktion.....	16
1.4.2	Regulation, Modulation und Anpassung der passiven Titin- und Myokardsteifigkeit	18
1.5	Ziele der Arbeit	26
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material	28
2.1.1	Laborgeräte	28
2.1.2	Chemikalien.....	29
2.1.3	Puffer und Lösungen	30
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.5	Antikörper	31
2.2	Methoden	33
2.2.1	Ex vivo Untersuchungen an isoliertem humanem Herzgewebe	33
2.2.2	Biochemische Analyse.....	35
2.2.3	Auswertung	40
2.2.4	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	41
3.1	Auswirkungen des Diabetes mellitus und des Myokardinfarkts auf das Titin.....	41

3.1.1	Einfluss von Diabetes mellitus und Myokardinfarkt auf das Titin-Isoformen Expressionsverhältnis.....	41
3.1.2	Analyse der relativen Titin-Degradation bei Myokardinfarkt und Diabetes mellitus	43
3.1.3	Auswirkung von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung der Titin PEVK-Region	44
3.1.4	Einfluss von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung N2B <i>unique sequence</i> des Titins.....	45
3.1.5	Analyse der relativen Titin-Ubiquitinierung unter Einfluss eines Myokardinfarkts oder Diabetes mellitus	47
3.1.6	Einfluss von Diabetes mellitus und Myokardinfarkt auf die Aktivierung der Proteinkinase C α	49
3.1.7	Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung unter Einfluss von Diabetes mellitus oder Myokardinfarkt	51
3.2	Komorbiditäten des Myokardinfarkts und deren Einfluss auf die Kardiomyozyten-Steifigkeit	52
3.2.1	Vergleich der Titin-Isoformen Expression unter Einfluss der arteriellen Hypertonie	53
3.2.2	Analyse der relativen Titin-Degradation unter Einfluss der arteriellen Hypertonie ohne Myokardinfarkt und Diabetes	54
3.2.3	Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die PKC α -abhängige Phosphorylierung der Titin PEVK-Region und der N2B <i>unique sequence</i>	54
3.2.4	Analyse der relativen Titin-Ubiquitinierung unter Einfluss der arteriellen Hypertonie	56
3.2.5	Einfluss von COPD und arterieller Hypertonie auf die Aktivität der Proteinkinase C α	56
3.2.6	Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung unter dem Einfluss einer COPD oder einer arteriellen Hypertonie.....	57
4	Diskussion.....	58
4.1	Der Myokardinfarkt und seine Komorbiditäten modifizieren die Titin-basierte Steifigkeit im Großtiermodell Mensch.....	58
4.2	Die Titinisoformen-Zusammensetzung wird	59
	durch einen akuten Myokardinfarkt sowie seine	59
	Komorbiditäten nicht beeinflusst	59
4.2.1	Das Titinisoformen-Verhältnis im Menschenmodell	59
4.2.2	Der akute Myokardinfarkt und der Diabetes mellitus haben keinen Einfluss auf das Titinisoformen-Expressionsverhältnis und die Titindegradation	60
4.2.3	Die arterielle Hypertonie hat keinen Einfluss auf das Titinisoformen-Expressionsverhältnis und die Titindegradation.....	61

4.3	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus induzieren posttranslationale Modifikationen des Riesenproteins Titin.....	62
4.3.1	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus modifizieren die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 der PEVK-Region nicht	63
4.3.2	Die arterielle Hypertonie erhöht die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 der PEVK-Region	64
4.3.3	Einfluss auf die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 durch Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie im Vergleich.....	65
4.3.4	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus, sowie eine arterielle Hypertonie modifizieren die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser4099 der N2Bus nicht	66
4.3.5	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus modifizieren die Ubiquitinierung des Titins	67
4.3.6	Die arterielle Hypertonie modifiziert die Ubiquitinierung des Titins nicht.....	69
4.3.7	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus beeinflussen die Aktivität der Proteinkinase $C\alpha$ nicht	69
4.3.8	COPD und arterielle Hypertonie beeinflussen die Aktivität der Proteinkinase $C\alpha$ nicht	72
4.3.9	Myokardinfarkt und Diabetes mellitus beeinflussen die relative Phosphorylierung von Troponin I.....	75
4.3.10	Arterielle Hypertonie und COPD beeinflussen die relative Phosphorylierung von Troponin I.....	77
4.4	Limitationen der Arbeit	79
4.5	Schlussfolgerung.....	80
5	Literaturverzeichnis.....	81
6	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	90

1. Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologische und ätiologische Relevanz

Koronare Herzkrankheiten sind die häufigsten Todesursachen weltweit (Yellon and Hausenloy, 2007). Der Myokardinfarkt stellt mit 13,2% die zweithäufigste Todesursache Deutschlands dar (Statistisches Bundesamt, 2021). Der Grund für die meisten kardiovaskulären, ischämischen Ereignisse ist die Atherosklerose, eine stille, chronisch-vaskuläre Pathologie. Die Entwicklung einer solchen arteriellen Gefäßerkrankung und einer atherosklerotischen Plaque ist abhängig von der Kombination vieler einzelner Komponenten, wie zum Beispiel einer ausgedehnten Lipidablagerung in der Intima, einer endothelialen Dysfunktion, einer verstärkten Immunantwort oder einer verstärkten Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, beziehungsweise ein Umbau der extrazellulären Matrix (Badimon and Vilahur, 2014). Die Bildung eines solchen Plaques resultiert häufig in der Ausbildung einer lebensgefährlichen Koronarthrombose, welche sich symptomatisch oftmals als akutes Koronarsyndrom darstellen lässt. Grund dafür ist eine Ruptur der Plaques mit folgender Freilegung von thrombogenem, an roten Blutkörperchen reichen, nekrotischem Material, welches zum Verschluss des Gefäßes führt (Bentzon et al., 2014). Die dem Verschluss zugrunde liegende Minderperfusion des betroffenen Gefäßabschnittes führt zu einer Hypoxie des Gewebes und folglich zu einer Nekrose. Das Myokard infarziert (Thygesen et al., 2018). Die *Arteria coronaria sinistra* und insbesondere ihr Abgang *Ramus interventricularis anterior* stellt mit einer Betroffenheit von 50% den häufigsten Verschlussort der koronaren Gefäße dar. Mit 60% führt dieser Verschluss am häufigsten zu einem Vorderwandspitzeninfarkt (Burke and Virmani, 2007).

Der Herzinfarkt kann im weiteren Verlauf zu verschiedenen, lebensgefährlichen Komplikationen führen. Das infarzierte Myokard kann in seiner Mechanik beeinträchtigt und betäubt werden, was zu einer Linksherzinsuffizienz, zu Arrhythmien oder einem plötzlichen Herztod führen kann (Jenca et al., 2021, Thygesen et al., 2018). Auch eine Myokardruptur, so wie ein Ventrikelseptumdefekt stellen schwerwiegende Komplikationen dar und können letztlich zu einer globalen Herzinsuffizienz führen, welche statistisch eine fünf-Jahres-Überlebensrate von 35% bedeutet und damit die hohe

Sterblichkeitsrate kardiovaskulärer Erkrankungen erklärt (Jenca et al., 2021, Mosterd and Hoes, 2007).

Verschiedene Risikofaktoren begünstigen die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. So liegt das Exzess-Risiko bei Patienten mit arterieller Hypertension zwischen 7% und 70%. Eine 60-70% erhöhte Inzidenz der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt wiesen auch Diabetiker im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes auf (Jenca et al., 2021). Auch die Prognose der Diabetiker nach Myokardinfarkt ist deutlich schlechter als bei Patienten ohne Infarkt. Die kardiovaskuläre Sterblichkeitsrate ist bei Männern mehr als verdoppelt, bei Frauen mit Diabetes mehr als vervierfacht (Kannel and McGee, 1979). Die Behandlung der Diabetiker mit akutem Myokardinfarkt ist größtenteils ähnlich der Behandlung nicht-diabetischer Patienten, weist aber gewisse Sonderpunkte auf (Jacoby and Nesto, 1992). Beispielsweise ist eine Thrombolyse-Therapie bei älteren Diabetikern (>75 Jahre) limitierend einzusetzen und bei Diabetikern mit zusätzlicher proliferativer Retinopathie kontraindiziert (Jacoby and Nesto, 1992). Auch die Bypass-Operation ist bei Diabetikern eine mögliche Therapieoption, aufgrund des erhöhten Atherosklerose-Risikos kann diese aber mehrfach indiziert sein. Zudem spielt auch das erhöhte Restenosierungs-Risiko der Diabetiker nach perkutaner, transluminaler koronarer Angioplastie eine Rolle in der Auswahl der Therapie (Jacoby and Nesto, 1992). Um die verschiedenen, lebensbedrohlichen Komplikationen einschränken zu können, ist es wichtig die pathophysiologischen Mechanismen des infarzierten Gewebes zu kennen und zu verstehen. Zudem muss der Einfluss der Komorbiditäten auf den Zelluntergang berücksichtigt werden, um so den nekrotisierenden Gewebsverlust weitestgehend zu minimieren.

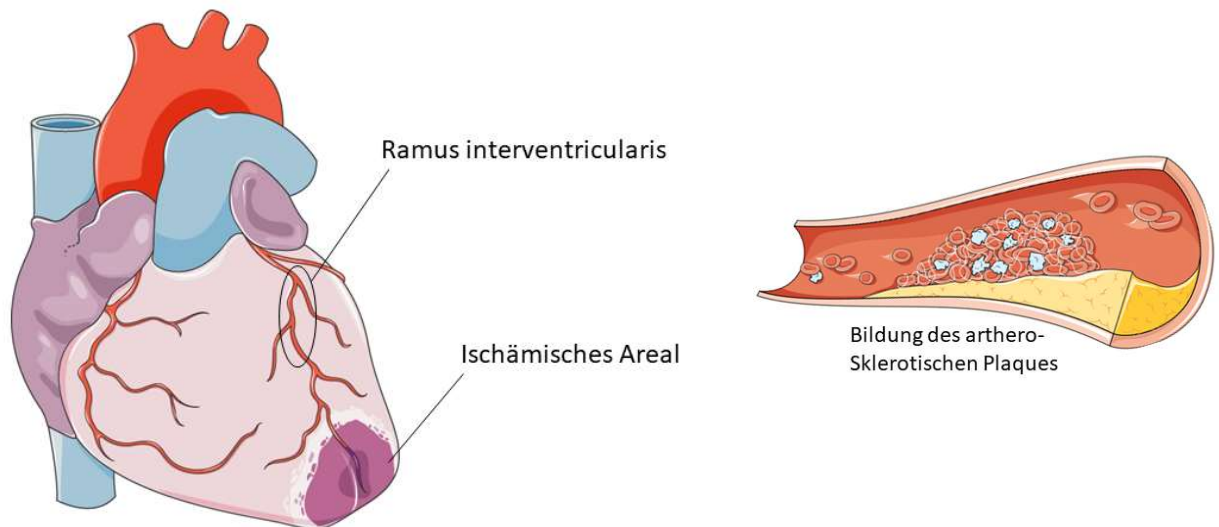


Abb. 1: Ätiologie des Vorderwand-Spitzeninfarkts (angelehnt an (Thygesen et al., 2018, Jahns, 2021)). Die Abbildung wurde unter Nutzung von „Servier Medical Art“, bereitgestellt von Servier, lizenziert durch eine „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“, entworfen (<https://smart.servier.com>). Dargestellt ist eine Abbildung des menschlichen Herzens, in der der *Ramus interventricularis* der *Arteria coronaria sinistra* gekennzeichnet ist, da er als häufigste Lokalisation für einen Myokardinfarkt gilt. Durch die Atherosklerose kann es in den Koronararterien zur lipidreichen Plaquebildung kommen (gelb), dessen fibröse Kappe rupturieren kann. Der dadurch freigelegte Kern begünstigt weiterhin die Bildung eines Thrombus, der eine Verengung oder einen Verschluss des Gefäßes zur Folge haben kann (Jahns, 2021).

1.1.2 Pathomechanismus im infarzierten Myokard

Da biochemische und funktionelle Anomalien fast unmittelbar mit Beginn der Ischämie eintreten, kann ein schwerer Verlust der myokardialen Kontraktilität schon innerhalb der ersten 60 Sekunden erfolgen. Andere pathologische Veränderungen, wie zum Beispiel der vermehrte Zelltod der Kardiomyozyten, treten erst 20-40 Minuten nach vollständigem Verschluss des Blutgefäßes auf (Burke and Virmani, 2007).

Das infarzierte Gewebe durchläuft aufgrund des Immunsystems einen dreiphasigen, erst pro- dann antiinflammatorischen Verlauf. Beginnend mit der Inflammationsphase kommt es zur Einwanderung von Immunzellen, welche für die Verdauung und Beseitigung beschädigter extrazellulärer Matrix und betroffener Zellen zuständig sind und den Übergang in die Reparations- und Proliferationsphase einleiten. In der Reparations- und Proliferationsphase wird die zuvor entstandene Inflammation gehemmt und aufgelöst. Weiterhin kommt es über Fibroblastenproliferation und Ablagerung des Granulationsgewebes zur Reparatur des betroffenen Gewebes. Der Umbau der extrazellulären Matrix so wie die Ausbildung des Narbengewebes wird letztlich in der

Reifungsphase koordiniert. Monozyten und Makrophagen sind an allen drei Stadien beteiligt (Prabhu and Frangogiannis, 2016, Peet et al., 2020).

Inflamationsphase

In der Inflamationsphase kommt es zur Aktivierung verschiedener molekularer Kaskaden, welche an der Entzündungsreaktion des Myokards beteiligt sind. Die entstehende Hypoxie während der Ischämie beeinträchtigt die Barrierefunktion der vaskulären Endothelzellen, wodurch die Gefäßpermeabilität erhöht wird und somit die Leukozyteninfiltration erleichtert ist. Ist das kardiale Gewebe der Hypoxie über längere Zeit ausgesetzt, so kommt es zur Aktivierung verschiedener Zelltodprogramme. Primär wird ein nekrotischer- so wie sekundär ein apoptotischer Zelltod eingeleitet.

Die nekrotischen Kardiomyozyten setzen so genannte *danger associated molecular patterns* (DAMPs) frei (= (IL)-1 α , heat shock Proteine, ATP), welche im Weiteren an *pattern recognition receptors* (PRRs) (= *toll-like receptor/IL-1 receptors* (TLR/IL-1Rs), *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NLRs)) des angeborenen Immunsystems binden und somit eine Kaskade verschiedener Entzündungsmediatoren beginnen (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Aktiviert und exprimiert werden durch diese Kaskade verschiedene Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, welche die Extravasation der Leukozyten begünstigen (Vestweber et al., 2014).

Im Vordergrund stehen vor allem die Aktivierung der MAP-Kinase und des (NF)- κ B-Signalwegs, da über diese die Expression proinflammatorischer Zytokine (= Tumornekrosefaktor- α [TNF], IL1 β , IL-6 und IL-18) reguliert wird (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Zum Ende der Inflamationsphase steht eine effektive Efferozytose der nekrotisierenden und apoptotischen Kardiomyozyten im Infarktgebiet im Vordergrund, die dann in die Phase der Entzündungshemmung und Wundheilung übergeht. Zum Teil wird dies durch Makrophagen reguliert, welche für die Expression der *myeloid-epithelial-reproductive tyrosin kinase* (MerTK) zuständig sind (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Reparations- und Proliferationsphase

Der Inflamationsphase schließt die Reparations- und Proliferationsphase an, welche fließend ineinander übergehen. Während die Reparationsphase eine entzündungshemmende Aufgabe übernimmt, ist die Proliferationsphase für die Gewebsneubildung zuständig.

Monozyten und Makrophagen, pleiotrope Zellen des angeborenen Immunsystems, sind in vielen Geweben, einschließlich des Herzens, sowohl bei der anfänglichen Entzündungsreaktion auf eine Verletzung, als auch bei der anschließenden Wundheilung von wesentlicher Bedeutung. Die Zahl der Monozyten und Makrophagen nimmt in den Tagen nach dem akuten Myokardinfarkt rasch zu. Der anfangs vorhandene proinflammatorische Phänotyp verschiebt sich in der Reparation in einen antiinflammatorischen Phänotyp, welcher die Ablagerung von Narbengewebe koordiniert. Grund dafür sind die verschiedenen Zellsubtypen. In der anfänglichen Inflammationsphase sind die proinflammatorischen Monozyten (CD14⁺CD16^{neg}) und M1-Makrophagen für die Beseitigung der geschädigten extrazellulären Matrix zuständig. Nach ca. vier Tagen setzt dann die Reparationsphase ein, in der die antiinflammatorischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺) und die antiinflammatorischen M2-Makrophagen aktiviert werden. Diese produzieren antiinflammatorische Zytokine (= IL10) sowie Wachstumsfaktoren (= *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *tumor growth factor beta* (TGF- β), welche sowohl profibrotisch wirken, als auch die Angiogenese begünstigen (Peet et al., 2020). Unterstützt werden die Monozyten und Makrophagen dabei von dendritischen Zellen, welche den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt durch die Aktivierung von T-Lymphozyten in drainierenden Lymphknoten, sowie durch die Produktion von entzündlichen Zytokinen und die direkte Aktivierung von Fibroblasten begünstigen (Kologrivova et al., 2021).

Auch neutrophile Granulozyten und apoptotisch neutrophile Granulozyten sind durch verschiedene Mechanismen entscheidend für die Entzündungsauflösung. Zum einen koordinieren sie die Freisetzung von Mediatoren, welche die Auflösung von Entzündungen fördern, wie z.B. proresolvierende Lipidmediatoren (= Lipoxine, Resolvine, Annexin A1, Lactoferrin). Sie dämpfen die Transmigration und Apoptose von neutrophilen Granulozyten und begünstigen die Phagozytose durch Makrophagen. Zum anderen induzieren sie die Expression von Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten, welche gemeinsam mit *eat-me-Signalen* die Aufnahme durch Makrophagen begünstigen (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Die Inflammations- und Reparationsphase wird durch ein Zusammenwirken dieser Zellen abgeschlossen und die darauffolgende Proliferationsphase wird durch die profibrotische Wirkung der Zellen eingeleitet.

Ähnlich wie bei anderen Immunzellen beinhaltet auch die Aktivierung von Fibroblasten bei Myokardinfarkt eine Veränderung des Phänotyps. In der antiinflammatorischen

Proliferationsphase werden die Fibroblasten verstärkt proliferiert und nehmen einen entzündungshemmenden und pro-angiogenen Phänotypen an, welcher als *Acta2-positiver* Myofibroblast bezeichnet wird (Barsotti et al., 2011, Prabhu and Frangogiannis, 2016). TGF β 1 ist ein bekannter profibrotischer Wachstumsfaktor und ein parakrines Schlüsselsignal zur Induktion der Fibroblastenaktivierung. Der *TGF β 1/Acta2/Kollagen-I-Signalweg* in kardialen Fibroblasten führt zu einer verstärkten Produktion intakter extrazellulärer Matrix, bestehend aus Fibrin und Fibronectin sowie dem Einbau von kontraktilen Proteinen, so wie *α smooth muscle actin (Acta2)* (Barsotti et al., 2011, Prabhu and Frangogiannis, 2016). Unterstützt wird die nachfolgende Narbenbildung auch durch die verstärkte Expression des Wachstumsfaktors, *connective tissue growth factor (CTGF)* (Daseke et al., 2020). Fibrin, die natürliche, provisorische Matrix für die Wundheilung und Gewebereparatur, ist ein biokompatibles Biopolymer, welches aus der Thrombin induzierten katalytischen Spaltung von Fibrinogen entsteht. Das Fibrinnetzwerk besitzt eine nanometrische Faserstruktur mit einem hohen Flächen/Volumen-Verhältnis und wird als provisorische fibrotische Narbe angelegt. (Barsotti et al., 2011).

Reifungsphase

In der Reifungsphase der Herzreparatur wird die extrazelluläre Matrix vernetzt und die Apoptose einiger Reparaturzellen wird eingeleitet, um das provisorische Narbengewebe zu verfestigen. Der Expressionsstopp von fibrogenen Wachstumsfaktoren, die Aktivierung inhibitorischer Stopp-Signale, welche die TGF β - und Angiotensin-II Signalgebung beenden und die Clearance von matrix-zellulären Proteinen können die Zellproliferation unterdrücken und die matrixsynthetische Aktivität der Fibroblasten verringern (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Auch das CXC-Chemokin Interferon- γ dämmt die fibrogene Reaktion in der Infarktregion ein und hemmt die Fibroblastenmigration durch die Verstärkung verschiedener Proteoglykane (Levick and Goldspink, 2014, Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Der Umbau der extrazellulären Matrix zu einem verfestigten, voll ausgereiften, fibrotischen Narbengewebe ist meist nach 21 Tagen abgeschlossen, kann selten aber auch bis zu einem Jahr andauern (Reinke and Sorg, 2012, Prabhu and Frangogiannis, 2016).

1.1.3 Remote Myokard

Das dem Infarktgebiet umliegende, nicht infarzierte Gewebe wird als so genanntes *remote Myokard* bezeichnet (dos Santos et al., 2013). Infolge eines Myokardinfarkts kommt es nicht nur im Infarktgebiet zu Umbauprozessen, sondern auch das remote Myokard wird durch den ischämischen Einfluss moduliert. Das sogenannte *remodeling* des remote Myokards beeinträchtigt die Herzfunktion durch langfristige Verdickung (Hypertrophie) und Versteifung (Fibrose) des Myokards (Talman and Ruskoaho, 2016, Sutton, 2000).

Grund dafür ist die so genannte *Akute-Phase-Reaktion*, welche die Mobilisierung und Rekrutierung von Immunzellen beinhaltet. Ausgelöst wird diese Reaktion im Infarktgebiet des akuten Myokardinfarkts. Dieser proinflammatorische Signalweg tritt auf das remote Myokard über, wodurch Leukozyten auch das remote Myokard infiltrieren und häufig für einen Umbau des linken Ventrikels sorgen (Ruparelia et al., 2013).

Sowohl die ersetzende Fibrose im Infarktgebiet, als auch die reaktive Fibrose im remote Myokard trägt zur linksventrikulären Dysfunktion bei, aus der eine Herzinsuffizienz resultieren kann (Gonzalez et al., 2018, Talman and Ruskoaho, 2016).

Auch die Entwicklung einer Arrhythmie kann Folge der Fibrosierung von infarziertem und nicht infarziertem Myokard sein, da die Narbe als isolierter, nicht erregbarer Bereich die elektrische Signalweiterleitung des Herzens beeinträchtigt. Wiederkehrende Arrhythmien werden durch den nicht erregbaren Bereich verankert, die zu einer anhaltenden ventrikulären Tachykardie führen. (Talman and Ruskoaho, 2016, Francis Stuart et al., 2016).

Eine weitere Folge des akuten Myokardinfarkts ist die Verringerung des systolischen Auswurfs und die Erhöhung des enddiastolischen Drucks und Volumens. Um das physiologische Schlagvolumen wieder herzustellen, nutzt das Herz den so genannten *Frank-Starling-Mechanismus* und erhöht die Kontraktionskraft. Die daraus resultierende Wandspannung hat zur Folge, dass es zu einer regionalen Hypertrophie im remote Myokard kommt, während die sich im infarzierten Bereich ausdehnende Läsion zu einer Dilatation führt (Cohn, 1993).

Im Mensch- und Tiermodell wird beschrieben, dass eine Beeinträchtigung der diastolischen Füllung eine erhöhte passive Steifigkeit des linken Ventrikels mit einer verringerten Belastungstoleranz zur Folge hat. Das elastische Protein *Titin*, welches in dieser Arbeit im Fokus steht, trägt wesentlich zur passiven Steifheit des Sarkomers, und damit des Muskels bei. Durch die Veränderung der Größe der Titin-Isoformen sowie

durch posttranslationale Modifikation der Titin-Steifigkeit wird die Wandspannung und infolgedessen die diastolische Füllung, sowie die anschließende systolische Pumpfunktion beeinflusst (Lalande et al., 2017, Koser et al., 2019). Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass die auf Titin basierende passive Spannung ein regulierender Faktor im Frank-Starling-Mechanismus ist. Die erhöhte passive Steifigkeit des Titins führt zu einer erhöhten längenabhängigen Aktivierung (LDA), indem die Ca^{2+} -Sensitivität bei großer Sarkomerlänge erhöht wird (Lee et al., 2010).

Eine schnelle Regulierung der Titin-Steifigkeit hilft, die kardiale Myofilamentaktivität dynamisch an die vorherrschenden hämodynamischen Anforderungen des Kreislaufs unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen anzupassen (Koser et al., 2019). Infolge des Myokardinfarkts ist diese Anpassung unabdingbar, um den mechanischen Stress, entstehend durch den Gewebsverlust, zu kompensieren (Kötter et al., 2016, Fukuda et al., 2008).

1.1.4 Therapie des Myokardinfarkts

Der Kreislauf beeinflussende kardiogene Schock stellt mit ca. 10,1% eine recht häufige Komplikation des Myokardinfarkts dar. Das Pumpversagen des Herzens resultiert in einem kritischen Blutdruckabfall und letztlich in einer Kreislaufinstabilität (Kapur et al., 2020). Eine initiale Sicherung von Herz-, Kreislauf- und Lungenfunktion ist zur sicheren und effizienten Durchführung der Koronarintervention notwendig. Die meist durch Katecholamin eingeleitete Therapie sollte durch die Gabe von *Dobutamin* (positiv inotrope Wirkung) und *Noradrenalin* (positiv inotrope und vasopressorische Wirkung) erfolgen. Bei respiratorischer Insuffizienz steht zusätzlich die maschinelle Beatmung, bei Infarzierung des rechten Ventrikels zudem die Volumengabe im Vordergrund. Ist die hämodynamische Stabilität des Patienten dennoch nicht zu sichern, so ist der Verdacht auf eine rechtskardiale Infarzierung zu stellen, welche als ST-Streckenhebung in (V_{3R}) / V_{4R} des EKGs sichtbar wird. Das rasche Wiedereröffnen der verschlossenen Infarktgefäße zur Koronarrevaskularisation mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) ist die wichtigste, effektivste und Prognose-entscheidendste Therapiemaßnahme. Steht die initiale PCI nicht zur Verfügung so sollte im Fall eines *ST-Strecken-Elevationsinfarkts* (STEMI) rasch eine Fibrinolyse initiiert werden und es sollte notfallmedizinisch eine intraaortale Ballonpumpe (IABP) eingesetzt werden, um der hämodynamischen Instabilität vorzubeugen und einen kardiogenen Schock behandeln zu können (de Waha

et al., 2012, Werdan et al., 2011). Die PCI der „Infarktarterie“ erfolgt i.d.R. unter intensiver Thrombozytenaggregationshemmung als *Stentimplantation*. Gelingt die interventionelle Revaskularisation nicht, so sollte schnellstmöglich operativ interveniert werden (Werdan et al., 2011).

1.1.5 Therapiekomplication – Reperfusionsschaden

Zwar stellt die schnelle Wiederherstellung des Blutflusses durch die Verwendung einer Thrombolysetherapie oder durch den Einsatz einer primären perkutanen Koronarintervention die effektivste Strategie zur Verringerung der Größe des Myokardinfarkts dar, dennoch kann die Reperfusion des Myokards auch zu Verletzungen des Gewebes führen und somit die kardiovaskuläre Funktion beeinträchtigen (Frank et al., 2012). Die Verletzung des Herzens während der myokardialen Reperfusion wird in vier Arten der Herzfunktionsstörung eingeteilt: das myokardiale *stunning*, das *no-reflow* Phänomen, die Reperusionsarrhythmien und der letale Reperfusionsschaden (Yellon and Hausenloy, 2007).

Während des myokardialen *stunnings* besteht eine mechanische Dysfunktion der Herzmuskulatur trotz nahezu normalem Koronarfluss (Yellon and Hausenloy, 2007). Das *no-reflow* Phänomen bezieht sich auf ein Gewebe, welches aufgrund der Okklusion einer Arterie ischämisch wird. Die Wiederherstellung der Durchgängigkeit dieser Arterie führt letztlich nicht zur Durchblutung des Mikrogefäßsystems und damit nicht zur Revaskularisation des ischämischen Gewebes. Das Phänomen ist gekennzeichnet durch einen langsamen oder fehlenden epikardialen Fluss mit unzureichender myokardialer Perfusion (Kloner et al., 2018, Annibali et al., 2022). Die Reperusionsarrhythmie entsteht durch die Beeinträchtigung des Elektrolytgleichgewichts (Taskin et al., 2016). Die letale Form des Reperfusionsschadens ist sowohl eine Folge des oxidativen Stresses, als auch eine Folge des pH- und Elektrolytungleichgewichts (Yellon and Hausenloy, 2007).

Der infarzierte Bereich entwickelt 60-90 Minuten nach Ischämie eine Kontrakturstarre. Grund dafür ist die anaerobe Glykolyse, auf die im ischämischen Areal umgeschaltet wird, wodurch auch die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) vermindert ist, welches zur Kontraktion des Muskels benötigt wird. Bei Reperfusion des ischämischen Gewebes kehrt die mitochondriale oxidative Phosphorylierung innerhalb von Sekunden auf präischämisches Niveau zurück, während die kontraktile Kraft nur allmählich den

präischämischen Wert erreicht (= *myocardial stunning*). Das betäubte Myokard hat einen relativ übermäßigen Sauerstoffverbrauch für die gegebene Kontraktionsbreite und somit eine verringerte mechanische Effizienz. Aufgrund der anaeroben Glykolyse, während der Ischämie, reichert sich intrazellulär H^+ an. Durch die Reperfusion gelangt H^+ im Austausch mit Na^+ in den Extrazellulärraum, um den pH-Wert zu normalisieren. Der intrazelluläre Na^+ -Überschuss führt zu einer Aktivierung der sarkolemmalen Na^+/Ca^{2+} -*Antiporter*. Der daraus resultierende intrazelluläre und mitochondriale Ca^{2+} -Überschuss führt zur einer Hyperkontraktur der Herzmuskelzellen und zu einer Öffnung der mitochondrialen Phosphat-Transporter (PTP), wodurch letztlich der Zelltod der Kardiomyozyten induziert wird (Frank et al., 2012, Piper, 1998). Die extrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} und ATP nach nekrotischem Zelltod induziert die Aktivierung vieler TLR-Signalwege, wodurch Entzündungsreaktionen gefördert werden. Um die Folgen des Reperfusionsschadens zu minimieren ist eine immunologische Therapie sinnvoll. Die systemische Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine induziert die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen, die in der akuten Phase des myokardialen I/R-Syndroms, in einen Th1-Phänotyp differenzieren und proinflammatorisch wirken. Nach 4-7 Tagen tritt die proinflammatorische Th1-Reaktion in eine antiinflammatorische Th2-Reaktion über, die durch viele Veränderungen der kardialen Mikroumgebung induziert ist. Th1-Zellen wechseln ihren Phänotyp zu Th2-Zellen und schütten die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β aus. Ein therapeutisches Ziel bezieht sich darauf, die akute Th1-Gewebe-schädigende Reaktion herunterzuregulieren, während die spätere Th2-Gewebe-reparierende Phase gefördert werden soll (Sanchez-Hernandez et al., 2020). Weitere Therapieansätze beziehen sich auf eine intravenöse Magnesium Injektion während Reperfusion. Auch die mitochondriale *permeability transition pore* (PTP), ein unselektiver Kanal der inneren mitochondrialen Membran, stellt ein therapeutisches Ziel dar, da das Öffnen dieses Kanals während der Reperfusion zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt und folglich zu einem ATP-Mangel (Yellon and Hausenloy, 2007). Letztlich ist auch das endogene ischämische *conditioning* ein therapeutisches Ziel, wodurch die Infarktgröße verringert werden kann. Das ischämische *conditioning* stellt eine endogene Strategie dar, die das Herz vor I/R-Schäden schützen soll und an mehreren Zeitpunkten intervenieren kann. Bei der ischämischen Präkonditionierung werden mehrere kurze, 4–5-minütige Zyklen von Okklusion und *reflow* koordiniert, was zu einer 75 %igen Reduktion des Infarktbereiches führen kann. Problematisch an der ischämischen Präkonditionierung ist der

Interventionszeitraum, da dieser vor dem ischämischen Ereignis erfolgen muss, was bei einem akuten Myokardinfarkt nicht möglich ist. Dennoch fand man heraus, dass das Herz vor einem akuten Myokardinfarkt geschützt werden könnte, indem die myokardiale Reperfusion durch mehrere kurzlebige Episoden myokardialer Ischämie unterbrochen wird (= ischämische Postkonditionierung). Auch wenn die kardioprotektive Wirkung der ischämischen Postkonditionierung nicht so stark ist, wie die der ischämischen Präkonditionierung, stellt sie eine wichtige Strategie zur Bekämpfung myokardialer Reperfusionsschäden dar und dient der Größenreduktion des Infarktgebietes (Hausenloy and Yellon, 2016).

1.2 Komorbiditäten des Myokardinfarkts

1.2.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für heterogene Stoffwechselerkrankungen, deren Hauptbefund in einer chronischen Hyperglykämie resultiert. Die Ursache einer solchen Erkrankung ist abhängig von der Form des Diabetes, bezieht sich in den meisten Fällen aber auf eine gestörte Insulinausschüttung oder -wirkung (Petersmann et al., 2019). Der Diabetes mellitus kann in verschiedene Formen unterteilt werden, dabei stellen der Typ 1 und der Typ 2 Diabetes die häufigsten Formen dar (Lee and Huda, 2021). Während im Typ 1 Diabetes die β -Zellzerstörung und der daraus resultierende absolute Insulinmangel im Vordergrund steht, liegt im Typ 2 Diabetes eher ein relativer Insulinmangel mit überwiegender Insulinresistenz vor (Petersmann et al., 2019). Weltweit ist der Diabetes mellitus ein signifikantes Gesundheitsproblem und seine Assoziation in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Es ist wichtig zu verstehen, dass Patienten mit Diabetes oder Prädiabetes ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Myokardinfarkts, Schlaganfalls oder einer peripher arteriellen Verschlusskrankheit haben. Vor allem der Typ 2 Diabetes wird meistens erst spät im Verlauf einer kardiovaskulären Erkrankung erkannt, weshalb die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose häufig an einem komplizierten Verlauf leiden (Huang et al., 2017). Der akute Myokardinfarkt bleibt eine Hauptursache für die Morbidität und Mortalität bei Diabetikern (Jacoby and Nesto, 1992). Pathogenetisch wird angenommen, dass sowohl eine Insulinresistenz, als auch eine Hyperglykämie signifikant zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen und makrovaskulärer Komplikationen beitragen (Huang et al., 2017). Die Insulinresistenz

selbst kommt i.d.R. durch eine verminderte Expression der Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4) zustande, welcher hauptsächlich in Fett- und Muskelzellen vorkommt. Eine zusätzliche Freisetzung freier Fettsäuren führt zu einer Bindung dieser an TLRs, wodurch im Weiteren die Aktivität der PI3-Kinase (PI3K) und die Akt-Aktivität herunterreguliert werden. Neben der verminderten GLUT4 Expression führt die verminderte Aktivität der PI3K auch zur Inaktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), wodurch weniger Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert wird. Die Abnahme des Schlüsselmoleküls NO führt dazu, dass die physiologische Funktion der Endothelzellen nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion trägt zur nachfolgenden atherosklerotischen Veränderung bei. Zusätzlich zur verminderten Aktivität von Akt und der PI3K, kommt es zu einer verstärkten Aktivität von (NF)- κ B. Mausmodelle zeigten, dass (NF)- κ B an der Genexpression von Adhäsionsmolekülen und an der Infiltration von Makrophagen beteiligt ist. Diese Prozesse tragen ebenfalls zur Entwicklung einer Atherosklerose bei. Letztlich führt die Insulinresistenz auch einen prothrombotischen Zustand herbei, welcher ebenfalls zu makrovaskulären Komplikationen führt. Unter physiologischen Bedingungen hemmt Insulin die Thrombose und verstärkt die Fibrinolyse. Die bestehende Insulinresistenz dagegen bewirkt eine Kalziumakkumulation in den Blutplättchen, wodurch die Blutplättchenaggregation verstärkt wird (Huang et al., 2017). Die beim Diabetes mellitus entstehende Hyperglykämie ist ebenfalls an der Pathogenese kardiovaskulärer Komplikationen beteiligt. In Folge der Hyperglykämie kommt es zu einer verstärkten Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche NO inaktiviert und somit die endotheliale Dysfunktion fördert. ROS führt zudem zu einer verstärkten Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche über verschiedene Signalwege das vaskuläre Zellwachstum, die Gefäßpermeabilität und die extrazelluläre Matrixsynthese beeinflusst. Des Weiteren induziert die PKC die ROS-Aktivität, wodurch ein Kreislauf entsteht, der letztlich die vaskuläre Homöostase beeinträchtigt (Huang et al., 2017).

Neben der Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung ist auch der Einfluss von Diabetes mellitus auf die Titin-Steifigkeit von besonderer Bedeutung. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Steifigkeit der Kardiomyozyten bei Diabetes mellitus eine Folge einer gestörten Titin-Phosphorylierung ist. Eine reduzierte Phosphorylierung der Aminosäure Serin-4099 (S4099) und eine verstärkte Phosphorylierung der Aminosäure Serin-11878 (S11878) tragen zu einer erhöhten passiven Steifigkeit des Proteins Titin bei (Hopf et al., 2018, Methawasin and Granzier,

2018). Eine Beeinflussung der diastolischen Füllung sowie der anschließenden systolischen Pumpfunktion ist die Folge (Lalande et al., 2017, Koser et al., 2019).

1.2.2 Arterielle Hypertonie

Die essenzielle arterielle Hypertonie ist eine der wichtigsten, zu behandelnden, kardiovaskulären Risikofaktoren weltweit (Jordan et al., 2018). 30% der Bevölkerung sind vom Bluthochdruck betroffen (Wenzel et al., 2017). Allein in Deutschland haben ca. 13% der Frauen und 18% der Männer einen unkontrollierten Bluthochdruck (Jordan et al., 2018). Schätzungsweise sind ca. 47% der ischämischen Herzkrankheiten eine direkte Folge der arteriellen Hypertonie (Lawes et al., 2008).

Die Diagnose einer arteriellen Hypertonie wird in ärztlicher Behandlung gestellt, indem wiederholte Messwerte von 140/90mmHg oder höher auftreten. Differentialdiagnostisch müssen Erkrankungen wie zum Beispiel eine Nierenarterienstenose, der Hyperaldosteronismus oder das Phäochromozytom ausgeschlossen werden, die vor allem bei jüngeren Patienten eine sekundäre Hypertonie verursachen können (Jordan et al., 2018). In der Regel ist die arterielle Hypertonie auf ein erhöhtes Herzzeitvolumen, einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand oder eine Kombination aus beidem zurückzuführen (Jordan et al., 2018). Die häufigste Ursache in der älteren Bevölkerung stellt der erhöhte periphere Gefäßwiderstand dar, der meist zusätzlich mit einer erhöhten Gefäßsteifigkeit einhergeht und sich klinisch als isolierte systolische Hypertonie manifestiert (Wallace et al., 2007).

Pathophysiologisch können bereits kleinere Zunahmen von prohypertensiven Faktoren wie Angiotensin II, Aldosteron oder Salzretention das angeborene Immunsystem aktivieren. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Komplementkaskade mit Freisetzung von DAMPs, welche an TLRs binden und über weitere Signalwege direkten hypertensiven Organschaden verursachen können. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten den verursachten hypertensiven Schaden verstärken. Die hypertensive Gewebsverletzung führt zu einem vermehrten Zelluntergang, wodurch es zur Freisetzung verschiedener Antigene kommt, welche durch dendritische Zellen erkannt werden können. Es kommt zu einer verstärkten Aktivierung von B- und T-Zellen, welche ins periphere Gewebe, wie unter anderem ins Herz, einwandern (Wenzel et al., 2017). Neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems gilt die arterielle Hypertonie als wichtiger Risikofaktor für

atherosklerotische Herzkreislauferkrankungen und kann eine vorbestehende Atherosklerose beschleunigen (Al-Sharea et al., 2019, Atherosclerosis et al., 1957) Vor allem Angiotensin II, welches bei arterieller Hypertonie verstärkt ausgeschüttet wird, hat eine beschleunigende Wirkung auf die Atherogenese (Daugherty et al., 2000, Mazzolai et al., 2004). Weiterhin kann die Atherosklerose durch die Infiltration von Immunzellen, insbesondere von Monozyten, in den Plaque, verursacht werden (van der Valk et al., 2017, Al-Sharea et al., 2019). Das sympathische Nervensystem spielt bei der Regulierung der Hämatopoese und damit bei der Bildung der Immunzellen eine wichtige Rolle (Katayama et al., 2006, Al-Sharea et al., 2019, Stiekema et al., 2017). Die aus der Hypertonie resultierende Atherosklerose gilt als eine der am weitesten verbreiteten chronischen Gefäßerkrankungen und als eine der Grundursachen des Myokardinfarkts (Poller et al., 2020).

1.3 Sarkomer

1.3.1 Aufbau und Funktion

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit der quergestreiften Herz- und Skelettmuskulatur (de Souza Leite and Rassier, 2020, Henderson et al., 2017). Es besteht aus präzise organisierten einzelnen Filamentsystemen, welche gemeinsam die Kontraktilität der Muskulatur koordinieren. Unterteilt werden die Filamentsysteme in dünne Aktinfilamente, dicke Myosinfilamente, sowie Titinfilamente. Über Intermediärfilamente ist das Sarkomer mit anderen Zellorganellen verbunden, so dass die zelluläre Integrität aufrechterhalten werden kann. Über Costamere ist das Sarkomer, mit dem Sarkolemm der Myofibrillen verbunden (Henderson et al., 2017).

Die lateralen Grenzen des Sarkomers werden durch proteindichte Z-Scheiben definiert (Henderson et al., 2017). Die elastische I-Band Region liegt beidseits der Z-Scheibe und ist frei von dicken myosinhaltigen Filamenten (Krüger and Kötter, 2016, Henderson et al., 2017). Das A-Band umfasst den gesamten Bereich der dicken Myosinfilamente, während das M-Band im Zentrum des A-Bandes zu finden ist (Henderson et al., 2017). Die zentrale H-Zone bezieht sich auf die kopflose Myosinregion, in der keine dünnen Aktinfilamente vorliegen (Szikora et al., 2020). Die erzeugten Kräfte des Sarkomers, welche für die Muskelkontraktion benötigt werden, werden durch den Querbrückenwechsel (= Querbrückenzyklus) zwischen dünnen Aktinfilamenten und dicken Myosinfilamenten koordiniert (Burbaum et al., 2021).

1.3.2 Querbrückenzyklus

Die Muskelkontraktion tritt auf, indem die dünnen, zweisträngigen Aktinfilamente an den dicken, dreisträngigen Myosinfilamenten vorbeigleiten. Dieser Gleitprozess wird durch Querbrücken angetrieben, welche sich von den Myosinfilamenten aus erstrecken und zyklisch in Interaktion mit den Aktinfilamenten stehen, wenn ATP hydrolysiert wird (Brenner and Eisenberg, 1987, Powers et al., 2021). Die Regulation der Muskelkontraktion erfolgt unter anderem über Troponin-Tropomyosin-Komplexe, die an der dünnen, doppel-helikalen Filamentstruktur lokalisiert sind. Jedes doppelsträngige Tropomyosin bedeckt sieben globuläre (G)-Aktine entlang des helikalen F-Aktin-Strangs. Die Troponinkomplexe enthalten eine Kalzium bindende (TnC), eine inhibitorische (TnI) und eine Tropomyosin verknüpfende (TnT) Untereinheit auf jedem Strang des Filaments, so dass ein Verhältnis von sieben Aktinen zu einem Tropomyosin- und einem Troponinkomplex besteht (7:1:1). Bindet kein Kalzium an der TnC, so ist die Kontraktion gehemmt, da das Tropomyosin durch die TnI in einer Position stabilisiert wird, die die Myosinbindungsstellen auf jedem G-Aktin des dünnen Filaments blockiert (Powers et al., 2021). Erreicht ein zelluläres Aktionspotential die Muskelzelle, so kommt es zur Freisetzung von Kalzium (Ca^{2+}) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Ca^{2+} bindet an den N-Terminus der TnC-Untereinheit wodurch die Affinität zwischen TnC und TnI verstärkt und somit die Affinität der TnI-Untereinheit zu Aktin verringert wird (da Silva and Reinach, 1991). Aus der verringerten Affinität von TnI zu Aktin resultiert eine höhere Mobilität von Tropomyosin auf den dünnen Filamenten, wodurch Myosinbindungsstellen freigelegt werden (McKillop and Geeves, 1993). Folglich bindet Myosin an Aktin, wodurch Tropomyosin verdrängt wird und nicht mehr in die blockierende Position zurückkehren kann (Xu et al., 1999). Dissoziiert Ca^{2+} vom Troponin, so löst sich das Myosin von den dünnen Filamenten. Tropomyosin gelangt zurück in seine inhibitorische Position und das Sarkomer relaxiert (Powers et al., 2021). Die kardiale TnC-Untereinheit besitzt im Gegensatz zum Skelettmuskel nur eine Ca^{2+} -Bindungsschleife, welche nicht allein ausreicht um hydrophobe Reste der TnI-Untereinheit freizulegen, weshalb eine vollständige Aktivierung der dünnen Filamente durch die alleinige Bindung von Ca^{2+} nicht möglich ist (Wang and Fuchs, 1994). Aus diesem Grund nutzen Kardiomyozyten zusätzliche Mechanismen zur Aktivierung des dünnen Filaments, wie zum Beispiel die kooperative Aktivierung zwischen benachbarten

regulatorischen Einheiten oder der Bildung der Querbrückenbindungen entlang des dünnen Filaments (Razumova et al., 2000, Campbell et al., 2010). Da die kardialen dünnen Filamente weniger empfindlich auf Ca^{2+} reagieren, kann die Modulation von Myosin im Herzmuskel auch die Aktivierungskinetik und -kraft koordinieren (Kreutziger et al., 2008). Die Lösung der Querbrücken zwischen Aktin und Myosin, nachdem Ca^{2+} dissoziiert führt im Herzmuskel somit zu einer schnelleren Deaktivierung des dünnen Filaments und einer schnelleren Rückkehr des Muskels in den Ruhezustand (Palmer et al., 2020). Ein weiterer Mechanismus, der bei adrenerger Stimulation für eine erhöhte Relaxationsrate im Herzmuskel sorgt, ist die Phosphorylierung der TnI-Untereinheit, welche über eine herzspezifische N-terminale Verlängerung von TnI ermöglicht wird (Kentish et al., 2001, Solaro et al., 2008).

Angetrieben wird die zyklische Aktin-Myosin-Wechselwirkung durch die hydrolytische Spaltung von ATP. (Cooke, 1997, Gordon et al., 2000). Im entspannten Muskel stehen die meisten Myosinköpfe nicht mit Aktin in Verbindung, sondern binden stattdessen Adenosindiphosphat (ADP) sowie anorganisches Phosphat (Pi). Diese Konformation weist polare und geladene Reste auf, welche potenziell am Aktin binden können. Da Tropomyosin die Bindungsstellen blockiert, bindet Myosin zuerst mittels schwacher elektrostatischer Wechselwirkungen an Aktin und positioniert den S1-Kopf so, dass sich starke hydrophobe Wechselwirkungen entwickeln. Der Kraftschlag wird erzeugt, indem Myosin isomerisiert und Pi freigesetzt wird. Die darauffolgende Freisetzung von ADP versetzt Myosin für kurze Zeit in einen Rigor. Eine rasche Bindung von ATP in der Nukleotidbindungstasche verringert die Affinität von Myosin zu Aktin und löst die Querbrücke auf. ATP wird im Folgenden wieder hydrolysiert und der S1-Kopf des Myosins wird für den nächsten Kraftschlag des Querbrückenzyklus vorbereitet (Powers et al., 2021).

1.4 Titin

1.4.1 Aufbau und Funktion

Mit 3-4 Megadalton (MDa) ist Titin das größte bekannte Protein des menschlichen Organismus und besteht aus vielen einzigartig seriell verknüpften Immunglobulin-Domänen, Fibronectin-Typ3-Domänen und so genannten *unique sequences*, welche unterschiedliche Aufgaben in der Physiologie der quergestreiften Muskulatur übernehmen (Krüger and Linke, 2011, Bang et al., 2001, Powers et al., 2021). Das riesige

Protein überspannt mit einer Länge von 0,9-1,5 μm das halbe Sarkomer und erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Krüger and Linke, 2011, Krüger and Kötter, 2016). Die Proteine Nebulin, beziehungsweise die kardiale Form *Nebulette*, so wie α -Actinin 2 und Telethonin (T-CAP) fixieren das NH₂-terminale Ende des Titins an der Z-Scheibe des Sarkomers (Witt et al., 2006, Labeit et al., 2006, Granzier and Labeit, 2004). Das gegenüberliegende COOH-terminale Ende ist dagegen mit der M-Linie verbunden (Obermann et al., 1996). Das Riesenprotein kann in seinem Aufbau in vier verschiedene Bereiche eingeteilt werden (Krüger and Kötter, 2016). Das I-Band des Riesenproteins im Herzmuskel besteht aus einer Reihe von proximalen Immunglobulin-Domänen, der N2B-Domäne einschließlich der einzigartigen N2B *unique Sequenz*, der distalen PEVK-Domäne mit einer hohen Menge an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V) und Lysin (K), sowie der distalen Immunglobulin-Domänen (Watanabe et al., 2002). Die I-Band-Region wird während der Sarkomerdehnung sequentiell verlängert, dient als anpassungsfähige molekulare Feder und stellt das elastische Hauptsegment von Titin dar (Linke et al., 1996, Li et al., 2002, Krüger and Kötter, 2016) Der größte Teil des Titinmoleküls wird durch das A-Band definiert, welches eng mit Myosin und dem *myosin-binding-protein C* (MyBP-C) assoziiert ist und somit die geordnete Strukturierung des dicken Filaments koordiniert (Tskhovrebova and Trinick, 2004, Lange et al., 2006, Labeit et al., 1992). Das M-Band des Titins befindet sich in der Mitte des Sarkomers und dient dazu, die dicken Filamente in A-Bänder einzuordnen (Lange et al., 2020). Im M-Band befinden sich verschiedene Insertionssequenzen, sowie eine Titinkinase-Domäne (Bang et al., 2001, Gautel, 2011). Funktionell dient es dazu, die Myosinfilamente zu einem hexagonalen Gitter zu vernetzen und so die relative Rotation um die Längsachse zu koordinieren (Pask et al., 1994, Luther and Squire, 1978, Luther et al., 1981). Die zentrale Position des Titins im Sarkomer sowie die enge Assoziation mit Myosin gelten als Grundlage für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität während des Entspannungs-Kontraktions-Zyklus. Grund dafür ist die reversible Verlängerung des elastischen I-Bands, welches die passiven mechanischen Eigenschaften der Myofilamente definiert (Granzier and Wang, 1993, Bartoo et al., 1997).

Beeinflusst wird die Länge der I-Band-Region von Titin durch alternatives Spleißen, wodurch Titin in verschiedenen Isoformen vorliegt und die Titin-basierte Myofilament-Steifigkeit moduliert werden kann (Prado et al., 2005). Im adulten Herzmuskel liegen zwei unterschiedliche Isoformen vor, welche als flexiblere N2BA- und steifere N2B-Isoform bekannt sind und durch das 364-Exon-TTN-Gen codiert werden (Chauveau et

al., 2014, Kellermayer et al., 2021). Die längere, nachgiebigere N2BA-Isoform (3,2-3,7 MDa) beinhaltet die N2B- und N2A-Domäne, während die kürzere, steifere N2B-Isoform (3,0 MDa) des Herzmuskels nur die N2B-Domäne beinhaltet (Guo et al., 2010, Kötter et al., 2014). Das Expressionsverhältnis der N2BA- und N2B-Titin-Isoformen bestimmt letztlich die Titin-basierte passive Myofilamentsteifigkeit der Kardiomyozyten (Krüger and Linke, 2011). Neben der Regulation der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten fungiert Titin als Gerüstprotein, welches an der Sarkomergeneese beteiligt ist und den myofibrillären Zusammenbau unterstützt (Ehler and Gautel, 2008).

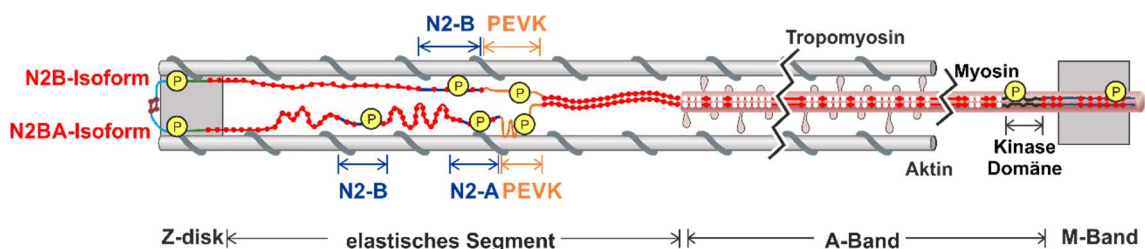


Abb 2.: Myofilamentprotein im schematischen Aufbau (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).

Zwischen der Z-Scheibe und der M-Bande erstreckt sich das Riesenprotein Titin, welches aus der proximalen Immunglobulin-Domäne, der N2B-Domäne, der PEVK-Region und der distalen Ig-Domäne zusammengesetzt ist. Zwei verschiedene Isoformen (N2A, N2BA) des Titins liegen im kardialen Gewebe vor, die sich durch zusätzliche Ig-Domänen und einer N2A-Domäne vom Titin in anderweitiger Muskulatur unterscheiden. Die Kinase-Domäne befindet sich zusätzlich im M-Band.

1.4.2 Regulation, Modulation und Anpassung der passiven Titin- und Myokardsteifigkeit

Die passive Steifigkeit des Myokards

Die zugrunde liegende passive, mechanische Steifigkeit des Myokardgewebes und damit die passive Dehnbarkeit des Herzens wird durch zwei Hauptfaktoren bestimmt: zum einen durch die kollagenbasierte Steifigkeit der extrazellulären Matrix, zum anderen durch die Titin-basierte Steifigkeit der Kardiomyozyten (Kötter et al., 2013). Die linksventrikuläre Dehnbarkeit ist eine wichtige Hauptvariable der diastolischen Herzfunktion. Eine Einschränkung der ventrikulären Dehnbarkeit, z.B. durch den myokardialen Umbau aufgrund von Herzerkrankungen, beeinträchtigt die diastolische Füllungsphase und folglich die Herzleistung (Katz and Zile, 2006). Es resultiert eine diastolische Dysfunktion, in der die Myofibrillen nicht schnell oder vollständig zu ihrer Ruhelänge zurückkehren. Der folgende verminderte Druck im Ventrikel führt zu einer unvollständigen Ventrikelfüllung, welche durch einen erhöhten atrialen Druck

kompensiert wird (Gaasch and Zile, 2004). Infolgedessen kann der betroffene Patient eine asymptomatische, diastolische Herzinsuffizienz entwickeln (Zile et al., 2001).

Die Steifigkeit des Titins und seine Modulation sowie Regulation werden maßgeblich durch zwei Mechanismen koordiniert (Lalande et al., 2017).

Zum einen kann über die Veränderung des kardialen N2BA- und N2B-Titin-Isoformen Expressionsverhältnisses die Dehnbarkeit des Herzens langfristig reguliert werden (Krüger and Linke, 2011).

Zum anderen wird eine schnelle Modulation der Titin-Steifigkeit des Herzens durch posttranslationale Modifikationen vermittelt, von denen bislang Phosphorylierung der I-Banden Region und andere, durch oxidativen Stress induzierte Modifikationen des Titins untersucht wurden. (Koser et al., 2019).

Kardiale und muskuloskelettale Isoformenzusammensetzung

Das in der quergestreiften Muskulatur vorkommende Riesenprotein wird, anders als andere Sarkomerproteine, nur durch ein Gen codiert (Chauveau et al., 2014), wodurch das Vorkommen unterschiedlicher, muskelspezifischer Isoformen in Kardiomyozyten oder in Myozyten der Skelettmuskulatur durch das alternative Spleißen reguliert werden kann. Die mit 3MDa kürzere N2B-Isoform des Titins ist aufgrund ihrer Länge wesentlich steifer als die N2BA-Isoform, welche neben der N2B-Domäne auch die N2A-Domäne beinhaltet (Guo et al., 2010, Kötter et al., 2014, Linke and Kruger, 2010). Obwohl beide Isoformen in erwachsenen Kardiomyozyten koexprimiert werden, definiert das Expressionsverhältnis der kardialen Titin-Isoformen die passive Steifigkeit der Herzmuskulatur (Eldemire et al., 2021). Ein kleineres N2BA:N2B-Isoformen-Verhältnis spricht für eine stärkere Expression der N2B-Isoform und folglich für eine erhöhte Steifigkeit der Herzmuskulatur. Steigt das Verhältnis dagegen durch ein verstärktes Vorkommen der N2BA-Isoform an, so nimmt die Elastizität des Herzmuskels zu (Kellermayer et al., 2021). In den erwachsenen Herzen vieler Säugetierarten, einschließlich des Menschen, liegt ein physiologisches N2BA:N2B-Expressionsverhältnis von etwa 30:70 % vor (Neagoe et al., 2002). Ratten dagegen zeigen eine N2B-Expressionsdominanz von ca. 90%, wodurch man eine erhöhte Steifheit der Herzmuskulatur in kleinen Tieren erschließen kann (Kötter et al., 2014).

Das Expressionsverhältnis der Isoformen kann durch physiologische, aber auch durch pathophysiologische Ereignisse beeinflusst werden. Fetale Titin-Isoformen sind sowohl in der Herzmuskulatur, als auch in der Skelettmuskulatur sehr groß (Opitz et al., 2004,

Krüger and Linke, 2011). Das früheste nachweisbare fetale, kardiale Titin ist eine Isoform von 3,7 MDa, die während der prä-/perinatalen Entwicklung in eine kleinere N2BA-Isoform übergeht und zum Teil durch eine N2B-Isoform ersetzt wird (Opitz et al., 2004). Auch im Sportlerherz ist eine erhöhte, physiologische Expression der N2BA-Isoform und die damit verbundene verminderte passive Steifheit des Myokards zu erkennen (Kellermayer et al., 2021).

Eine pathologische, transkriptionelle Hochregulierung der nachgiebigeren N2BA-Isoform dagegen, wurde bei verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten beschrieben, die mit einer verminderten systolischen Funktion und einer ventrikulären Dilatation verbunden sind. (LeWinter and Granzier, 2014). Weiterhin konnte über die Echokardiographie nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer höheren N2BA-Expression, auch ein höheres enddiastolisches Volumen/Druck-Verhältnis aufweisen, das mit einer verminderten ventrikulären Steifheit korreliert (Nagueh et al., 2004).

Vermutungen zur Folge dient die verminderte Titin-Steifigkeit durch die erhöhte Expression der N2BA-Isoform als Kompensation der kardialen Fibrose, welche mit einer stärkeren Steifheit des Herzgewebes assoziiert ist (Makarenko et al., 2004).

Posttranslationale Modifikation des Riesenproteins - Phosphorylierung

Das Titin-Isoformen Expressionsverhältnis dient nach bisherigen Erkenntnissen eher der langfristigen Regulation der passiven Steifigkeit des Gewebes. Dem gegenüber stehen posttranslationale Modifikationen, welche die passive Steifigkeit des Titins auch kurzfristig regulieren können (Koser et al., 2019). Die Dehnbarkeit und passive Kraft des Titins leiten sich von den Eigenschaften der elastischen I-Band-Region ab. Insbesondere die PEVK-Region, sowie die herzspezifische N2B *unique sequence* (N2Bus) sind für die passive Kraft im mäßig bis stark gedehntem Myokard verantwortlich (Watanabe et al., 2002). Ihre Phosphorylierung trägt zur Regulation der Titin-basierten Steifigkeit bei (Kötter et al., 2013) und wird in dieser Arbeit gezielt behandelt. Da die PEVK-Region der N2B-Isoform kürzer, die der N2A- und dadurch auch die der N2BA-Isoform aber länger ist, stehen vor allem Sequenzen im Vordergrund, die in beiden Isoformen vertreten sind (Guo et al., 2010).

Koordiniert wird die Phosphorylierung, an potenziell konservierten Phosphorylierungsstellen der Titin-Domänen, durch unterschiedliche Kinasen (Kötter et al., 2013). Die PEVK-Region wird durch die α -Isoform der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C ($\text{PKC}\alpha$) an den Positionen Ser11878 und Ser12022 in einer Sequenz

phosphoryliert, die in Herz- und Skelettmuskel-Titin vorkommt (Hidalgo et al., 2009). Eine weitere Kinase, die für die Phosphorylierung des Titins zuständig ist, ist die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Vor allem die im Herzen vorliegende Isoform CaMKII δ kann einen zusätzlichen Einfluss auf eine stärkere Phosphorylierung der Stelle Ser12022 haben (Hamdani et al., 2013).

Die Phosphorylierung der N2Bus erfolgt vor allem über die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), sowie über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) (Kötter et al., 2013). Die cAMP-abhängige PKA wird durch β -adrenerge Stimulation aktiviert und ist in der Lage unterschiedliche Sarkomer-Proteine zu phosphorylieren (Krüger and Linke, 2006). Die Phosphorylierung der N2Bus erfolgt vor allem am Serinrest Ser4010, welcher neben der PKA auch durch die *extracellular-signal regulated kinase 1 and 2* (ERK1/2) phosphoryliert werden kann (Salcan et al., 2020). Die Aktivierung der cGMP-abhängigen PKG dagegen erfolgt über die Aktivierung der Guanylatzyklase, die auf Stickstoffmonoxid (NO) und natriuretische Peptide reagiert (Krüger et al., 2009). Das Phosphorylierungsziel der PKG ist der, in der N2Bus liegende Serinrest Ser4099 (Salcan et al., 2020). Auch die herzspezifische CaMKII δ ist in der Lage die N2Bus an den Serinresten Ser4209 und Ser3705 zu phosphorylieren (Hamdani et al., 2013).

Über phosphospezifische Antikörper, die gegen die Serinreste Ser11878 und Ser12022 in der PEVK-Region gerichtet sind, sowie über Antikörper, die gegen die Serinreste der N2Bus gerichtet sind, kann der Titin-Phosphorylierungsstatus exemplarisch für die beiden Regionen ermittelt werden (Kötter et al., 2013).

Interessanterweise ist vor allem die Lokalisation der Phosphorylierung für den Einfluss auf die Titin-Steifigkeit definierend. Eine PKA-, PKG- oder ERK1/2 induzierte Phosphorylierung der N2Bus führt zu einer Verminderung der Titin-Steifigkeit, wohingegen eine PKC α -induzierte Phosphorylierung der PEVK-Region zu einer verstärkten Steifheit des Riesenproteins führt (Kötter et al., 2013, Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens basiert auf den jeweiligen Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Titin-Segmente. Die N2Bus enthält einen hohen Anteil an sauren, negativ geladenen Aminosäuren, was zu einem niedrigen isoelektrischen Punkt in dieser Region führt. Die PEVK-Region dagegen besteht aus einer großen Menge basischer, positiv geladener Aminosäuren, wodurch ein viel höherer isoelektrischer Punkt vorliegt. Die Phosphorylierung einer Region führt zu einer zusätzlichen negativen Ladung im phosphorylierten Bereich, da Phosphatgruppen negativ geladen sind. In einer bereits negativ geladenen Umgebung, wie z.B. in der

N2Bus, könnte dies zu einer intramolekularen, elektrostatischen Abstoßung führen, die Persistenzlänge der Region nimmt zu und folglich nimmt die Steifigkeit ab. In der positiv geladenen PEVK-Region dagegen können intramolekulare elektrostatische Anziehungskräfte ausgebildet werden, die Persistenzlänge nimmt ab und es kommt zu einer Verdichtung, sowie zu einer Verfestigung des Proteins (Kötter et al., 2013, Krüger and Kötter, 2016).

Da die CaMKII δ dazu in der Lage ist, sowohl die N2Bus als auch die PEVK-Region zu phosphorylieren und somit zeitgleich einen verstärkenden, sowie vermindernenden Einfluss auf die Titin-Steifigkeit ausübt, könnte man davon ausgehen, dass die Steifigkeit des Riesenproteins letztlich unverändert bleibt. Da CaMKII entlang der Z-Banden stark angereichert und die N2Bus näher an den Z-Banden lokalisiert ist als die PEVK-Region, kann davon ausgegangen werden, dass die N2Bus vermehrt phosphoryliert wird, wodurch die CaMKII δ eher eine verminderte Versteifung des Titins koordiniert (Couchonnal and Anderson, 2008, Trombitás et al., 2000, Hidalgo et al., 2013).

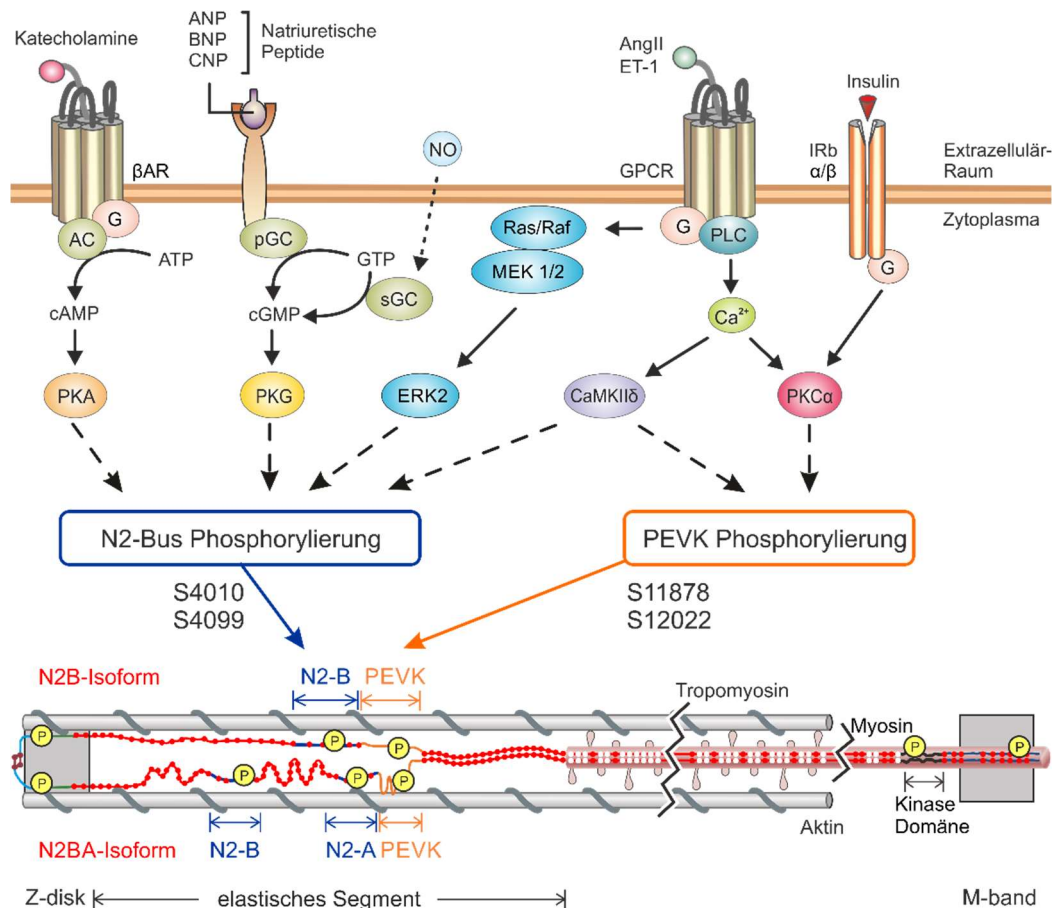


Abb. 3: Schematische Darstellung der Phosphorylierung der beiden elastischen Titin-Domänen N2-Bus und PEVK, sowie die dafür benötigten Kinasen, Signalwege und der humanen Phosphorylierungsstellen. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).

Dargestellt sind die Signalwege der relevanten Kinasen (Proteinkinase A (PKA), cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), *extracellular-signal regulated Kinase* (ERK2), Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) und Proteinkinase C α (PKCα)), die für die eine Phosphorylierung der Titin-Domänen N2-Bus und PEVK bekannt ist. Die Serinreste S4010 und S4099 stellen wichtige Phosphorylierungsstellen der N2-Bus dar, während die Serinreste S11878 und S12022 wichtige Phosphorylierungsstellen der PEVK-Region sind (Jahns, 2021).

Posttranslationale Modifikation des Riesenproteins – oxidativer Stress

Die Muskelelastizität und die passive Steifigkeit des Titins werden posttranslational nicht nur durch erhöhte bzw. verminderte relative Phosphorylierungen reguliert, sondern auch oxidativer Stress trägt posttranslational zur Modifikation der Titin-Steifigkeit bei (Beckendorf and Linke, 2015). In der Zelle tritt der oxidative Stress dann auf, wenn der Anteil der reaktiven Sauerstoff-/Stickstoffspezies (ROS/RNS) erhöht wird, oder wenn die antioxidativen Abwehrmechanismen vermindert aktiv sind (Beckendorf and Linke, 2015). Klinisch geht vor allem ein Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden, sowie eine Herzinsuffizienz oder verschiedene Muskeldystrophien mit einer Erhöhung der ROS/RNS einher (Canton et al., 2004, Haywood et al., 1996, Terrill et al., 2013). Die anfallenden ROS/RNS beeinflussen die Steifigkeit des Titins über verschiedene

Mechanismen, wie z.B. über eine indirekte Veränderung der relativen Titin-Phosphorylierung. Weiterhin können auch die Induktion einer Disulfidbrückenbildung in der N2Bus, sowie die S-Glutathionylierung im Immunglobulin-Bereich der I-Bande oder auch eine verstärkte Aktivierung Titin-abbauender Proteasen einen Einfluss auf die Titin-basierte Steifigkeit haben (Beckendorf and Linke, 2015).

Unter physiologischen Bedingungen aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase und induziert die Synthese von cGMP. Folglich kommt es zur Phosphorylierung von Titin durch die PKG. Dieser Signalmechanismus wird durch den oxidativen Stress beeinträchtigt. Durch den oxidativen Stress verliert die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) an Aktivität, wodurch NO vermindert synthetisiert wird, während das reaktive Superoxid-Anion O_2^- verstärkt anfällt (Beckendorf and Linke, 2015). Der beeinträchtigte NO/cGMP/PKG-Signalweg führt zu einer Hypophosphorylierung des Titins an der N2Bus, was in einer erhöhten Steifigkeit des Titins resultiert (Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2013).

Eine weitere, durch den oxidativen Stress verursachte, Modifikation des Titins, welche in einer erhöhten Steifigkeit der Kardiomyozyten resultiert, ist die Ausbildung von Disulfidbrücken in der herzspezifischen N2Bus. Unter oxidativem Stress können die sechs Cystein-Aminosäuren insgesamt drei Schwefel-Schwefel (S-S)-Brücken ausbilden. Die dadurch ungeordnete N2Bus wird mechanisch stabilisiert wodurch die Dehnbarkeit stark beeinträchtigt wird und die Steifheit zunimmt (Grutzner et al., 2009).

Neben einer erhöhten Steifigkeit des Titins kann der oxidative Stress, ähnlich der Phosphorylierung, auch einen reduzierenden Effekt auf die Steifheit des Titins haben. In den Immunglobulin-Domänen des elastischen I-Bandes liegen ebenfalls Cystein-Aminosäuren, welche durch die Dehnung des Proteins freigelegt werden. Der oxidative Stress induziert eine S-Glutathionylierung, wodurch zwei Schwefel-Wasserstoff (SH)-Gruppen eine Disulfidbrücke ausbilden und als Glutathiondisulfid (GSSG) vorliegen. Durch die S-Glutathionylierung wird die mechanische Stabilität der Domäne vermindert und die Neufaltung der Domäne wird verhindert. Die Immunglobulin-Domäne verbleibt in einem instabileren, gedehnten Zustand und vermittelt eine Abnahme der Titin-Steifigkeit (Alegre-Cebollada et al., 2014).

Auch die indirekte Aktivierung von Proteasen, welche den Abbau des Titins koordinieren, kann durch oxidativen/nitrosativen Stress beeinflusst werden. Eine dieser Proteasen ist die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), die vor allem in Kardiomyozyten reichlich vorhanden ist und unter anderem an der Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert ist

(Ali et al., 2010, Kandasamy et al., 2010). Nach myokardialen I/R-Schäden konnte eine höhere Aktivität der MMP2 nachgewiesen werden, aus der nachfolgend eine verstärkte Titin-Spaltung resultiert (Ali et al., 2010). Auch die Ca^{2+} -abhängige, intrazelluläre Protease Calpain-1 ist für den Abbau von Titin in den Kardiomyozyten von Bedeutung (Lim et al., 2004). Anders als die MMP2, wird Calpain-1 indirekt, über eine verstärkte Ausschüttung von Ca^{2+} aktiviert. Induziert wird der Ca^{2+} -Anstieg unter anderem durch oxidativen Stress, der vor allem eine erhöhte Aktivierung/Sensibilisierung des Ryanodinrezeptors verschiedener Ca^{2+} -Kanäle koordiniert (Inserte et al., 2012, Allen et al., 2008). Auffällig ist, dass das Riesenprotein Titin im gedehnten Zustand anfälliger für die Calpain-1 vermittelte Proteolyse ist und vor allem im Bereich des I-Bandes abgebaut wird (Bang et al., 2001, Murphy et al., 2006). Der, durch oxidativen Stress induzierte, proteolytische Abbau des Titin-Federsegments resultiert in einer irreversiblen Reduktion der passiven Steifheit der Kardiomyozyten. Zudem wird die aktive Kontraktion des Muskels beeinträchtigt, da das geschädigte Titin-I-Band die zentrale Positionierung der dicken Filamente nicht mehr aufrechterhalten kann und somit die Krafterzeugung durch Aktomyosin stört (Horowitz et al., 1986).

Fasst man den Einfluss des oxidativen Stresses auf die passive Steifigkeit des Titins und die Elastizität des Herzmuskels zusammen, so sieht man, dass gegensätzliche Effekte auf die passive Steifigkeit des Titins vermittelt werden. Eine verminderte Steifigkeit des Titins wird durch die S-Glutathionylierung sowie durch eine erhöhte Aktivität verschiedener, Titin abbauender Proteasen induziert. Eine erhöhte Steifigkeit erlangt das Titin dagegen aufgrund einer Disulfidbrückenbildung in der N2Bus oder durch eine indirekt induzierte Hypophosphorylierung (Beckendorf and Linke, 2015).

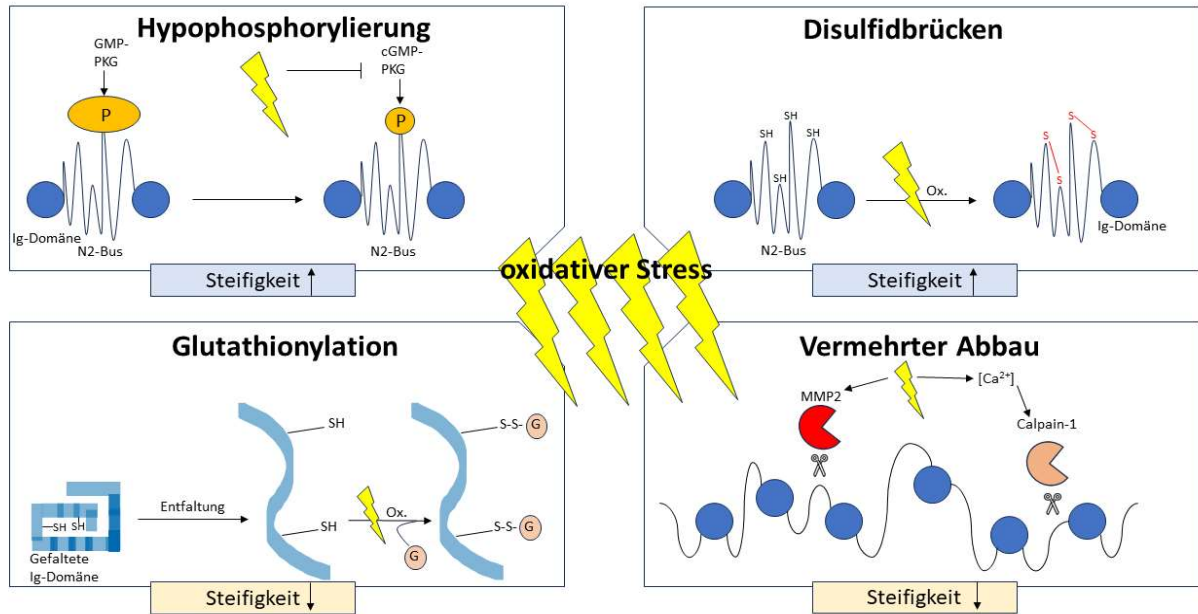


Abb. 4: Oxidativer Stress und seine Auswirkung auf das Riesprotein Titin sowie auf die Titin-basierte Steifigkeit (modifiziert nach (Jahns, 2021, Beckendorf and Linke, 2015)). Oben links: Oxidativer Stress vermindert die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase G, was in einer Hyperphosphorylierung der N2-Bus und somit in einer erhöhten Steifigkeit resultiert. Oben rechts: Oxidativer Stress führt zur Oxidation der Cysteine in der N2-Bus und folglich zur Disulfidbrückenausbildung, was in einer erhöhten Steifigkeit des Proteins resultiert. Unten links: Eine Dehnung des Sarkomers führt zur Freilegung von Cysteinen der Ig-Domäne, die unter Einfluss von oxidativem Stress und Glutathion Disulfidbrücken ausbilden, wodurch sich das Protein nicht mehr zurück falten lässt und die Steifigkeit abnimmt. Unten rechts: Titin-abbauende Proteasen, wie die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) und Calpain-1 werden durch oxidativen Stress aktiviert. Der verminderte Titingehalt führt zu einer erhöhten Flexibilität des Sarkomers (Beckendorf and Linke, 2015).

1.5 Ziele der Arbeit

Der Myokardinfarkt stellt die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar und kann im weiteren Verlauf zu verschiedenen, lebensgefährlichen Komplikationen führen, welche die hohe Mortalität dieser Erkrankung erklären. Die schwerwiegendsten Komplikationen stellen hierbei die Linksherzinsuffizienz oder der plötzliche Herztod dar. Da noch nicht alle pathophysiologischen Abläufe nach Myokardinfarkt bekannt sind, ist es wichtig diese weitestgehend zu erforschen und zu verstehen, um die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung eines Myokardinfarkts zu erweitern und somit das klinische *outcome* der betroffenen Patienten zu verbessern.

Diese Arbeit befasst sich mit den molekularen Veränderungen des elastischen Sarkomerproteins Titin in humanen Herzmuskelzellen, maximal 21 Tage nach Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus, wobei der Fokus der Untersuchung auf überlebenden Kardiomyozyten aus dem Myokardbereich liegt, der nicht unmittelbar von der Ischämie betroffen war. Durch Vorarbeiten am Mausmodell konnte bereits gezeigt

werden, dass es im Bereich des *remote* Myokards unmittelbar nach Ischämie/Reperfusion zu posttranslationalen Modifikationen des Titins kommt, wodurch die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten ansteigt. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch diabetische Proben. Ausgehend davon wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Versteifung eine vorübergehende stabilisierende Wirkung auf das überlebende Ventrikel-Myokard hat und so die Funktion bis zur Ausbildung der intakten, fibrotischen Narbe aufrechterhält. Um zu prüfen, ob diese stabilisierende Wirkung auch in humanen Herzen auftritt und somit prinzipiell für die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes in Frage käme, sollten die posttranslationalen Modifikationen nach Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus untersucht werden mit Fokus auf die Versteifung des Titins und die Kontraktionsfähigkeit des Herzens. Durch die Verwendung humaner Vorhof-Kardiomyozyten, die im Rahmen einer Bypass-Operation entnommen werden konnten, können die Erkenntnisse aus dem Kleintiermodell Maus und aus dem Großtiermodell Schwein in dieser Arbeit auf menschliche Gewebeproben übertragen werden. Die zu untersuchenden Patientenproben wurden hierfür in verschiedene Untersuchungs-Gruppen aufgeteilt, denen allen gemein eine koronare Herzkrankheit war. Unterschiede wiesen die Proben im Vorhandensein eines Diabetes mellitus oder eines vorherigen Myokardinfarkts auf. Zudem waren sowohl die Medikation als auch zusätzliche Komorbiditäten der Patienten unterschiedlich. In dieser Arbeit soll der Unterschied der posttranslationalen Modifikation in diabetischen und nicht-diabetischen Herzen, z.T. nach Myokardinfarkt, bezogen auf das Sarkomerprotein Titin untersucht werden. Die Proben werden mittels Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert. Der darauffolgende Einsatz primärer und sekundärer Antikörper, die zum Teil phosphorspezifisch sind, soll erste Ergebnisse auf den Phosphorylierungsstatus der Zielstrukturen geben, welche wiederum erste Hinweise auf die passive Steifigkeit des Myokards nach Infarkt oder Diabetes mellitus geben. Untersucht werden unter anderem die Serinreste Ser4099 und Ser11878 der N2Bus beziehungsweise der PEVK-Region, die Phosphorylierung des Troponin I und der PKC α sowie auch die Ubiquitinierung des Titins.

Da sowohl der Myokardinfarkt, als auch der Diabetes mellitus häufig mit Komorbiditäten einhergehen, wird in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die posttranslationale Modifikation des Titins untersucht und auch der Einfluss der COPD auf die Titin-basierte Steifigkeit stellt einen analytischen Anhaltspunkt dar. Mögliche Einflüsse der Komorbiditäten können somit erste Hinweise darauf geben, ob der

Myokardinfarkt alleine oder auch weitere Erkrankungen einen Einfluss auf die Titin-basierte Steifigkeit nehmen und somit die Pumpfunktion des Herzens beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte mit Angaben zum Hersteller

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	VX-100	Systemec, Erkrath, DE
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules, USA
Chemilumineszenz Imager	Fusion FX6	Vilber, Eberhardzell, DE
Eismaschine	R 404A	Ziegra, Isernhagen, DE
Elektrophorese Kammer	Mini-Twin	Biometra, Göttingen, DE
Feinwaage	AE163	Mettler, Columbus, USA
Gefrierschrank, -20°C	Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank, -80°C	UXF40086V	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühlschrank, +4°C	KT1730	Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer	7x7 ALU Hot/Stir	VWR, Wien, AT
Mikrowelle	Micromat 135	AEG, Berlin, DE
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR, Wien, AT
Netzteil	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, DE
Orbitalschüttler	SM-30	Edmund Bühler, Tübingen, DE
PC-Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP, Kalifornien, USA
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Photometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific, Waltham,

Taumelrollenmischer	RMS-30V	USA CAT, Ballrechten-Dottingen, DE
Tischwaage	Kern 572	Kern, Balingen-Frommern, DE
Tischzentrifuge	Mini Star	VWR, Wien, AT
Vortexschüttler	Reax top	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad	3043	Köttermann, Uetze, DE

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Angaben zum Hersteller

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose LE	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricom Scientific, Ebsdorfergrund, DE
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL (Western blotting detection reagent)	Cynagen, Bologna, IT
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol absolut	VWR, Wien, AT
Ethanol (vergällt mit 1%igen Petrolether)	VWR, Wien, AT

Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Guanidin Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, DE
Imperial protein stain	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molekulargewichtsmarker	Thermo Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Nonident P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Serva Blue R	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, DE
Tetramethylethyldiamin (Temed)	AppliChem, Darmstadt, DE
Thiourea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tricine	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Urea	AppliChem, Darmstadt, DE

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10% SDS Laufpuffer	250mM Tris, 2M Glycin, 1%SDS, pH >8,5
10x TBST	0,2M Tris, 1,5M NaCl, 0,1% Tween, pH 7,4
10x TBS	0,2M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,4

4x SDS Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCL, 0,4% SDS, pH 6,8
4x SDS Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCL, 0,4% SDS, pH 8,8
Anodenpuffer	300mM Tris/HCL, 100mM Tricine, pH 8,8
Kathodenpuffer	300mM Aminocaprinsäure, 300mM Tris/HCL, pH 8,7
Blockierlösung	2% BSA in 1x-TBST (10g BSA auf 500ml TBST)
Probenpuffer	8M Urea, 2M Thiourea, TRIS, 3%SDS, 0,035 Serva Blue, 10% Glycerol, pH 6,8
PVDF Stain	0,075% Serva Blue (150mg) 200ml Methanol
PVDF Destain	10% Essigsäure, 40% Ethanol (95%), 50% Aqua bidest
Strippingpuffer	20mM Tris, 6M Guanidinhydrochlorid, 0,2% Nonident P40, 0,1M beta-Mercaptoethanol, pH 7,5
Tris/HCL	50mM Tris, Aqua dest, pH 6,8

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien mit Angaben zum Hersteller

Material	Hersteller
Blotting Papier	Machery-Nagel, Münschen, DE
Pipettenspitzen	TipOne, Hamburg, DE
PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
UV-Küvetten	Brand, Wertheim, DE
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Angaben zum Hersteller, zur Verdünnung und Quelle

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
------------	------------	--------	------------

Anti-PKC α	1:10.000	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PKC α (phospho T497)	1:5000	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Phospho-S11878pan (PEVK)	1:1000	Kaninchen	immunoGlobe, Würzburg, DE
Phospho-S11878	1:1000	Kaninchen	immunoGlobe, Würzburg, DE
Phospho-S4099	1:1000	Kaninchen	immunoGlobe Würzburg, DE
Phospho-Troponin I	1:2000	Kaninchen	Cell Siganling Technology, Cambridge, UK
Troponin I	1:1000	Kaninchen	Cell Siganling Technology, Cambridge, UK
Ubiquitin (P4D1)	1:5000	Maus	Cell Signaling Technology, Leiden, NLD

Sekundärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Angaben zum Hersteller, zur Verdünnung und Quelle

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
Anti-mouse IgG HRP (horseradisch-peroxidase linked)	1:5000	Pferd	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
Anti-rabbit IgG HRP (horseradish-peroxidase linked)	1:3000	Ziege	Cell Siganling Technology, Cambridge, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Ex vivo Untersuchungen an isoliertem humanem

Herzgewebe

Genehmigung

Die hier verwendeten Patienten-Biopsien wurden von der Klinik für Thorax- und Kardiovaskulärer Chirurgie (Prof. Dr. med. Matthias Thielmann), sowie dem Institut für Pathophysiologie der Universität Essen (Prof. Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Verwendung von Patientenbiopsien im Rahmen dieser Studie erfolgte gemäß den geltenden ethischen und rechtlichen Bestimmungen. Der entsprechende Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen geprüft und genehmigt (Aktenzeichen 20-9250-BO). Alle institutionellen und datenschutzrechtlichen Vorgaben wurden eingehalten.

Verwendete Patientengruppen

Die Zielgruppe der zu rekrutierenden Studienteilnehmer bestand aus erwachsenen (>18 Jahre), einwilligungsfähigen Patienten mit Indikation zur elektiven Herzoperation, erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion (LVEF >30%), Indikation zum Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, milder Hypothermie (>32°C) und Indikation zur antegraden Bretschneider-Kardioplegie. Allen teilnehmenden Patienten lag die Indikation zur koronaren Bypassoperation zu Grunde. Die Studienteilnehmer wurden durch den aufklärenden Arzt über die Studie informiert. Nach ausführlicher Aufklärung unterschrieben die Patienten freiwillig die Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme. Die Patienten hatten die Möglichkeit jederzeit und ohne Angabe von Gründen das Einverständnis an dieser Studie teilzunehmen zu widerrufen. Die Patienten wurden nicht randomisiert und eine Verblindung war nicht notwendig.

In der vorliegenden Arbeit lag das Alter der Patienten, deren Proben in die Studie eingeschlossen wurden, zwischen 37 und 84 Jahren. Die überwiegende Mehrheit der Studienteilnehmer war männlich; eine geschlechtsspezifische Analyse wurde aufgrund der geringen Patientenzahlen nicht durchgeführt.

Die Untersuchung erfolgte in zwei separaten Versuchsdurchläufen. Im ersten Durchlauf wurden insgesamt 31 Proben analysiert: 8 Proben von Patienten mit Diabetes mellitus (D+), 8 Proben von Patienten mit Myokardinfarkt und begleitendem Diabetes mellitus

(ID), 7 Proben von Patienten mit Myokardinfarkt ohne Diabetes (I) sowie 8 Kontrollproben (K). Die Kontrollgruppe wies weder einen Diabetes mellitus noch einen stattgehabten Myokardinfarkt auf; weitere Komorbiditäten wurden nicht als Ausschlusskriterium definiert. Der Schwerpunkt lag auf dem Vergleich von Proben mit und ohne Diabetes mellitus bei Patienten mit kürzlich zurückliegendem Infarkt ereignis, wobei die Probenentnahme maximal 21 Tage *post infarctum* erfolgte.

Im zweiten Durchlauf wurden 17 Proben untersucht: 9 Proben von Patienten mit arterieller Hypertonie (AH), 3 Proben von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) sowie 5 Kontrollproben (Kontrolle). Analog zum ersten Durchlauf waren hier das Fehlen von arterieller Hypertonie und COPD die einzigen Definitionskriterien für die Kontrollgruppe; weitere Komorbiditäten stellten keine Ausschlusskriterien dar.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das tierexperimentelle Modell unterlag mehreren Limitationen: Zum einen erfolgte die Probenentnahme bei Infarktpatienten aufgrund des zeitlichen Zusammenhangs mit der Bypass-Operation in einem engen zeitlichen Fenster nach dem Infarkt ereignis und unterlag strengen ethischen Auflagen. Zum anderen wurde weder eine Stratifizierung nach weiteren Komorbiditäten noch nach Geschlecht vorgenommen, was eine vollständige Vergleichbarkeit mit dem tierexperimentellen Ansatz einschränkte.

Entnahme der Gewebeproben

Nach dem Hautschnitt, der medianen Sternotomie und Y-förmigen Eröffnung des Perikards wurde zunächst das Herz freigelegt. Vor dem arteriellen und venösen Anschluss der *Aorta ascendens* und des rechten Vorhofes an die Herz-Lungen-Maschine wurde routinemäßig eine Tabaksbeutelnaht um das rechte Herzohr gelegt, wodurch das rechte Herzohr abgeklemmt wurde und eine Entfernung des rechten Herzohres durchgeführt werden konnte. Bei der operativen Behandlung einer Aortenklappenstenose wiederum wurde neben dem prothetischen Aortenklappenersatz oftmals zusätzlich ein Teil des stark hypertrophierten, des linksventrikulären Ausflustrakt (LVOT) obstruierenden Ventrikelsptums, entnommen. Das entnommene Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden dann von Mitarbeitern des Institutes für

Pathophysiologie in der Klinik abgeholt und an das Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weitergeleitet.

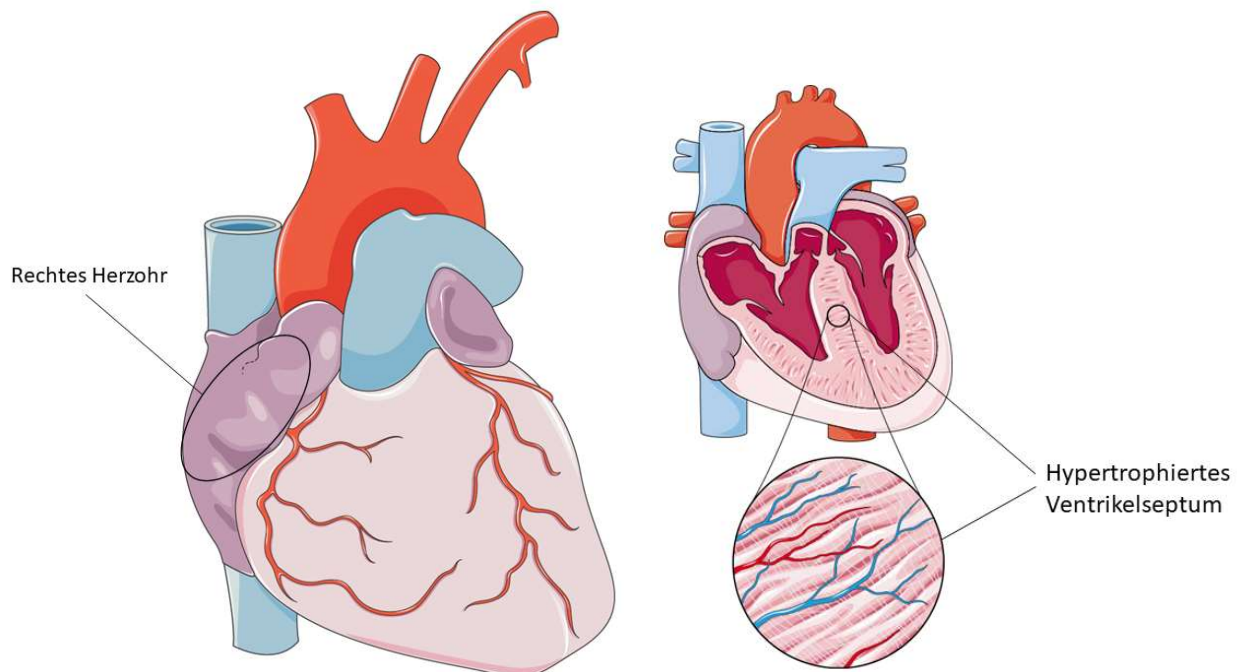


Abb. 5: Entnahmeorte des Probenorgewebes nach Indikation zur operativen Bypasschirurgie. Die Abbildung wurde unter Nutzung von „Servier Medical Art“, bereitgestellt von Servier, lizenziert durch eine „Creative Common Attribution 3.0 unported license“, entworfen (<https://smart.servier.com>). Gezeigt ist ein anatomischer Überblick des humanen Herzens. Gekennzeichnet ist das rechte Herzohr, welches über eine Tabaksbeutelnaht abgeklemmt wird und somit eine Entfernung des rechten Herzohres erfolgen kann. Auf der rechten Seite ist ein hypertrophiertes Ventrikelseptum dargestellt, welches bei Behandlung einer operativen Aortenklappenstenose linksventrikulär zum Teil entnommen wird.

2.2.2 Biochemische Analyse

Proteinsolubilisierung

Das Solubilisieren der Proteine aus den einzelnen, bei -80°C gelagerten, Gewebeproben des rechten humanen Vorhofs erfolgte über die Zugabe von jeweils $90 - 110\mu\text{l}$ Probenpuffer, welchem zuvor $40\mu\text{l}$ DTT beigefügt wurden. Mechanisch zerkleinert und vermischt wurde das Lysat durch den Einsatz zweier Skalpelle. Daraufhin folgte die 30-minütige Lagerung der Proben auf Eis. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erzielen, wurden die Proben in einem Thermoblock bei 96°C für drei Minuten erhitzt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats wurde die Proteinbestimmung nach Bradford angewandt (Bradford, 1976). Hierfür wurden die solubilisierten Proben vorerst drei Minuten lang bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand der Proben wurde in $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin folgte das

Erstellen einer Verdünnungsreihe der einzelnen Proben (Verdünnungsverhältnis 1:5) mittels Einsatzes von 2µl Probe und 8µl Wasser. Die verdünnten Proben dienen der Herstellung jeweils zweier Extinktionslösungen, welche 800µl Wasser, 200µl Bradford Reagenz und 2µl der verdünnten Probe enthielten. Als Leerwert diente ein weiteres Reaktionsgefäß, welches mit 800µl Wasser und 200µl Bradford Reagenz befüllt wurde. Anschließend wurden die Extinktionslösungen mit einem Vortex-Schüttler durchmischt. Die Messung der Extinktion wurde nach 10-minütiger Inkubationszeit in einem Photometer bei 595nm durchgeführt. Hierdurch ließ sich die Konzentration des Lysats und damit eine Angabe der gewünschten Proteinmenge in µg/µl bestimmen. Als Referenz wurde eine Eichreihe von 0 – 2 mg/ml BSA eingesetzt.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um die Proteine auf ihre Strukturen und Charakteristika analysieren zu können, wurden diese auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer molekularen Masse (10 - 250kDa) nach aufgetrennt. Die Auftrennung wird durch die vorherige Denaturierung und anschließende Behandlung mit SDS gewährleistet, da durch die Denaturierung mit Hitze die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst wird. Anschließend bindet SDS an die Aminosäuren, wodurch die Proteine des Lysats eine negative Ladung erhalten. Die beladenen, negativ geladenen Proteine wandern aufgrund des, bei der Gelelektrophorese angelegten elektrischen Feldes, erzeugt durch die Stromquellen Kathode (negativ geladen) und Anode (positiv geladen), in Richtung der Anode. Während kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern können, benötigen größere Proteine mehr Zeit, um die Anode zu erreichen. Durch die unterschiedlichen Geschwindigkeiten kommt es zur Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße innerhalb des SDS-Gels.

10% SDS-PAGE

Die Polyacrylamidgele, welche mit den oben genannten Proteinen beladen wurden, wurden mit einem Acrylamidanteil von 10% gegossen, wodurch die Auftrennung von Proteinen zwischen 5 – 250 Kilodalton (kDa) möglich ist. Die Acrylamidgele bestehen aus zwei einzelnen Gelen, welche nacheinander in gängiger Vorgehensweise hergestellt wurden (zu entnehmen aus Tabelle 7). Der erste Schritt ist die Anfertigung des Trenngels, welches nach der Verfertigung eine Stunde polymerisiert. Im zweiten Schritt folgt die Erstellung des Sammelgels, welches nach Polymerisation des Trenngels, auf dieses

gegeben werden konnte. Schließlich wurde ein Kamm in das Sammelgel geschoben, um die Beladungstaschen zu bilden. Nach 20-minütiger Aushärtung konnte der Kamm entfernt, und die Taschen beladen werden. Um die Proteinbanden, der nach Größe sortierten Proteine, einordnen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (2,5µl) in jeweils die erste Tasche des Gels pipettiert. Der Marker enthält ein bekanntes, speziell angefärbtes Proteingemisch, welches ein normiertes Muster mit neun Referenzbanden erbringt (von 10kDa bis 250kDa). Die zu untersuchenden Proteine konnten so anhand ihres Molekulargewichts erkannt werden.

Tabelle 7: Rezept für verwendete SDS-PAGE-Gele (Trenn- und Sammelgel)

Trenngel für zwei Gele	10%-ige Gele
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	3,75ml
APS	75µl
H ₂ O (deionisiert)	7,5ml
Temed	7,5µl
Trenngelpuffer	3,75ml
<hr/>	
Sammelgel für zwei Gele	
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	0,667ml
APS	50µl
H ₂ O (deionisiert)	3,025ml
Sammelgelpuffer	1,25ml
Temed	15µl

Titinglele

Das Protein Titin ist mit bis zu 3,7 Megadalton (MDa) das größte monomere Protein im menschlichen Organismus und zu groß, um es mittels einer Standard-SDS-PAGE darzustellen, da dieses Verfahren auf etwa 250kDa limitiert ist (Krüger and Kötter, 2016). Um das Protein dennoch in einem Gel nachweisen zu können, wird eine andere Gel-Zusammensetzung verwendet. Ein wesentlicher Unterschied zu den Standard-SDS-Gelen ist die Stammlösung mit einer anderen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration (29:1),

sodass die entstandene Netzstruktur auch größere Proteine hindurch lässt (Warren et al., 2003). Weiterhin wurde 1,5%-Agarose verwendet, um dem Gel eine höhere Stabilität zu gewährleisten. Das SDS-Gel polymerisiert über Nacht aus und die durch den Kamm entstandenen Taschen konnten am nächsten Tag beladen werden. Durch die Größe des Titins ist kein Molekulargewichtsmarker nötig, da nach der Gelelektrophorese nur die entsprechenden Titinbanden im fertigen Gel sichtbar sind.

Tabelle 8: Rezept für Titingele

Rezept für zwei Titingele	2,1%ige -Gele
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (29:1)	1,4ml
H ₂ O (deionisiert)	6,67ml
Temed	11,5µl
Trenngelpuffer	5ml
Im Wasserbad auf 48° erwärmen	
Agarose (1,5%)	6,67ml
APS	150µl

Western Blot

Zur weiteren Analyse der aufgetrennten Proteine wurde ein Semi-Dry-Blot-System verwendet, mit dessen Hilfe man die auf dem SDS-Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) transferiert. Das SDS-Gel wurde hierfür auf eine PVDF-Membran gelegt, welche zuvor mit Ethanol aktiviert wurde, um die hydrophoben Eigenschaften zu vermindern. SDS-Gel und PVDF-Membran wurden zwischen jeweils fünf Blotting-Papiere gelagert, welche gemäß dem zwei-Puffersystem zuvor in einen Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt wurden. Die Membran lag hierbei auf dem anodenpuffergetränkten Papier, auf dem Gel lag das kathodenpuffergetränkte Papier. Die Blotting-Papiere lagen gemeinsam mit der PVDF-Membran und dem SDS-Gel in einer Blotting-Kassette, welche verschlossen wurde und anschließend in einer Trans Blot Turbo Apparatur (Blotkammer) platziert wurde. Eingestellt wurde diese auf 1,0 Ampère à 20 Volt für jeweils 40 Minuten (Titingele) oder auf 1,5 Ampère à 20 Volt für jeweils 12 Minuten (10% SDS-PAGE). Nachdem der Blotting-Prozess beendet war, wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran mittels Serva Blue Lösung (PVDF Stain) für 15

– 20 Sekunden angefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund der PVDF-Membran mittels einer PVDF-Destain-Lösung entfernt, indem die Membran für fünf Minuten auf einem Orbitalschüttler gewaschen wurde.

Immundetektion

Die nun angefärbten Proteinbanden auf der PVDF-Membran wurden weiterhin mit Antikörpern behandelt, um die Proteine in einem Chemilumineszenzverfahren darstellen zu können. Um eine möglichst genaue Bindung der Antikörper auf den jeweiligen Proteinen zu ermöglichen, musste die Membran zuvor mit einer 2%igen-BSA-Lösung, bestehend aus TBST und 2%igem Rinderserumalbumin, für 2 Stunden blockiert werden. Anschließend wurden die Antikörper in vorgegebener Verdünnung (zu entnehmen aus Tabelle 5 und 6), mit jeweils 3ml 0,5%iger-BSA-Lösung auf die Membranen aufgetragen und konnten über Nacht binden. Die Membranen (=Blots) wurden nachfolgend dreimalig, für jeweils fünf Minuten, mit TBST Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu lösen. Hierauf folgte die Behandlung mit einem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper (= HRP, horseradish peroxidase) auf gleiche Weise, welcher gegen den Fc-Bereich des bereits gebundenen Primärantikörpers gerichtet ist und diesen bindet. Nach zwei Stunden folgten drei weitere Waschungen à 10 Minuten mittels TBST, wodurch im nachfolgenden Chemilumineszenzverfahren die markierten Proteine in ihren Banden klar sichtbar wurden. Hierfür wurden die Blots mit einem Luminol haltigem ECL-Reagenz benetzt. Die HRP wird katalysiert, wodurch das Luminol des Reagenzes oxidiert und es zu einer Lichtreaktion kommt. Diese Lichtreaktion kann durch den Chemilumineszenzimager detektiert werden und die Banden werden sichtbar.

Strippingpuffer-System

Der Vergleich einzelner Proteinbanden erfolgte über die Beladung mit phosphospezifischen und nicht-phospho-spezifischen (Pan)-Antikörpern. Der 15-minütige Einsatz des Stripping-Puffers diente der Entfernung der phospho-spezifischen Antikörper von der Membran. Nach anschließendem dreimaligen Waschzyklus mit TBS à fünf Minuten konnten die Membranen erneut blockiert und mit neuem Primärantikörper beladen werden.

Isoformen Detektion

Das in der quergestreiften Herzmuskulatur liegende Protein Titin findet sich bei humanen

Kardiomyozyten, anders als im Tiermodell, in zwei Isoformen wieder. Die kürzere N2B-Isoform und die längere N2BA-Isoform. Die unterschiedliche Ausprägung des Proteinbanden-Signals und damit die unterschiedliche Menge der einzelnen Isoformen kann auf Erkrankungen des Organismus zurückgeführt werden. Auch der verstärkte oder verminderte Nachweis der Degradationsbande T2 kann ein Hinweis auf verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen sein. Eine Untersuchung der einzelnen Isoformen war durch das einstündige Anfärben des SDS-Gels mittels Imperial-Stain möglich, da dieser Farbstoff an freie, geladene Amino- und Iminogruppen bindet. Für ein klares Ergebnis wurde der Hintergrund anschließend mit deionisiertem Wasser für vier Stunden entfärbt.

2.2.3 Auswertung

Quantitative Messung der Farbdichte zur Auswertung der Isoformen

Die oben genannten gefärbten Gele wurden zur weiteren Auswertung und Analyse mit einem Bio-Rad *Molecular Imager* gescannt und fotografisch gespeichert. Anschließend folgte die Bearbeitung über das Programm Image-J, wodurch die Dichte der einzelnen Proteinbanden bestimmt werden konnte und letztlich ein prozentuales Mengenverhältnis der einzelnen Isoformen ermittelt wurde.

Quantitative Messung der Farbdichte zur Auswertung der Western Blots

Zur Auswertung der Antikörper-beladenen Blots wurde ein Chemilumineszenz-Imager angewandt. Auch hier wurden die Ergebnisse bildlich gespeichert und über das Programm Image-J ausgewertet. Ein Verhältnis zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Proteinen wurde durch einen Vergleich der Banden gezogen, welche mit unterschiedlichen Antikörpern beladen wurden. Angewandt wurden hierbei zunächst phospho-spezifisch-bindende Antikörper, gefolgt von so genannten nicht-phospho-spezifischen (Pan)-Antikörpern. Zur normierten Auswertung wurden zunächst einzig die Proben der einzelnen Blots miteinander verglichen, weshalb jeder Blot mit mindestens zwei Kontrollen versehen war. Anschließend wurden die normierten Mittelwerte zu den verschiedenen Untersuchungsgruppen zusammengefügt.

Verwendete Softwares

Die Erstellung und Anfertigung der Arbeit erfolgte zusätzlich über den Einsatz folgender

Programme: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, Adobe Photoshop CS6, Image-J, GraphPad Prism.

2.2.4 Statistik

Zur Testung der Signifikanz diente das Programm GraphPad Prism, mit dessen Hilfe sowohl ein *one way*-, als auch ein *two way* ANOVA (= *analysis of variance*) durchgeführt werden konnte. Die p-Werte von $<0,05$ galten als signifikante Ergebnisse und wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Versuche n waren dabei unabhängig.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen des Diabetes mellitus und des Myokardinfarkts auf das Titin

Um die Auswirkungen des Diabetes mellitus und des Myokardinfarkts auf die Steifigkeit beziehungsweise Elastizität der Kardiomyozyten analysieren zu können, wurden im Rahmen eines operativen Eingriffs, Herzbiopsien des rechten humanen Vorhofs gewonnen. Nachfolgend wurden die Proben aufbereitet und auf Titingele aufgetragen. Über das Western-Blot-System sowie über die darauffolgende Immundetektion konnte die relative Phosphorylierung der PEVK-Region sowie der N2Bus des Titins bestimmt werden. Zudem wurde die Titin-Isoformzusammensetzung der verschiedenen Gewebeproben analysiert. Da auch andere Proteine und Enzyme Einfluss auf die Steifigkeit der Kardiomyozyten nehmen können, wurden die Proben ebenfalls auf 10%ige Polyacrylamidgele aufgetragen und die relative Phosphorylierung des Proteins Troponin I sowie die relative Ubiquitinierung bestimmt. Auch die Titin phosphorylierende PKC α wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die weder an einem Diabetes mellitus, noch an einem Myokardinfarkt erkrankt sind.

3.1.1 Einfluss von Diabetes mellitus und Myokardinfarkt auf das Titin-Isoformen Expressionsverhältnis

Das Expressionsverhältnis der beiden myokardialen Titin-Isoformen N2BA und N2B kann die Steifigkeit und Elastizität des Herzmuskels langfristig beeinflussen (Eldemire et al., 2021). Um den Einfluss des Myokardinfarkts und des Diabetes mellitus, auf das

Expressionsverhältnis, untersuchen zu können, wurden die aufbereiteten Gewebsbiopsien mittels 2,1%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mittels Imperial Protein Stain® angefärbt und densitometrisch analysiert. Ein signifikanter Unterschied der Isoformenzusammensetzung zeigte sich zu keinem Zeitpunkt (Abb. 6). In der Kontrollgruppe betrug die durchschnittliche N2BA-Expression $54,00 \pm 2,67\%$, die N2B-Expression entsprechend $46,00 \pm 2,67\%$. Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankten (D-Gruppe), wiesen eine durchschnittliche N2BA-Expression von $51,50 \pm 2,43\%$, mit entsprechender N2B-Expression von $48,50 \pm 2,43\%$ auf. Im Vergleich dazu wiesen Patienten mit vorherigem Myokardinfarkt (I-Gruppe) eine N2BA-Expressionsrate von $55,50 \pm 1,48\%$ mit dazugehöriger N2B-Expressionsrate von $44,50 \pm 1,48\%$ auf. Lag sowohl ein Diabetes mellitus vor, als auch ein vorheriger Myokardinfarkt (ID-Gruppe), so lag die N2BA-Expression bei $52,00 \pm 2,12\%$, die N2B-Expression demnach bei $48,00 \pm 2,12\%$.

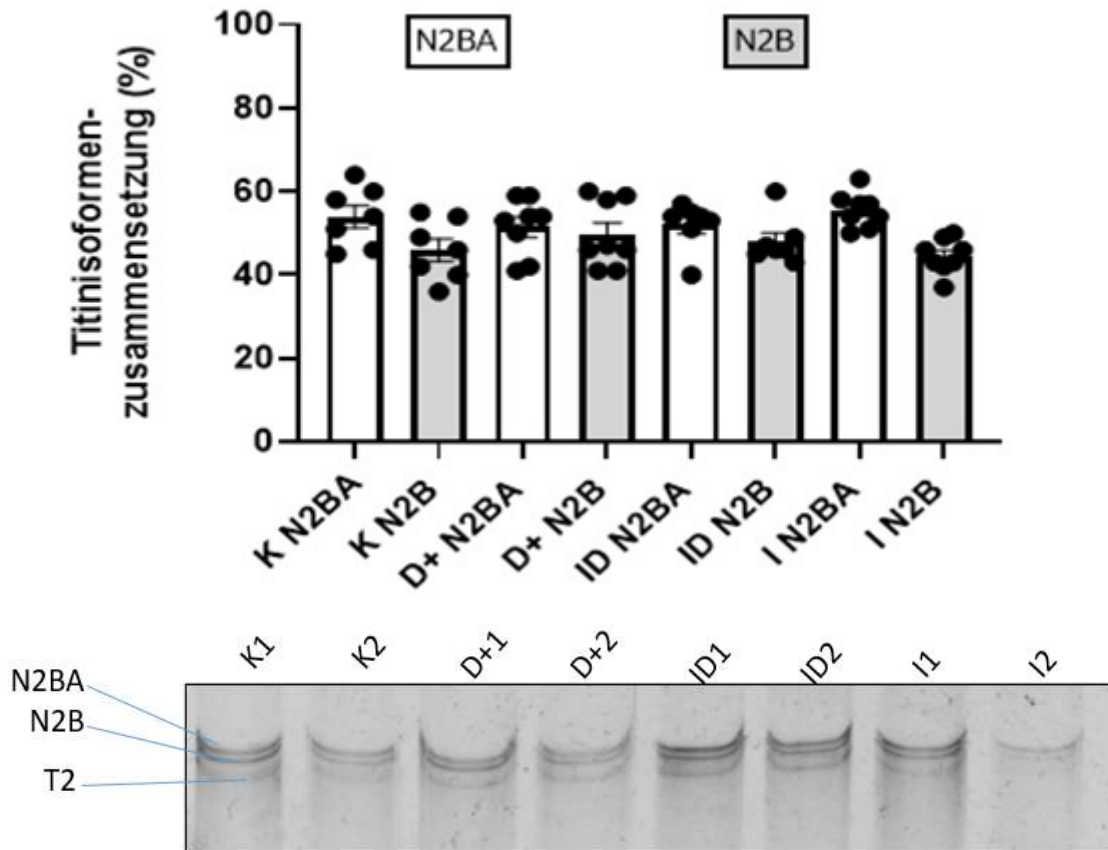


Abb. 6: Titin-Isoformen Expressionsverhältnis im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts. Die kardiale Zusammensetzung der Titin-Isoformen ergibt sich aus der Summe von N2BA+N2B=100%. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (K) (n = 7), der Diabetes-Gruppe (D+) (n = 8), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (ID) (n = 7) und der Infarktgruppe (I) (n = 8). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *ordinary two-way ANOVA*). Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentatives, exemplarisches Blotbild (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe). Neben den kardialen Isoformen N2BA und N2B ist auch die charakteristische Degradationsbande T2 sichtbar. Molekulargewichte der Titin-Isoformen: N2B = 2,97MDa, N2BA 3,2-3,4MDa, T2 = 2-2,2MDa.

3.1.2 Analyse der relativen Titin-Degradation bei Myokardinfarkt und Diabetes mellitus

Neben dem Titin-Isoformen-Expressionsverhältnis, hat auch der Abbau von Titin einen wesentlichen Einfluss auf die Steifigkeit des Myokards (Beckendorf and Linke, 2015). Die kardialen Titin-Isoformen N2BA und N2B, zusammengefasst als T1, können bei strukturellen Veränderungen des Myokards verstärkt degradiert werden, so dass die charakteristische Degradationsbande T2 gehäuft auftritt (Vikhlyantsev et al., 2013). Die humanen Gewebeproben wurden hinsichtlich einer verstärkten Titindegradation getestet, indem das densitometrische Signal der Degradationsbande T2 ins Verhältnis zu dem Signal der intakten Titin-Isoformen N2BA+N2B (= T1) gesetzt wurden. Abbildung 7

zeigt, dass unter den verschiedenen Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im T2:T1 zu erkennen war. Das relative T2:T1-Verhältnis der Kontrollgruppe lag bei $29,39 \pm 2,70\%$, während das der Diabetiker bei $36,26 \pm 4,05\%$ lag. Die Infarktgruppe zeigte ein relatives T2:T1 Verhältnis von $28,50 \pm 4,16\%$ lag. Die an Diabetes mellitus und Myokardinfarkt erkrankten Patienten dagegen wiesen ein T2:T1-Verhältnis von $39,55 \pm 5,59\%$ auf.

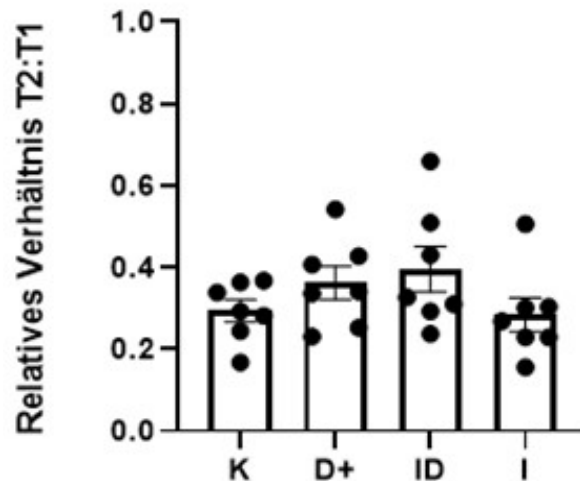


Abb. 7: Titin-Isoformen Degradationsverhältnis T2:T1 im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.

Das relative Verhältnis von T2:T1 beschreibt die Degradation der Titin-Isoformen N2BA und N2B. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (K), der Diabetes-Gruppe (D+), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (ID) und der Infarktgruppe (I). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM ($n = 7$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *ordinary one-way ANOVA*).

3.1.3 Auswirkung von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung der Titin PEVK-Region

Die Phosphorylierung des Titins ist ein kurzfristiger, schneller Regulationsmechanismus zur Beeinflussung der Titin-Steifigkeit. Vor allem die Phosphorylierung der Serinreste Ser11878 und Ser12022 in der PEVK-Region definieren eine erhöhte Steifigkeit des Titins mit resultierender, verminderter Elastizität der Kardiomyozyten (Kötter et al., 2013). Um den Einfluss eines Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts auf die passive Steifigkeit des Myokards analysieren zu können, wurde die relative Phosphorylierung der PEVK-Region im Bereich des Serinrests Ser11878 mittels Western-Blot und phosphorspezifischer Antikörper sichtbar gemacht und untersucht. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, in der die relative Phosphorylierung bei $100,00 \pm 5,55\%$ lag, war die relative Phosphorylierung der Diabetiker mit $119,90 \pm 13,93\%$ leicht erhöht. Die relative Phosphorylierung der Infarktgruppe lagen mit $83,32 \pm 19,79\%$ unterhalb der

Kontrollgruppe. Bei Patienten die sowohl einen Diabetes mellitus, als auch einen vorherigen Myokardinfarkt aufwiesen, lag der Phosphorylierungsstatus bei $106,70 \pm 8,89\%$. Keine der hier beobachteten Veränderungen der relativen Titin Ser11878 Phosphorylierung war statistisch signifikant (siehe Abb. 8).

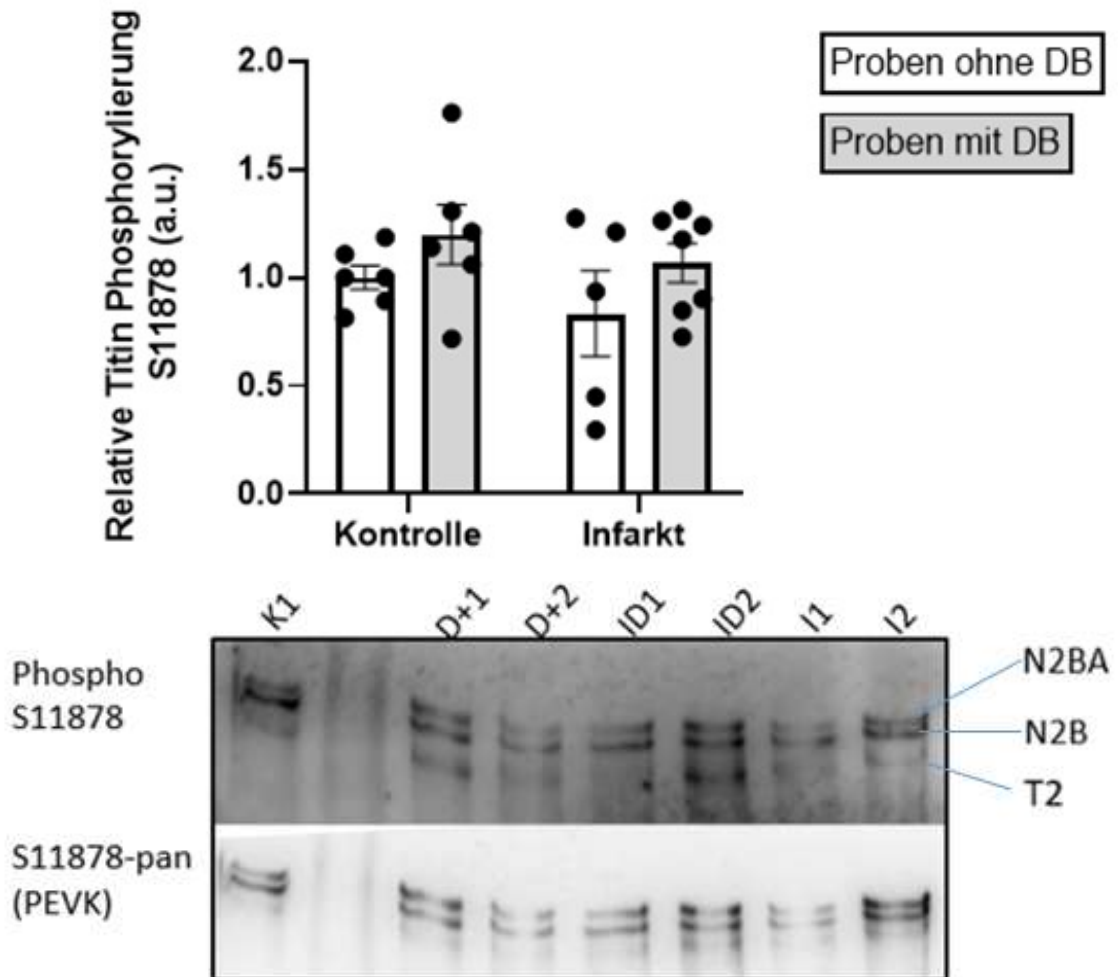


Abb. 8: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser11878 der PEVK-Domäne im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Proben ohne DB) (n = 6), der Diabetes-Gruppe (Proben mit DB) (n = 6), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (Infarkt mit DB) (n = 7) und der Infarktgruppe (Infarkt ohne DB) (n = 6). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *two-way* ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe).

3.1.4 Einfluss von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung N2B *unique sequence* des Titins

Neben der Phosphorylierung der PEVK-Region, kann auch die Phosphorylierung der N2Bus einen Einfluss auf die passive Steifigkeit des Titins haben. Wichtige potenziell konservierte Phosphorylierungsstellen der N2Bus sind die Serinreste Ser4185, Ser4010

und Ser4099, deren Phosphorylierung eine verminderte Steifigkeit des Riesenproteins vermitteln (Kötter et al., 2013). In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung des Serinrests Ser4099 mittels Western-Blot und phosphospezifischer Antikörper untersucht, um den Einfluss von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die N2Bus zu charakterisieren. Ein signifikanter Unterschied der Ser4099 Phosphorylierung zwischen den verschiedenen Gruppen war zu keinem Zeitpunkt zu verzeichnen. Abbildung 9 zeigt, dass die Phosphorylierung der Kontrollgruppe bei $100,00 \pm 4,81\%$ lag, die der Diabetiker dagegen mit $102,00 \pm 5,14\%$ über der Kontrolle lag. Verglichen mit der Kontrollgruppe, zeigte sich in der Infarktgruppe mit $73,79 \pm 16,77\%$ ein verminderter Phosphorylierungsstatus. Auffällig ist der Vergleich zwischen den Diabetikern und den Diabetikern, die zusätzlich an einem Myokardinfarkt erkrankten. Der über den *two-way* ANOVA ermittelte p-Wert von 0,0684 lag nur leicht über der oberen Grenze des gesetzten Signifikanzniveaus. Die Patienten, die sowohl an Diabetes mellitus, als auch an einem Myokardinfarkt erkrankten, wiesen mit einer relativen Phosphorylierung von $74,92 \pm 7,55\%$ eine verminderte relative Phosphorylierung im Vergleich zu den Diabetikern auf, wodurch auf einen aussagekräftigen Trend geschlossen werden kann. Auffallend ist auch die starke Varianz der Daten in den Gewebeproben der nicht-diabetischen Patienten nach Myokardinfarkt.

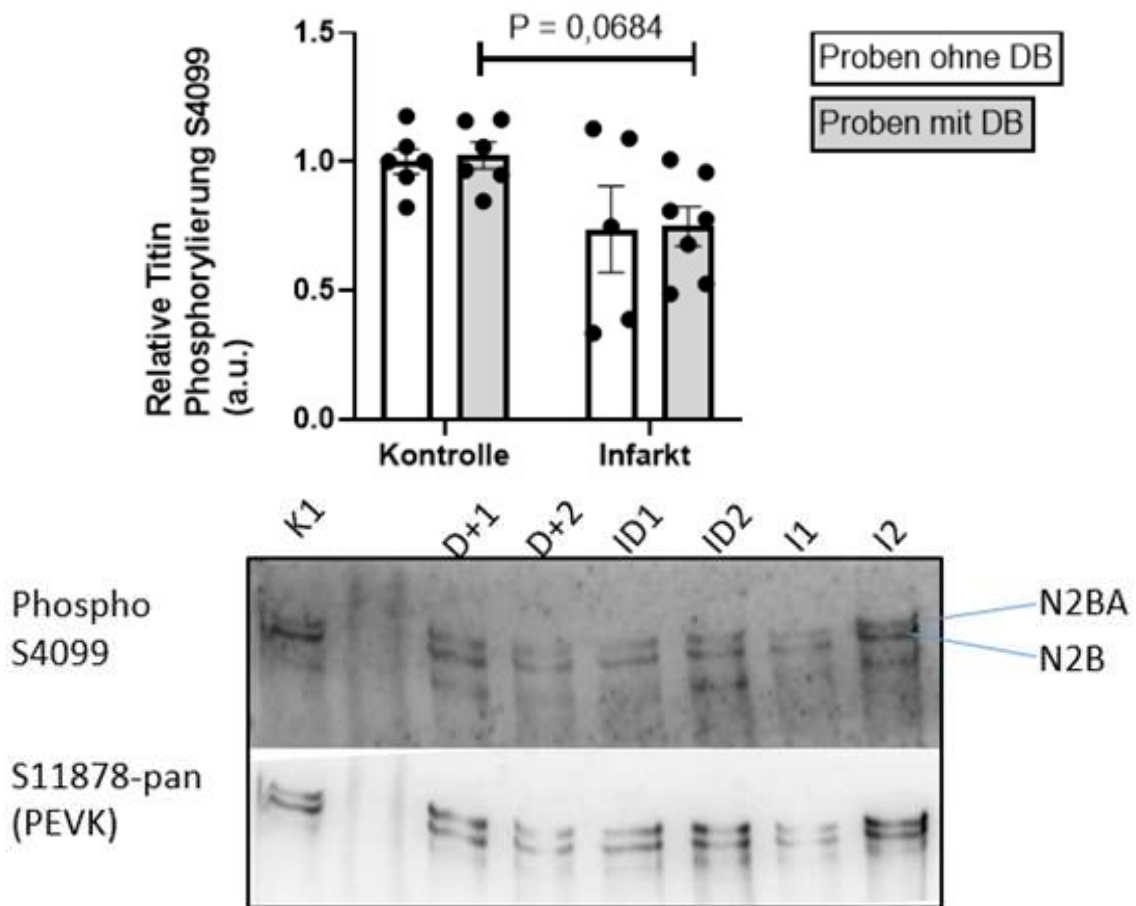


Abb. 9: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser4099 der N2B *unique sequence* im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle ohne DB) (n = 6), der Diabetes-Gruppe (Kontrolle mit DB) (n = 6), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (Infarkt mit DB) (n = 7) und der Infarktgruppe (Infarkt ohne DB) (n = 5). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *two-way* ANOVA). Ein statistisch nicht-signifikanter Trend ist mit $P = 0,0684$ gekennzeichnet. a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe).

3.1.5 Analyse der relativen Titin-Ubiquitinierung unter Einfluss eines Myokardinfarkts oder Diabetes mellitus

Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, durch die Proteine für die Proteindegradation markiert werden. Häufig findet die Ubiquitinierung unter zellulären Stressbedingungen statt, um den Abbau verschiedener Zellbestandteile zu koordinieren und die Zellhomöostase wieder herzustellen (Chen et al., 2019). Ubiquitinierung kontrolliert so beispielsweise mehrere Schritte in der Autophagie, einem wichtigen Lysosom-vermittelten, intrazellulären Abbauweg (Grumati and Dikic, 2018). Auch der Einfluss auf die Ubiquitinierung von Titin durch Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus

wurde mittels Western-Blot und spezifischer Antikörper untersucht. Vergleicht man die Ubiquitinierung der Kontrollgruppe mit der Diabetes-Gruppe, so waren weitläufige Trends zu erkennen. Die Kontrollgruppe wies eine Ubiquitinierung von $100,00 \pm 11,59\%$ auf, während die Ubiquitinierung in der Diabetes-Gruppe ohne Infarkt bei $71,82 \pm 6,64\%$ lag. Der über den *two-way* ANOVA ermittelte p-Wert von 0,0849 lag nahe des oberen Signifikanzniveaus ($p = < 0,05$) und bestätigt einen Trend zur tendenziell verminderten Ubiquitinierung des Titins in diabetischen Herzproben. Nicht signifikant war der Vergleich der Ubiquitinierung zwischen Kontrollgruppe und Infarktgruppe, da die relative Ubiquitinierung in der Infarkt-Gruppe ohne Diabetes bei $112,40 \pm 22,20\%$ lag. Auch der Vergleich beider Diabetes-Gruppen untereinander zeigte keinen signifikanten Unterschied. Patienten die sowohl an Diabetes mellitus, als auch an einem Herzinfarkt erkrankten (ID-Gruppe), hatten mit $64,39 \pm 7,61\%$ eine leicht verminderte relative Ubiquitinierung im Vergleich zu den Diabetikern. Einen signifikanten Unterschied in der relativen Ubiquitinierung zeigte der Vergleich beider Infarktgruppen mit einem *two-way* ANOVA ermittelten p-Wert von 0,0387, da die relative Ubiquitinierung der ID-Gruppe deutlich unter der relativen Ubiquitinierung der I-Gruppe lag (siehe Abb. 10).

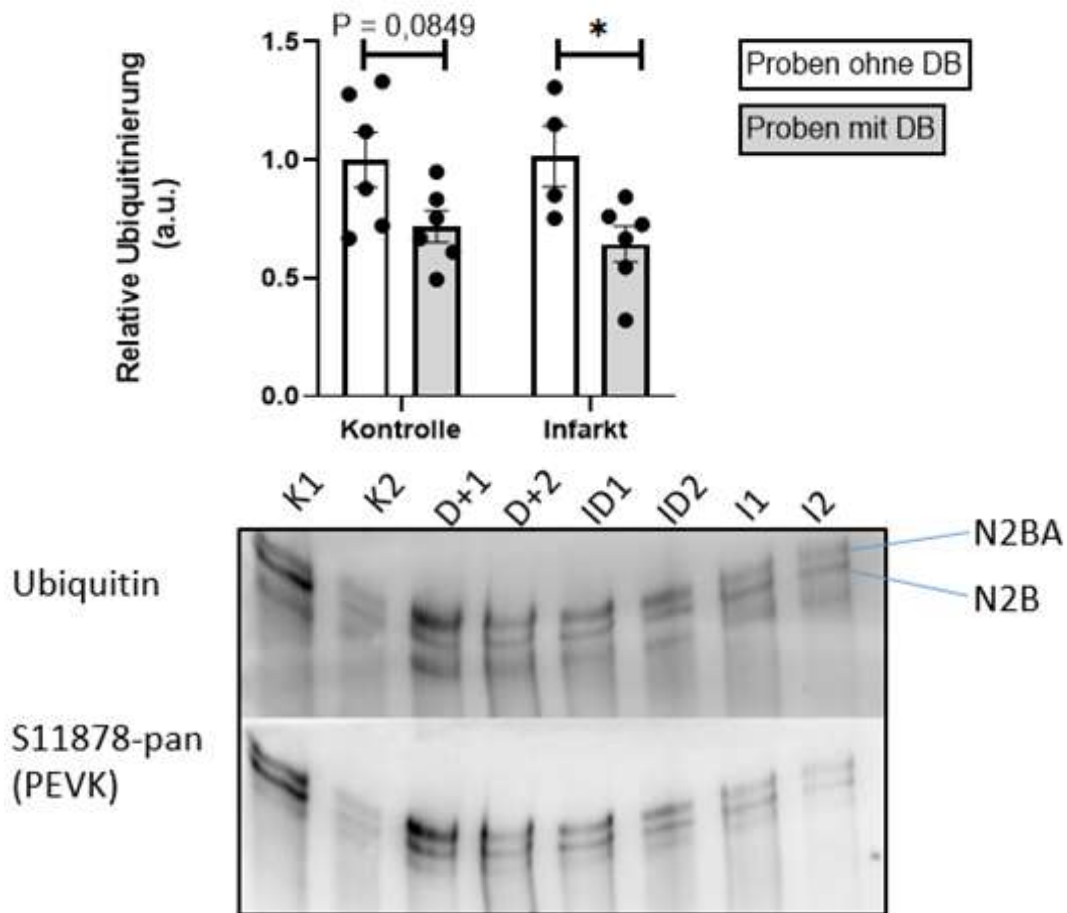


Abb. 10: Relative Titin Ubiquitinierung im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.

Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle ohne DB) (n = 6), der Diabetes-Gruppe (Kontrolle mit DB) (n = 6), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (Infarkt mit DB) (n = 7) und der Infarktgruppe (Infarkt ohne DB) (n = 5). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *two-way* ANOVA). Ein statistisch nicht-signifikanter Trend ist mit $P = 0,0849$ gekennzeichnet. a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe).

3.1.6 Einfluss von Diabetes mellitus und Myokardinfarkt auf die Aktivierung der Proteinkinase Ca

Die PKC α ist eine der wichtigsten Kinasen zur Regulation der passiven Titin-Steifigkeit. Eine erhöhte Aktivität der PKC α kann zu verstärkter Phosphorylierung der Titin PEVK-Region führen, was folglich zu einer erhöhten Steifigkeit des Moleküls führt (Kötter et al., 2013, Hidalgo et al., 2009). Eine erhöhte Phosphorylierung der PKC α am Threonin-497-Rest in der hochkonservierten Aktivierungsschleife der Kinasedomäne, erzeugt durch die Induktion weiterer Phosphorylierungen, ein katalytisch kompetentes und

aktives Enzym (Singh et al., 2017). Durch die relative Phosphorylierung der Kinase, untersucht mittels Western-Blot und phosphorspezifischer Antikörper, konnte daher auf die Aktivierung der PKC α rückgeschlossen werden. Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte die Untersuchung der Phosphorylierung der PKC α keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Der Phosphorylierungsstatus der Kontrollgruppe lag bei $99,86 \pm 1,50\%$, während dass der Diabetiker mit $97,97 \pm 3,64\%$ knapp darunter lag. Die Infarkt-Gruppe zeigte mit $114,60 \pm 9,08\%$ leicht erhöhte relative Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die PKC α -Phosphorylierung der Infarkt-Diabetes-Gruppe war mit $110,50 \pm 4,52\%$, im Vergleich zur Diabetes-Gruppe leicht erhöht.

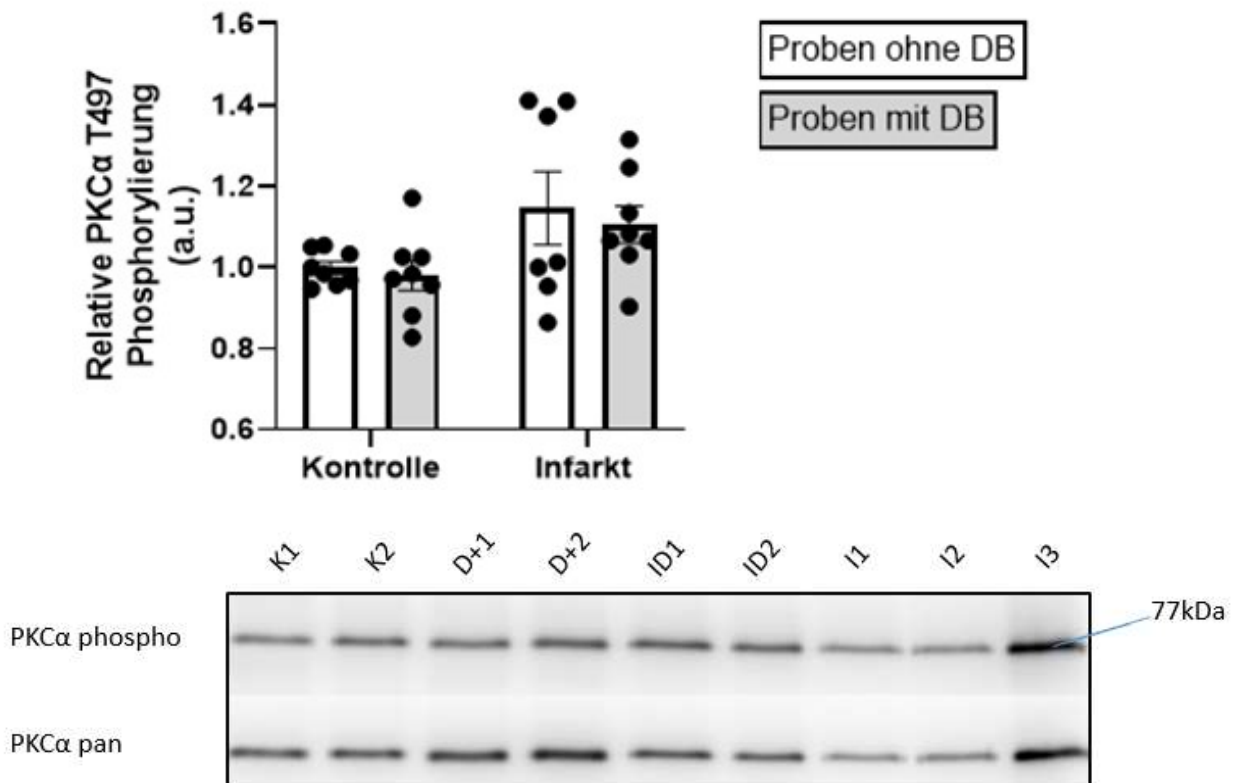


Abb. 11: Analyse der Kinaseaktivität im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.

Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle ohne DB) (n = 8), der Diabetes-Gruppe (Kontrolle mit DB) (n = 8), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (Infarkt mit DB) (n = 8) und der Infarktgruppe (Infarkt ohne DB) (n = 7). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p = < 0,05$ in *two-way* ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe).

3.1.7 Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung unter Einfluss von Diabetes mellitus oder Myokardinfarkt

Das Troponin I (TnI) ist die inhibitorische Untereinheit des Troponinkomplexes, welcher an der Regulation und Erzeugung der Muskelkontraktion beteiligt ist. TnI steht in Verbindung mit den Aktinfilamenten und blockiert die Tropomyosin-Bindungsstellen, solange keine Muskelkontraktion induziert ist. Durch Bindung von Ca^{2+} an die TnC-Untereinheit, verliert TnI die Affinität zu Aktin und der Kraftschlag wird eingeleitet (Powers et al., 2021, da Silva and Reinach, 1991). Die Modulation von Troponin I durch Phosphorylierung beeinflusst die längenabhängige Aktivierung des Muskels. Die durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) vermittelte Phosphorylierung der Serinreste Ser23/Ser24 in der kardialen TnI Isoform ist zudem mit einer Zunahme der Querbrückenkinetik verbunden, was eine verbesserte Kraft-Frequenz-Modulation zur Folge hat, da die Ca^{2+} -Sensitivität gemindert wird und eine schnellere Relaxation erfolgen kann. (Solaro et al., 2013, Kooij et al., 2010). Die relative Phosphorylierung von Troponin I wurde mittels Western-Blot und phosphorspezifischer Antikörper untersucht, um den Einfluss eines Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts, auf die Herzmuskelkontraktion besser verstehen zu können. Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Diabetes-Gruppe zeigte hinsichtlich der Phosphorylierung von TnI, keinen signifikanten Unterschied. Die Kontrollgruppe wies eine TnI-Phosphorylierung von $99,61 \pm 3,64\%$ auf, während in der Diabetes-Gruppe eine verminderte relative Phosphorylierung von $84,19 \pm 5,22\%$ zu erkennen war. Auch der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Infarktgruppe zeigte keine statistische Signifikanz, da der Phosphorylierungsstatus der Infarktgruppe mit $112,10 \pm 15,06\%$ nur leicht über dem der Kontrollgruppe lag. Statistisch signifikant dagegen war der Vergleich zwischen der Infarktgruppe und der Infarkt-Diabetes-Gruppe, da die relative Phosphorylierung der Infarkt-Diabetes-Gruppe mit $82,43 \pm 6,28\%$ deutlich unter dem der Infarktgruppe lag. Der Vergleich zwischen Diabetes-Gruppe und Diabetes-Infarkt-Gruppe hingegen gab keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied. Die relative Phosphorylierung der ID-Gruppe lag nur leicht unter dem der D-Gruppe (siehe Abbildung 12).

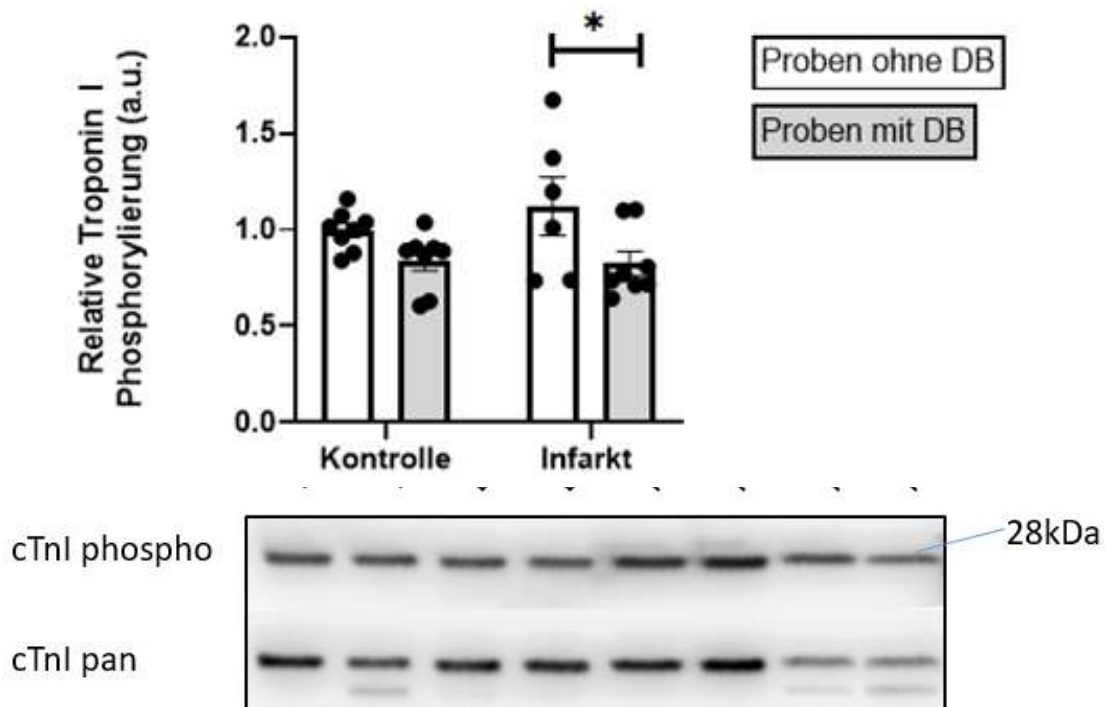


Abb. 12: Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle ohne DB) (n = 8), der Diabetes-Gruppe (Kontrolle mit DB) (n = 8), der Infarkt-Diabetes-Gruppe (Infarkt mit DB) (n = 8) und der Infarktgruppe (Infarkt ohne DB) (n = 6). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p = < 0,05$ in two-way ANOVA). a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; D+ = Diabetes-Gruppe; ID = Infarkt-Diabetes-Gruppe; I = Infarktgruppe).

3.2 Komorbiditäten des Myokardinfarkts und deren Einfluss auf die Kardiomyozyten-Steifigkeit

Sowohl die arterielle Hypertonie als auch die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sind häufige Komorbiditäten kardiovaskulärer Erkrankungen und können als solche einen starken Einfluss auf den klinischen Verlauf eines Myokardinfarkts nehmen. Auch in einigen der hier untersuchten Patientenproben lagen arterielle Hypertonie oder COPD als Komorbidität vor. Um die Auswirkungen dieser beiden Komorbiditäten auf die Steifigkeit des Titins und somit auf die Elastizität des Herzmuskels einhergehender betrachten zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei entsprechende Subgruppen der Patientenproben mit Myokardinfarkt und arterieller Hypertonie oder COPD isoliert untersucht. Zur Untersuchung dieser Subgruppen wurden die COPD-Proben, sowie die Hypertonie-Proben aus der vorherigen Kohorte ausgeschlossen und separat analysiert. Mittels Western-Blot und phosphospezifischen Antikörpern wurden die Proben analysiert

und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Ebenso wie bei den Infarkt- und Diabetes-Gruppen, wurde nicht nur die Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Titins, sondern auch die Phosphorylierung der PKC α , sowie von TnI untersucht. Aufgrund der limitierten COPD-Probenanzahl als auch Probengröße konnten die COPD-Proben nur hinsichtlich der Phosphorylierung der PKC α , sowie von TnI untersucht werden.

3.2.1 Vergleich der Titin-Isoformen Expression unter Einfluss der arteriellen Hypertonie

Da das Expressionsverhältnis der beiden kardialen Titin-Isoformen N2BA und N2B einen wesentlichen Einfluss auf die Steifigkeit der Kardiomyozyten hat, wurde neben den oben beschriebenen Erkrankungen, auch die Komorbidität „arterielle Hypertonie“ und deren Einfluss auf das Expressionsverhältnis untersucht. Hierzu wurden Proben mit manifesten Hypertonus und ohne Diabetes mellitus sowie Myokardinfarkt ausgewählt und mit einer Kontrollgruppe ohne manifesten Hypertonus verglichen. Wie Abbildung 13 zeigt, konnte das Vorliegen einer Hypertonie nicht mit einer veränderten Zusammensetzung der kardialen Titin-Isoformen in Verbindung gebracht werden. Die N2BA-Expression der Kontrollgruppe lag bei $61,40 \pm 3,06\%$ des Gesamttitins, die N2B-Expression bei $38,60 \pm 3,06\%$. Dem gegenüber stand in der Hypertonie-Gruppe eine N2BA-Expression von $61,89 \pm 2,32\%$ mit gleichzeitiger N2B-Expression von $38,11 \pm 2,32\%$ des Gesamttitins vor.

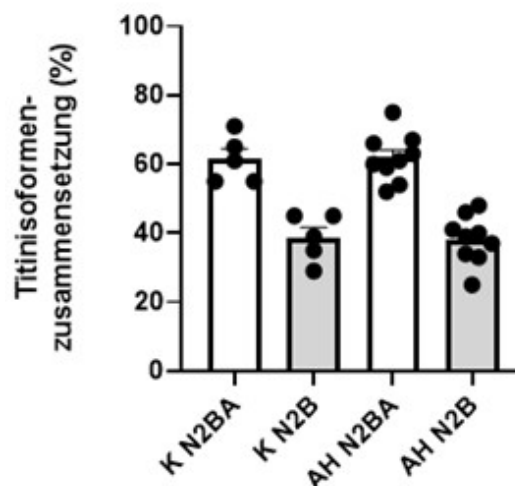


Abb. 13: Titin-Isoformen Expressionsverhältnis im rechten humanen Einfluss unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.

Die kardiale Zusammensetzung der Titin-Isoformen ergibt sich aus der Summe von $N2BA+N2B=100\%$. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) ($n = 5$) und der Hypertonie-Gruppe (AH) ($n = 9$). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in ordinary one-way ANOVA).

3.2.2 Analyse der relativen Titin-Degradation unter Einfluss der arteriellen Hypertonie ohne Myokardinfarkt und Diabetes

Der Vergleich zwischen Expression und Degradation von T1 (T1 = *full length titin*) kann durch das relative T2:T1-Verhältnis beschrieben werden und ist in Abbildung 14 dargestellt. Dabei stellt T2 eine spezifische Degradationsbande des Titins dar (Vikhlyantsev et al., 2013). Die Analysen zeigen, dass Hypertonie alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Degradation des Titins hat. Das relative T2:T1-Verhältnis der Kontrollgruppe lag bei $22,60 \pm 4,18\%$, das T2:T1-Verhältnis der Hypertonie-Gruppe dagegen lag bei $20,11 \pm 2,23\%$.

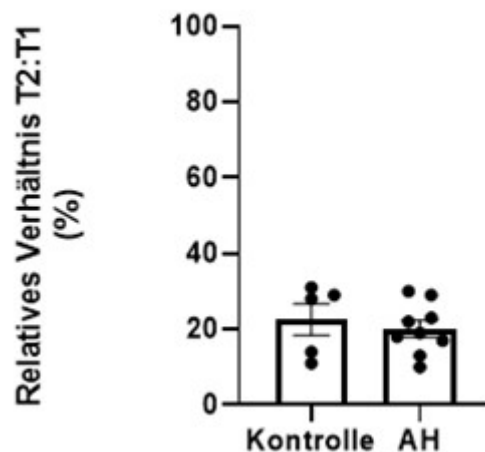


Abb. 14: Titin-Isoformen Degradationsverhältnis T2:T1 im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.

Das relative Verhältnis von T2:T1 beschreibt die Degradation der Titin-Isoformen N2BA und N2B. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) (n = 5) und der Hypertonie-Gruppe (AH) (n = 9). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM (n = 7). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *ordinary one-way ANOVA*).

3.2.3 Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die PKC α -abhängige Phosphorylierung der Titin PEVK-Region und der N2B *unique sequence*

Um den Einfluss eines vorliegenden Hypertonus auf die Phosphorylierung der Titin PEVK-Region und der N2Bus zu untersuchen, wurden die beiden Gruppen hinsichtlich der relativen Phosphorylierung der Serinreste Ser11878 und Ser4099 untersucht (dargestellt in Abbildung 15). Der Vergleich der Phosphorylierung von Ser11878 in der Kontrollgruppe und der Hypertonie-Gruppe zeigte einen statistisch signifikanten

Unterschied ($P = 0,0084$). Der Phosphorylierungsstatus der Hypertonie-Gruppe lag mit $145,90 \pm 8,43\%$ deutlich über dem Phosphorylierungsstatus der Kontrollgruppe ($P = 0,0084$ im *unpaired Student's t-test*) und somit deutlich unterhalb des angegebenen Signifikanzniveaus ($P = <0,05$). Kein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen konnte für die Phosphorylierung der N2Bus festgestellt werden. Die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser4099 war in der Hypertonie-Gruppe lediglich auf $115,40 \pm 10,07\%$ der Vergleichsgruppe angestiegen.

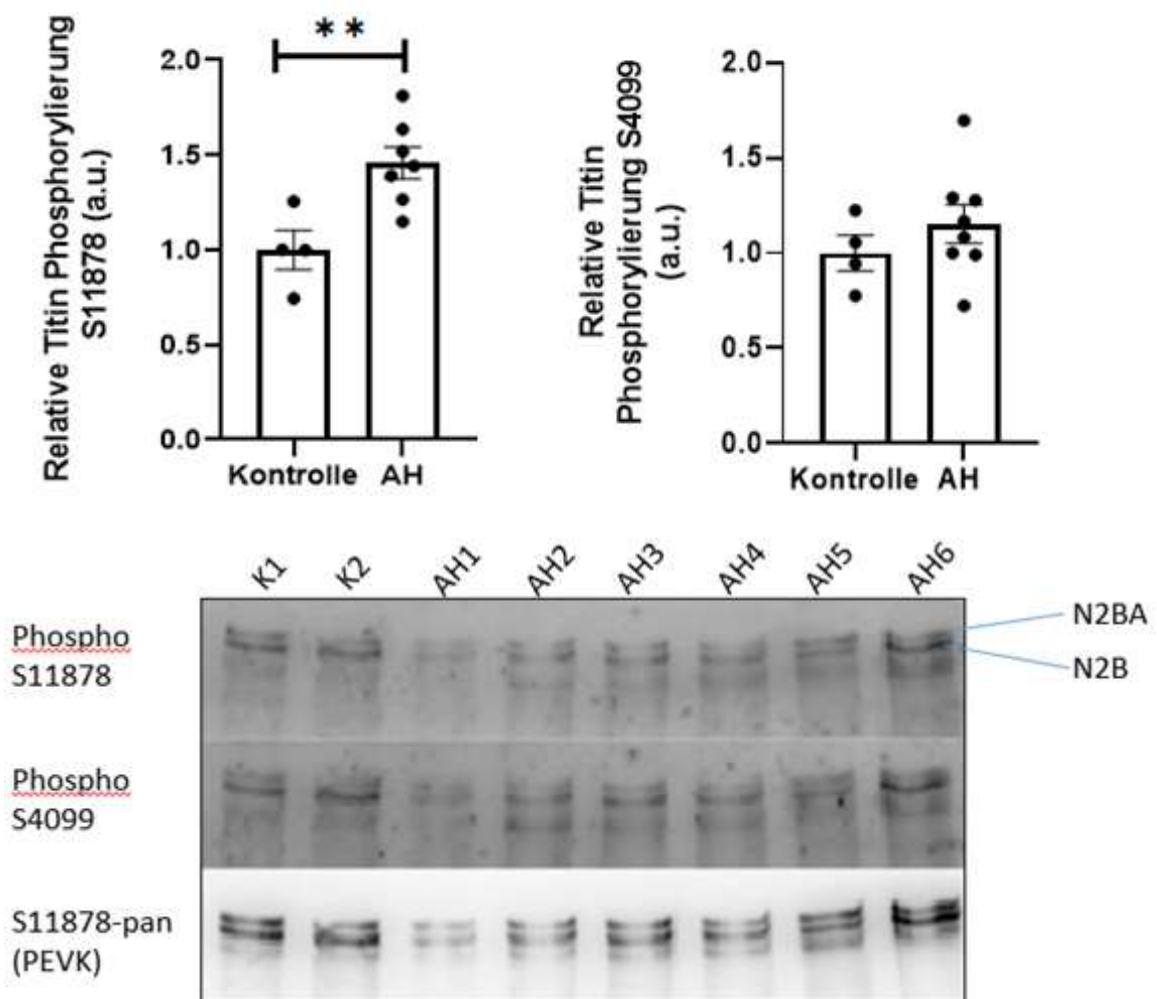


Abb. 15: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser11878 der PEVK-Domäne und am Serinrest Ser4099 der N2B *unique sequence* im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.

Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) ($n = 4$) und der Hypertonie-Gruppe (AH) ($n = 7-8$). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p = < 0,05$ in *unpaired t Test*). a.u. = arbitrary units. Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; AH = Hypertonie-Gruppe).

3.2.4 Analyse der relativen Titin-Ubiquitinierung unter Einfluss der arteriellen Hypertonie

Über den Einsatz des Western-Blot-Systems sowie über spezifische Antikörper konnte die relative Ubiquitinierung der zu untersuchenden Herzproben analysiert werden. Wie Abbildung 16 zeigt, war ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Hypertonie-Gruppe nicht nachzuweisen. Die relative Ubiquitinierung des Riesenproteins in der Hypertonie-Gruppe lag mit $95,89 \pm 10,59\%$ unterhalb der Ubiquitinierungsrate der Kontrollgruppe.

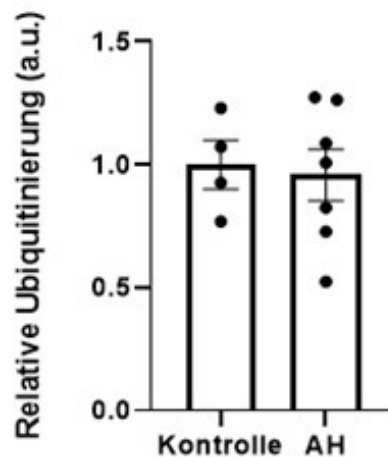


Abb. 16: Relative Titin Ubiquitinierung im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.

Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) ($n = 4$) und der Hypertonie-Gruppe (AH) ($n = 7$). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ unpaired t Test). a.u. = arbitrary units.

3.2.5 Einfluss von COPD und arterieller Hypertonie auf die Aktivität der Proteinkinase $C\alpha$

Da auch die chronisch obstruktive Lungenerkrankung eine häufige Komorbidität der kardiovaskulären Erkrankungen darstellt, wurde neben dem Einfluss der arteriellen Hypertonie auch der Einfluss der COPD auf die PKC α untersucht. Um den Einfluss von COPD und der arteriellen Hypertonie auf die Aktivität der PKC α untersuchen zu können, wurde mittels Western-Blot, unter Verwendung von phosphorspezifischen Antikörpern, die Phosphorylierung der PKC α an Thr497 untersucht (siehe Abb. 17). Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und COPD-Gruppe wies, ebenso wie der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Hypertonie-Gruppe, keinen signifikanten Unterschied auf. Die relative Phosphorylierung der PKC α in der Kontrollgruppe betrug $100,00 \pm 7,51\%$. In der COPD-Gruppe war eine leichte Erhöhung der Phosphorylierungsrate auf $105,40 \pm 8,50\%$

zu erkennen. Auch die Hypertonie-Gruppe wies mit einem Wert von $111,00 \pm 2,92\%$ eine leichte Erhöhung der PKC α -Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

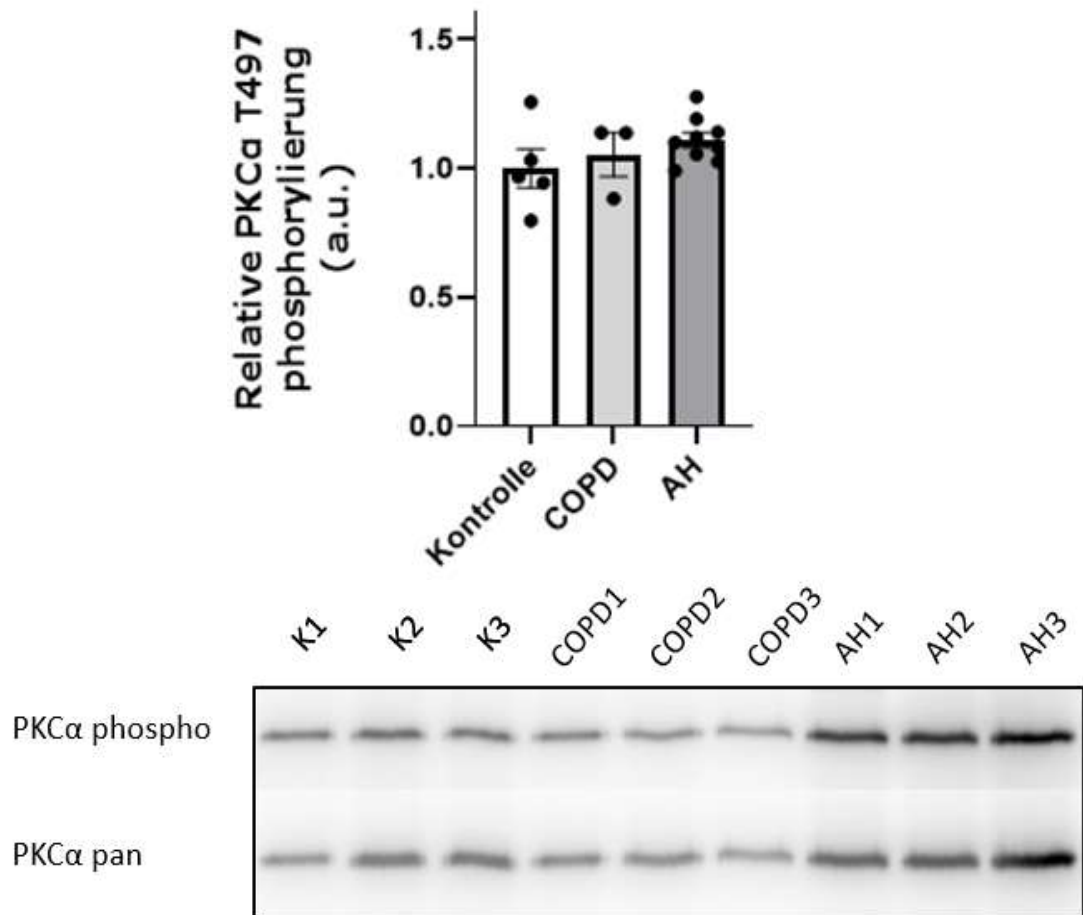


Abb. 17: Analyse der Kinaseaktivität im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss der Komorbiditäten COPD oder arteriellen Hypertonie.

Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) (n = 5), der COPD-Gruppe (COPD) (n = 3) und der Hypertonie-Gruppe (AH) (n = 9). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *ordinary one-way* ANOVA). Unterhalb des Balkendiagramms befindet sich ein repräsentativer Blot (K = Kontrollgruppe; AH = Hypertonie-Gruppe; COPD = COPD-Gruppe).

3.2.6 Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung unter dem Einfluss einer COPD oder einer arteriellen Hypertonie

Auch der Vergleich der relativen Phosphorylierung von TnI, unter dem Einfluss einer COPD und einer arteriellen Hypertonie, wurde mittels Western-Blot und phosphorspezifischer Antikörper durchgeführt und ist in Abb. 18 dargestellt. Der Vergleich der relativen Phosphorylierung zwischen der Kontrollgruppe und der COPD-Gruppe zeigte einen signifikanten Unterschied ($P = 0,0210$) zugunsten einer stärkeren Phosphorylierung in der COPD-Gruppe. Die Phosphorylierungsrate der COPD-Gruppe stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe auf $138,90 \pm 3,81\%$ an. Der über den *ordinary one-way* ANOVA ermittelte P-Wert von 0,0210 lag demnach weit unter dem

Signifikanzniveau von $P = 0,05$. Anders als die COPD-Gruppe, zeigte die Hypertonie-Gruppe mit einer Phosphorylierungsrate von $86,39 \pm 7,71\%$ zwar eine leicht verminderte relative Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine statistische Signifikanz dagegen konnte nicht beschrieben werden.

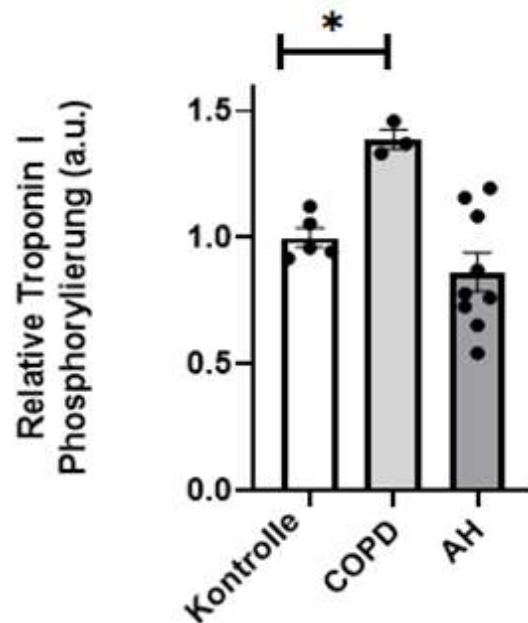


Abb. 18: Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss der Komorbiditäten COPD oder arterielle Hypertonie. Untersucht wurden Herzbiopsien der Kontrollgruppe (Kontrolle) ($n = 5$), der COPD-Gruppe (COPD) ($n = 3$) und der Hypertonie-Gruppe (AH) ($n = 9$). Das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ in *one-way* ANOVA). a.u. = arbitrary units.

4 Diskussion

4.1 Der Myokardinfarkt und seine Komorbiditäten modifizieren die Titin-basierte Steifigkeit im Großtiermodell Mensch

Der Myokardinfarkt ist die zweithäufigste Todesursache Deutschlands und stellt eine der behandlungsbedürftigsten kardiovaskulären Erkrankungen zur Reduktion der hohen Mortalität dar. Um neue therapeutische Angriffspunkte identifizieren zu können, ist es wichtig die pathophysiologischen Vorgänge des Myokardinfarkts und seiner Komorbiditäten zu kennen und zu verstehen. Nach einem Myokardinfarkt ist die Kontraktilität der Herzmuskulatur häufig vermindert. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Riesenprotein Titin, das die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten reguliert.

Veränderungen in der Titin-Struktur oder -Isoformzusammensetzung können die elastischen Eigenschaften des Herzmuskels beeinflussen und damit zur gestörten mechanischen Funktion und Kontraktilität beitragen. Die ischämischen Auswirkungen auf die Titin-basierte Steifigkeit sind bisher überwiegend in Tiermodellen untersucht worden, daher war das Ziel dieser Arbeit, die nachgewiesenen Erkenntnisse der Tiermodelle am menschlichen Modell zu überprüfen und somit den Einfluss des Myokardinfarkts auf das menschliche Herz besser zu verstehen.

4.2 Die Titinisoformen-Zusammensetzung wird durch einen akuten Myokardinfarkt sowie seine Komorbiditäten nicht beeinflusst

4.2.1 Das Titinisoformen-Verhältnis im Menschenmodell

Die muskelspezifischen Isoformen des Titins unterscheiden sich vor allem in der Länge des elastischen I-Bands. Im kardialen Gewebe liegen sowohl die elastischere N2BA-Isoform als auch die steifere N2B-Isoform vor, dessen Expressionsverhältnis die passive Steifigkeit des Herzmuskels bestimmt. Physiologische sowie pathologische Ereignisse können das Expressionsverhältnis beeinflussen, welches abhängig von der Art des Säugetiers ist. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen die Daten vorangegangener Studien weitestgehend, da das Isoformen-Expressionsverhältnis in der Kontrollgruppe bei ungefähr 57,7%:42,3% (N2BA : N2B) lag. Frühere Studien zeigten je nach verwendeter Patientenkohorte ein humanes N2BA:N2B-Expressionsverhältnis von etwa 35:65% oder auch 40:60%. (Neagoe et al., 2002, Kötter et al., 2013) Im Kleintiermodell dagegen konnte eine N2B-Expressionsdominanz von ca. 90% nachgewiesen werden, was auf eine erhöhte Steifigkeit der Herzmuskulatur in kleinen Tieren hinweist (Kötter et al., 2014). Wichtig zu unterscheiden ist, dass in den Arbeiten von Neagoe et al. und Kötter et al. Proben des linken Ventrikels verwendet wurden, wohingegen in der vorliegenden Arbeit Proben des Atriums verwendet wurden, wodurch eine leichte Abweichung der Expressionsverhältnisse zustande kommen kann. Ein weiterer Unterschied rührt vermutlich daher, dass in der vorliegenden Arbeit humane Herzbiopsien untersucht wurden, welche im Rahmen einer Bypassoperation entnommen wurden, wohingegen die vorangegangenen Studien vor allem Spenderherzen aus fehlgeschlagenen Herztransplantationen verwendeten. Eine indizierte Bypassoperation,

welche für die Proben dieser Arbeit vorausgesetzt war, spricht bereits für eine kardiovaskuläre Vorerkrankung des Patienten, wodurch das Expressionsverhältnis beeinflusst werden kann. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits in den Proben der Kontrollgruppe das Expressionsverhältnis durch unterschiedliche Komorbiditäten beeinflusst wurde.

4.2.2 Der akute Myokardinfarkt und der Diabetes mellitus haben keinen Einfluss auf das Titinisoformen-Expressionsverhältnis und die Titindegradation

Da das Expressionsverhältnis der kardialen Titin-Isoformen die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des akuten Myokardinfarkts und des Diabetes mellitus auf die Titin-Isoformen-Zusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass sowohl der Myokardinfarkt, als auch der Diabetes mellitus, sowie beide Erkrankungen gemeinsam, keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Isoformen-Expressionsverhältnisse haben. Verglichen wurden die Proben mit denen der Kontrollgruppe, welche bei Indikation zur Bypassoperation jedoch durch andere Komorbiditäten beeinflusst sein konnten. Frühere Ergebnisse einer Mausmodell-Studie lieferten erste Hinweise darauf, dass eine myokardiale Ischämie keinen Einfluss auf ein verändertes Titin-Isoformen-Expressionsverhältnis hat (Kötter et al., 2016). Das Titinisoformen-Expressionsverhältnis humaner Herzen unter dem Einfluss von Diabetes mellitus wurde in vorangegangenen Studien bereits an anderen Patientenkohorten untersucht. Hopf et al. etwa zeigten einen Anstieg der langen und weniger steifen N2BA-Titin Isoform. Da von Hopf et al. in funktionellen Analysen der untersuchten Gewebeprobe n allerdings eine erhöhte Titin-abhängige myokardiale Steifigkeit in Proben von Diabetikern zeigten ist davon auszugehen, dass nicht eine veränderte Isoformen-Expression, sondern posttranslationale Modifikationen eine maßgebliche Rolle bei der Diabetes-abhängigen Titin-Steifigkeit spielen (Hopf et al., 2018).

Eine Veränderung des Titin-Isoformen-Verhältnisses wurde auch in chronisch-ischämisch belasteten Herzen beobachtet (Neagoe et al., 2002). Die Verschiebung des Isoformen-Verhältnisses zugunsten von N2BA-Titin, führte zu einer verringerten Titin-abgeleiteten Steifheit isolierter Kardiomyozyten. Man geht davon aus, dass die Titin-Modifikationen im chronisch ischämischen Myokard die Fähigkeit des Herzens so

beeinflussen, dass der Frank-Starling-Mechanismus vermehrt genutzt wird, um so die erhöhten mechanischen Anforderungen zu kompensieren (Neagoe et al., 2002).

Auch der Abbau beziehungsweise die Degradation von Titin kann die Elastizität des Herzmuskels beeinflussen, da durch die Schädigung des I-Band Titins die genaue Positionierung der dicken Filamente in der Mitte des Sarkomers und somit die Krafterzeugung durch Actomyosin beeinträchtigt wird. (Beckendorf and Linke, 2015). Durch die benachbarte Lokalisation der Metalloproteinase 2 (MMP2) und der Z-Scheiben Region des Titins kann es, nach akutem I/R-Ereignis zu einer MMP2-vermittelten Titindegradation kommen (Ali et al., 2010).

Daher erschien eine Analyse der Titindegradation, neben der Untersuchung des Isoformen-Expressionsverhältnisses, sinnvoll. Neben den beiden kardialen Isoformen N2BA und N2B, die als T1 zusammengefasst werden, kann der Abbau des Riesenproteins in der SDS-PAGE durch die charakteristische Degradationsbande T2 dargestellt werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten keine erhöhte Titindegradation durch den Einfluss eines Infarkts auf. Ähnliche Untersuchungsergebnisse traten bereits in einer Studie von Celerina Jahns auf, in der Myokardproben nach I/R aus dem Großtiermodell Schwein analysiert wurden und kein erhöhtes Auftreten der Titindegradation beobachtet werden konnte (Jahns, 2021). Im Mausmodell dagegen konnte gezeigt werden, dass ein akuter, Infarkt-bedingter Anstieg der Titin-Steifigkeit nach 3-10 Tagen eine verstärkte Degradation des Muskelproteins zur Folge hat (Kötter et al., 2016). Letztlich wiesen auch die Proben der Patienten mit Diabetes mellitus, ähnlich den Infarkt-Proben, keine Hinweise auf eine erhöhte Titindegradation im Vergleich zur Kontrollgruppe – weder basal noch nach I/R – auf.

4.2.3 Die arterielle Hypertonie hat keinen Einfluss auf das Titinisoformen-Expressionsverhältnis und die Titindegradation

Die arterielle Hypertonie stellt eine der wichtigsten, zu behandelnden, kardiovaskulären Risikofaktoren weltweit dar und ist zu ca. 47% ein direkter Grund einer ischämischen Herzkrankheit (Jordan et al., 2018, Lawes et al., 2008). Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Menschenmodell zeigte keine Verschiebung in der Isoformen-Expression aufgrund einer arteriellen Hypertonie und steht damit nicht in Übereinstimmung mit dem Rattenmodell von Warren. In der Studie von Warren wurde myokardiales Gewebe von Ratten auf die Isoformen-Zusammensetzung unter Einfluss einer Hypertonie analysiert.

Ergebnisse dieser Studie zeigten eine verminderte Expression der N2BA-Isoform und resultierend daraus erhöhte Expression der N2B-Isoform, was zu einer erhöhten passiven Steifigkeit des Titins und folglich zu einer Beeinflussung der Herzleistung führt. (Warren, 2003). Die Übertragbarkeit vom Tiermodell auf das Menschenmodell war gemäß den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich. Wichtig zu betrachten ist, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Mensch- und Rattenmodell vermutlich nicht nur auf die Speziesunterschiede zurückzuführen sind. In der Studie von Warren wurden spontan hypertensive Ratten (SHR) untersucht, deren Alter zwischen 20-27 Wochen lag. Während die Entwicklung des Bluthochdrucks in diesen Ratten in der sechsten Lebenswoche beginnt und die Ratten der Hypertonie somit nur einige Wochen ausgesetzt waren, entwickelt sich der Bluthochdruck bei Menschen über Jahre und beeinflusst das kardiovaskuläre System langfristig. Des Weiteren wurden die Patienten, anders als die Ratten, medikamentös behandelt, wodurch die Hypertonie langfristig reguliert wird und somit die erwartete Reaktion auf das Herz vorerst ausbleibt. Da die Komorbidität arterielle Hypertonie, ebenso wie die Erkrankung an einem Diabetes mellitus oder an einem Myokardinfarkt keinen Einfluss auf das Titin-Isoformen-Expressionsverhältnis zu haben scheint, kann die arterielle Hypertonie als zusätzliche Fehlerquelle bei der Erhebung der Ergebnisse, bezüglich des Einflusses eines Myokardinfarkts oder eines Diabetes mellitus auf das Expressionsverhältnis, ausgeschlossen werden. Zusätzlich zum Isoformen-Expressionsverhältnis wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Titindegradation untersucht. Ähnlich wie der Einfluss durch Myokardinfarkt oder Diabetes mellitus, zeigte auch die arterielle Hypertonie in dieser Arbeit keine signifikante Veränderung in der Degradation des Titins, was die Aussagekraft der veränderten Titindegradation unter Einfluss eines Infarkts oder Diabetes mellitus verstärkt.

4.3 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus induzieren posttranslationale Modifikationen des Riesenproteins Titin

Die posttranslationale Modifikation stellt einen schnellen und kurzfristigen Regulationsmechanismus zur Koordinierung der passiven Steifigkeit des Titins dar (Koser et al., 2019). Das Riesenprotein dient als wichtiges Strukturprotein im *remodeling*-

Prozess nach Myokardinfarkt, sowie nach Ischämie/Reperfusion, wodurch die Elastizität der Kardiomyozyten beeinflusst werden kann (Kötter et al., 2016). Auch bei Diabetikern wird die Steifigkeit des Titins moduliert und stellt einen wichtigen Kompensationsmechanismus dar, wie in der Arbeit von Hopf et al. gezeigt werden konnte (Hopf et al., 2018). Eine wichtige posttranslationale Modifikation, die der Regulierung der passiven Steifigkeit dient, ist die posttranslationale Phosphorylierung in der PEVK-Region bzw. in der N2Bus. Die Phosphorylierung verschiedener Serinreste in der PEVK-Region korreliert mit einem Anstieg der passiven Steifigkeit, während die Phosphorylierung verschiedener Serinreste in der N2Bus zu einer verminderten Steifigkeit der Kardiomyozyten führt (Kötter et al., 2013, Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus vor allem in der Untersuchung der relativen Phosphorylierung des Serinrests Ser11878, lokalisiert in der PEVK-Region und des Serinrests Ser4099, lokalisiert in der N2Bus.

4.3.1 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus modifizieren die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 der PEVK-Region nicht

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 in der Kontrollgruppe verglichen mit den Gewebeproben nach Myokardinfarkt oder mit der Komorbidität Diabetes mellitus, dennoch konnten leichte, nicht signifikant erhöhte Phosphorylierungen der Versuchsgruppen dargestellt werden. Zusätzlich konnte eine nicht signifikant erhöhte relative Phosphorylierung der Infarkt-Diabetes-Proben, verglichen mit den Infarkt-Proben, an den Serinresten Ser11878 nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe, die am Mausmodell 3d nach Ischämie/Reperfusion eine erhöhte PKC α -abhängige Phosphorylierung der Serinreste Ser11878 und Ser12022 in der PEVK-Region gezeigt hatten (Kötter et al., 2016). In einer weiteren Studie wurden zudem humane Herzproben von Diabetikern auf die relative Phosphorylierung der N2Bus und der PEVK-Region untersucht. Auch diese Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung in der Phosphorylierung des Serinrests Ser11878, was für eine erhöhte Steifigkeit des Riesenproteins spricht (Hopf et al., 2018). Ein Grund für die Abweichung der hier gezeigten Ergebnisse von den bisher publizierten Daten aus Maus- und Humanproben

könnte die limitierte Anzahl der untersuchten Infarkt-Proben sein, die für diese Arbeit zur Verfügung standen. Die Analyse der Infarkt-Proben ($n = 5$) zeigte eine recht starke Streuung der bestimmten relativen Phosphorylierungen, was etwaige signifikante Unterschiede ggfs. maskieren könnte. Eine erhöhte Proben-Anzahl der zu untersuchenden Patienten-Gruppen könnte somit zu einer Reproduktion vorheriger Studienergebnisse führen und diese gegebenenfalls bestätigen.

4.3.2 Die arterielle Hypertonie erhöht die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 der PEVK-Region

Die arterielle Hypertonie stellt eine wichtige Komorbidität des Diabetes mellitus und des Myokardinfarkts dar. Angiotensin II gilt als prohypertensiver Faktor und kann zu einer Aktivierung der Komplementkaskade führen, wodurch das angeborene Immunsystem induziert wird (Wenzel et al., 2017). In der Arbeit von Kovacs et al. wurde beschrieben, dass Angiotensin II ein Aktivator der PKC α ist, die neben anderen myofibrillären Proteinen auch das Titin phosphoryliert (Kovacs et al., 2016). Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten eine signifikant erhöhte Phosphorylierung am Serinrest11878 im Bereich der PEVK-Region, was in einer erhöhten Steifigkeit der Herzmuskelzellen resultiert. Damit stimmen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit den Daten aus einer vorangegangenen Studie, welche die Phosphorylierung der Serinreste Ser12742 und Ser12884 der PEVK-Region im Rattenmodell untersuchte, überein. Während die Ergebnisse in der Arbeit von Kovacs et al. keinen Unterschied in der Phosphorylierung des Serinrests Ser12884 beschreiben konnten, wurde ein erhöhter Phosphorylierungsstatus des Serinrests Ser12742 nachgewiesen, welcher ebenfalls für eine erhöhte passive Steifigkeit des Titins spricht (Kovacs et al., 2016). Weiterhin konnte die PEVK-Ser12742 Hyperphosphorylierung in Mäusen mit transversaler Aortenverengung, sowie in humanen Proben mit Herzversagen nachgewiesen werden (Kovacs et al., 2016). Da es aufgrund einer arteriellen Hypertonie zu einer erhöhten Nachlast und folgend zu einer hypertrophen Wandverdickung im Rahmen einer kompensierten Wandspannung kommen kann, ist es tatsächlich sinnvoll, dass eine geringfügige Erhöhung der passiven Steifigkeit durch Titin-Modifikation das Myokard gegen Überdehnung schützen könnte (Roe et al., 2017).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten des humanen Modells bestätigen insgesamt die Ergebnisse des Rattenmodells bezüglich eines erhöhten Phosphorylierungsstatus der

PEVK-Region und damit die Möglichkeit zur erhöhten passiven Steifigkeit durch den Einfluss einer arteriellen Hypertonie.

4.3.3 Einfluss auf die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 durch Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie im Vergleich

Da sowohl der Diabetes mellitus, als auch der Myokardinfarkt häufig mit einer arteriellen Hypertonie einhergehen und der Großteil der untersuchten Proben sowohl eine arterielle Hypertonie, als auch einen Diabetes mellitus beziehungsweise einen Myokardinfarkt aufwies, müssen die Ergebnisse genauer betrachtet werden. Während durch den Einfluss der arteriellen Hypertonie signifikante Unterschiede in der Phosphorylierung der PEVK-Region bezogen auf den Serinrest Ser11878, im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen waren, wies der Diabetes mellitus nur eine nicht-signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung auf. Auch die Untersuchung der Infarkt-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, wies keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Ergebnisse könnten dadurch zustande kommen, dass die arterielle Hypertonie im Vergleich zur Kontrollgruppe isoliert betrachtet wurde. Die Kontrollgruppe, die dagegen im Vergleich zur Infarkt- und Diabetes-Gruppe stand, wies lediglich weder Infarkt noch Diabetes auf. Eine arterielle Hypertonie war in dieser Kontrollgruppe durchaus vorhanden, was dafürsprechen könnte, dass die relative Phosphorylierung der Kontrollgruppe ohnehin schon erhöht waren. Vergleicht man die erhöhte relative Phosphorylierung mit der in der Infarkt- oder Diabetes-Gruppe, so kann man aufgrund vorheriger Studien erschließen, dass auch dort womöglich bereits erhöhte relative Phosphorylierungen vorhanden waren. Da sowohl die Kontrollgruppe, als auch die Infarkt- oder Diabetes-Gruppe ohnehin schon eine erhöhte relative Phosphorylierung aufwiesen, ist es möglich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Untersuchungsgruppen maskiert ist. Um genauere Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 erzielen zu können, sollten in weiterführenden Studien Kontrollproben verwendet werden, die weder eine arterielle Hypertonie, noch einen Infarkt beziehungsweise Diabetes aufweisen. Diese sollten mit Proben verglichen werden, die nur einen Infarkt, beziehungsweise Diabetes ohne zusätzliche Hypertonie aufweisen. Da Proben dieser Art kaum der klinischen Realität entsprechen, kann auch eine Kontrollgruppe verwendet werden, in der alle Proben eine isolierte arterielle

Hypertonie aufweisen. Diese sollte dann mit einer Infarkt- beziehungsweise Diabetes-Gruppe verglichen werden, in der alle Proben zusätzlich eine arterielle Hypertonie aufweisen. So kann der zusätzliche Einfluss eines Diabetes beziehungsweise eines Infarkts auf die Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 nachgewiesen werden.

4.3.4 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus, sowie eine arterielle Hypertonie modifizieren die relative Phosphorylierung des Serinrests Ser4099 der N2Bus nicht

Zur Charakterisierung der Titin-Steifigkeit unter Einfluss eines Myokardinfarkts oder eines Diabetes mellitus, sowie unter Einfluss einer arteriellen Hypertonie wurde zusätzlich zur Phosphorylierung der PEVK-Region auch die Phosphorylierung der N2Bus untersucht. Ein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung der untersuchten Patienten-Gruppen dieser Arbeit war zu keinem Zeitpunkt zu verzeichnen. Lediglich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung der Proben mit arterieller Hypertonie war zu verzeichnen. Auffällig war dennoch eine nicht signifikant verminderte relative Phosphorylierung der Infarktgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem zeigt auch ein nicht signifikanter Trend eine verminderte relative Phosphorylierung in der Infarkt-Diabetes-Gruppe verglichen mit der Diabetes-Gruppe. Die Ergebnisse beider Infarkt-Gruppen weisen demnach eine leicht verminderte relative Phosphorylierung am Serinrest Ser4099 auf, was nach derzeitigem Kenntnisstand in einer erhöhten Titin-Steifigkeit resultieren sollte. Somit liegt der Trend der Ergebnisse dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den erhobenen Daten von Kötter et al., 2016 und deutet an, dass es zu Veränderungen kommt, die zu einer erhöhten passiven Steifigkeit führen. Im Mausmodell 3d nach Myokardinfarkt wurde die relative Phosphorylierung der N2Bus an den Serinresten Ser4010 und Ser4099 untersucht. Ergebnisse der Studie zeigten eine verminderte relative Phosphorylierung am Serinrest Ser4010 drei und zehn Tage nach Ischämie und Reperfusion (Kötter et al., 2016). Die Phosphorylierung am Serinrest Ser4099 dagegen blieb unverändert. In einer vorherigen Studie von Kötter et al. wurde die relative Phosphorylierung der N2Bus in humanen Herzproben unter Einfluss eines Herzversagens untersucht (Kötter et al., 2013). Auch diese Ergebnisse stimmen mit dem oben genannten Trend dieser Arbeit überein, da sowohl die relative Phosphorylierung am Serinrest Ser4010, als auch am Serinrest Ser4099 signifikant reduziert waren. Zudem wurde die Phosphorylierung der N2Bus humaner Diabetes-Proben bereits in der Studie

von Hopf et al. untersucht. Hopf et al. zeigten, dass die Phosphorylierung des Serinrestes Ser4010 nicht signifikant verändert war, der Phosphorylierungsstatus des Serinrests Ser4099 dagegen war signifikant reduziert und somit vermutlich an der erhöhten Titin-basierten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten beteiligt (Hopf et al., 2018).

Die Arbeit von Kötter et al. weist daraufhin, dass eine verstärkte Phosphorylierung der N2Bus für eine erhöhte Elastizität der Kardiomyozyten spricht (Kötter et al., 2013). Die Datenlage zum Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Phosphorylierung der N2Bus und insbesondere auf den Serinrest Ser4099 ist stark limitiert und auch Tiermodelle liefern nur wenige Hinweise zum Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Titin N2Bus-Phosphorylierung. Um weitere Erkenntnisse zum Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Phosphorylierung der N2Bus zu gewinnen, ist es sinnvoll, die Datenlage des Kleintier- und des Großtiermodells zu aktualisieren und die Untersuchung an humanen Proben mit einer größeren Anzahl zu erweitern.

4.3.5 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus modifizieren die Ubiquitinierung des Titins

Unter zellulären Stressbedingungen werden Proteine durch Ubiquitinierung markiert und der Proteindegradation zugeführt. Degradation von Titin kann die Steifigkeit der Kardiomyozyten beeinflussen (Chen et al., 2019), daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die relative Ubiquitinierung des Riesenproteins Titin untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Infarkt-Proben eine nicht signifikante, aber gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöhte relative Ubiquitinierung aufwiesen. Auch der Einfluss des Diabetes mellitus wurde in dieser Arbeit untersucht und es konnten statistisch signifikante Unterschiede in der relativen Ubiquitinierung verschiedener Gruppen nachgewiesen werden. Die Diabetiker wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stark verminderte Ubiquitinierung des Titins auf und auch die Diabetiker, die zusätzlich an einem Myokardinfarkt erkrankten, hatten im Vergleich zur Infarkt-Gruppe ohne Diabetes eine stark verminderte relative Titin-Ubiquitinierung.

Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden anhand eines Mausmodells in der Arbeit von Kötter et al. erhoben, in der die Herzen der Kontrollmäuse mit Herzen von I/R-Mäusen verglichen wurden (Kötter et al., 2016). In der Mausmodell-Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Protein-Ubiquitinierungsniveau drei Tage nach Myokardinfarkt im Molekulargewichtsbereich von 100-260kDa erhöht war und auch eine signifikant erhöhte

Titin-Ubiquitinierung war nachweisbar. Zehn Tage nach Myokardinfarkt dagegen war die Gesamtprotein-Ubiquitinierung unverändert, während die Titinubiquitinierung weiterhin erhöht war. Da entsprechend ubiquitinierte Proteine in der Regel direkt der Degradation über das UPS oder der Autophagie zugeführt werden, kann die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine nach Myokardinfarkt auf eine Dysfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems oder einen stark erhöhten Proteinumsatz hinweisen. In der Mausmodell-Studie wurde hierfür die proteasomale Aktivität des Trypsin-ähnlichen 26S-Proteasoms gemessen und es konnte eine erhöhte Aktivität drei Tage nach Myokardinfarkt identifiziert werden, was auf einen erhöhten Umsatz der Herzproteine, einschließlich des Titins hinweist. Weiterhin wird vermutet, dass durch diesen Prozess, drei Tage nach Myokardinfarkt, eine Phase der hohen Myozyten-Steifigkeit eingeleitet wird (Kötter et al., 2016). Empfehlenswert wäre daher, bei Verfügbarkeit von größeren Gewebeproben eine solche Untersuchung an humanen Proben durchzuführen, um mehr Hinweise auf die proteasomale Aktivität nach Myokardinfarkt zu erhalten.

Die genauen Zusammenhänge zwischen metabolischen Stoffwechselprozessen, wie z.B. dem Diabetes mellitus und dem Ubiquitinsystem, hinsichtlich eines Einflusses auf das Riesenprotein Titin, sind weitgehend unerforscht. Eine Studie zeigte, dass das Ubiquitinsystem mit der Insulinsignalisierung in Verbindung gebracht werden kann und so die Stabilität des Insulinrezeptors verschiedener Proteine reguliert wird (Petroski, 2008). In Mausmodellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass der Diabetes mellitus die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems verstärkt. Beispielsweise führte die Induktion eines Typ-1-Diabetes mellitus durch das Medikament Streptozotocin zu einer verstärkten Skelettmuskel-Proteolyse mit erhöhtem Umsatz des myofibrillären Proteins Aktin. Auch eine erhöhte kardiale Ubiquitin-Proteasom-System-Aktivität konnte durch erhöhte Ubiquitin-mRNA und durch erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden (Hu et al., 2008). Auch hier gilt es, den Einfluss metabolischer Erkrankungen auf das Herz weiter zu untersuchen. Insbesondere die Titin-Ubiquitinierung infolge eines Diabetes mellitus sollte zusätzlich im Tiermodell untersucht werden und mit einer größeren Anzahl humaner Herzbiopsien ergänzt werden.

4.3.6 Die arterielle Hypertonie modifiziert die Ubiquitinierung des Titins nicht

Um die Aussagekraft der Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Myokardinfarkt und Diabetes mellitus auf die Ubiquitinierung des Titins zu unterstützen, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die Ubiquitinierung des kardialen Titins untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eine nicht signifikante, leichte Verminderung der relativen Ubiquitinierung in der Hypertonie-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe, was darauf hinweist, dass die arterielle Hypertonie keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung des Riesenproteins hat. Aufgrund einer chronisch erhöhter Nachlast durch arterielle Hypertonie könnte jedoch ein erhöhter Umbau des Titins erwartet werden, weil die mechanischen und strukturellen Bedingungen des Myokards verändert sind und mechanosensitive Proteinsysteme angestoßen werden könnten. Unterschiedliche Kontrollsysteme, wie zum Beispiel das Ubiquitin-Proteasom-System und die Autophagie könnten unter chronischer Belastung hochreguliert sein und so einen beschleunigten Abbau beschädigter oder fehlgefalteter Titinanteile effizient ausgleichen, wodurch im gemessenen Ubiquitinierungsgrad trotz erhöhtem strukturellem Stress kein signifikanter Unterschied dargestellt werden kann. Ein Bezug zum Tiermodell oder einer ähnlichen Studie konnte nicht dargestellt werden, da die Datenlage hinsichtlich der Ubiquitinierung des Titins nicht ausreichend ist. Der Vergleich der relativen Ubiquitinierung unter Einfluss einer arteriellen Hypertonie, zwischen humanen Proben und Proben eines Tiermodells könnte die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit somit verstärken und weitere Hinweise zur Titin-Steifigkeit nach kardiovaskulären Erkrankungen liefern.

4.3.7 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus beeinflussen die Aktivität der Proteinkinase Ca nicht

Die Ca^{2+} -abhängige PKC α ist für die Phosphorylierung der Titin PEVK-Region, unter anderem in den Bereichen der Serinreste Ser11878 und Ser12022, verantwortlich (Hidalgo et al., 2009). Die Aktivität der PKC α kann über ihren Phosphorylierungsstatus erschlossen werden, da eine erhöhte Phosphorylierung am Threoninrest-497 in der hochkonservierten Aktivierungsschleife zu einer erhöhten, enzymatischen Aktivität führt (Singh et al., 2017). Folglich kann die PEVK-Region verstärkt phosphoryliert werden und koordiniert eine erhöhte Steifigkeit des Titins (Kötter et al., 2013). Wie bereits

beschrieben, konnten in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte relative Phosphorylierung durch den Einfluss eines Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts, im Bereich der PEVK-Region, nachgewiesen werden. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Phosphorylierung der PKC α wies keine signifikante Veränderung durch den Einfluss des Myokardinfarkts oder Diabetes mellitus auf, dennoch war auffällig, dass in der Infarkt-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und in der Infarkt-Diabetes-Gruppe im Vergleich zur Diabetes-Gruppe eine nicht signifikante, leicht erhöhte relative Phosphorylierung dargestellt werden konnte. Zwar sind die Ergebnisse der relativen Phosphorylierung der PKC α in dieser Arbeit nicht signifikant, dennoch deuten sie auf eine verstärkte Aktivität der PKC α nach Myokardinfarkt hin, was mit einer Vielzahl vorheriger Studien übereinstimmt. Beispielsweise beschäftigt sich die Arbeit von Kötter et al. mit einer erhöhten Phosphorylierung der PEVK-Domäne am Serinrest Ser11878 nach Herzversagen und vermutet eine dem zugrunde liegende, erhöhte Aktivität der PKC α (Kötter et al., 2013). Auch in der Dissertation von Celerina Jahns wurde die PEVK-Phosphorylierung, sowie die Phosphor-abhängige Aktivität der PKC α im Großtiermodell Schwein untersucht (Jahns, 2021). Hier konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die PKC α Phosphorylierung, als auch die Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 wenige Minuten nach I/R erhöht war, wodurch auf eine erhöhte Aktivität der PKC α geschlossen werden konnte. Die Arbeit von Wang et al. gab zudem erste Auskünfte über den Einfluss eines Myokardinfarkts auf die Aktivität der PKC α . In dem untersuchten Rattenmodell konnte eine erhöhte Aktivität der PKC α im *remote* Myokard nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Wang et al., 2003). Zu diskutieren ist, dass die Infarkt-Proben der vorliegenden Arbeit maximal drei Wochen nach Myokardinfarkt operativ entnommen wurden, der genaue Zeitpunkt aber nicht angegeben war, während die Titin-Phosphorylierung am Großtiermodell Schwein dagegen nur in einem Zeitraum von vier Stunden untersucht wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass die Aktivität der PKC α nicht allein durch einen Infarkt, sondern auch durch die vergangene Zeit nach Infarkt beeinflusst wird. Da die Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 in zwei Proben der vorliegenden Arbeit erhöht, in zwei weiteren Proben dagegen vermindert war, kann davon ausgegangen werden, dass erstere Proben ggfs. von Patienten stammen, deren Myokardinfarkt nur wenige Tage von der operativen Behandlung entfernt war, so dass die PKC α eine erhöhte Aktivität aufwies. Weiterhin muss diskutiert werden, dass die relative Phosphorylierung der PEVK-Region nur stellvertretend über die Phosphorylierung des Serinrests Ser11878 betrachtet wurden und die Phosphorylierung

von Ser12022 zusätzliche Hinweise zur Aktivität der PKC α liefern kann. Zudem muss die relative Phosphorylierung der PEVK-Region nicht zwingend mit einer erhöhten Aktivität der PKC α korrelieren. Zwar wird in einer anderen Studie beschrieben, dass eine erhöhte Aktivität der PKC α auch zu einer verstärkten Phosphorylierung der PEVK-Region führt, dennoch könnte durch die Aktivierung bzw. den Einsatz der Protein-Phosphatase-1 die relative Phosphorylierung wieder vermindert werden, da diese unter anderem für die Dephosphorylierung an den PKC-sensitiven Stellen verantwortlich ist (Hidalgo et al., 2009). Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Studien, neben der Aktivität der PKC α , auch die Aktivität einer Phosphatase untersucht werden, die möglicherweise ebenfalls die Phosphorylierung der PEVK-Region nach Myokardinfarkt beeinflusst. Auch die Angabe eines genauen Zeitpunktes zwischen Myokardinfarkt und operativen Eingriff zur Biopsie-Gewinnung könnte weitere Erkenntnisse zur PKC α -Aktivität in Abhängigkeit zurzeit liefern und sollte in nachfolgenden Studien mit einer größeren Probenanzahl untersucht werden.

Neben der Infarkt Gruppe, wurden in dieser Arbeit auch die Diabetes-Gruppe, sowie die Diabetes-Infarkt-Gruppe auf die Phosphorylierung der PEVK-Region, sowie auf die Phosphorylierung der PKC α untersucht. Wie oben bereits beschrieben, konnte in dieser Arbeit nur eine nicht signifikante Erhöhung der Phosphorylierung am Serinrest Ser11878 nachgewiesen werden. Eine verstärkte Aktivierung der PKC α durch Thr497-Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden und stimmen daher nur zum Teil mit den Ergebnissen der Studie von Hopf et al. überein, in der an humanen kardialen Gewebeproben von Diabetes Patienten eine signifikant erhöhte PKC α -Aktivität gezeigt werden konnte, die gepaart mit einer zusätzlich eingeschränkten PKG-abhängigen Phosphorylierung zu einer signifikant erhöhten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten führte (Hopf et al., 2018). In der Arbeit von Hopf et al. wurden die Proben anhand des HbA1c in Kontrollgruppe und Diabetesgruppe aufgeteilt, dabei fiel auf, dass die Kontrollgruppe z.T. schon einen prä-Diabetes aufwies, da der HbA1c höher war, als bei den bereits bekannten, medikamentös eingestellten Diabetikern (Hopf et al., 2018). Da die Gruppeneinteilung in der hier vorliegenden Arbeit anhand des Vorhandenseins eines Diabetes mellitus durchgeführt wurde und weitere Parameter für die Einteilung eines Diabetes mellitus, wie beispielsweise der HbA1c-Wert fehlten, könnte eine erneute Gruppeneinteilung zwischen Kontroll- und Diabetesgruppe anhand eines erhobenen HbA1c-Wertes zu einer stärkeren Aussagekraft führen. Weiterhin sollte, wie bei Hopf et al., auch die passive Steifigkeit der Proben untersucht werden, was aufgrund der

limitierenden Anzahl bisher nicht möglich war. Bei erhöhter passiver Steifigkeit in den diabetischen Proben sollte, ähnlich wie bei den Infarkt-Proben, auch in beiden Diabetes-Gruppen die Aktivität einer Phosphatase untersucht werden, die Einfluss auf die Phosphorylierung der PEVK-Region hat. Zudem sollte die Probenanzahl erhöht werden und der Einfluss möglicher Medikamente sollte überprüft und möglicherweise ausgeschlossen werden. Die Arbeit von Hopf et al. liefert erste Erkenntnisse zum Einfluss verschiedener Medikamente auf die Titin-Steifigkeit in diabetischen Ratten (Hopf et al., 2018).

4.3.8 COPD und arterielle Hypertonie beeinflussen die Aktivität der Proteinkinase Ca nicht

Humane Patienten die im Verlauf einer KHK +/- Myokardinfarkt eine Bypassoperation benötigen, haben neben Diabetes mellitus häufig auch andere Komorbiditäten, die eine Interpretation der Daten aus humanem Gewebematerial zusätzlich erschweren. Um einen ersten Eindruck solcher Einflussgrößen zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss einer COPD und einer arteriellen Hypertonie auf die Aktivierung der PKC α und die PKC-abhängige Phosphorylierung von Titin untersucht. Sowohl die COPD, als auch die arterielle Hypertonie wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Phosphorylierung der PKC α auf, dennoch konnte eine nicht signifikant erhöhte Phosphorylierung der PKC α der COPD-Patienten beschrieben werden. Auch auffällig ist der zuvor beschriebene, erhöhte Phosphorylierungsstatus des Serinrests 11878 der PEVK-Region durch den Einfluss der arteriellen Hypertonie, dem eine erhöhte Aktivität der PKC α zugrunde liegen könnte. Dieses Ergebnis würde mit Daten von Nieves-Cintron et al. übereinstimmen, die zeigen konnten, dass die PKC α -Aktivität, ebenso wie die Ca²⁺-*sparklet* Aktivität in arteriellen Myozyten bei Patienten mit Bluthochdruck erhöht ist (Nieves-Cintron et al., 2008). Über die Aktivierung der prohypertensiven Calcineurin/NFATc3-Signalkaskade kann die Erhöhung der PKC α -Aktivität, sowie der Ca²⁺-*sparklet* Aktivität in charakteristischen Anzeichen einer Bluthochdruck-assoziierten vaskulären Dysfunktion resultieren. Dem zugrunde liegt unter anderem die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und der verstärkte myogene Muskeltonus. Weiterhin wurde in der Arbeit beschrieben, dass eine PKC α -Ablation vor der Entwicklung von Angiotensin-II induziertem Bluthochdruck schützen kann (Nieves-Cintron et al., 2008). Da die Datenlage bezüglich eines Einflusses der arteriellen Hypertonie auf die PKC α -

Aktivität sehr limitiert ist, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der Arbeit von Nieves-Cintron et al. aber auf eine erhöhte Aktivität der PKC α durch den Einfluss einer arteriellen Hypertonie hinweisen, ist zu empfehlen, den Einfluss der arteriellen Hypertonie auf die PKC α und auf die Phosphorylierung des Titins im Kleintier- und Großtiermodell weiter zu untersuchen (Nieves-Cintron et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit war die relative Phosphorylierung der PKC α bei zwei der untersuchten Proben aus COPD-Patienten leicht erhöht, was auf eine erhöhte Kinaseaktivität hinweisen könnte und zum Teil mit der Arbeit von Xaing et al. übereinstimmt (Xaing et al., 2010). Xaing et al. beschäftigte sich unter anderem mit der Veränderung der PKC α -Expression in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien unter dem Einfluss einer COPD. Die Autoren zeigten, dass eine signifikant erhöhte PKC α -Expression in der Rauchergruppe und der COPD-Gruppe verglichen mit der Nicht-Rauchergruppe vorlag, woraus auch auf eine erhöhte Aktivität der PKC α geschlossen wurde (Xaing et al., 2010). Zu diskutieren ist, inwiefern sich die PKC α -Expression und Aktivität zwischen glatter Gefäßmuskulatur und quergestreifter Herzmuskulatur unterscheiden, da diese aufgrund der geringen Datenlage in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen werden. Auch die Arbeiten von van der Pijl et al. und van Hees et al. beschäftigten sich mit dem Einfluss einer COPD beziehungsweise einer künstlichen Beatmung im Rattenmodell und fokussierten sich auf die Analyse der Phosphorylierung und Steifigkeit von Titin in der quergestreiften Zwerchfellmuskulatur (van der Pijl et al., 2019, van Hees et al., 2012). Die Autoren beschrieben, dass die Druckerzeugungsfähigkeit bei Patienten mit COPD deutlich reduziert ist, was einer erhöhten Elastizität des Diaphragmas zugrunde liegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die mechanische Beatmung die Steifheit der Zwerchfellmuskelfasern reduziert. In den Arbeiten wird unter anderem davon ausgegangen, dass eine Abnahme der Phosphorylierung der Titin PEVK-Region zur verminderten Steifigkeit des Zwerchfells führt. Auffällig war vor allem, dass der Einsatz der dephosphorylierenden Protein-Phosphatase-1 eine erhöhte Elastizität im Diaphragma der Kontrolltiere hervorrief, während die Elastizität in den mechanisch beatmeten Tieren unverändert blieb. Diese Daten legen nahe, dass der Phosphorylierungsstatus der Titin PEVK-Domäne in Zwerchfellfasern von mechanisch beatmeten Tieren bereits niedrig ist oder dass der Phosphorylierungsstatus nicht der Grund für eine verminderte Steifigkeit des Diaphragmas darstellt. Weiterhin zeigte eine Studie von Pierno et al., dass aus einem drei-tägigen nicht-Gebrauch der Skelettmuskulatur eine rasche Verringerung der PKC-

Aktivität resultiert (Pierno et al., 2007). Da auch das Zwerchfell während der mechanischen Beatmung kontraktile inaktiv ist, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die mechanische Beatmung die PKC-Aktivität im Zwerchfell reduziert (van Hees et al., 2012). Inwieweit die bisher bekannten Daten zu Skelettmuskelveränderungen bei COPD auch auf den Herzmuskel übertragbar sind, wird durch zukünftige Studien adressiert werden müssen. Insbesondere der Einfluss einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung auf die PKC α -Aktivität und Titin-Phosphorylierung des Myokards stellt einen blinden Fleck in der Wissenschaft dar. Erste Daten zur myokardialen PKC α -Phosphorylierung unter Einfluss einer COPD wurden in dieser Arbeit erhoben und sollten durch weitere Daten verschiedener Kleintier- und Großtiermodelle unterstützt werden. Interessanterweise haben sowohl die COPD als auch die arterielle Hypertonie einen Einfluss auf die Vorlast beziehungsweise Nachlast des Herzens und beeinflussen im weiteren Sinne die Kontraktilität sowie den Frank-Starling-Mechanismus (Fouad, 1994, Neder and O'Donnell, 2022). Die Vorlast baut sich während der diastolischen Füllung und Dehnung der Kardiomyozyten auf, was zu einer sofortigen Rekrutierung kontraktiler Einheiten mit folgender Steigerung der Herzleistung durch den Frank-Starling-Mechanismus führt. Auch das Muskelprotein Titin wird gedehnt, was sich auf die myokardiale Elastizität und Kontraktilität auswirkt. Die zur Nachlast passende systolische Kraft wird von jedem Kardiomyozyten erzeugt, um den Druck in den Gefäßen (= Gefäßwiderstand) zu überwinden (Toischer et al., 2010).

Grundsätzlich wirken sich kardiopulmonale Erkrankungen wie COPD eher auf den rechten Ventrikel des Herzens aus, da dieser aufgrund der unmittelbaren Verbindung zum Lungenkreislauf, anfälliger für die Folgen erhöhter Lungenvolumina und intrathorakaler Druckschwankungen ist. Bei Patienten mit COPD und einer zugrunde liegenden Lungenüberblähung, kommt es infolgedessen zu einem hohen intrathorakalen Druck, der den Druckgradienten zwischen intra- und extrathorakalen venösen Gefäßen beeinträchtigt, was letztlich zu einem verminderten venösen Rückstrom und erhöhtem rechts-atrialen Druck führt. Der rechte Ventrikel wird nicht vollständig gefüllt und die rechtsventrikuläre Vorlast ist reduziert (Gajic, 2011). Umgekehrt kann das end-diastolische rechtsventrikuläre Volumen erhöht werden, wenn ein hoher intrinsischer, positiver, end-expiratorischer Druck sowie eine pulmonale Vasokonstriktion die Nachlast erhöhen und zu einer Überdehnung des rechten Ventrikels führen (Neder and O'Donnell, 2022). Dem gegenüber steht die arterielle Hypertonie, welche eine der häufigsten Ursachen für eine erhöhte linksventrikuläre Nachlast darstellt. Die

linksventrikuläre Füllungsrate ist bei etwa 30% der Bluthochdruckpatienten, ohne Veränderung der systolischen Funktion reduziert. Eine kompensatorische Hypertrophie führt dazu, dass die linksventrikuläre systolische Gesamtleistung innerhalb der Norm bleibt (Fouad, 1994). In der Arbeit von Toischer et al. wird beschrieben, dass eine Erhöhung der Nachlast eher zu einer maladaptiven Hypertrophie führt, während die Vorlast zu einer günstigeren Form der Hypertrophie durch dehnungsvermittelte Aktivierung von Aktinin führt (Toischer et al., 2010).

4.3.9 Myokardinfarkt und Diabetes mellitus beeinflussen die relative Phosphorylierung von Troponin I

Da die Elastizität und insbesondere die Kontraktilität der Kardiomyozyten ausschließlich von dem Riesenprotein Titin abhängt, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Phosphorylierungsstatus der inhibitorischen Untereinheit des Troponinkomplexes untersucht. Ein erhöhter Phosphorylierungsstatus der Serinreste Ser23/Ser24 führt hierbei zu einer verbesserten Kraft-Frequenz-Modulation, da die Ca^{2+} -Sensitivität herunterreguliert wird und die Relaxation der Muskulatur schneller eingeleitet werden kann. Insgesamt ist die Phosphorylierung von TnI ein wichtiger Mechanismus, mit dem das Herz kurzfristig seine Pump- und Füllungsdynamik an physiologische Anforderungen anpassen kann. So kompensiert das Herz unter anderem die unterschiedlichen, physiologischen Anforderungen, welche sich unter Ruhe oder Belastung ergeben. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten eine nicht-signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung nach Einfluss eines Myokardinfarkts. Auffälliger als die relative Phosphorylierung der Infarkt-Gruppe war der Einfluss des Diabetes mellitus auf die relative Phosphorylierung von TnI. Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe, welche jedoch durch andere Komorbiditäten beeinflusst war und Diabetes-Gruppe wies in dieser Arbeit eine nicht-signifikante Verminderung der relativen Phosphorylierung in der Diabetes-Gruppe auf. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch der Vergleich zwischen Infarkt-Gruppe und Infarkt-Diabetes-Gruppe, der in einer signifikanten Verminderung der Phosphorylierung in der Infarkt-Diabetes-Gruppe resultierte. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein verminderter Phosphorylierungsstatus von TnI in den verschiedenen Diabetes-(Infarkt)-Gruppen nachgewiesen werden.

Die nicht signifikante Erhöhung der TnI-Phosphorylierung nach Einfluss eines Myokardinfarkts stimmt mit Ergebnissen der Arbeit von Walker et al. überein. Walker et

al. zeigten an einem Mausmodell eine verminderte Phosphorylierung von TnI zwei- und 14-Tage nach Infarkt (Walker et al., 2010). Eine erhöhte Phosphorylierung des TnI wurde dagegen in Mäusen detektiert, die zwei bis vier Monate nach Infarkt untersucht wurden. Daraus lässt sich schließen, dass die relative Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit des Troponinkomplexes abhängig vom post-infarzierten Zeitpunkt ist. Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen Herzbiopsien des rechten humanen Vorhofs maximal 21 Tage nach Myokardinfarkt entnommen wurden, ihre relative Phosphorylierung aber nur nicht signifikant erhöht ist, weisen sie daraufhin, dass eine erhöhte Phosphorylierung des TnI's nach Myokardinfarkt auch beim Menschen zu beobachten ist. Um mehr Erkenntnisse zur Phosphorylierung des humanen TnI's zu gewinnen, ist es sinnvoll, weitere Herzproben auf die Phosphorylierung des Troponins zu untersuchen und auf den post-infarzierten Zeitpunkt der Proben zu beziehen. Hierdurch wäre eine genauere Datenerhebung bezüglich einer veränderten Phosphorylierung zu verschiedenen Zeitpunkten möglich und könnte folglich besser mit dem Mausmodell von Walker et al. verglichen werden (Walker et al., 2010).

In der Arbeit von Liu et al. wurde der Einfluss des Diabetes mellitus und der Gabe von Insulin auf eine veränderte Phosphorylierung des TnI's anhand eines Rattenmodells untersucht (Liu et al., 1996). Interessanterweise war die Phosphorylierung von TnI im diabetischen Herzmuskel bezogen auf den linken, sowie den rechten Ventrikel, um 40-50% erhöht. Nach einer zweiwöchigen Behandlung mit Insulin sank die relative Phosphorylierung um 20-30%, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von TnI unter dem Einsatz von Insulin reversibel ist. In Folge der Ergebnisse, wurde in der Studie beschrieben, dass die erhöhte Phosphorylierung im diabetischen Herzen vermutlich auf eine erhöhte Aktivität der PKC zurückzuführen ist. Diese Ansicht basiert auf der Beobachtung, dass die PKC abhängige Troponin-Phosphorylierung mit einer verminderten Ca^{2+} -abhängigen ATPase-Aktivität verbunden war, während die Sensitivität der Myofibrillen gegenüber Ca^{2+} sich nicht änderte (Liu et al., 1996, Noland and Kuo, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, diabetischen Proben wurden nicht nach der Therapie des Diabetes mellitus unterschieden. Die meisten Patienten erhielten Insulin, woraufhin darauf geschlossen werden kann, dass eine durch den Diabetes mellitus vorhandene Hyperphosphorylierung von TnI gegebenenfalls reversibel behandelt wurde. Auffällig ist vor allem, dass zwei nicht mit Insulin behandelte Infarkt-Diabetes-Proben eine höhere relative Phosphorylierung aufweisen als der Rest der Proben, was ebenfalls Hinweise darauf liefert, dass Insulin

einen reversiblen Effekt auf eine durch den Diabetes induzierte, erhöhte Phosphorylierung hat. Da die Phosphorylierung von TnI nach Infarkt in dieser Arbeit zum Teil erhöht war, kann wie bereits oben beschrieben, davon ausgegangen werden, dass die Ca^{2+} -Sensitivität am Troponin dadurch gesenkt wird. Folglich ist eine Bindung von Ca^{2+} an der TnC-Untereinheit der Infarkt-Gruppe erschwert. Das Myosin bindet erschwert am Aktin, wodurch das inhibitorische Tropomyosin erst später verdrängt wird. Da bei verminderter Ca^{2+} -Sensitivität am Troponin mehr Ca^{2+} für die gleiche Kraftentwicklung notwendig ist, führt die verminderte Ca^{2+} -Sensitivität zu einer verbesserten Kraft-Frequenz-Modulation mit erhöhter Schnelligkeit zur Relaxation des Herzmuskels (positive Lusitropie), wodurch eine Anpassung des Herzens an erhöhte Herzfrequenzen ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu stehen die Diabetes-(+Infarkt)-Proben, in denen die Phosphorylierung von TnI eher vermindert war, was für eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität spricht und folglich zu einer vereinfachten Bindung von Ca^{2+} an der TnC-Untereinheit der Diabetes-Gruppen führt. Letztlich ist weniger Ca^{2+} für die gleiche Kraftentwicklung notwendig. Zum Ende hin dissoziiert Ca^{2+} bei erhöhter Sensitivität erschwert vom Troponin, wodurch das Tropomyosin nicht in seine inhibitorische Position zurück gelangt, was eine verlangsamte Relaxation zur Folge hat (Powers et al., 2021). Um mehr Hinweise bezüglich einer veränderten Phosphorylierung von TnI durch den Einfluss des Diabetes zu erhalten, sollte sowohl der Einfluss von Insulin, als auch der Einfluss weiterer Medikamente auf die TnI-Phosphorylierung isoliert untersucht werden. Zudem sollte zusätzlich der Einfluss verschiedener Komorbiditäten des Diabetes mellitus auf die TnI-Phosphorylierung untersucht werden, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren.

4.3.10 Arterielle Hypertonie und COPD beeinflussen die relative Phosphorylierung von Troponin I

Da sowohl ein nicht signifikanter Einfluss des Myokardinfarkts, als auch ein signifikanter Einfluss des Diabetes auf die TnI-Phosphorylierung in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden konnte, wurde infolgedessen auch der Einfluss der arteriellen Hypertonie und der COPD auf die TnI-Phosphorylierung untersucht, um auf mögliche Fehlerquellen aufmerksam zu machen beziehungsweise diese auszuschließen. Auffällig war hierbei, dass die COPD eine signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung des kardialen TnI zur Folge hatte, während die arterielle Hypertonie dagegen eine nicht-signifikant verminderte relative Phosphorylierung aufwies.

Da die TnI-Phosphorylierung der COPD-Patienten in der vorliegenden Arbeit erhöht war und die Phosphorylierung an den Serinresten Ser23/Ser24 über die PKA koordiniert wird, kann indirekt darauf geschlossen werden, dass eine erhöhte Aktivität der PKA vorlag (Solaro et al., 2013, Kooij et al., 2010). Die cAMP-abhängige PKA ist nicht nur für die Phosphorylierung des Troponins, sondern unter anderem auch für die Phosphorylierung der N2Bus des Titins zuständig, was neben einer erhöhten Phosphorylierung des TnI's zusätzlich eine erhöhte PKA-abhängige Phosphorylierung der N2Bus, z.B. an S4010 bedeuten kann, aber aufgrund einer zu geringen Probenmenge in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnte und somit in künftigen Studien mitberücksichtigt werden sollte. Infolgedessen würde die Titin-Steifigkeit im Bereich des rechten Vorhofs vermindert werden und die Elastizität der Kardiomyozyten nimmt zu (Kötter et al., 2013). Gleichzeitig zur erhöhten Elastizität der Muskulatur, ist auch die Relaxation der Muskulatur durch die erhöhte TnI-Phosphorylierung und die damit verbundene, verminderte Ca^{2+} -Sensitivität verbessert und kann schneller erfolgen (Solaro et al., 2013, Kooij et al., 2010). Dieser Prozess legt die Vermutung nahe, dass das Herz einen Kompensationsmechanismus aufbaut, um die verminderte enddiastolische Füllung des rechten Ventrikels auszugleichen. Da die pulmonale Hypertonie eine häufige Folge der COPD darstellt, kann diese, gemeinsam mit dem Kompensationsmechanismus zu einer erhöhten rechtsventrikulären Nachlast führen und in einer Hypertrophie des rechten Ventrikels resultieren (Cassady and Reed, 2019, Antigny et al., 2020).

Diese Vermutung kann durch den Vergleich der TnI-Phosphorylierung der Hypertonie-Gruppe der vorliegenden Arbeit unterstützt werden. Da die TnI-Phosphorylierung in der Hypertonie-Gruppe leicht vermindert ist, kann man eine verminderte PKA-Aktivität vermuten, was letztlich in einer verringerten N2Bus-Phosphorylierung und einer erhöhten Titin-Steifigkeit resultieren könnte (Kötter et al., 2013). In der Arbeit von Lee et al. wird beschrieben, dass die passive Titin-Steifigkeit einen wichtigen Faktor im Frank-Starling-Mechanismus darstellt und zu einer größeren, längenabhängigen Krafterzeugung führt (Lee et al., 2010). Somit könnte eine verminderte Elastizität des Titins sowie die ohnehin schon erhöhte Nachlast, bedingt durch die arterielle Hypertonie, in einer Hypertrophie des linken Ventrikels resultieren und die Inotropie des Herzens beeinflussen, um die systolische Auswurfleistung des Herzens gegen den erhöhten arteriellen Druck im Körperkreislauf zu pumpen (Lovic et al., 2017).

Infolge dieser Diskussion muss betont werden, dass die aufgestellten Vermutungen nur auf der in dieser Arbeit untersuchte TnI-Phosphorylierung unter Einfluss der COPD und

arteriellen Hypertonie beruhen. Da die Datenlage in diesem Bereich noch sehr limitiert ist, ist es empfehlenswert, auch die kardiale Titin-Phosphorylierung unter Einfluss der COPD genauer zu erforschen, um so eine genauere Aussage über die Beeinflussung der Titin-Steifigkeit treffen zu können. Auch sollten die zu untersuchenden Herzbiopsien nicht auf Proben des rechten Vorhofs beschränkt werden, da eine Untersuchung der rechten und linken Ventrikel eine genauere Aussage bezüglich des Einflusses der COPD auf die Myokardsteifigkeit ermöglicht, da sich sowohl physiologische als auch pathophysiologische Aspekte in Atrium und Ventrikel unterscheiden können. So sollte zum Beispiel der Frank-Starling-Mechanismus betrachtet werden, der unter Einfluss einer COPD auch im rechten Ventrikel greifen kann, wenn dem zusätzlich eine pulmonal-arterielle Hypertonie zugrunde liegt. Diese Überlegung steht einer erhöhten PKA-Aktivität und vor allem einer erhöhten N2Bus-Phosphorylierung gegenüber, da eine erhöhte Steifigkeit des Titins eine größere, aktive Krafterzeugung über den Frank-Starling-Mechanismus zur Folge hat. Infolge der angegebenen Untersuchungen wäre es demnach sinnvoll, neben der Modifikation der Sarkomerproteine auch die kalziumabhängige Kraftentwicklung des Myokards beziehungsweise der Kardiomyozyten zu untersuchen, um auftretende Modifikationen im Sarkomer besser interpretieren zu können. Um diese aufwändigen Untersuchungen durchführen zu können, ist eine größere Probenanzahl und vor allem eine Verwendung einer höheren Probengröße unvermeidlich.

4.4 Limitationen der Arbeit

Um die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit in ihrer Aussagekraft umfassend einschätzen zu können, werden die Einschränkungen der Arbeit in diesem Abschnitt näher erläutert.

Die Datenerhebung dieser Arbeit wurde durch die geringe Anzahl der auswertbaren Gewebeproben pro Gruppe ($n = 3-9$) erschwert, weshalb eine Erhöhung der n-Zahl zu einer Reduktion der Varianz und folglich zu einer stärkeren Aussagekraft führen könnte. Auch die Art der Gewebeproben stellt einen limitierenden Faktor dar, da diese auf Biopsien des rechten humanen Vorhofs beschränkt waren. Die pathophysiologischen Ereignisse in Herz-Vorhof und Herz-Kammer sind nicht zwingend identisch, wodurch die Untersuchung verschiedener Biopsien von Vorhof und Kammer signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Proben liefern könnte. Durch die zusätzlich teils

sehr geringe Größe der untersuchten Biopsien, war zudem auch die weitere Verarbeitung und Analyse der Proben erschwert. So konnten viele Biopsien lediglich für die Analyse eines der Parameter verwendet werden. Da die untersuchten Biopsien maximal 21 Tage nach Myokardinfarkt entnommen wurden, der genaue Zeitpunkt des Infarkts aber nicht bekannt war, stellt auch die zeitliche Komponente einen limitierenden Faktor dar. Wie in verschiedenen Modellen bereits gezeigt werden konnte, können sich pathophysiologische Ereignisse, wie beispielsweise die Phosphorylierung des Titins, zeitabhängig verändern, wodurch eine genauere Zeitangabe des vorherigen Infarkt-Ereignisses eine stärkere Aussagekraft ermöglichen könnte. Da auch zuvor eingenommene Medikamente einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Herzmuskelsteifigkeit nehmen können, ist es wichtig, diese künftig isoliert zu betrachten und so die Aussagekraft der Ergebnisse zu verstärken. Grundsätzlich ist auch ein direkter, quantifizierender Vergleich der Ergebnisse der Infarkt- und Diabetes-Proben mit den Proben der Komorbiditäten COPD und arterielle Hypertonie nicht möglich, da die Biopsien nicht auf einem *Blot* aufgetragen wurden. Um zukünftig den Einfluss des Infarkts und des Diabetes aussagekräftiger zu machen, sollten die dazu gehörigen Komorbiditäten isoliert auf dem selben *Blot* aufgetragen werden, um mögliche Fehlerquellen und zu hohe Varianzen minimieren zu können. Da für die PEVK-Region und die N2Bus stellvertretend nur die Phosphorylierung eines Serinrests betrachtet wurde, könnte eine genauere Aussage bezüglich der Phosphorylierung der PEVK-Region beziehungsweise der N2Bus durch die Betrachtung verschiedener, potentiell konservierter Phosphorylierungsstellen die Aussagekraft zur Aktivität der PKC α unterstützen.

Letztlich erschwert auch der Einsatz der verschiedenen, z.T. phosphospezifischen Antikörper und deren Auswertung die Interpretation der Ergebnisse.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erste Erkenntnisse aufgezeigt werden, die auch im menschlichen Myokard auf eine erhöhte passive Steifigkeit des Titin nach einem Myokardinfarkt und bei Diabetes schließen lassen. Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Komorbiditäten des Myokardinfarkts beziehungsweise Diabetes mellitus einen zusätzlichen Einfluss auf die passive Steifigkeit des Titins haben. Da vor allem die Anzahl der verwendeten Proben limitiert war und daraus resultierend nicht-signifikante Ergebnisse bezüglich der Titin-Phosphorylierung vorliegen, ist es perspektivisch wichtig

die Daten dieser Arbeit mit weiterführenden Untersuchungen zu stützen. Sowohl die Erhöhung der Probenanzahl, als auch die Untersuchung weiterer Komponenten, die einen Einfluss auf die Titin-Steifigkeit haben, können weitere Hinweise zum pathophysiologischen Mechanismus bezüglich einer veränderten Steifigkeit des Titins liefern. Somit kann der funktionelle Nutzen der myokardialen Steifigkeit bedingt durch das Titin besser verstanden werden und neue Anhaltspunkte zur therapeutischen Behandlung eines Myokardinfarkts liefern. Weiterhin können weitere Untersuchungen der Komorbiditäten sowie des Diabetes mellitus Hinweise auf eine präventive Therapie des Diabetes liefern.

5 Literaturverzeichnis

- AL-SHAREA, A., LEE, M. K. S., WHILLAS, A., MICHELL, D. L., SHIHATA, W. A., NICHOLLS, A. J., COONEY, O. D., KRAAKMAN, M. J., VEIGA, C. B., JEFFERIS, A. M., JACKSON, K., NAGAREDDY, P. R., LAMBERT, G., WONG, C. H. Y., ANDREWS, K. L., HEAD, G. A., CHINDUSTING, J. & MURPHY, A. J. 2019. Chronic sympathetic driven hypertension promotes atherosclerosis by enhancing hematopoiesis. *Haematologica*, 104, 456-467.
- ALEGRE-CEBOLLADA, J., KOSURI, P., GIGANTI, D., ECKELS, E., RIVAS-PARDO, J. A., HAMDANI, N., WARREN, C. M., SOLARO, R. J., LINKE, W. A. & FERNANDEZ, J. M. 2014. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156, 1235-1246.
- ALI, M. A., CHO, W. J., HUDSON, B., KASSIRI, Z., GRANZIER, H. & SCHULZ, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- ALLEN, D. G., LAMB, G. D. & WESTERBLAD, H. 2008. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*, 88, 287-332.
- ANNIBALI, G., SCROCCA, I., ARANZULLA, T. C., MELIGA, E., MAIELLARO, F. & MUSUMECI, G. 2022. "No-Reflow" Phenomenon: A Contemporary Review. *J Clin Med*, 11.
- ANTIGNY, F., MERCIER, O., HUMBERT, M. & SABOURIN, J. 2020. Excitation-contraction coupling and relaxation alteration in right ventricular remodelling caused by pulmonary arterial hypertension. *Arch Cardiovasc Dis*, 113, 70-84.
- ATHEROSCLEROSIS, W. H. O. S. G. O., ISCHAEMIC HEART, D. & WORLD HEALTH, O. 1957. Study Group on Atherosclerosis and Ischaemic Heart Disease [meeting held in Geneva from 7 to 11 November 1955] : report. Geneva: World Health Organization.
- BADIMON, L. & VILAHUR, G. 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*, 276, 618-32.
- BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- BARSOTTI, M. C., FELICE, F., BALBARINI, A. & DI STEFANO, R. 2011. Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Appl Biochem*, 58, 301-10.
- BARTOO, M. L., LINKE, W. A. & POLLACK, G. H. 1997. Basis of passive tension and stiffness in isolated rabbit myofibrils. *Am J Physiol*, 273, C266-76.

- BECKENDORF, L. & LINKE, W. A. 2015. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 25-36.
- BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. & FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114, 1852-66.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRENNER, B. & EISENBERG, E. 1987. The mechanism of muscle contraction. Biochemical, mechanical, and structural approaches to elucidate cross-bridge action in muscle. *Basic Res Cardiol*, 82 Suppl 2, 3-16.
- BURBAUM, L., SCHNEIDER, J., SCHOLZE, S., BOTTCHE, R. T., BAUMEISTER, W., SCHWILLE, P., PLITZKO, J. M. & JASNIN, M. 2021. Molecular-scale visualization of sarcomere contraction within native cardiomyocytes. *Nat Commun*, 12, 4086.
- BURKE, A. P. & VIRMANI, R. 2007. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am*, 91, 553-72; ix.
- CAMPBELL, S. G., LIONETTI, F. V., CAMPBELL, K. S. & MCCULLOCH, A. D. 2010. Coupling of adjacent tropomyosins enhances cross-bridge-mediated cooperative activation in a markov model of the cardiac thin filament. *Biophys J*, 98, 2254-64.
- CANTON, M., NEVEROVA, I., MENABO, R., VAN EYK, J. & DI LISA, F. 2004. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H870-7.
- CASSADY, S. J. & REED, R. M. 2019. Pulmonary Hypertension in COPD: A Case Study and Review of the Literature. *Medicina (Kaunas)*, 55.
- CHAUVEAU, C., ROWELL, J. & FERREIRO, A. 2014. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat*, 35, 1046-59.
- CHEN, R. H., CHEN, Y. H. & HUANG, T. Y. 2019. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *J Biomed Sci*, 26, 80.
- COHN, J. N. 1993. Post-MI remodeling. *Clin Cardiol*, 16, 1121-4.
- COOKE, R. 1997. Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol Rev*, 77, 671-97.
- COUCHONNAL, L. F. & ANDERSON, M. E. 2008. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*, 23, 151-9.
- DA SILVA, A. C. R. & REINACH, F. C. 1991. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 53-57.
- DASEKE, M. J., 2ND, TENKORANG, M. A. A., CHALISE, U., KONFRST, S. R. & LINDSEY, M. L. 2020. Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: Fibroblast polarization after MI. *Matrix Biol*, 91-92, 109-116.
- DAUGHERTY, A., MANNING, M. W. & CASSIS, L. A. 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*, 105, 1605-12.
- DE SOUZA LEITE, F. & RASSIER, D. E. 2020. Sarcomere Length Nonuniformity and Force Regulation in Myofibrils and Sarcomeres. *Biophys J*, 119, 2372-2377.
- DE WAHA, S., DESCH, S., EITEL, I., FUERNAU, G., LURZ, P., DE WAHA, A., SCHULER, G. & THIELE, H. 2012. What is the evidence for IABP in STEMI with and without cardiogenic shock? *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 6, 123-32.
- DOS SANTOS, L., GONCALVES, G. A., DAVEL, A. P., SANTOS, A. A., KRIEGER, J. E., ROSSONI, L. V. & TUCCI, P. J. 2013. Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. *Int J Cardiol*, 168, 3829-36.
- EHLER, E. & GAUTEL, M. 2008. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 642, 1-14.
- ELDEMIRE, R., THARP, C. A., TAYLOR, M. R. G., SBAIZERO, O. & MESTRONI, L. 2021. The Sarcomeric Spring Protein Titin: Biophysical Properties, Molecular Mechanisms, and Genetic Mutations Associated with Heart Failure and Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*, 23, 121.

- FOUAD, F. M. 1994. Cardiac function and dysfunction in hypertension. *Cleve Clin J Med*, 61, 351-5.
- FRANCIS STUART, S. D., DE JESUS, N. M., LINDSEY, M. L. & RIPPLINGER, C. M. 2016. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 91, 114-22.
- FRANK, A., BONNEY, M., BONNEY, S., WEITZEL, L., KOEPPEN, M. & ECKLE, T. 2012. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 16, 123-32.
- FUKUDA, N., GRANZIER, H. L., ISHIWATA, S. & KURIHARA, S. 2008. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci*, 58, 151-9.
- GAASCH, W. H. & ZILE, M. R. 2004. Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Annu Rev Med*, 55, 373-94.
- GAJIC, A. 2011. *Lungenüberblähung bei COPD:*

Einfluss auf die Funktion des

linken Ventrikels [Online]. PT08 ZHAW Departement G: Züricher Hochschule für angewandte Wissenschaften. Available:

[https://digitalcollection.zhaw.ch/bitstream/11475/432/1/Gajic Andreja PT08_BA08.pdf](https://digitalcollection.zhaw.ch/bitstream/11475/432/1/Gajic_Andreja_PT08_BA08.pdf) [Accessed 20.08. 2023].

- GAUTEL, M. 2011. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch*, 462, 119-34.
- GONZALEZ, A., SCHELBERT, E. B., DIEZ, J. & BUTLER, J. 2018. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol*, 71, 1696-1706.
- GORDON, A. M., HOMSHER, E. & REGNIER, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, 80, 853-924.
- GRANZIER, H. L. & LABELIT, S. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 94, 284-95.
- GRANZIER, H. L. & WANG, K. 1993. Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophysical Journal*, 65, 2141-2159.
- GRUMATI, P. & DIKIC, I. 2018. Ubiquitin signaling and autophagy. *J Biol Chem*, 293, 5404-5413.
- GRUTZNER, A., GARCIA-MANYES, S., KOTTER, S., BADILLA, C. L., FERNANDEZ, J. M. & LINKE, W. A. 2009. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, 97, 825-34.
- GUO, W., BHARMAL, S. J., ESBONA, K. & GREASER, M. L. 2010. Titin diversity--alternative splicing gone wild. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 753675.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRUGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2016. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*, 13, 193-209.
- HAYWOOD, G. A., TSAO, P. S., VON DER LEYEN, H. E., MANN, M. J., KEELING, P. J., TRINDADE, P. T., LEWIS, N. P., BYRNE, C. D., RICKENBACHER, P. R., BISHOPRIC, N. H., COOKE, J. P., MCKENNA, W. J. & FOWLER, M. B. 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*, 93, 1087-94.
- HENDERSON, C. A., GOMEZ, C. G., NOVAK, S. M., MI-MI, L. & GREGORIO, C. C. 2017. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol*, 7, 891-944.
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABELIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and

- conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- HIDALGO, C. G., CHUNG, C. S., SARIPALLI, C., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRILIS, G., LABELT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKIIdelta) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HOPF, A. E., ANDRESEN, C., KOTTER, S., ISIC, M., ULRICH, K., SAHIN, S., BONGARDT, S., ROLL, W., DROVE, F., SCHEERER, N., VANDEKERCKHOVE, L., DE KEULENAER, G. W., HAMDANI, N., LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2018. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*, 123, 342-355.
- HOROWITS, R., KEMPNER, E. S., BISHOP, M. E. & PODOLSKY, R. J. 1986. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323, 160-4.
- HU, J., KLEIN, J. D., DU, J. & WANG, X. H. 2008. Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology*, 149, 5384-90.
- HUANG, D., REFAAT, M., MOHAMMEDI, K., JAYYOUSI, A., AL SUWAIDI, J. & ABI KHALIL, C. 2017. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *Biomed Res Int*, 2017, 7839101.
- INSERTE, J., HERNANDO, V. & GARCIA-DORADO, D. 2012. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 96, 23-31.
- JACOBY, R. M. & NESTO, R. W. 1992. Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis. *J Am Coll Cardiol*, 20, 736-44.
- JAHNS, C. 2021. *Der Einfluss von Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung auf die Titin-basierte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im Großtiermodell* [Online]. Available: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-60945/Jahns,%20Celerina%20-%20Dissertation%20PDF-1b.pdf> [Accessed 17.08. 2023].
- JENCA, D., MELENOVSKY, V., STEHLIK, J., STANEK, V., KETTNER, J., KAUTZNER, J., ADAMKOVA, V. & WOHLFAHRT, P. 2021. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail*, 8, 222-237.
- JORDAN, J., KURSCHAT, C. & REUTER, H. 2018. Arterial Hypertension. *Dtsch Arztebl Int*, 115, 557-568.
- KANDASAMY, A. D., CHOW, A. K., ALI, M. A. & SCHULZ, R. 2010. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*, 85, 413-23.
- KANNEL, W. B. & MCGEE, D. L. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*, 241, 2035-8.
- KAPUR, N. K., THAYER, K. L. & ZWECK, E. 2020. Cardiogenic Shock in the Setting of Acute Myocardial Infarction. *Methodist Debaque Cardiovasc J*, 16, 16-21.
- KATAYAMA, Y., BATTISTA, M., KAO, W. M., HIDALGO, A., PEIRED, A. J., THOMAS, S. A. & FRENETTE, P. S. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124, 407-21.
- KATZ, A. M. & ZILE, M. R. 2006. New molecular mechanism in diastolic heart failure. *Circulation*, 113, 1922-5.
- KELLERMAYER, D., KISS, B., TORDAI, H., OLAH, A., GRANZIER, H. L., MERKELY, B., KELLERMAYER, M. & RADOVITS, T. 2021. Increased Expression of N2BA Titin Corresponds to More Compliant Myofibrils in Athlete's Heart. *Int J Mol Sci*, 22.
- KENTISH, J. C., MCCLOSKEY, D. T., LAYLAND, J., PALMER, S., LEIDEN, J. M., MARTIN, A. F. & SOLARO, R. J. 2001. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates

- relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res*, 88, 1059-65.
- KLONER, R. A., KING, K. S. & HARRINGTON, M. G. 2018. No-reflow phenomenon in the heart and brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315, H550-H562.
- KOLOGRIVOVA, I., SHTATOLKINA, M., SUSLOVA, T. & RYABOV, V. 2021. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol*, 12, 664457.
- KOOIJ, V., SAES, M., JAQUET, K., ZAREMBA, R., FOSTER, D. B., MURPHY, A. M., DOS REMEDIOS, C., VAN DER VELDEN, J. & STIENEN, G. J. 2010. Effect of troponin I Ser23/24 phosphorylation on Ca²⁺-sensitivity in human myocardium depends on the phosphorylation background. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 954-63.
- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*, 286, 2240-2260.
- KÖTTER, S., ANDRESEN, C. & KRUGER, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MULLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GODECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRUGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KOVACS, A., FULOP, G. A., KOVACS, A., CSIPO, T., BODI, B., PRIKSZ, D., JUHASZ, B., BEKE, L., HENDRIK, Z., MEHES, G., GRANZIER, H. L., EDES, I., FAGYAS, M., PAPP, Z., BARTA, J. & TOTH, A. 2016. Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310, H1671-82.
- KREUTZIGER, K. L., PIRODDI, N., SCELLINI, B., TESI, C., POGGESI, C. & REGNIER, M. 2008. Thin filament Ca²⁺ binding properties and regulatory unit interactions alter kinetics of tension development and relaxation in rabbit skeletal muscle. *J Physiol*, 586, 3683-700.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRUTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M. M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C. G. & LINKE, W. A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- LABEIT, S., GAUTEL, M., LAKEY, A. & TRINICK, J. 1992. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J*, 11, 1711-6.
- LABEIT, S., LAHMERS, S., BURKART, C., FONG, C., MCNABB, M., WITT, S., WITT, C., LABEIT, D. & GRANZIER, H. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol*, 362, 664-81.
- LALANDE, S., MUELLER, P. J. & CHUNG, C. S. 2017. The link between exercise and titin passive stiffness. *Exp Physiol*, 102, 1055-1066.
- LANGE, S., EHLER, E. & GAUTEL, M. 2006. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 16, 11-8.

- LANGE, S., PINOTSIS, N., AGARKOVA, I. & EHLER, E. 2020. The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867, 118440.
- LAWES, C. M. M., HOORN, S. V. & RODGERS, A. 2008. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *The Lancet*, 371, 1513-1518.
- LEE, E. J., PENG, J., RADKE, M., GOTTHARDT, M. & GRANZIER, H. L. 2010. Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 449-58.
- LEE, Y. N. & HUDA, M. S. 2021. Uncommon forms of diabetes. *Clin Med (Lond)*, 21, e337-e341.
- LEVICK, S. P. & GOLDSPINK, P. H. 2014. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev*, 19, 227-36.
- LEWINTER, M. M. & GRANZIER, H. L. 2014. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 63, 207-12.
- LI, H., LINKE, W. A., OBERHAUSER, A. F., CARRION-VAZQUEZ, M., KERKVLIT, J. G., LU, H., MARSZALEK, P. E. & FERNANDEZ, J. M. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418, 998-1002.
- LIM, C. C., ZUPPINGER, C., GUO, X., KUSTER, G. M., HELMES, M., EPPENBERGER, H. M., SUTER, T. M., LIAO, R. & SAWYER, D. B. 2004. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279, 8290-9.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2010. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*, 25, 186-98.
- LIU, X., TAKEDA, N. & DHALLA, N. S. 1996. Troponin I phosphorylation in heart homogenate from diabetic rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1316, 78-84.
- LOVIC, D., NARAYAN, P., PITTARAS, A., FASELIS, C., DOUMAS, M. & KOKKINOS, P. 2017. Left ventricular hypertrophy in athletes and hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 19, 413-417.
- LUTHER, P. & SQUIRE, J. 1978. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle M-region. *Journal of Molecular Biology*, 125, 313-324.
- LUTHER, P. K., MUNRO, P. M. G. & SQUIRE, J. M. 1981. Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. *Journal of Molecular Biology*, 151, 703-730.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MAZZOLAI, L., DUCHOSAL, M. A., KORBER, M., BOUZOURENE, K., AUBERT, J. F., HAO, H., VALLET, V., BRUNNER, H. R., NUSSBERGER, J., GABBIANI, G. & HAYOZ, D. 2004. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension*, 44, 277-82.
- MCKILLOP, D. F. & GEEVES, M. A. 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophysical Journal*, 65, 693-701.
- METHAWASIN, M. & GRANZIER, H. 2018. Softening the Stressed Giant Titin in Diabetes Mellitus. *Circ Res*, 123, 315-317.
- MOSTERD, A. & HOES, A. W. 2007. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 93, 1137-46.
- MURPHY, R. M., VERBURG, E. & LAMB, G. D. 2006. Ca²⁺ activation of diffusible and bound pools of mu-calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 576, 595-612.
- NAGUEH, S. F., SHAH, G., WU, Y., TORRE-AMIONE, G., KING, N. M., LAHMERS, S., WITT, C. C., BECKER, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 155-62.

- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- NEDER, J. A. & O'DONNELL, D. E. 2022. Right ventricular dimensions during COPD exacerbations: A matter of low preload versus high afterload? *Respirology*, 27, 7-9.
- NIEVES-CINTRON, M., AMBERG, G. C., NAVEDO, M. F., MOKKENTIN, J. D. & SANTANA, L. F. 2008. The control of Ca²⁺ influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15623-8.
- NOLAND, T. A., JR. & KUO, J. F. 1992. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin T decreases Ca(2+)-dependent actomyosin MgATPase activity and troponin T binding to tropomyosin-F-actin complex. *Biochem J*, 288 (Pt 1), 123-9.
- OBERMANN, W. M., GAUTEL, M., STEINER, F., VAN DER VEN, P. F., WEBER, K. & FURST, D. O. 1996. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134, 1441-53.
- OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., MAKARENKO, I., BENES, V. & LINKE, W. A. 2004. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 94, 967-75.
- PALMER, B. M., SWANK, D. M., MILLER, M. S., TANNER, B. C. W., MEYER, M. & LEWINTER, M. M. 2020. Enhancing diastolic function by strain-dependent detachment of cardiac myosin crossbridges. *J Gen Physiol*, 152.
- PASK, H. T., JONES, K. L., LUTHER, P. K. & SQUIRE, J. M. 1994. M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J Muscle Res Cell Motil*, 15, 633-45.
- PEET, C., IVETIC, A., BROMAGE, D. I. & SHAH, A. M. 2020. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 116, 1101-1112.
- PETERSMANN, A., MULLER-WIELAND, D., MULLER, U. A., LANDGRAF, R., NAUCK, M., FRECKMANN, G., HEINEMANN, L. & SCHLEICHER, E. 2019. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127, S1-S7.
- PETROSKI, M. D. 2008. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem*, 9 Suppl 1, S7.
- PIERNO, S., DESAPHY, J. F., LIANTONIO, A., DE LUCA, A., ZARRILLI, A., MASTROFRANCESCO, L., PROCINO, G., VALENTI, G. & CONTE CAMERINO, D. 2007. Disuse of rat muscle in vivo reduces protein kinase C activity controlling the sarcolemma chloride conductance. *J Physiol*, 584, 983-95.
- PIPER, H. 1998. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 38, 291-300.
- POLLER, W. C., NAHRENDORF, M. & SWIRSKI, F. K. 2020. Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 126, 1061-1085.
- POWERS, J. D., MALINGEN, S. A., REGNIER, M. & DANIEL, T. L. 2021. The Sliding Filament Theory Since Andrew Huxley: Multiscale and Multidisciplinary Muscle Research. *Annu Rev Biophys*, 50, 373-400.
- PRABHU, S. D. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.
- PRADO, L. G., MAKARENKO, I., ANDRESEN, C., KRUGER, M., OPITZ, C. A. & LINKE, W. A. 2005. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, 126, 461-80.
- RAZUMOVA, M. V., BUKATINA, A. E. & CAMPBELL, K. B. 2000. Different Myofilament Nearest-Neighbor Interactions Have Distinctive Effects on Contractile Behavior. *Biophysical Journal*, 78, 3120-3137.
- REINKE, J. M. & SORG, H. 2012. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, 49, 35-43.
- ROE, A. T., ARONSEN, J. M., SKARDAL, K., HAMDANI, N., LINKE, W. A., DANIELSEN, H. E., SEJERSTED, O. M., SJAASTAD, I. & LOUCH, W. E. 2017. Increased passive stiffness

- promotes diastolic dysfunction despite improved Ca²⁺ handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 113, 1161-1172.
- RUPARELIA, N., DIGBY, J. E., JEFFERSON, A., MEDWAY, D. J., NEUBAUER, S., LYGATE, C. A. & CHOUDHURY, R. P. 2013. Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflamm Res*, 62, 515-25.
- SALCAN, S., BONGARDT, S., MONTEIRO BARBOSA, D., EFIMOV, I. R., RASSAF, T., KRUGER, M. & KOTTER, S. 2020. Elastic titin properties and protein quality control in the aging heart. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867, 118532.
- SANCHEZ-HERNANDEZ, C. D., TORRES-ALARCON, L. A., GONZALEZ-CORTES, A. & PEON, A. N. 2020. Ischemia/Reperfusion Injury: Pathophysiology, Current Clinical Management, and Potential Preventive Approaches. *Mediators Inflamm*, 2020, 8405370.
- SINGH, R. K., KUMAR, S., GAUTAM, P. K., TOMAR, M. S., VERMA, P. K., SINGH, S. P., KUMAR, S. & ACHARYA, A. 2017. Protein kinase C-alpha and the regulation of diverse cell responses. *Biomol Concepts*, 8, 143-153.
- SOLARO, R. J., HENZE, M. & KOBAYASHI, T. 2013. Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks. *Circ Res*, 112, 355-66.
- SOLARO, R. J., ROSEVEAR, P. & KOBAYASHI, T. 2008. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 82-7.
- STATISTISCHES BUNDESAMT 2021. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2020.
- STIEKEMA, L. C. A., SCHNITZLER, J. G., NAHRENDORF, M. & STROES, E. S. G. 2017. The maturation of a 'neural-hematopoietic' inflammatory axis in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 28, 507-512.
- SUTTON, M., SHARPE, N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy.
- SZIKORA, S., GAJDOS, T., NOVAK, T., FARKAS, D., FOLDI, I., LENART, P., ERDELYI, M. & MIHALY, J. 2020. Nanoscopy reveals the layered organization of the sarcomeric H-zone and I-band complexes. *J Cell Biol*, 219.
- TALMAN, V. & RUSKOAHO, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 365, 563-81.
- TASKIN, E., TUNCER, K. A., GUVEN, C., KAYA, S. T. & DURSUN, N. 2016. Inhibition of Angiotensin-II Production Increases Susceptibility to Acute Ischemia/Reperfusion Arrhythmia. *Med Sci Monit*, 22, 4587-4595.
- TERRILL, J. R., RADLEY-CRABB, H. G., IWASAKI, T., LEMCKERT, F. A., ARTHUR, P. G. & GROUNDS, M. D. 2013. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*, 280, 4149-64.
- THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A., WHITE, H. D. & EXECUTIVE GROUP ON BEHALF OF THE JOINT EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY /AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY /AMERICAN HEART ASSOCIATION /WORLD HEART FEDERATION TASK FORCE FOR THE UNIVERSAL DEFINITION OF MYOCARDIAL, I. 2018. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*, 72, 2231-2264.
- TOISCHER, K., ROKITA, A. G., UNSOLD, B., ZHU, W., KARARIGAS, G., SOSSALLA, S., REUTER, S. P., BECKER, A., TEUCHER, N., SEIDLER, T., GREBE, C., PREUSS, L., GUPTA, S. N., SCHMIDT, K., LEHNART, S. E., KRUGER, M., LINKE, W. A., BACKS, J., REGITZ-ZAGROSEK, V., SCHAFER, K., FIELD, L. J., MAIER, L. S. & HASENFUSS, G. 2010. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122, 993-1003.
- TROMBITÁS, K., REDKAR, A., CENTNER, T., WU, Y., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Extensibility of Isoforms of Cardiac Titin: Variation in Contour Length of Molecular Subsegments

- Provides a Basis for Cellular Passive Stiffness Diversity. *Biophysical Journal*, 79, 3226-3234.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- VAN DER PIJL, R. J., GRANZIER, H. L. & OTTENHEIJM, C. A. C. 2019. Diaphragm contractile weakness due to reduced mechanical loading: role of titin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 317, C167-C176.
- VAN DER VALK, F. M., KUIJK, C., VERWEIJ, S. L., STIEKEMA, L. C. A., KAISER, Y., ZEERLEDER, S., NAHRENDORF, M., VOERMANS, C. & STROES, E. S. G. 2017. Increased haematopoietic activity in patients with atherosclerosis. *Eur Heart J*, 38, 425-432.
- VAN HEES, H. W., SCHELLEKENS, W. J., ANDRADE ACUNA, G. L., LINKELS, M., HAFMANS, T., OTTENHEIJM, C. A., GRANZIER, H. L., SCHEFFER, G. J., VAN DER HOEVEN, J. G., DEKHUIJZEN, P. N. & HEUNKS, L. M. 2012. Titin and diaphragm dysfunction in mechanically ventilated rats. *Intensive Care Med*, 38, 702-9.
- VESTWEBER, D., WESSEL, F. & NOTTEBAUM, A. F. 2014. Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability. *Semin Immunopathol*, 36, 177-92.
- VIKHLIANTSEV, I. M., OKUNEVA, A. D., SHUMILINA, U. V., SALMOV, N. N., BOBYLEV, A. G., MOLOCHKOV, N. V. & PODLUBNAYA, Z. A. 2013. Method for isolation of intact titin (connectin) molecules from mammalian cardiac muscle. *Biochemistry (Mosc)*, 78, 455-62.
- WALKER, L. A., WALKER, J. S., AMBLER, S. K. & BUTTRICK, P. M. 2010. Stage-specific changes in myofilament protein phosphorylation following myocardial infarction in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 1180-6.
- WALLACE, S. M., YASMIN, MCENIERY, C. M., MAKI-PETAJA, K. M., BOOTH, A. D., COCKCROFT, J. R. & WILKINSON, I. B. 2007. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension*, 50, 228-33.
- WANG, J., LIU, X., SENTEX, E., TAKEDA, N. & DHALLA, N. S. 2003. Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H2277-87.
- WANG, Y. P. & FUCHS, F. 1994. Length, force, and Ca(2+)-troponin C affinity in cardiac and slow skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266, C1077-82.
- WARREN, C. 2003. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovascular Research*, 59, 86-94.
- WARREN, C. M., KRZESINSKI, P. R. & GREASER, M. L. 2003. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis*, 24, 1695-702.
- WATANABE, K., NAIR, P., LABEIT, D., KELLERMAYER, M. S., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2002. Molecular mechanics of cardiac titin's PEVK and N2B spring elements. *J Biol Chem*, 277, 11549-58.
- WENZEL, U. O., BODE, M., KOHL, J. & EHMKE, H. 2017. A pathogenic role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312, H349-H354.
- WERDAN, K., RUß, M., BUERKE, M., ENGELMANN, L., FERRARI, M., FRIEDRICH, I., GEPPERT, A., GRAF, J., HINDRICKS, G., JANSSENS, U., PIESKE, B.M., PRONDZINSKY, R., REITH, S., TRAPPE, H.-J., ZEHENDER, M., ZERKOWSKI, H.-R., ZEYMER, U., ADAMS, H.A., BRIEGEL, J., DELLE-KARTH, G., SCHÖNDUBE, F.A., SCHWAAB, B., BODE, C., CHRISTOPH, A., ERBEL, R., FUHRMANN, J.T., STRASSER, R., FIGULLA, H.-R., GÖRGE, G., SCHMITT, D., & SCHULER, G., SILBER, R.-E., TEBBE, U., ZWIßLER, B. 2011. Deutsche-österreichische S3-Leitlinie „Infarktbedingter kardiogener Schock – Diagnose, Monitoring und Therapie“.

- WITT, C. C., BURKART, C., LABEIT, D., MCNABB, M., WU, Y., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J*, 25, 3843-55.
- XAING, M., LIU, X., ZENG, D., WANG, R. & XU, Y. 2010. Changes of protein kinase Calpha and cyclin D1 expressions in pulmonary arteries from smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 30, 159-64.
- XU, C., CRAIG, R., TOBACMAN, L., HOROWITZ, R. & LEHMAN, W. 1999. Tropomyosin Positions in Regulated Thin Filaments Revealed by Cryoelectron Microscopy. *Biophysical Journal*, 77, 985-992.
- YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357, 1121-35.
- ZILE, M. R., GAASCH, W. H., CARROLL, J. D., FELDMAN, M. D., AURIGEMMA, G. P., SCHAER, G. L., GHALI, J. K. & LIEBSON, P. R. 2001. Heart failure with a normal ejection fraction: is measurement of diastolic function necessary to make the diagnosis of diastolic heart failure? *Circulation*, 104, 779-82.

6 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte mit Angaben zum Hersteller.....	28
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Angaben zum Hersteller	29
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung.....	30
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien mit Angaben zum Hersteller.....	31
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Angaben zum Hersteller, zur Verdünnung und Quelle.....	31
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Angaben zum Hersteller, zur Verdünnung und Quelle.....	32
Tabelle 7: Rezept für verwendete SDS-PAGE-Gele (Trenn- und Sammelgel).....	37
Tabelle 8: Rezept für Titingele	38

- Abb. 1: Ätiologie des Vorderwand-Spitzeninfarkts (angelehnt an (Thygesen et al., 2018, Jahns, 2021))......**Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- Abb. 2: Myofilamentprotein im schematischen Aufbau (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).**Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Phosphorylierung der beiden elastischen Titin-Domänen N2-Bus und PEVK, sowie die dafür benötigten Kinasen, Signalwege und der humanen Phosphorylierungsstellen. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Martina Krüger).**Fehler! Textmarke nicht definiert.**3
- Abb. 4: Oxidativer Stress und seine Auswirkung auf das Riesenprotein Titin sowie auf die Titin-basierte Steifigkeit (modifiziert nach (Jahns, 2021, Beckendorf and Linke, 2015))......**Fehler! Textmarke nicht definiert.**6
- Abb. 5: Entnahmeorte des Probengewebes nach Indikation zur operativen Bypasschirurgie. Die Abbildung wurde unter Nutzung von „Servier Medical Art“, bereitgestellt von Servier, lizenziert durch eine „Creative Common Attribution 3.0 unported license“, entworfen (<https://smart.servier.com>)..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**5

Abb. 6: Titin-Isoformen Expressionsverhältnis im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	43
Abb. 7: Titin-Isoformen Degradationsverhältnis T2:T1 im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	44
Abb. 8: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser11878 der PEVK-Domäne im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts. ..	45
Abb. 9: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser4099 der N2B unique sequence im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	47
Abb. 10: Relative Titin Ubiquitinierung im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	49
Abb. 11: Analyse der Kinaseaktivität im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	50
Abb. 12: Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	52
Abb. 13: Titin-Isoformen Expressionsverhältnis im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.	53
Abb. 14: Titin-Isoformen Degradationsverhältnis T2:T1 im rechten humanen Vorhof unter Einfluss des Diabetes mellitus oder Myokardinfarkts.	54
Abb. 15: Relative Titin Phosphorylierung am Serinrest Ser11878 der PEVK-Domäne und am Serinrest Ser4099 der N2B unique sequence im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.	55
Abb. 16: Relative Titin Ubiquitinierung im rechten humanen Vorhof unter Einfluss der arteriellen Hypertonie.	56
Abb. 17: Analyse der Kinaseaktivität im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss der Komorbiditäten COPD oder arteriellen Hypertonie.	57
Abb. 18: Analyse der relativen Troponin I Phosphorylierung im Herzgewebe des rechten humanen Vorhofs unter Einfluss der Komorbiditäten COPD oder arterielle Hypertonie.	58

Danksagung

Meinen ersten und größten Dank möchte ich an Prof. Martina Krüger richten. Du hast mich nicht nur beim experimentellen Arbeiten und im Schreibprozess betreut, sondern darüber hinaus sehr viel während meines Studiums möglich gemacht. Egal ob ich ein kleineres Problem hatte oder dringend deine Hilfe brauchte, du warst immer ansprechbar und hast in Sekundenschnelle eine Antwort gefunden. Ein riesiges Danke geht an dich, deine sehr detaillierten Korrekturen und die Wege, die du mir ermöglicht hast.

Ebenso danke ich meinem Co-Betreuer Herr Prof. Joachim Schmitt für seine einfließenden Gedanken bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Auch der restlichen AG-Krüger gilt mein Dank. Egal ob ich in den frühesten Morgenstunden mit Sabine im Labor stand oder Sebastian am späten Nachmittag mit Fragen löcherte, die Arbeit hat immer Spaß gemacht. Zur AG gehört natürlich auch Kathie, der ich nicht nur für die viele Hilfe und die tolle Zeit danken möchte, sondern auch für die Freundschaft, die sich in der schönen Zusammenarbeit entwickelt hat. Nie vergesse ich meinen ersten Triathlon, den ich dank dir absolviert habe!

Natürlich gilt ein weiterer Dank dem gesamten Institut, für die Möglichkeit der Promotion in einem solch atemberaubendem Fach.

Ebenfalls danke ich dem Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums in Essen, ohne die eine Arbeit an menschlichen Herzproben nicht möglich gewesen wäre.

Der zweitgrößte Dank gilt meinen Großeltern, Hartmut und Monika. Auch wenn ihr mich nicht bis zum Promotionserhalt unterstützen konntet, so werde ich nie vergessen, dass ich ohne eure Hilfe nie so weit gekommen wäre. Familiär möchte ich zusätzlich noch meiner Mutter, meiner Cousine Zarah, meiner Tante Micky und meinem Onkel René danken, die mich alle mit breitem Interesse unterstützt haben und mir immer wieder Mut zusprachen.

Abschließend möchte ich meinen langjährigen Freunden namentlich danken, die nicht nur während dieser Arbeit oder des Studiums, sondern bereits mein gesamtes Leben an meiner Seite sind: Lars, Justin, Marc, Lucas, Kevin, Maik, Sven, Basti, Lucca, Eugen, Bartosch, Nils, René.