

**Veränderungen der elastischen
Titineigenschaften in alternden Herzen sowie
die Beteiligung von Protein-
Qualitätskontrollmechanismen am *Turnover*
des Titins**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Senem Salcan (geb. Sahin)

aus Zonguldak, Türkei

Bochum, September 2018

aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Martina Krüger

Korreferent: Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2018

Meinem Mann und meiner Schwester

„Naturwissenschaft ohne Religion ist lahm,
die Religion ohne Naturwissenschaft ist blind.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Anatomie des Herzens	1
1.2 Arbeitsdiagramm des Herzens	2
1.2.1 Der Aufbau des Sarkomers	3
1.3 Frank-Starling-Mechanismus	4
1.3.1 Der Aufbau des Mechanosensors Titin	6
1.3.2 Modulation der passiven Steifigkeit von Kardiomyozyten durch Titin	9
1.4 Protein-Qualitätskontroll-Systeme im Herzen	13
1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	13
1.4.2 Calpain-System	16
1.4.3 Autophagie-System	16
1.5 Veränderungen im alternden Herz	20
1.6 Kennzeichen des alternden Herzen in Kardiomyopathien	22
1.7 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits	24
2.1.2 Antikörper	24
2.1.3 Geräte	26
2.1.4 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten	27
2.1.5 Kits	28
2.1.6 Primer	28

2.1.7	Puffer und Lösungen.....	30
2.2	Gewebe Modelle.....	32
2.2.1	Humane Donorherzen.....	32
2.2.2	Mäuseherzen	33
2.2.3	Wistar Ratten	34
2.3	Methoden	34
2.3.1	Zellkulturmethoden	34
2.3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.3.3	Bestimmung der passiven Spannung einzelner Kardiomyozyten	38
2.3.4	Molekularbiologische Methoden.....	40
2.4	Software	41
2.5	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Untersuchung des Titin Abbaus über das Autophagie-System in kultivierten embryonalen Rattenkardiomyozyten.....	42
3.1.1	Inhibition und Aktivierung der Autophagie.....	42
3.1.2	Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten.....	48
3.1.3	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem proteasomalen und dem autolysosomalen Proteinabbauweg.....	49
3.2	Veränderungen der elastischen Titin Eigenschaften im Alterungsprozess und die Beteiligung des Protein-Qualitätskontrollsystems am Titin Abbau	53
3.2.1	Titin Isoformen Zusammensetzung im alternden Herzen.....	53
3.2.2	Phosphorylierung der elastischen I-Bandendomäne des Titins im alternden Herzen	54
3.2.3	Die Titin-abhängige passive Steifigkeit von Kardiomyozyten im Alterungsprozess.....	59
3.2.4	Genexpression extrazellulärer Matrixproteine im alternden Herzen.....	59

3.2.5	Die Regulation des UPS und des Calpain-Systems im alternden Herzen	60
3.2.6	Autophagie im alternden Herzen.....	63
4	Diskussion.....	66
4.1	Der Einfluss der Autophagie Inhibition und Aktivierung auf das Titinfilament	66
4.2	Die Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten	67
4.3	Der Effekt der Wechselwirkung zwischen der Autophagie und dem proteasomalen Abbauweg auf den Titin Abbau	68
4.4	Zusammenfassung und Fazit Teil I.....	69
4.5	Der Alterungsprozess hat keinen Einfluss auf die Isoformen Zusammensetzung von Titin	69
4.6	Die Modifikation der Titin Phosphorylierung im Alter führt nicht zu Änderungen der passiven Myozytensteifigkeit	71
4.7	Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist im Alter verändert.....	73
4.8	Die Regulation der Protein-Qualitätskontrolle in alternden Herzen	75
4.9	Autophagie im alternden Herzen	77
4.10	Zusammenfassung und Fazit zu Teil 2.....	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Summary.....	81
	Literaturverzeichnis	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Herzens.....	1
Abbildung 2: Arbeitsdiagramm des Herzens.....	3
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Sarkomers	4
Abbildung 4: Schematischer Querschnitt durch den gestreiften Muskel	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung der I-Bandendomänenstruktur der beiden kardialen Titin Isoformen	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rolle des Titins bei der Modulation des Interfilamentgitterabstandes.	8
Abbildung 7: Titinphosphorylierungen an N2-Bus und PEVK und zugehörige Kinase-Signalwege.....	10
Abbildung 8: Der Effekt von Phosphorylierungen am N2B und PEVK Titin Segment auf die Titin-basierte Steifigkeit.	12
Abbildung 9: Aufbau des 26S Proteasoms. Das Proteasom besteht aus zwei regulatorischen 19S und einer zentralen katalytischen 20S Untereinheit.....	14
Abbildung 10: Schematischer Ablauf der proteasomalen Proteindegradation	15
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Autophagie	17
Abbildung 12: Altersbedingte Veränderungen im Herzen.....	22
Abbildung 13: Zeitachse des Versuchsverlaufs	35
Abbildung 14: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC.....	43
Abbildung 15: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC.....	44
Abbildung 16: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC.....	46
Abbildung 17: Bestimmung des Titin Isoformen Verhältnisses und des T2/T1 Verhältnisses in embryonalen Rattenkardiomyozyten.....	47
Abbildung 18: Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC).....	49
Abbildung 19: Wechselwirkung zwischen der Autophagie und dem Ubiquitin-Proteasom-System.	51
Abbildung 20: Lokalisation von Ubiquitinmolekülen in ERC.....	52

Abbildung 21: Schematischer Überblick der Regulation der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems	53
Abbildung 22: Titin Isoformen Zusammensetzung in humanen und Maus Herzgewebe (N2BA+N2B=100%)..	54
Abbildung 23: Ergebnisse der Detektion der Titin- Phosphorylierung und Kinase-Aktivität in humanen Herzgewebe	56
Abbildung 24: Ergebnisse der Detektion der Titin- und Kinase-Phosphorylierung in alterndem Mäuseherzgewebe mittels Western Blot	58
Abbildung 25: Passive Spannung gehäuteter Kardiomyozyten aus humanen- und Maus Herzgewebe.....	59
Abbildung 26: Genexpressionsanalyse extrazellulärer Matrixproteine	60
Abbildung 27: Analyse der Regulation des Ubiquitin-Proteasom und des Calpain-Systems im alternden Herzen und ihrer Beteiligung an der Titin Degradation ..	62
Abbildung 28: Genexpressionsanalyse von E3-Ligasen in humanen und Mäuseherzgewebe	63
Abbildung 29: Analyse der Regulation des autophagosomalen Abbausystems im alternden Herzen und ihrer Beteiligung am Titin Abbau	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Titin.....	24
Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper.....	25
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte.....	26
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.....	27
Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Kits.....	28
Tabelle 7: Verwendete <i>SYBR GREEN</i> Primer für die qRT-PCR.....	28
Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 9: Baseline Eigenschaften und Hämodynamik der Herz-Spender.....	32
Tabelle 10: Pipettierschema für zwei Titingele (2,1%ig).....	36
Tabelle 11: Pipettierschema für zwei Polyacrylamidgele.....	37
Tabelle 12: Pipettierschema für einen RT-PCR Ansatz.....	40
Tabelle 13: Thermoprofil für eine SYBR-Green-PCR.....	41

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosintri-phosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CQ	Chloroquine
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERC	<i>Embryonic rat cardiomyocytes</i>
Erk1/2	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2
et al.	et alii. (und andere)
FBS	Fötales Kälberserum
FBX32	<i>F-box protein 32</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GST	Gluthation-S-Transferase
I-Band	isotropes Band
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Broth
LV	linker Ventrikel
m	Milli
M	Molar/Mol
mA	Milliampère
MAP-Kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
M-Linie	mittleres Band
MDa	Megadalton
MET	Metformin
Mg	Magnesium
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuRF	<i>Muscle-specific RING Finger E3-Ligase</i>
n	Anzahl an unabhängigen Experimenten
N2-Bus	<i>N2-B unique sequence</i>
nbr1	<i>Neighbor-of-BRCA1-gene-1</i>
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p62/SQSTM1	Sequestosome-1
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C
PKG	Protein-Kinase G
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
S	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
<i>us</i>	<i>unique sequence</i>
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
WB	Western Blot
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Die Anatomie des Herzens

Das menschliche Herz ist funktionell betrachtet ein Hohlmuskel, es sitzt hinter dem Sternum im Brustkorb. Das Herz besteht aus vier Kammern, dem linken und dem rechten Ventrikel sowie den dazu gehörigen Atrien (Vorhöfen, Abb. 1). Durch Kontraktion und Entspannung der Herzmuskulatur wird Blut in zwei Kreisläufen durch den Körper gepumpt, den kleineren Lungenkreislauf und den größeren Körperkreislauf. Die obere und untere Hohlvene münden in das rechte Atrium, von hier aus wird das Blut über die Trikuspidalklappen in den rechten Ventrikel geleitet und durch Kontraktion des rechten Ventrikels in den Lungenkreislauf gepumpt. Nach Sauerstoffanreicherung gelangt das Blut über die Lungenvenen in das linke Atrium und schließlich in den durch die Mitralklappen vom Atrium abgegrenzte linken Ventrikel. Aus dem linken Ventrikel wird das Blut durch kräftige Kontraktionsbewegungen durch die Aortenklappen in die Aorta und weiter in den Körperkreislauf gepumpt (Abb. 1, weiße Pfeile). Die Herzwand, Myokard genannt, wird überwiegend aus Muskelgewebe gebildet. Dabei wird zwischen dem Endokard (innen) und Epikard (außen) unterschieden. Der Herzbeutel, Perikard genannt, umschließt den größten Teil des Herzens.

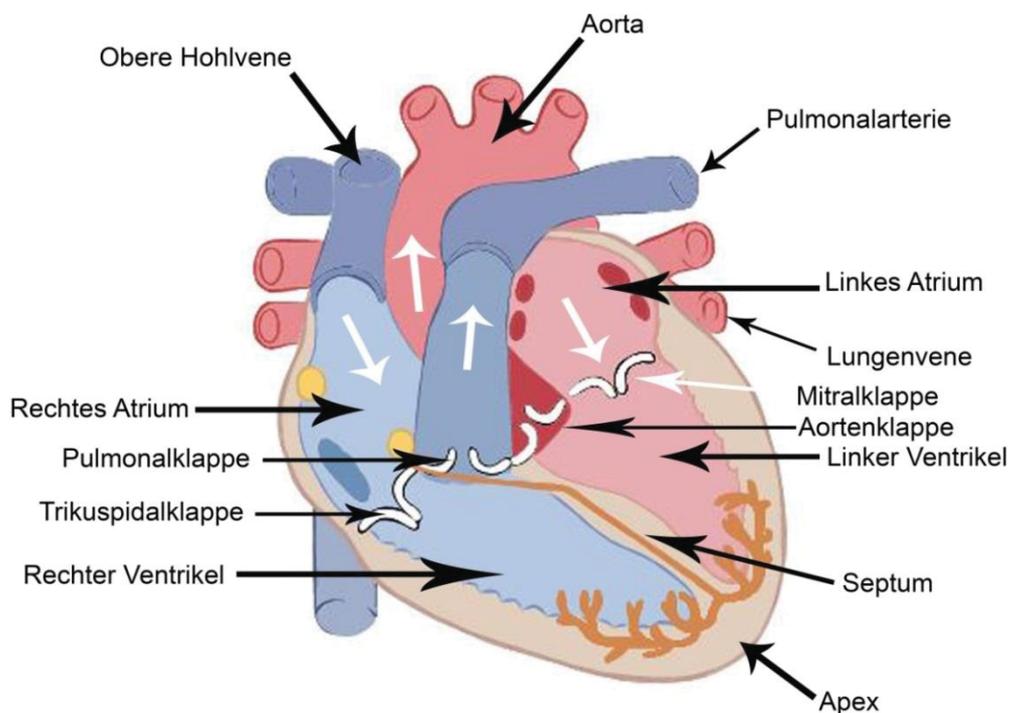


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Herzens. Das Herz besteht aus vier Kammern, den beiden Atrien und den beiden Ventrikeln. Das Blut fließt von den beiden Atrien in die jeweiligen Ventrikel und wird durch Kontraktionsbewegungen des Herzmuskels in die großen und kleinen Körperkreisläufe gepumpt.

1.2 Arbeitsdiagramm des Herzens

Mit dem Schluss der Mitralklappe und der isovolumetrischen Anspannungsphase des Ventrikels beginnt die Systole. Während dieser Phase ist die Aortenklappe geschlossen. Dies führt zum isovolumetrischen Anstieg des Ventrikeldrucks über den Vorhofdruck. Somit kann es zu keinem Blutrückfluss aus dem Ventrikel in das Atrium kommen. Der Ventrikeldruck ist hierbei zunächst geringer als der Aortendruck, mit dem Überschreiten des diastolischen Drucks in der Aorta beginnt schließlich die Austreibungsphase. In der Austreibungsphase fließt das Blut durch die einzige Öffnung über den linksventrikulären Ausflusstrakt und über die Aorta hin zur Hauptschlagader. Das führt zum Anstieg des Aortendrucks. Das Auswurfvolumen wird Schlagvolumen (SV) genannt. Nur ca. 60 – 75% des gesamten Füllungsvolumens (enddiastolisches Volumen, EDV) werden ausgeworfen (Klinke et al., 2005). Das zurückbleibende Volumen ist das endsystolische Volumen (ESV). Als Ejektionsfraktion (EF) wird der ausgeworfene Anteil bezeichnet ($EF = \frac{EDV - ESV}{EDV}$) (Boron, 2005). Während der Ventrikelsystole wird Blut in die Vorhöfe gepumpt (Levick, 1998). Sobald der ventrikuläre Druck unter den aortalen Druck fällt, schließt sich die Aortenklappe. Somit beginnt die isovolumetrische Entspannungsphase, die Taschen- und auch die Atrioventrikularklappen sind dabei geschlossen. Wenn der Kammerdruck weiter auf Werte unterhalb derer im Vorhof sinkt, öffnet sich die Mitralklappe und die Füllungsphase beginnt. Das Blut fließt vom Vorhof in den Ventrikel. In den Pulmonalvenen herrscht dabei ein minimal höherer Druck als im Atrium, wodurch das Blut in das Atrium fließt. Nun wird entlang des Druckgradienten der Vorhof und über die weit geöffnete Mitralklappe auch der Ventrikel befüllt, sodass langsam der linksventrikuläre Druck ansteigt. Enddiastolisch kontrahiert der Vorhof, dadurch wird zusätzliches Volumen in den Ventrikel gepumpt. Sobald der ventrikuläre Druck den atrialen überschreitet, wird die Mitralklappe geschlossen, wodurch wieder die Anspannungsphase beginnt. Die Druckwerte im linken Ventrikel gegen die Volumenwerte zum jeweils gleichen Zeitpunkt des Herzzyklus ergeben das Arbeitsdiagramm des Herzens. In diesem Druck-Volumen-Diagramm wird die Beziehung zwischen dem ventrikulären Druck und dem ventrikulären Volumen während jeder Phase des Herzzyklus beschrieben (Boron, 2005). In Abb. 2 ist eine Druck-Volumen-Schleife eines gesunden Herzens beispielhaft dargestellt. Ein Umlauf der Schleife repräsentiert einen Herzzyklus.

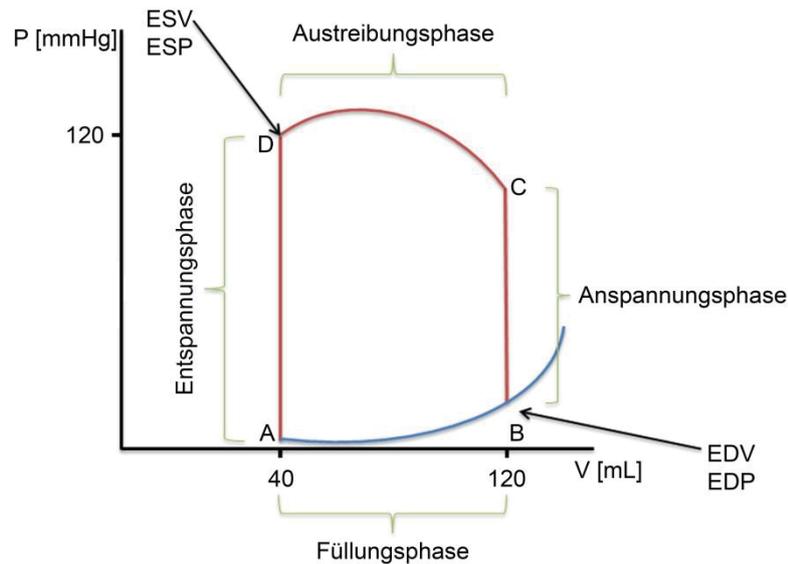


Abbildung 2: Arbeitsdiagramm des Herzens. ESV: Endsystolisches Volumen, ESP: Endsystolischer Druck, EDV: Enddiastolisches Volumen, EDP: Enddiastolischer Druck. Druck (P), Volumen (V).

1.2.1 Der Aufbau des Sarkomers

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit in quergestreiften Muskelzellen. Es kann unterteilt werden in die Z-Scheibe, das isotrope Band (I-Band) und das anisotrope Band (A-Band) sowie in die M-Linie in der Mitte des Sarkomers. Drei Myofilamentsysteme durchspannen das Sarkomer: die dünnen (Aktin) Filamente, die dicken (Myosin) Filamenten und die Titinfilamente (Abb.3).

Die Z-Scheiben sind verantwortlich für die laterale Begrenzung des Sarkomers und für die Verankerung der Aktin- und Myosinfilamente (Pyle und Solaro, 2004). Ferner stellen die Z-Scheiben ein *Hotspot* für Signaltransduktionen dar (Pyle und Solaro, 2004) und verbinden aneinander grenzende Sarkomere. Die rigide Struktur der Z-Scheibe lässt vermuten, dass sie auch als Kraftsensor dienen könnte (Völkel und Linke, 2011). Das I-Band erhielt seinen Namen aufgrund seiner physikalischen Lichtbrechungseigenschaften im Lichtmikroskop (isotrop = nicht doppelbrechende Band). Abhängig von der Sarkomerkontraktion oder -dehnung, wird das I-Band schmaler oder breiter. Das A-Band erscheint unter dem Lichtmikroskop doppelt lichtbrechend, anisotrop und erscheint dunkel im polarisierten Licht. Die M-Linie in der Mitte des Sarkomers ist in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als ein Bereich paralleler, elektronendichter Linien erkennbar (Agarkova und Perriard, 2005). Sowohl die Myosinfilamente, als auch die Titinfilamente sind in der M-Bande verankert.

Aufbau eines Sarkomers

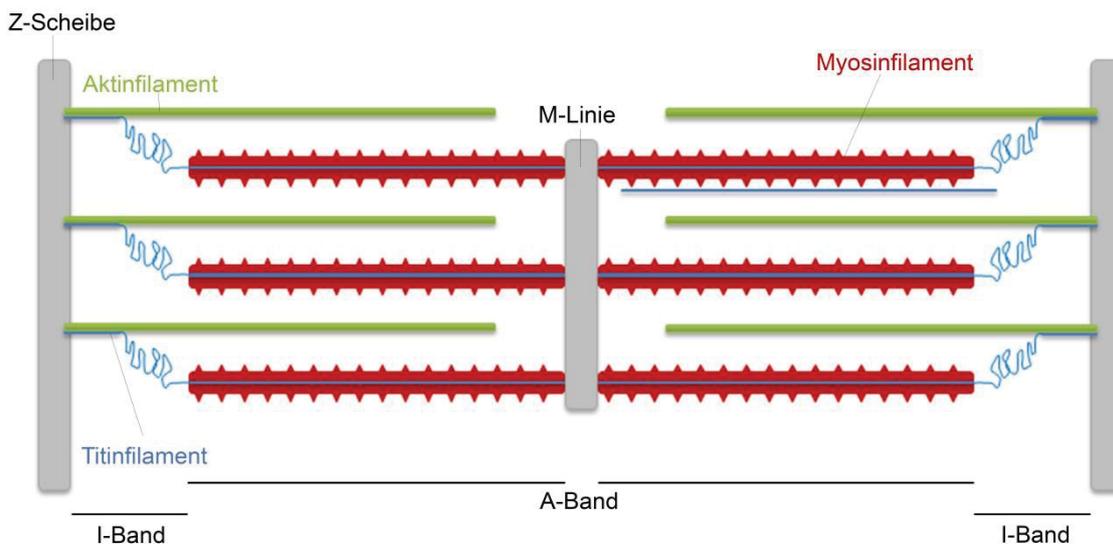


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. Durch das Ineinandergleiten bewirken die Myosin- und Aktinfilamente eine Verkürzung des Sarkomers. Ein einzelnes Titinfilament durchspannt das Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. A-Band (anisotropes Band), I-Band (isotropes Band), M-Linie (mediane Verdichtung der Myosinfilamente), Z-Scheibe (laterale Begrenzung des Sarkomers und Aufhängeapparat für Aktin- und Titinfilamente).

1.3 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus ist eine intrinsische Eigenschaft aller Wirbeltierherzen. Sowohl im adulten als auch im embryonalen Myokard wird dieser Mechanismus beobachtet (Asnes et al., 2006). Das Herz muss in der Lage sein, sein Kontraktionsverhalten und somit auch ihre Auswurfleistung den unterschiedlichen Anforderungen des Organismus anpassen zu können. Hierbei spielt der Frank-Starling-Mechanismus eine große Rolle. Otto Frank beschrieb 1895, dass „die Spannungsentwicklung des Herzmuskels entscheidend von seiner Vordehnung abhängig ist“ (Klinke et al., 2005). Ernest Starling entwickelte diese Erkenntnis zu Beginn des 20. Jahrhunderts weiter, sodass nun vom Frank-Starling-Mechanismus“ die Rede ist. Alan Burton beschrieb den Mechanismus simpel mit „*What goes in, must come out*“ (Levik, 1998). Bei erhöhtem Füllungsdruck, steigt die Vorlast (*Preload*, Dehnung der linksventrikulären Wand) des Ventrikels. Dadurch wird Punkt B aus dem Arbeitsdiagramm des Herzens (Abb. 2) nach rechts verschoben. Das hat zur Folge, dass das enddiastolische Volumen zunimmt bei gleichzeitigem Anstieg des enddiastolischen Drucks sowie der Wandspannung des Ventrikels. Zu erklären ist diese Entwicklung zum einen über die Sarkomerlängen-Spannungsbeziehung der dicken (Myosin) und der dünnen (Aktin) Myofilamentüberlappung (Gordon et al.,

1966). Der Grad der Myofilamentüberlappung im Sarkomer bestimmt dabei die Menge an möglichen Aktin-Myosin-Querbrücken und das Potential zur Muskelverkürzung. Ausgehend von einer Ruhesarkomerlänge von $1,9\ \mu\text{m}$ nimmt die Filamentüberlappung bei Dehnung progressiv ab. Ein optimaler Überlappungsgrad von Aktin und Myosin ist im Herzen bei Sarkomerlängen zwischen $2,0$ bis $2,2\ \mu\text{m}$ erreicht und ermöglicht maximale Ca^{2+} -abhängige Kontraktion. Wird das Sarkomer weiter gedehnt, sinkt die Spannung wieder, da die Myofilamentüberlappung zu gering für eine ausreichende Anzahl an Querbrücken wird (Abb. 4).

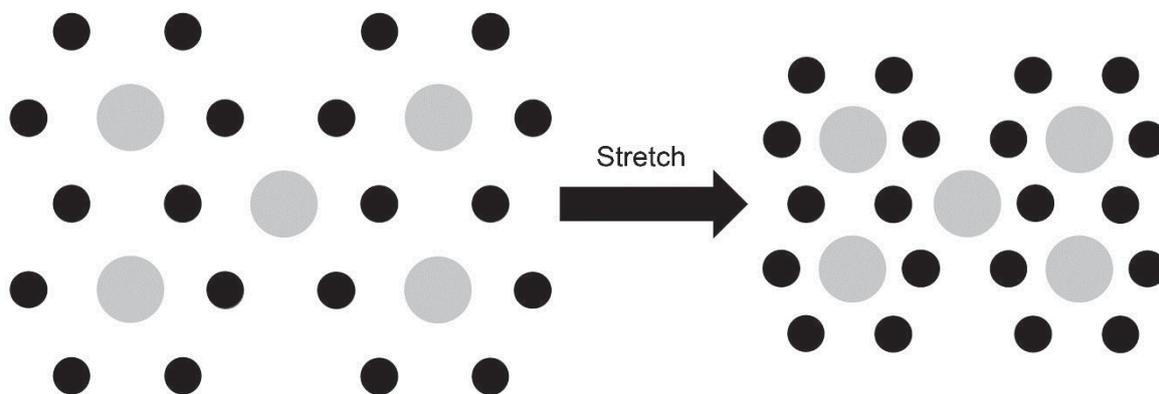


Abbildung 4: Schematischer Querschnitt durch den gestreiften Muskel. Zu sehen ist der Effekt der Sarkomerdehnung auf den Gitterabstand der Myofilamente. Hellgraue Kreise repräsentieren dicke (Myosin) Filamente und schwarze Kreise repräsentieren dünne (Aktin) Filamente.

Auch die dehnungsabhängige Empfindlichkeitszunahme der Myofilaments für Ca^{2+} -Ionen spielt eine wichtige Rolle bei dem Frank-Starling-Mechanismus (Klinke et al., 2005). Ausgelöst durch ein Aktionspotential im Herzmuskel wird Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Dies führt vorübergehend zu einem Anstieg und schließlich zum Abfall der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Als Reaktion auf diesen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten erfolgt eine Kontraktion des Muskels. Wird der Muskel dabei gestreckt, kommt es zu einem sofortigen Anstieg der Kontraktionskraft. Es wurde allerdings gezeigt, dass dieser rasche Effekt nicht mit dem Größenanstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten zusammenhängt (Allen und Kurihara, 1982). Vielmehr scheint eine längenabhängige Zunahme der Kontraktilität des Herzmuskels mit einer längenabhängigen Zunahme der myofibrillären Ca^{2+} -Empfindlichkeit vorzuliegen. In Abwesenheit von Ca^{2+} verhindert das dünne Filamentprotein Tropomyosin die Bindung von Aktin und Myosin. Das Troponinkomplex, der Troponin T (TnT; Tropomyosin-Bindung), Troponin C (TnC; Ca^{2+} -Bindung) und Troponin I (TnI; inhibitorisch) enthält, ist an Troponinmyosin assoziiert. Wenn Ca^{2+} an TnC bindet, erlaubt seine größere Wechselwirkung mit TnI,

dass sich Tropomyosin teilweise in eine Rille entlang des dünnen Aktinfilaments bewegt, wodurch die Myosinköpfe schwache und starke Querbrücken mit Aktin bilden können. Wenn sich eine stark bindende Querbrücke bildet, erzeugt sie Spannung, verschiebt aber auch das Tropomyosinmolekül weiter in die Aktinrille, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein benachbarter Myosinkopf eine Querbrücke bildet (Fitzsimons et al., 1998). Starke bindende Querbrücken induzieren auch eine kooperative Aktivierung von Aktin, indem sie die scheinbare Affinität von TnC für Ca^{2+} erhöhen (Gordon und Ridgway, 1993), was auf eine Kopplung zwischen den Ca^{2+} -Regulierungsstellen auf TnC und Querbrückeninteraktionen im dünnen Filament hinweist (Fukuda und Granzier, 2005). Auch die passive Spannung des Herzmuskels spielt eine Schlüsselrolle im Frank-Starling-Mechanismus, da sie eine kritische Determinante der ventrikulären Füllung darstellt. Das liegt daran, dass die passive Spannung Widerstand gegen die ventrikuläre Füllung bietet. Bei einer gegebenen Ventrikelgröße bedeutet eine größere passive Spannung, dass das Myokard weniger dehnbar und somit schwerer zu füllen ist. Die wichtigste Determinante der passiven Spannung bei Sarkomerlängen zwischen 1,9 – 2,4 μm ist das elastische Protein Titin (Wu et al., 2000), welches im Folgenden detailliert erklärt wird.

1.3.1 Der Aufbau des Mechanosensors Titin

Titin ist das größte bekannte Protein im menschlichen Körper. Es durchspannt das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Abb. 3) (Fürst et al., 1988). Titin ist modular aufgebaut und setzt sich aus mehreren aneinander gereihten Ig-Domänen zusammen. Die gesamte Aminosäuresequenz des Titins wird im Menschen von einem einzigen Gen (*TTN*) kodiert, das aus 363 Exons besteht. Durch alternatives Spleißen werden im Herzen die lange und elastische N2BA (ca. 3,2 – 3,3 MDa) sowie die kürzere und steifere N2B (ca. 3,0 MDa) Titin Isoform koexprimiert (Bang et al., 2001).

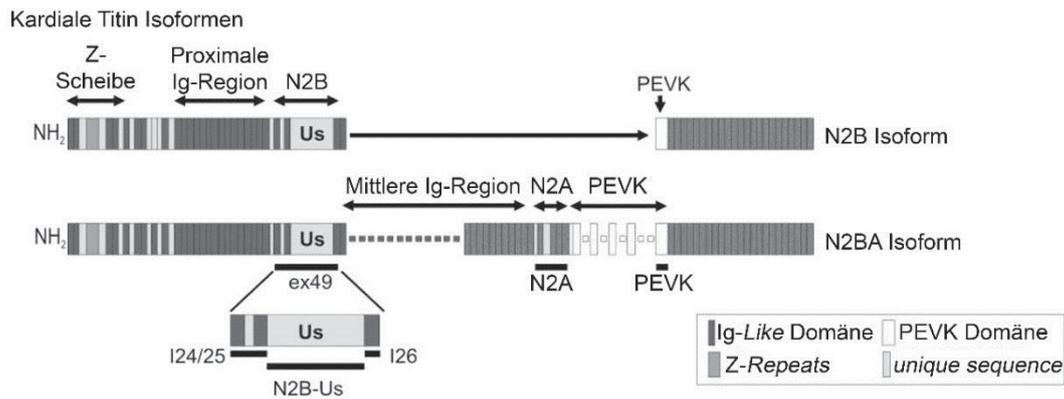


Abbildung 5: Schematische Darstellung der I-Bandendomänenstruktur der beiden kardialen Titin Isoformen. I = Ig-Domäne; NH₂ = N-Terminus; COOH = C-Terminus. Modifiziert nach Krüger et al., 2009.

Die beiden Titin Isoformen, N2B und N2BA, unterscheiden sich hauptsächlich in der I-Bandenregion (800 kDa - 1,5 MDa). Diese Region besteht aus proximalen (Ig10 - Ig20), mittleren (Ig24 - Ig76, alternativ gespleißt) und distalen (Ig80 - Ig95) Ig-Domänen (Freiburg et al., 2000). Außerdem unterscheiden sich die beiden Isoformen in der Länge ihrer Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) reichen Region (PEVK) (Abb. 5). Während die PEVK-Region in der N2B-Isoform relativ kurz ist, ist sie in der N2BA-Isoform deutlich länger (Greaser et al., 2002). Die N2BA-Isoform enthält zusätzlich die mittlere Ig-Domänenregion mit einer variablen Länge (Lahmers et al., 2004). Ein weiterer Unterschied zwischen der N2B- und N2BA-Isoform ist das in der N2BA-Isoform vorkommende N2A-Element (Bang et al., 2001). Durch die zusätzlichen Ig-Domänen (mittleres Ig-Domänensegment), das längere PEVK-Segment und die Expression des N2A-Elements ist die N2BA-Isoform deutlich größer und elastischer als die N2B-Isoform, insbesondere während der Diastole (Bang et al., 2001). Die N2B- und die N2BA-Isoformen des Titins enthalten zudem die herzspezifische N2B Domäne, inklusive der N2B *unique sequence* (N2-Bus) (Linke et al., 1999). Bei Dehnung des Sarkomers während der Diastole werden zunächst die *linker sequences* in den proximalen und distalen Ig-Domänen-Regionen gestreckt (Linke et al., 1999). Bei weiterer Dehnung extendieren die PEVK- und die N2-Bus-Region. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der passiven Spannung des Sarkomers und es entsteht eine Rückstellkraft wie bei einer Feder (Linke et al., 1999). Die I-Bandenregion des Titins übt demnach eine Federfunktion aus, welche die Elastizität des Sarkomers entscheidend mitbestimmt (Linke und Granzier, 1998). Im A-Bandsegment des Titins liegen sowohl Ig- als auch sogenannte Fibronectin-Typ-III (FNIII)-Domänen. Diese sind gekennzeichnet durch zwei Arten von *Super-*

Repeats: ein 7-Domänen-*Super-Repeat*, das sechsmal vorkommt (Ig97-Ig108/FNIII12-FNIII41) sowie ein 11-Domänen-*Super-Repeat*, welches 11-mal vorliegt (Ig109-Ig139/FNIII42-FNIII129). An die M-Bandenregion grenzt die Titinkinase Domäne (Gautel, 2011). Die M-Bandenregion besteht aus 10 Ig Domänen (Ig143-Ig152), die mit *us* durchsetzt sind. Die M-Bande ist ein *Hotspot* für Protein-Protein Interaktionen.

Eine der Hauptaufgaben des Titins ist seine viskoelastische Kraftentwicklung im Sarkomer (Gautel, 2011). Außerdem sorgt Titin für einen optimalen Wirkungsgrad, indem es die dicken Myofilamente im Sarkomer zentriert. Titin dient ferner als Vorlage für die Sarkomerassemblierung, da es eines der ersten Proteine ist, das in das Sarkomer eingebaut wird. Darüber hinaus ist Titin über seine Z-Scheibe an zahlreichen Signalkaskaden beteiligt. Ferner ist Titin ein entscheidender Faktor für die längenabhängige Aktivierung des kontraktile Apparates, der dem Frank-Starling-Gesetz zugrunde liegt, deren zugrunde liegenden Mechanismen bislang jedoch nur unvollständig verstanden sind. Der Grad der Sarkomerdehnung während der Ventrikelfüllung wird dabei wegen seiner elastischen Eigenschaften von Titin mitbestimmt. In Abb. 6 ist zu sehen, dass es durch eine starke Vordehnung zu einem reduzierten Interfilamentabstand im Sarkomer kommt.

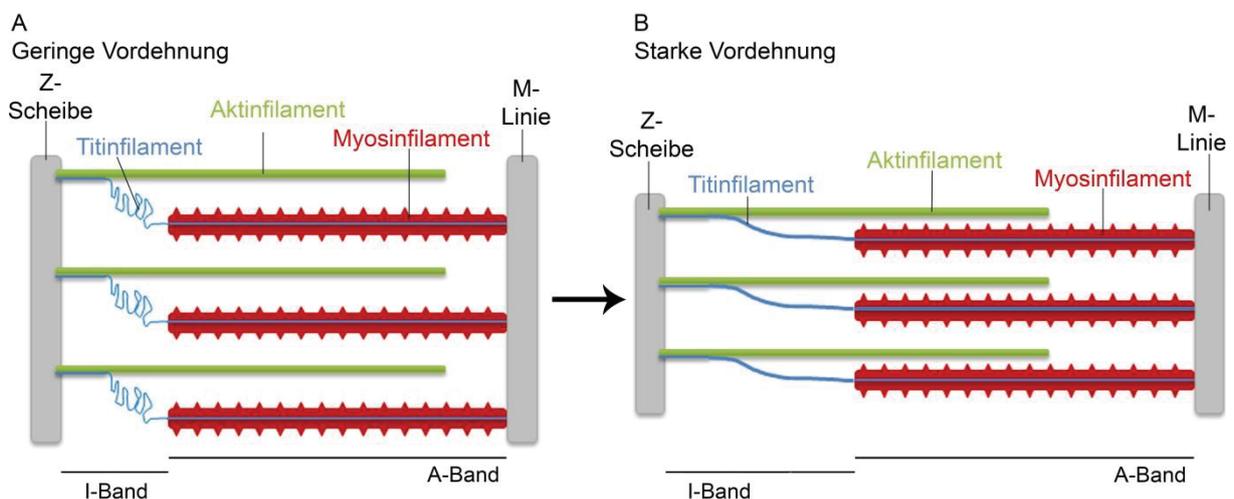


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rolle des Titins bei der Modulation des Interfilamentgitterabstandes.

1.3.2 Modulation der passiven Steifigkeit von Kardiomyozyten durch Titin

1.3.2.1.1 Modulation der passiven Steifigkeit durch Veränderung der Titin Isoformenkomposition

Ein bedeutender Modulator der passiven Spannung im Myokard in Kardiomyozyten ist der Titin Isoformenwechsel. Durch Variation des Isoformen Verhältnisses von Titin kann sich das Herz an zunehmende Belastungen anpassen. Beispielsweise ist der Anteil der N2BA-Isoform in adulten Nagern relativ gering, wohingegen ihr Anteil in größeren Säugetieren erhöht ist. Daher ist das Myokard von Nagern steifer, als das größerer Säugetiere (Cazarola et al., 2000). Durch die Variation der Myokardsteifigkeit kann Einfluss auf die Ventrikelfüllung genommen werden. Eine niedrige Myokardsteifigkeit ermöglicht schnellere Ventrikelfüllung und führt folglich dazu, dass höhere EDV bei einem konstanten Füllungsdruck erreicht werden (Cazarola et al., 2000). Daher kann das Titin Isoformenverhältnis verschiedener Spezies in Relation mit der Füllungsrate und des Füllvolumens des Herzens in Beziehung gesetzt werden und wird somit entwicklungspezifisch geregelt (Cazarola et al., 2000). Im pränatalen Herz wird zunächst die fötale N2BA-Isoform (~3,7MDa) exprimiert (Opitz et al., 2004). Im Zuge der perinatalen Entwicklung wird diese Isoform durch die wesentlich kleinere und dadurch weniger elastische N2BA und N2B-Isoform des Titins ersetzt. Durch diesen Isoformen Wechsel findet ein gradueller Anstieg der passiven Kardiomyozytensteifigkeit statt (Opitz et al., 2004), weshalb adulte Kardiomyozyten steifer sind als fetale. In gesunden, adulten humanen Herzen beträgt das N2BA:N2B Verhältnis ca. 35:65 (Neagoe et al., 2002). Aufgrund der großen Elastizitätsunterschiede der Isoformen führen selbst kleine Verschiebungen im Expressionsverhältnis der Titin Isoformen zu signifikanten Veränderungen in der passiven Spannung.

1.3.2.1.2 Modulation der passiven Steifigkeit durch Phosphorylierung von Titin

Titin kann durch eine Vielzahl von Proteinkinasen phosphoryliert werden. Durch die Bindung von Katecholaminen an den G-Protein gekoppelten β -adrenergen Rezeptor (β AR) wird die Adenylzyklase (AC) aktiviert. Sie wandelt Adenosintri-phosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonosphat (cAMP) um (Abb. 7). Der *second messenger* cAMP aktiviert daraufhin die Protein Kinase A (PKA), die schließlich das

humane Titin am N2B Segment phosphoryliert. PKA phosphoryliert unter anderem den konservierten Serinrest S4010 im N2B Segment von Titin (Kötter et al., 2013). Yamasaki et al. zeigten in Rattenkardiomyozyten, dass die Phosphorylierung des N2-Bus Segments durch PKA zu einer reduzierten passiven Spannung in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge führt, dabei konnten größere Effekte bei kürzeren Sarkomerlängen beobachtet werden (Yamasaki et al, 2002). Laut Fukuda et al. kommt es zudem im Gewebe mit höherem N2B-Titin Anteil nach PKA-vermittelter Phosphorylierung von N2B- und N2BA-Titin zu einer stärkeren Abnahme der passiven Steifigkeit als im Gewebe mit geringerem N2B-Titin Anteil (Fukuda und Granzier, 2005).

Neben der PKA kann der Serinrest S4010 auch durch die Extrazellulär-Signal regulierte Kinas 1/2 (Erk1/2) phosphoryliert werden (Raskin et al., 2012). Die Bindung von Angiotensin II (AngII) an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) führt über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase/Erk (MAPK/Erk) Signalweg zur Phosphorylierung des N2-Bus Segments (Raskin et al., 2012).

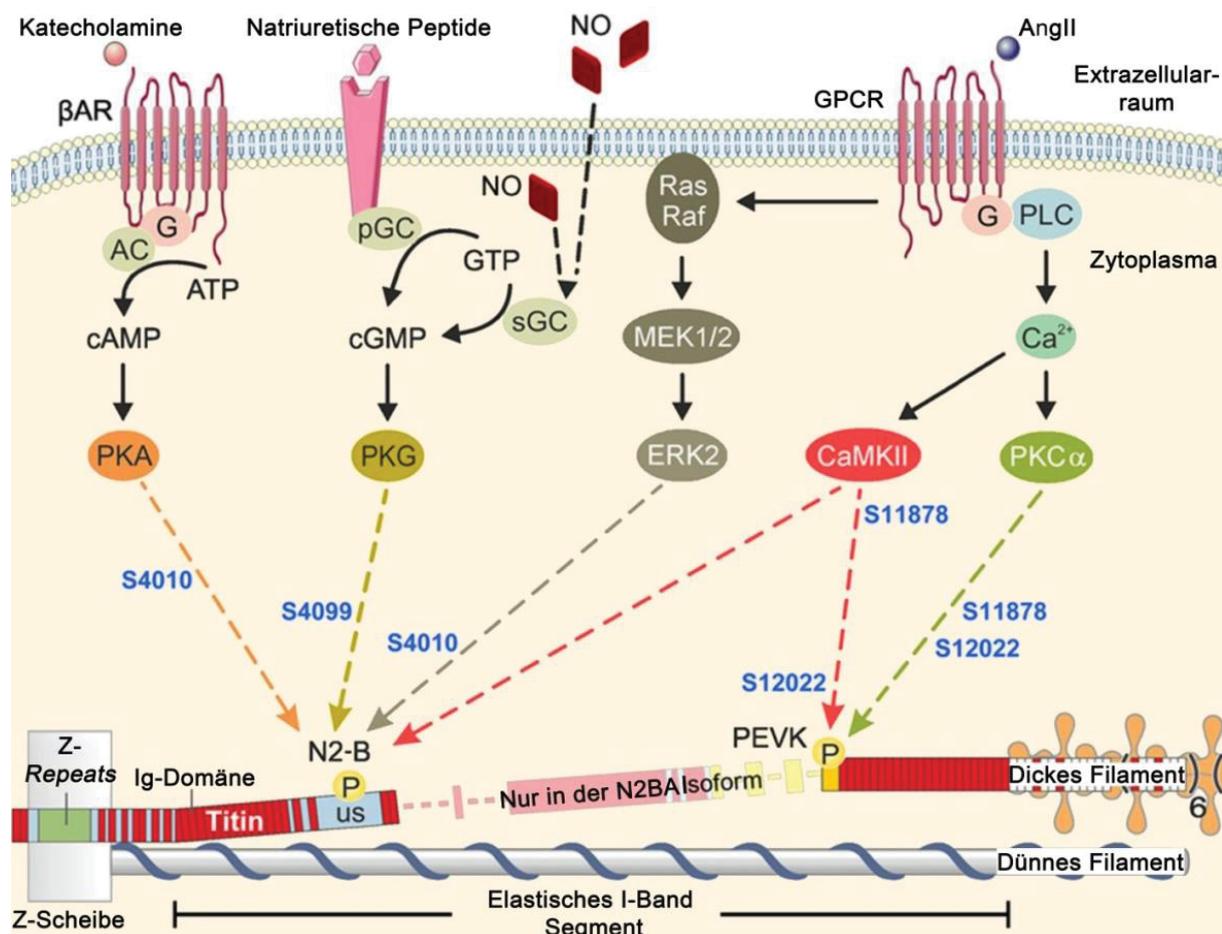


Abbildung 7: Titinphosphorylierungen an N2-Bus und PEVK und zugehörige Kinase-Signalwege. Die Nummerierung der aufgeführten Phosphorylierungsstellen wurde anhand der kanonischen humanen Titin Sequenz vorgenommen (UniProtKB identifier Q8WZ42-1). Durch Antikörper oder andere ortsspezifische

Methoden identifizierte Stellen sind in blau zu sehen. Adenylylzyklase (AC); Angiotensin II (AngII); β -adrenerger Rezeptor (β AR); Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase $\text{C}\alpha$ (PKC α); Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II δ (CaMKII δ); cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA); cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG); Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 2 (Erk2); G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR); lösliche Guanylylzyklase (sGC); *small G-Protein* (G); MAPK/Erk Kinase-1 und -2 (MEK1/2); partikuläre Guanylylzyklase (pGC); Phospholipase C (PLC); *Rat Fibrosarcoma Protein* (Raf); Ratten Sarcoma Protein (Ras); Stickstoffmonoxid (NO); *Unique Sequence* (us); zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP); zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Modifiziert nach Linke und Hamdani, 2014.

Titin ist auch ein Substrat der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II δ (CaMKII δ) und wird unter anderem an Position Serinrest S4062 im N2-Bus Segment phosphoryliert (Hamdani et al., 2013). Diese posttranslationale Modifikation setzt die passive Spannung der Kardiomyozyten herab. Das N2-Bus Segment des Titins wird außerdem durch die Proteinkinase G (PKG) phosphoryliert (Kötter et al., 2013; Krüger et al., 2009). Die Aktivierung der zyklischen Guanosinmonophosphat-abhängigen Proteinkinase G (cGMP-PKG) Signalkaskade kann über mehrere Mechanismen erfolgen. Erstens aktiviert die Bindung des *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) an den partikulären Guanylylzyklase-A Rezeptor (GC-A) die partikuläre Guanylylzyklase (pGC). Die aktivierte pGC wandelt daraufhin Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP um und der *second messenger* cGMP aktiviert nachfolgend PKG durch Bindung an sie. Nach ihrer Aktivierung phosphoryliert PKG das Titin unter anderem am konservierten Serinrest S4099 (Krüger et al., 2009) und trägt somit zur Senkung der passiven Steifigkeit bei (Kötter et al., 2013). Ein alternativer Weg zur Aktivierung des cGMP-PKG Signalweges beginnt mit der Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) an der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (GC). Durch diese Bindung wird die GC aktiviert und wandelt GTP in den *second messenger* cGMP um (Abb. 7) (Frantz et al., 2013). Die weiteren Schritte bis zur Titinphosphorylierung verlaufen analog zum durch BNP initiierten cGMP-PKG Signalweg (Abb. 7). Die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase $\text{C}\alpha$ (PKC α) phosphoryliert Titin an zwei konservierten Stellen im PEVK Segment an Serinrest S11878 und Serinrest S12022 (Hidalgo et al., 2009). S12022 wird zudem auch durch CaMKII δ phosphoryliert (Hamdani et al., 2013). Eine PKC α vermittelte Phosphorylierung des PEVK Segments führt in Maus- und Schweine-Kardiomyozyten zu einer Erhöhung der passiven Spannung (Hidalgo et al., 2009) (Abb. 8). Während Phosphorylierungen von Titin durch PKA, CaMKII δ und PKG zu einer reduzierten passiven Spannung von Kardiomyozyten führen, vermittelt PKC α den gegenteiligen Effekt (Linke et al., 1994).

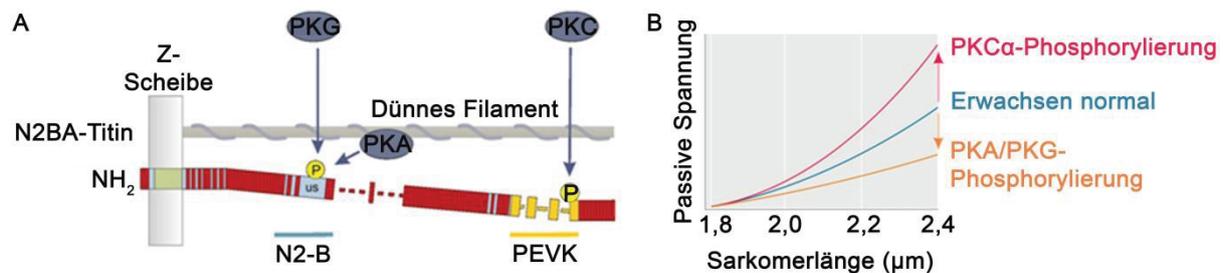


Abbildung 8: Der Effekt von Phosphorylierungen am N2B und PEVK Titin Segment auf die Titin-basierte Steifigkeit. (A) Die Proteinkinasen PKA und PKG phosphorylieren Titin am N2B Segment. Das PEVK Segment des Titins wird durch PKC α phosphoryliert. P = Phosphorylierung. (B) Die Phosphorylierung des N2B Segments durch PKA, PKG und Erk1/2 setzt die passive Spannung von Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge herab. Eine PKC α -vermittelte Phosphorylierung des PEVK Segments führt dagegen zur Erhöhung der passiven Spannung von Kardiomyozyten. Verändert nach Krüger und Linke, 2009.

1.3.2.1.3 Oxidativer Stress als Modulator der passiven Steifigkeit von Titin

Oxidativer Stress ist eine Störung im Gleichgewicht zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und der Antioxidantien-Abwehr (Betteridge, 2000). Oxidativer Stress wird z.B. durch myokardiale Ischämie-Reperfusionsschäden, Adipositas, Diabetes mellitus oder Alterungsprozesse induziert und moduliert ebenfalls die passive Spannung von Kardiomyozyten und damit die linksventrikuläre diastolische Funktion des Herzens (Linke und Hamdani, 2014). Durch oxidativen Stress wird die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der N2-Bus begünstigt. Hier befinden sich sechs Cysteine, die bis zu drei Disulfidbrücken ausbilden können. Das N2-Bus Segment büßt durch die interne Vernetzung über S-S Brücken einen großen Teil seiner Dehnbarkeit ein (Grützer et al., 2009). Ig-Domänen werden ebenfalls durch oxidativen Stress modifiziert. Sie exponieren bei Dehnung der I-Bandenregion des Titins verborgene (kryptische) Cysteine, die dadurch für Disulfidbrückenbildungen sowie S-Glutathionierungen zur Verfügung stehen (Alegre-Cebollada et al., 2014). Die entfalteten Ig-Domänen bilden jedoch vor allem gemischte Disulfidbrücken mit Glutathion, was die mechanische Stabilität dieser Domänen schwächt und ihre Rückfaltung verhindert. S-Glutathionierung von gedehnten Kardiomyozyten nach Inkubation mit oxidiertem Glutathion reduziert ihre passive Spannung, wobei die Zugabe von reduziertem Glutathion diesen Prozess reversibel macht (Alegre-Cebollada et al., 2014). Oxidativer Stress kann die Steifigkeit des Titins zudem über den cGMP-PKG Signalweg beeinflussen (Kuhn, 2004). Oxidativer Stress verringert die Zugänglichkeit von NO, blockiert die sGC Aktivität, erhöht die Konzentration der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase-5 A (PDE5A) und trägt somit zur Regulation der cGMP-PKG Signalkaskade bei

(Boerrigter et al., 2007). Eine durch oxidativen Stress verursachte verminderte PKG-Aktivität kann letztendlich eine Hypophosphorylierung des Titins bewirken und dadurch zu erhöhter passiver Kardiomyozytenspannung führen. Oxidativer Stress führt zur Bildung von Disulfidbrücken und modifiziert ferner indirekt die Phosphorylierung sowie die Steifigkeit des Titins und kann dadurch zur diastolischen Dysfunktion führen (Linke und Hamdani, 2014).

1.4 Protein-Qualitätskontroll-Systeme im Herzen

Eine präzise regulierte Homöostase zwischen Proteinsynthese und Degradation ist unabdingbar für die Aufrechterhaltung der Kardiomyozytenfunktion. Für das hochorganisierte Proteinnetzwerk der kontraktiven Sarkomere scheint diese Aufgabe besonders anspruchsvoll zu sein. Das Sarkomer ist trotz seiner hochorganisierten Struktur kein starres Gebilde, sondern unterliegt einem dynamischen System, das zur Aufrechterhaltung seiner mechanischen Funktion Umbau und Degradation ausgesetzt ist (Linke, 2008). Drei Protein-Qualitätskontroll-Systeme tragen zur Homöostase bei: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das Autophagie-Lysosom-System und die proteolytische Aktivität von Calpainen. Diese Systeme werden im Folgenden erklärt und anschließend wird die Interaktion des Titinfilaments mit Komponenten dieser Systeme erläutert.

1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dient als Schlüsselkomponente des Qualitätskontrollsystems für die nicht-lysosomale Degradation fehlgefalteter Proteine (Finley, 2009). Die meisten löslichen fehlgefalteten Proteine werden durch das UPS degradiert (Ciechanover und Schwartz, 1989). Das 26S Proteasom besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen 20S Untereinheit und der regulatorischen 19S Untereinheit (Abb. 9) (Gallastegui und Groll, 2010). Die 20S Untereinheit hat eine tonnenförmige Struktur mit vier siebengliedrigen Ringen (Finley, 2009). Die beiden äußeren Ringe bestehen aus sieben α -Untereinheiten ($\alpha 1$ bis $\alpha 7$) und die beiden inneren Ringe setzen sich aus sieben β -Untereinheiten ($\beta 1$ bis $\beta 7$) zusammen (Groll et al., 1997). Drei dieser β -Untereinheiten beinhalten proteolytisch aktive Zentren: Caspase-like ($\beta 1$), Trypsin-like ($\beta 2$) und Chymotrypsin-like ($\beta 5$) Enzymaktivitäten

(Chondroganni und Gonos, 2005). Die Aufgabe der α -Ringe ist die Substratkontrolle beim Eintritt in das katalytische Zentrum. Ein aktives Proteasom besteht aus der Assemblierung einer 20S Untereinheit und einer oder zweier 19S Untereinheiten (Hoffmann et al., 1992). Die 19S Untereinheit erkennt dabei polyubiquitinierte Substrate und entfaltet sie um sie schließlich in die 20S Untereinheit zu translozieren, wo sie dann ATP-abhängig degradiert werden (Deveraux et al., 1994). Die 19S Untereinheit setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen, einem Sockel an der 20S Untereinheit und dem sich auf dem Sockel befindlichen Deckel (Deveraux et al., 1994). Sechs ATPasen (Rpt1-Rpt6) aus der Familie der AAA-ATPasen und drei nicht ATPase Untereinheiten (Rpn1, Rpn2 und Rpn10) bilden den Sockel (Beyer, 1997). In Abb. 9 ist der Aufbau eines Proteasoms schematisch dargestellt.

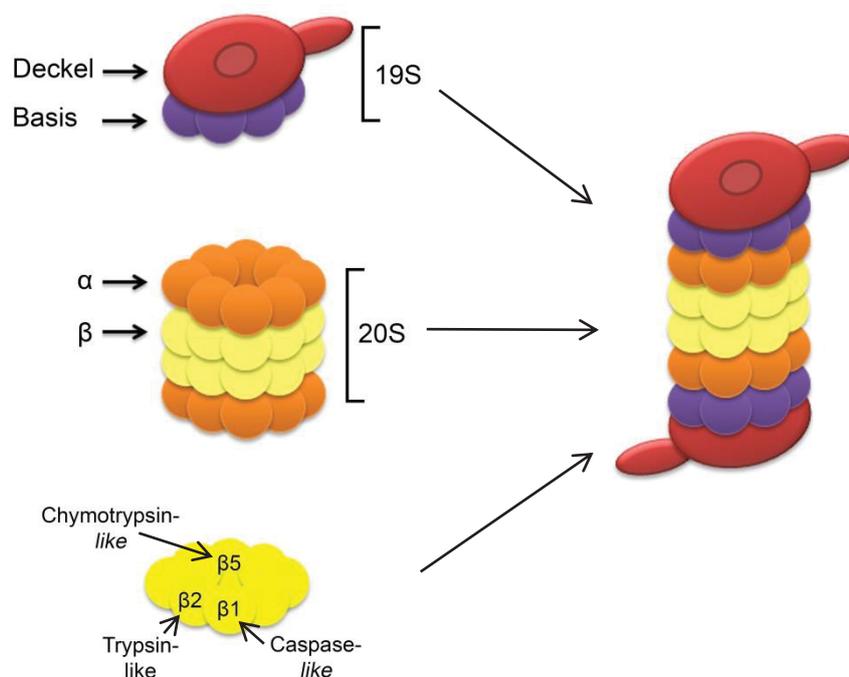


Abbildung 9: Aufbau des 26S Proteasoms. Das Proteasom besteht aus zwei regulatorischen 19S und einer zentralen katalytischen 20S Untereinheit. Die katalytische Untereinheit besitzt drei proteolytische Aktivitäten in ihren heptameren β -Einheiten: Trypsin-like, Chymotrypsin-like und Caspase-like Enzymaktivität.

Proteasomale Substratproteine werden für den Abbau durch sogenannte Polyubiquitinketten markiert. Im ersten Schritt des Substratabbaus erfolgt die Konjugation eines Ubiquitinmoleküls, einem hochkonservierten Polypeptid mit 76 Aminosäureresten und einem Molekulargewicht von 8,5 kDa, an das Substratprotein (Finley, 2009). Die Verknüpfung eines Ubiquitinmoleküls erfolgt durch einen sequenziellen Mechanismus dreier Enzymklassen, den Ubiquitinligasen (Finley, 2009). Zunächst aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ATP-abhängig den C-terminalen Glycinrest eines Ubiquitins. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend

auf eine Cystein-Stelle eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Im dritten Schritt verknüpft eine Ubiquitinligase (E3) das Ubiquitin aus dem Enzym E2 über ihren C-Terminus mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins. Während es zwei E1 gibt, gibt es eine Vielzahl an E2-Enzymen und eine noch größere Anzahl an E3-Ubiquitinligasen, die wiederum ein oder mehrere spezifische Proteinmotive erkennen (Pickart, 2001). Daher sind E3-Ubiquitinligasen entscheidend für die Substratspezifität. Die gleiche Kaskade verbindet zusätzliche Ubiquitinmoleküle mit dem primären Ubiquitin und bildet so eine Polyubiquitinkette. Ubiquitin enthält sieben Lysinreste, über die Polymerketten gebildet werden können (Iwai et al., 2014). Für den proteasomalen Abbau werden die Substrate mit einer Kette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen markiert, die untereinander über den Lysinrest-48 verknüpft sind (Thrower et al., 2000). Mono-ubiquitinierte Substrate dahingegen können beispielsweise an der Regulation des Membrantransports oder der Transkription beteiligt werden (Hicke, 2001). In Abb. 10 ist der Ablauf der Ubiquitinierung und der proteasomalen Degradation schematisch dargestellt.

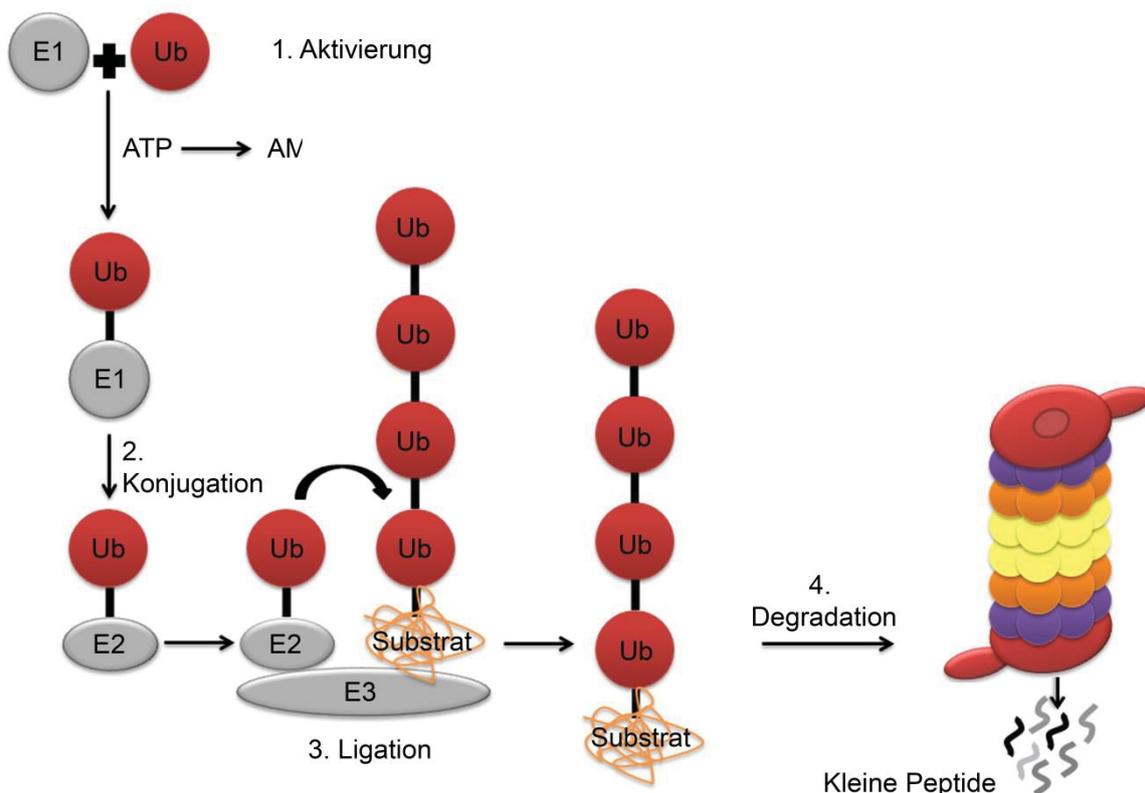


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der proteasomalen Proteindegradation. Im ersten Schritt wird ein Ubiquitinmolekül ATP-abhängig an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden. Im zweiten Schritt erfolgt die Aktivierung des Ubiquitinmoleküls durch Übertragung auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2). Ubiquitinligasen (E3) ligieren im folgenden Schritt das Ubiquitin an das Substratprotein. Dieser Prozess kann zur Verlängerung der Ubiquitinkette wiederholt werden. Im letzten Schritt erfolgt die Degradation des ubiquitinierten Substrats über das Proteasom.

1.4.2 Calpain-System

Calpaine sind ubiquitäre, nicht-lysosomale und Ca^{2+} -abhängige Proteasen. Derzeit sind 14 humane Calpain-Isoform-Gene bekannt. Calpaine werden in zwei Hauptklassen eingeteilt: micro (μ -) und milli (m -) Calpaine (Croall und DeMartino, 1997). Sowohl μ - als auch m -Calpaine sind Heterodimere bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Die regulatorische 28 kDa Untereinheit ist identisch zwischen den beiden Calpain-Klassen, wohingegen die katalytische 80 kDa Untereinheit lediglich 55-65% Sequenzhomologie zwischen den beiden Calpain-Klassen aufweist. Die Bezeichnung μ - und m -Calpain basiert auf dem Ca^{2+} -Bedarf zur Aktivierung der Protease. Die katalytische Untereinheit besteht aus vier Domänen (DI-DIV). Die DI-Domäne wird während der Ca^{2+} -abhängigen Calpainaktivierung autolytisch. In der DII-Domäne befindet sich eine Protease-Domäne, die wiederum in die Subdomänen IIA und IIB unterteilt ist. Diese beiden Subdomänen bilden bei Ca^{2+} -Bindung ein Signal. Domäne DIII ist an strukturellen Veränderungen während der Ca^{2+} -Bindung beteiligt (Hanna et al., 2008).

1.4.3 Autophagie-System

Die Autophagie spielt eine große Rolle bei der Degradation von langlebigen Proteinen und Organellen und ist darüber hinaus ein essentieller Mechanismus für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Herzen, auch während des Alterungsprozesses (Rubinsztein et al., 2011). Es gibt drei Arten der Autophagie: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) und Makroautophagie. Bei der Mikroautophagie werden zytoplasmatische Bestandteile durch Invaginationen der Lysosomenmembran und nachfolgender Abschnürung in die Lysosomen geleitet (Li et al., 2012). Die CMA ist ein selektiver Prozess, dabei werden sowohl zytosolische Substratproteine als auch ein *KFERQ-like-Motif* als Chaperon erkannt, entfalten und in Lysosomen zur Degradation transportiert (Tang et al., 2017). In dieser Studie wurde lediglich eine Analyse der Makroautophagie durchgeführt. Daher wird im Folgenden nur noch von Autophagie gesprochen und dieser Begriff äquivalent verwendet. Die Maschinerie der Autophagie unterteilt sich in mehrere Etappen. Es bilden sich zunächst kleine Vesikel, sogenannte Isolationsmembranen oder Phagophoren (Shaid et al., 2013). Die Phagophore, basierend auf einer Lipiddoppelmembran, umschließt zytosolische, langlebige Proteine und Organellen, was zur Bildung von

Doppelmembranstrukturen, den so genannten Autophagosomen, führt. Die Autophagosome verschmelzen dann mit den Lysosomen, was zum Abbau der markierten Zellinhalte durch lysosomale Hydrolasen in den fusionierten Autolysosomen führt (Abb. 11) (Rubinsztein et al., 2011). In Abb. 11 ist der Ablauf der Autophagie schematisch dargestellt.

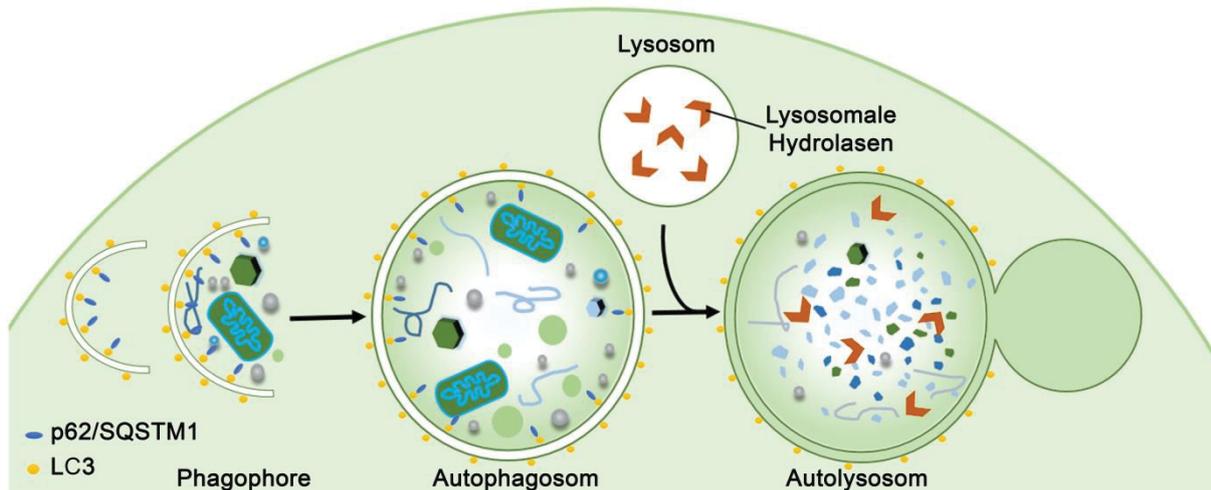


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Autophagie. Eine Lipiddoppelmembran extensiert um die Cargo-Substrate so lange, bis sich die beiden Enden treffen und ein Vesikel (Autophagosom) entsteht. Nach der Fusion mit dem Hydrolase-gefüllten Lysosom entsteht das Autolysosom und die Cargo-Proteine werden durch die Hydrolasen verdaut. LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), p62/SQSTM1 (Sequestosome 1). Verändert nach Meléndez und Levine, 2009.

Die Autophagie ist durch mehrere Signalwege gesteuert, zentrale Regulatoren sind dabei der mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und der AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) Signalweg. Wird mTOR inhibiert, so führt dies zur Aktivierung der Autophagie (Codogno und Meijer, 2005). Dem mTOR Signalweg nachgeschaltet ist der *autophagy related protein 1*-Komplex (Atg1) mit ihrer zentralen Kinase ULK (*uncoordinated-51 like kinase*). Unter nährstoffreichen Bedingungen phosphoryliert mTOR verstärkt ULK, wodurch eine Autophagie-Inhibition erreicht wird (Chan, 2012). Bei unzureichender zellulärer Nährstoffversorgung führt die Phosphorylierung der ULK durch die AMPK zur Autophagie-Induktion. Der aktivierte ULK-Komplex phosphoryliert Beclin 1, ein Bestandteil eines Proteinkomplexes (III PI3K-Komplex). Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase (Pi(3)K) produziert Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), welches ein wichtiger Bestandteil der Autophagosomen-Membran ist (Shibutani und Yoshimori, 2014). Aktivierte III PI3K-Komplexe spielen eine maßgebliche Rolle in der Rekrutierung weiterer regulatorischer Komplexe, Proteine und Lipide, die die Autophagosom-Membran formieren (Hale et al., 2013). LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain*

3) ist ein zentrales Protein im Autophagieprozess, welches häufig als Marker für die Aktivität der Autophagie herangezogen wird. Bei aktivierter Autophagie wird LC3 durch proteolytische Spaltung und Lipidierung in seine aktive Form, LC3-II, überführt. Dabei wird LC3 mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert, wodurch die lipidierte Form LC3-II entsteht (Hale et al., 2013). LC3-II wird bei der Bildung der Phagophore selektiv in die innere und äußere Doppelmembran eingebaut. Sobald das Autophagosom mit dem Lysosom fusioniert, wird LC3-II der inneren Membran mit dem Inhalt des Autophagosoms degradiert. LC3-II in der Außenmembran dahingegen wird nachfolgend recycelt (Hale et al., 2013). Substrate, die degradiert werden sollen, werden über Ubiquitin-bindende Adapter-Proteine zur Phagophore geleitet. p62/Sequestosome 1 (p62/SQSTM1), ist ein solches Anker-Protein (Hale et al., 2013). p62/SQSTM1 besitzt eine LC3-*recognition site* (LRS) und interagiert über diese Bindungsstelle direkt mit LC3, sowie eine C-terminale UBA (*ubiquitin-associated*) Domäne. Ubiquitinierte Proteine interagieren zunächst mit der UBA-Domäne und werden durch Interaktion zwischen der LRS und LC3 selektiv in Autophagosomen eingeschlossen, um sie anschließend abzubauen.

1.4.3.1 Der Link zwischen Titin und Protein-Qualitätskontroll-Systemen

Bislang ist noch unbekannt, wie Titin in das Sarkomer eingebaut wird und wie die nachfolgende Degradation verläuft. Aufgrund der außerordentlichen Größe des Titins ist es offensichtlich, dass der Austausch einzelner Myofilamente innerhalb des kontraktiven Sarkomers eine große Herausforderung darstellt. Daher wird postuliert, dass es eine Art Vorverdau des Titins im Sarkomer möglich sein könnte, um es zugänglicher für die Bestandteile des Proteasoms bzw. der Autophagie zu machen. Es wurden bereits direkte und indirekte Interaktionen zwischen Titin und Bestandteilen des UPS und auch der Autophagie festgestellt.

Titin scheint ein Substrat für den proteasomalen Abbau zu sein. Beweise hierfür wurden z.B. im Zusammenhang mit den E3-Ligasen der MuRF-Familie geliefert. Der M-Linie des Titins wurden Interaktionen mit den E3-Ligasen MuRF 1/TRIM63 und MuRF-2/TRIM55 (*Muscle-specific RING Finger E3 Ligase*) nachgewiesen (Wirr et al., 2005). Darüber hinaus wurde für die Z1-Z2-Domäne des Titins in der Z-Scheibenregion über T-Cap (*titin-cap/telethonin*) eine Interaktion mit der E3-Ligase MDM2 (*mouse-double-minute 2*) festgestellt (Tian et al., 2006). Ein Nachweis dafür,

dass Titin zumindest teilweise über das Proteasom abgebaut wird, wurde kürzlich im Zellkulturmodell der embryonalen Rattenkardiomyozyten gezeigt. Hierbei führte die Hemmung des Proteasoms zu einer deutlichen Zunahme der K48-abhängigen Polyubiquitinierung des Titins (Kötter et al., 2016). Durch die Proteasomhemmung können für den Abbau markierte Proteine nicht abgebaut werden und akkumulieren somit im Zytosol. Neben dem zellulären Hauptabbausystem UPS, wurden für das Calpain-System Titin-Interaktionen nachgewiesen. Dabei interagieren Calpaine mit der proximalen Ig-Domänenregion (Calpain-1), der N2A-Domäne und der C-terminalen Domäne des Titins (Calpain-3) (Coulis et al., 2008). Calpaine, vor allem Calpain-1, helfen Ubiquitinligasen bei der Markierung von sarkomerischen Proteinen für den Abbau über das Proteasom (Fareed et al., 2006) und sind daher unerlässlich für einen funktionierenden Abbau über das UPS.

Auch Bestandteile des dritten bekannten zellulären Abbausystems, der Autophagie, zeigen Interaktionen mit dem Titinfilament. Es konnte eine direkte Interaktion zwischen der katalytischen Titinkinase Domäne und dem p62/SQSTM1-nbr1 (*neighbor of BRCA1 gene 1 protein*) Komplex nachgewiesen werden, wobei nbr1 die primäre Interaktion eingeht (Lange et al., 2005). Nbr1 ist ein ubiquitiäres Gerüstprotein, das wie p62/SQSTM1 als Cargorezeptor wirkt und LC3- und Ubiquitin-bindende Domänen besitzt (Kirkin et al., 2009).

1.4.3.2 Altersbedingte Veränderungen der Protein-Qualitätskontroll-Systeme

Eine Verminderung der proteasomalen Aktivität ist ein Kennzeichen des physiologischen Alterungsprozesses (Tomaru et al., 2012). Dabei kann die Dysfunktion des Proteasoms vielfältig sein: geringere Expression der proteasomalen Einheiten (Lee et al., 1999), Veränderungen bzw. Ersatz proteasomaler Einheiten (Ferrington et al., 2005), Disassemblierung von Proteasomen (Vernace et al., 2007), oder auch Inaktivierung des Proteasoms durch die Interaktion mit Aggregaten (Ciechanover und Brundin, 2003). In diesem Zusammenhang liegt es nahe, dass auch das Titinfilament und damit die elastischen Eigenschaften der Herzventrikel beeinflusst werden. Im Gegensatz zum UPS im Alterungsprozess, wurde für das Calpain-System eine Hochregulation der Aktivität nachgewiesen (Kenessey et al., 1990). Immer mehr Anzeichen deuten darauf hin, dass auch die Autophagie eng mit dem Alterungsprozess des Herzens verbunden ist (Shirabake et al., 2016). Im

Alterungsprozess kommt es zu einer Verminderung des Autophagieflusses (Taneike et al., 2010) und dies führt unter anderem ebenfalls zur Akkumulation fehlgefalteter Proteinen sowie zu erhöhtem oxidativen Stress. Oxidativer Stress ist ein bekannter Modulator der Titin-basierten passiven Steifigkeit (Linke und Hamdani, 2014). Genauso nehmen Aggregate fehlgefalteter Proteine Einfluss auf die Titin-basierte Kardiomyozytensteifigkeit, daher liegt es nahe, dass die altersbedingte Verminderung der zellulären Abbauege die elastischen Eigenschaften des Titins beeinflussen könnte.

1.5 Veränderungen im alternden Herz

Die Alterung des Herzens ist ein komplexer Prozess, der viele molekulare Veränderungen innerhalb und außerhalb der Kardiomyozyten mit sich bringt. Strukturelle, funktionelle, zelluläre und auch molekulare Veränderungen nehmen dabei in unterschiedlichem Maß Einfluss auf die Steifigkeit des Myokards (Abb. 12). Strukturelle Veränderungen kennzeichnen sich dabei durch zunehmende epikardiale Fettgewebeablagerungen (Silaghi et al., 2008) und Verkalkungen, wie beispielsweise an den Aortenblättern (New und Aikawa, 2011). Auch die morphologische Struktur des Herzens verändert sich im Zuge des Alterungsprozesses und führt zu einer Verdickung der linksventrikulären (LV) Wand und zur Hypertrophie (Lakatta und Levy, 2003), während das systolische und diastolische LV-Volumen abnimmt (Strait und Lakatta, 2012). Diese Verdickung der LV-Wand ist häufig ein Versuch, den altersbedingten Kardiomyozytenverlust zu kompensieren (Olivetti et al., 1991). Zu diesem kompensatorischen Mechanismus zählen auch Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Matrix befindet sich unter physiologischen Bedingungen stets in einem dynamischen Gleichgewicht aus Synthese und Abbau. Dabei synthetisieren Myofibroblasten kardiale ECM-Proteine, einschließlich Kollagen Typ I, II, III, IV, V, und VI, Elastin, Fibronectin, Laminin und Fibronogen (DeQuach et al., 2010). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) übernehmen den Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix (Jabłońska-Trypuć et al., 2016). Im Zuge des Alterungsprozesses ist das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau dahingegen gestört. Bei einer Deregulation der extrazellulären Matrix Synthese kommt es zur Fibrosierung und schließlich zur erhöhten LV Steifigkeit (Zile et al., 2015). Erhöhte altersbedingte Fibrose konnte in LV Gewebe bereits

nachgewiesen werden (Lakatta und Levy, 2003). Die Aufrechterhaltung der normalen Herzfunktion erfordert einen enormen Energieaufwand, welcher durch die ATP-Produktion in den Mitochondrien gewährleistet wird. Mitochondrien sind zudem von großer Bedeutung für das Überleben und für die Funktion von Kardiomyozyten (Ren et al., 2010). Tocchi et al. (Tocchi et al., 2015) haben die Auswirkungen der mitochondrialen Dysfunktion auf das kardiale Altern eingehend untersucht. Sie beschreiben, dass die kardiale Seneszenz mit einem allgemeinen Rückgang der mitochondrialen Funktion, der Expansion von dysfunktionellen Mitochondrien, der erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der unterdrückten Mitophagie und der Dysregulation von mitochondrialen Qualitätsprozessen, wie Fusion und Spaltung, einhergeht. Von diesen Prozessen ist die Entstehung von oxidativem Stress als Folge übermäßiger ROS-Bildung das am häufigsten beschriebene Phänomen. Die chronische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems im Alter führt ebenso über gesteigerte ROS Produktion zu erhöhtem oxidativen Stress und nimmt unter anderem durch Hypertrophie und Fibrosierung des Herzgewebes Einfluss auf die elastischen Eigenschaften des Myokards. Eine weitere molekulare Veränderung im Zuge des Alterungsprozesses betrifft das β -adrenerge System. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Abnahme der Empfindlichkeit der β_1 - und β_2 -Rezeptoren. Die Ursache liegt hierbei vor allem in veränderten Second-Messenger-Systemen (White et al., 1994). Katecholamine, die an β -Rezeptoren binden, sind bei älteren Menschen weit weniger wirksam als bei Jüngeren. Das β -adrenerge System ist über die Synthese von cAMP und die nachfolgende Aktivierung der PKA mit anschließender Phosphorylierung des N2B-Segments des Titin von großer Bedeutung für die Titin-basierte passive Steifigkeit des Myokards. Auch die Veränderungen der Proteinhomöostase nehmen großen Einfluss auf das Herz im Altern. Die Aktivität zellulärer Abbaumaschinerien, wie beispielsweise des Ubiquitin-Proteasom- und des Autophagie-Systems nehmen im Zuge des Alterungsprozesses ab (Gaczynska et al., 2001). Als Folge der verringerten Aktivität der zellulären Abbausysteme können fehlgefaltene Proteine nicht abgebaut werden. Diese akkumulieren im Zytosol und schaffen damit eine Basis für Fehlfunktionen im Herzen. In Abb. 12 sind die altersbedingten Veränderungen im Herzen schematisch zusammengestellt.



Abbildung 12: Altersbedingte Veränderungen im Herzen.

1.6 Kennzeichen des alternden Herzens in Kardiomyopathien

Die Kennzeichen des alternden Herzens treten häufig auch im Zusammenhang mit Kardiomyopathien auf. Diastolische Dysfunktion ist bei der Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurfraction (*heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF) Patienten ebenfalls zu beobachten (Desai und Fang, 2008). HFpEF, früher diastolische Herzinsuffizienz genannt, ist durch diastolische Anomalien, wie verzögerte Frühentspannung, erhöhte Myokard- und Myozytenspannung und damit verbundenen Veränderungen der Füllungsdynamik gekennzeichnet (Sharma und Kass, 2015). Zudem kommt es bei HFpEF Patienten zu einer Verdickung des LV, wodurch das diastolische Ventrikelvolumen verringert wird. Fibrosierung durch Umstrukturierung der extrazellulären Matrix ist ebenfalls in HFpEF-Patienten zu beobachten (Artos et al., 2007). Auch die Protein-Qualitätskontrolle ist bei vielen Herzerkrankungen beeinträchtigt. DCM (dilatative Kardiomyopathie) Patienten weisen einen signifikant höheren Gehalt an ubiquitinierten Proteinen im Zytosol auf, was auf eine verminderte Aktivität des Proteasoms hindeutet (Weekes et al., 2003).

1.7 Zielsetzung

Das Sarkomer und insbesondere das Titinfilament ist im Herzen einem dauerhaften mechanischen Stress und somit einem ständigen Austausch seiner Bestandteile ausgesetzt. Die Mechanismen der Titin Degradation sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Studie sollte am Modell kultivierter embryonaler Rattenkardiomyozyten die Beteiligung der Autophagie am Titin Ab- und Umbau bestimmt werden. Unter physiologischen Bedingungen sowie nach Aktivierung oder Inhibition der Autophagie wurden die K63-abhängige Titin Polyubiquitinierung, Autophagie-assoziiierter Proteine, sowie ihre Lokalisation mittels Western Blot bzw. Immunfluoreszenzfärbung untersucht, um eine Beteiligung der Autophagie am Titin Abbau nachzuweisen. Aufgrund der Größe des Titinfilaments sowie seiner festen Verankerung im Sarkomer, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass Titin zunächst durch eine Protease aus dem Sarkomer gelöst wird (Vorverdau), um es für den weiteren Abbau durch intrazelluläre Degradationsmechanismen zugänglich zu machen. Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob Calpain-Proteasen potentielle Kandidaten für den Vorverdau im Herzen sein könnten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten potentielle, altersbedingte Veränderungen des Titinfilaments hinsichtlich der Isoformen Zusammensetzung, posttranslationalen Modifikationen des elastischen I-Bandensegments und darauf basierende Beeinflussung der Titin-basierten, passiven Steifigkeit von Myofilamenten untersucht werden. Für die Analyse dienten linksventrikuläre Gewebe von humanen Spender/Donorherzen (17-50 Jahre und 51-73 Jahre) und als Vergleich, in einer weiteren Spezies Mäuseherzen (6 Monate und 20 Monate) als Untersuchungsmodelle.

Zudem sollen altersbedingte Modifikationen der Proteinqualitätskontrolle auf ihren Einfluss bezüglich des Titinfilaments hin untersucht werden. Ferner soll die Frage beantwortet werden, welche Veränderungen, die häufig im Rahmen von Herzerkrankungen auftreten, durch den Alterungsprozess alleine hervorgerufen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits über die folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), J.T. Baker (Phillipsburg, USA), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis (Heidelberg) und SIGMA-Aldrich (St. Louis, USA). Für das Ansetzen von Lösungen wurde steriles Reinstwasser (Millipore-Qualität) verwendet.

2.1.2 Antikörper

Zur Detektion der Phosphorylierungsstellen S4010, S4099, S11878 und S12022 wurden Immunglobulin G (IgG)-basierte polyklonale Primärantikörper aus Kaninchen verwendet (Tab. 1). Hierzu wurden von der Firma Eurogentec (Liège, Belgien) phosphospezifische und sequenzspezifische Antikörper generiert. Die phosphospezifischen Antikörper sind jeweils gegen einen der phosphorylierten Serinreste gerichtet. Die sequenzspezifischen Antikörper erkennen sowohl phosphorylierte als auch unphosphorylierte Serinreste sowie die benachbarten Regionen. Alle Phosphorylierungsstellen sind nach UniProt Eintrag Q8WZ42-1, human, Isoform 1, kanonische Sequenz, 24.08.2014.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Titin.

Antikörper	Typ	Verdünnung
Anti-S4010	Sequenzspezifisch	1:1000
	Phosphospezifisch	1:500
Anti-S4099	Sequenzspezifisch	1:1000
	Phosphospezifisch	1:500
Anti-S11878	Sequenzspezifisch	1:500
	Phosphospezifisch	1:100
Anti-S12022	Sequenzspezifisch	1:1000
	Phosphospezifisch	1:500

In Tab. 2 sind weitere Primärantikörper aufgelistet, die für Western Blot Analysen verwendet wurden.

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Typ	Verwendung	Hersteller
α -Aktinin	1:5000	Kaninchen	WB, IF	Cell Signaling #3134
α -Aktinin	1:2000	Maus	WB	Sigma #A7732
	1:1000		IF	
Calpain-1	1:1000	Kaninchen	WB	Proteintech #10538-1-AP
Erk1/2 T202/Y204	1:2000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #9102
MAPK total				
Erk1/2 T202/Y204	1:2000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #4370
MAPK phospho				
FBX32	1:1000	Kaninchen	WB IF	Abcam #ab74023
GAPDH	1:5000	Maus	WB	Sigma Aldrich #G8795
iNOS	1:2000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #2977
K48-abhängiges Polyubiquitin	1:2000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #8081
K63-abhängiges Polyubiquitin	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #5621
Ki67	1:500	Kaninchen	IF	Abcam #ab16667
LC3	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #2775
	1:500		IF	
MDM2	1:1000	Kaninchen	WB, IF	Abcam #ab38618
nbr1	1:1000	Kaninchen	IF	Cell Signaling #9891
p62/SQSTM1	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #5114
	1:100	Maus	IF	Abcam #ab56416
PKC α total	1:10000	Kaninchen	WB	Abcam#32376
PKC α phospho	1:5000	Kaninchen	WB	Abcam #ab76016
PSMA2	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #11864
	1:200		IF	

STUB1 (CHIP)	1:10000	Kaninchen	WB IF	Abcam #ab134064
TRIM54 (MuRF3)	1:5000	Kaninchen	WB IF	Proteintech #21074-4- Ap
TRIM63 (MuRF1)	1:1000	Kaninchen	WB IF	Merck #ABS532
Troponin I (Ser23/24) total	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #4002
Troponin I (Ser23/24) phospho	1:1000	Kaninchen	WB	Cell Signaling #4004
Ubiquitin P4D1	1:2000	Maus	IF	Cell Signaling #3936

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Typ	Verwendung	Hersteller
Anti-mouse IgG, <i>horseradish-peroxidase-linked</i>	1:10000	Maus	WB	Cell Signaling, #7076
Anti-rabbit IgG, <i>horseradish-peroxidase-linked</i>	1:10000	Kaninchen	WB	Cell Signaling, #7074
Alexa Fluor 555	1:1000	Kaninchen	IF	Cell Signaling #4413
Alexa Fluor 488	1:1000	Maus	IF	Cell Signaling #4408

2.1.3 Geräte

In Tab. 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte.

Laborgerät	Modell	Hersteller
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad

Brutschrank	Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific
Chemilumineszenz Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophoresekammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Inversmikroskop	BZ-9000	Keyence
Magnetrührer		VWR
Photometer	Ultrospec 5300pro	GE Healthcare
SDS-Gelelektrophorese System		Biometra, Biorad
Ultra-Turrax T-25		IKA
Vortexer		VWR
Wasserbad		Köttermann
Westernblot Semi Dry		Biometra
Zentrifugen	5471 R	Eppendorf
	Mikrozentrifuge Galaxy Ministar	VWR

2.1.4 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

In Tab. 5 ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien zu sehen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.

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

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

2.1.5 Kits

In Tab. 6 ist eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits zu finden.

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific #23225
Calpain-Glo Assay	Promega #G8501
GSH/GSSG-Glo Assay	Promega #V6611
Proteasome-Glo Assay	Promega #G1180

2.1.6 Primer

Tab. 7 stellt die für qRT-PCR Analysen verwendeten *SYBR GREEN* Primersequenzen zusammen.

Tabelle 7: Verwendete *SYBR GREEN* Primer für die qRT-PCR.

Genbezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Typ	Hersteller
F_COL1A1	GCTATGATGAGAAATCAACCG	Human	Sigma
R_COL1A1	TCATCTCCATTCTTTCCAAGG	Human	Sigma
F_COL3A1	TCCATTTGGAGAATGTTGTG	Human	Sigma
R_COL3A1	CATGATTCACAGATTCCAGG	Human	Sigma
F_FBX32	AACTCAGTATTTCCACCAAG	Human	Sigma
R_FBX32	GAAGTCCAGTCTGTTGAAAG	Human	Sigma
F_GAPDH	ACAGTTGCCATGTAGACC	Human	Sigma
R_GAPDH	TTGAGCACAGGGTACTTTA	Human	Sigma
F_LOXL1	ATTGTCCAATCCTGATCTCC	Human	Sigma
R_LOXL1	GAATCCCTGTGGTTTTTCATC	Human	Sigma

F_LOXL2	GATGTACAACCTGCCACATAG	Human	Sigma
R_LOXL2	GACAGCTGGTTGTTTAAGAG	Human	Sigma
F_MDM2	CCTTAGCTGACTATTGGAAATG	Human	Sigma
R_MDM2	TGTTGAGTTTTCCAGTTTGG	Human	Sigma
F_STUB1	AAGAGGAAGAAGCGAGAC	Human	Sigma
R_STUB1	GGTCAAAATGACCCACAC	Human	Sigma
F_TRIM54	AAGTGATCCTCCCATCTTAG	Human	Sigma
R_TRIM54	TATTGTCCTCGATAGTCTGG	Human	Sigma
F_TRIM55	AGGAATGTTGCAGAAAACAG	Human	Sigma
R_TRIM55	GGTCATTTATTCTTCCTCTC	Human	Sigma
F_TRIM63	GACAGATGAGGAAGAGGAAG	Human	Sigma
R_TRIM63	TCATTCATCCAGCTCCTTAC	Human	Sigma
F_COL1A1	CGTATCACCAAACTCAGAAG	Maus	Sigma
R_COL1A1	GAAGCAAAGTTTCCTCCAAG	Maus	Sigma
F_COL3A1	ACTCAAGAGTGGAGAATACTG	Maus	Sigma
R_COL3A1	AACATGTTTCTTCTCTGCAC	Maus	Sigma
F_FBX32	CTGAAAGTTCTTGAAGACCAG	Maus	Sigma
R_FBX32	GTGTGCATAAGGATGTGTAG	Maus	Sigma
F_GAPDH	TGGCAAAGTGGAGATTGTTG	Maus	Thermo Scientific
R_GAPDH	CATTATCGGCCTTGACTGTG	Maus	Thermo Scientific
F_LOXL1	CAAGTACATTGTTCTGGAGTC	Maus	Sigma
R_LOXL1	CTTTTCAAGGAGAGACAAGG	Maus	Sigma
F_LOXL2	AGACTGCAAATTC AACACAG	Maus	Sigma
R_LOXL2	CATTTCTCTCTGTTAGCACC	Maus	Sigma
F_MDM2	TGTAAGTCAGCAAGACTCTG	Maus	Sigma
R_MDM2	TCTGTGTTCTCTTCTGTCTC	Maus	Sigma
F_STUB1	ATTCATATCTCACCAGGCTC	Maus	Sigma
R_STUB1	TCTCGCTTCTTTCTTTTCTC	Maus	Sigma
F_TRIM54	GGAGAAGCAGCTCATTTGCC	Maus	Sigma
R_TRIM54	CCTCCTGAAGACACCGTTGTG	Maus	Sigma
F_TRIM55	CTGTAAAACCTATTGAGGAGTGC	Maus	Sigma

R_TRIM55	CTTGGGTCATTTTCAGTCTTC	Maus	Sigma
F_TRIM63	ACATGGACTACTTTACTCTGG	Maus	Sigma
R_TRIM63	CATTGGTGTTCTTCTTTACCC	Maus	Sigma

2.1.7 Puffer und Lösungen

In Tab. 8 ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen zu finden.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	205 mM Tris 2 M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
50x TAE (pH 8,0)	50 mM EDTA 2 M Tris/HCl 1 M Essigsäure
10x TBST (pH 7,4)	0,2 M Tris/HCl 1,5 M NaCl 1% Tween-20
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris/HCl 100 mM Tricine
Blockierungslösung (WB)	2% BSA in 1 x TBST
Blockierungslösung (IF)	3% Triton X-100 0,002 % BSA in 1x PBS
Greaser-Puffer (pH 6,8)	50 mM Tris/HCl 8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3% (w/v) SDS

<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	150 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
<i>PVDF destain</i>	10% (v/v) CH ₃ COOH 40% (v/v) Ethanol
<i>PVDF stain</i>	0,075 % Serva Blue in Methanol
Relaxationslösung	10 mM Imidazol 3 mM EGTA 10 mM Na ₂ ATP-Mg 3 mM MgCl ₂ 10 mM Na ₂ CrP 2 mM DTT
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8 M Urea 2 M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05 M Tris/HCl
<i>Stripping Puffer</i>	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,25% Nonident P40 0,1 M β-Mercaptoethanol
Verdaupuffer (pH 7,35-7,45)	137 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,7 mM KCl 406 μM NaH ₂ PO ₄ 12 mM NaHCO ₃ 190 U/mL Kollagenase Typ II 1512 USL-U*/mL Trypsin Phenolrot

*USP unit: eine im US-Arzneiwesen (United States Pharmacopeia) verwendete Einheit der Arzneimittelpotenz

2.2 Gewebemodelle

2.2.1 Humane Donorherzen

Linksventrikuläres (LV) humanes Herzgewebe wurde aus 21 nicht insuffizienten Spenderherzen mit normaler Ejektionsfraktion (EF) gewonnen, die vom Mid-American Transplant Service (St. Louis, MO) zur Transplantation abgewiesen wurden. Ausschlusskriterien für diese Studie waren: Bluthochdruck, Diabetes, EF <45% und Alkoholismus. Die Herzen wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Thorax im Operationssaal gewonnen und in eiskalte kardioplegische Lösung eingelegt, anschließend zur Dissektion und Funktionsexperimenten in das Labor transportiert. Das Herzgewebe wurde für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proben wurden nach dem Alter in 17-50 Jahre (n = 10 als <50, jung) und 51-73 Jahre (n = 11 als >50, alt) eingeteilt. In Tab. 9 sind die einzelnen Herzspender aufgeführt mit Angaben über das Geschlecht, Alter, EF und den Todesgrund. Alle Studien mit humanem Herzgewebe wurden vom *Institutional Review Board der Washington University in St. Louis* genehmigt. Detaillierte Informationen über Medikationen oder mögliche Komorbiditäten fehlen weitestgehend. Bei keinem der Spender wurde jedoch eine Herzerkrankung diagnostiziert oder bereits eine Behandlung durchgeführt.

Tabelle 9: Baseline Eigenschaften und Hämodynamik der Herz-Spender.

Geschlecht	Alter, Jahre	EF %	Todesgrund
Weiblich	34	nicht angegeben	Hirntod
Weiblich	17	nicht angegeben	Motorradunfall
Männlich	31	nicht angegeben	Kopfschusswunde
Männlich	32	nicht angegeben	Motorradunfall
Weiblich	37	65	Zerebrovaskulär/Schlaganfall
Männlich	50	65	Interkraniale Blutung/Schlaganfall
Männlich	50	60-65	Interkraniale

Männlich	55	75	Blutung/Schlaganfall Interkraniale Blutung/Schlaganfall
Männlich	46	60-65	Interkraniale Blutung/Schlaganfall
Männlich	52	55	Kopftrauma
Männlich	46	45	Zerebrovaskulär/Schlaganfall
Männlich	53	nicht angegeben	Hirntod
Männlich	54	nicht angegeben	Motorradunfall
Weiblich	59	45-50	Kopftrauma
Weiblich	73	nicht angegeben	Anoxie
Weiblich	56	60-65	Interkraniale Blutung/Schlaganfall
Weiblich	66	nicht angegeben	Zerebrovaskulär/Schlaganfall
Weiblich	58	nicht angegeben	Zerebrovaskulär/Schlaganfall
Männlich	57	45-50	Interkraniale Blutung/Schlaganfall
Weiblich	59	nicht angegeben	Anoxische Hirnverletzung
Weiblich	66	nicht angegeben	Hirntod

2.2.2 Mäuseherzen

Gesunde männliche C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Janvier (Saint Berthevin, Frankreich) erworben und eine Woche in der örtlichen Tierversuchsanstalt zur Akklimatisierung gehalten. Es wurde LV Gewebe aus Mäusen im Alter von 6 Monaten und 20 Monaten entnommen. 6 Monate alte Mäuse werden als 6m (n = 5, jung) und die 20 Monate alten Mäuse als 20m (n = 5, alt) bezeichnet. Alle Verfahren

wurden nach den Tierschutzbestimmungen der deutschen Kommunen gemäß den Richtlinien des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV 84-02.04.2011.A189) durchgeführt.

2.2.3 Wistar Ratten

Für die Entnahme embryonaler Kardiomyozyten aus trächtigen Ratten wurde eine Verpaarung von Ratten drei Wochen im Voraus bei der Firma Janvier beantragt. Die trächtigen Ratten wurden nach der Verpaarung zur Akklimatisierung in der örtlichen Tierversuchsanstalt gehalten und schließlich am Gestationstag (E18) zur Entnahme der embryonalen Kardiomyozyten getötet. Alle Verfahren wurden nach den Tierschutzbestimmungen der deutschen Kommunen gemäß den Richtlinien des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV 84-02.04.2017.A145) durchgeführt.

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkulturmethoden

2.3.1.1 Präparation und Kultivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten

Zur Isolation embryonaler Rattenkardiomyozyten wurden trächtige Wistar-Ratten am Gestationstag 18 durch Isofluran-Inhalation und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Die Embryonen (E18) wurden aus dem Mutterfrei entnommen und freipräpariert. Nach dem Dekapitieren wurden den Embryonen die Herzen entnommen und in einem mit eiskalten PBS gefüllten 1,5 mL-Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Unter einer Werkbank wurden die Herzen mit Hilfe eines Skalpell mechanisch zerkleinert um die Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband zu lösen. Anschließend folgte die enzymatische Dissoziation der Kardiomyozyten in 1 mL Trypsin und Kollagenase enthaltendem Verdauopuffer. Die Zellen wurden eine Stunde im Inkubator bei 37°C verdaut, wobei die Zellsuspension nach 30 Minuten schonend auf- und abpipettiert wurde. Nach dem Verdau wurden die Zellen durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und die Verdauungsenzyme durch die Zugabe von 9 mL Kulturmedium mit 20% FBS gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurde der Überstand verworfen und das

Pellet in einem Volumen entsprechend der Größe des Pellet mit Kulturmedium (mit 20% FBS) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf Gelatine beschichteten 6 Wellplatten pipettiert und ca. 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden Zellen auf Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert. An Tag 1 nach der Präparation folgte eine Behandlung der Zellen mit Mitomycin zur Mitoseinaktivierung in der Zellpopulation. Hierzu wurde Mitomycin C (10µL/mL in 20% FBS-haltigem Kulturmedium) für 40 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit vorgewärmtem PBS wurde das Kulturmedium mit 1% FBS-Anteil (Aktivkohle gefiltert und somit hormonreduziert) auf die Zellen gegeben. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen ab Tag 3 mit dem Stimulationsmedium bestehend aus Kulturmedium (1% FBS) und Chloroquine in einer Konzentration von bis zu 1-5 µM oder 1-5 mM Metformin täglich versorgt (Abb. 13).

Zeitachse des Versuchsverlaufs

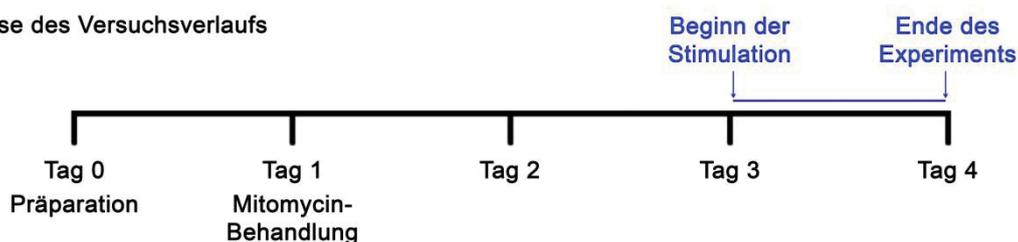


Abbildung 13: Zeitachse des Versuchsverlaufs. Die Stimulation der embryonalen Rattenkardiomyozyten erfolgte stets von Tag 3 auf Tag 4 nach der Präparation.

2.3.1.2 Paraformaldehydfixierung von Zellen zur Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde 1 mL Paraformaldehyd (PFA, 4% (v/v)) für ca. 10 min auf die Deckgläschen pipettiert. Anschließend wurde das PFA abgenommen und die Zellen wurden weitere dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen 3-5 Minuten lang mit 1% Triton X-100 in PBS behandelt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte für 1h bei Raumtemperatur in PBS + 2% BSA, gefolgt von einer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für 1h bei RT. Die Bilder wurden mit einem inversen Keyence-Mikroskop (BZ900E) aufgenommen.

2.3.2 Proteinbiochemische Methoden

2.3.2.1 Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Bei -80°C gelagertes LV Herzgewebe wurde in Stecknadelkopf große Stücke zerkleinert und mit 80-120 μL Probenpuffer versetzt, die Zusammensetzung des Puffers ist Tabelle 8 zu entnehmen. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Herzgewebe bei 96°C 3 min denaturiert.

2.3.2.2 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach Bradford wurde nach Herstellerangaben mit dem Bradford-Reagenz der Firma SIGMA durchgeführt. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ wurde am Photometer durchgeführt. Als Standard wurde eine BSA-Eichgerade herangezogen.

2.3.2.3 Titin Isoformen Auftrennung mittels 2,1%iger SDS-PAGE

Zur Auftrennung des Titins wurde eine 2,1%ige Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden die in Tab. 10 aufgeführten Chemikalien zusammen pipettiert und im Wasserbad erwärmt. Nach Erreichen von 45°C wurde frisch angesetztes Ammoniumpersulfat (APS) und vorgewärmte 1,5%ige Agaroselösung zugesetzt. Die Gele wurden nach der Polymerisation für 4 Stunden bei 4°C gelagert. Die anschließende Proteinauftrennung erfolgte über Nacht (ü.N.) bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA pro Gel.

Tabelle 10: Pipettierschema für zwei Titingele (2,1%ig)

Chemikalie	Volumen
ddH ₂ O	6,67 mL
Trenngelpuffer	5,00 mL
Acrylamid 30%	1,40 mL
SDS 20%	100 μL
TEMED	11,5 μL

Die Lösung auf 45°C erhitzen

APS 10%	150 µL
Agaroselösung 1,5%	6,67 µL

In Tab. 11 ist das Pipettierschema für jeweils zwei Polyacrylamidgele dargestellt.

Tabelle 11: Pipettierschema für zwei Polyacrylamidgele.

Chemikalie	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	7,5%	10%	12,5%	
30% Acrylamidlösung	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	0,667 ml
H ₂ O _{bidest}	7,5 ml	6,25 ml	5 ml	3,025 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
TEMED	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	15 µL
APS	75 µL	75 µL	75 µL	50 µL

2.3.2.4 Coomassie-Färbung von Proteinen mit *Imperial™ Protein Stain*

Zur Untersuchung der Titin Isoformen Zusammensetzung wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet. Dieser organische Farbstoff bindet an freie geladene Amino- und Iminogruppen von Proteinen im sauren Milieu. Das Polyacrylamidgel wurde dazu nach Durchlauf in der Elektrophoresekammer für eine Stunde in einer Coomassie-Färbelösung (*Imperial™ Protein Stain*) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Entfärbung des Gels in ddH₂O. Die entfärbten Gele wurden anschließend am Fusion-FX7 mit einem Durchlichtprogramm digitalisiert und beide Titin Banden entsprechend ihrer Pixeldichte mit der Software ImageJ 1.51k quantitativ ausgewertet. Für jede Probe wurden beide Titin Isoformen addiert und die einzelne Isoform (N2BA und N2B) als prozentualer Anteil des Gesamt-Titins angegeben.

2.3.2.5 Transfer des Titin auf eine PVDF-Membran

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte in einer Trans-Blot Turbo Apparatur. Dazu wurden fünf Whatman Filterpapiere in Anodenpuffer

(Zusammensetzung siehe Tab. 8) getränkt und in die Kassette der Blot-Apparatur gelegt. Auf diese Filterpapiere wurde eine in Ethanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran gelegt. Auf die PVDF-Membran wurden das SDS-Gel sowie fünf in Kathodenpuffer (Zusammensetzung siehe Tab. 8) getränkte Whatman Filterpapiere gelegt. Der Protein-Transfer erfolgte für 15 Minuten bei 25 V und 2,4 A. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine PVDF-Färbung kontrolliert. Dazu wurde die PVDF-Membran für 10 Sekunden in einer PVDF-Färbelösung inkubiert und anschließend 10 Minuten lang in einer Entfärbelösung (siehe Tab. 8) entfärbt. Es wurden nur Blots mit einem gleichmäßigen Proteintransfer für die folgenden Antikörperfärbungen verwendet.

2.3.2.6 Titin/Phosphotitin Immunoblots

Die PVDF-Membran wurde für 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert, deren Zusammensetzung in Tab. 8 angegeben ist. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit den Primärantikörpern (Tab. 1 und 2) ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde in 1x TBST gewaschen, bevor sie mit dem in Tab. 3 aufgeführten Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Antikörper versetzt wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1,5 Stunden bei RT. Nach anschließendem Waschen in TBST wurde die Membran mit dem ECL-*Detection* Kit versetzt und die Chemilumineszenz am LAS-4000 Image Analyzer detektiert.

2.3.3 Bestimmung der passiven Spannung einzelner Kardiomyozyten

2.3.3.1 Permeabilisierung der Zellmembran mittels Triton X-100

200 µL Relaxationslösung wurden in einen Douncer Homogenisator pipettiert und ein linksventrikuläres Herzgewebestückchen (3 – 6 mg) aus den in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2. beschriebenen Gewebemodellen dazugegeben. Das Gewebe wurde bei 750 rpm für 5 Sekunden homogenisiert. Dieses Vorgehen wurde 3x mit je 200 µL Relaxationslösung wiederholt. Die Zusammensetzung der Relaxationslösung ist in Tab. 8 angegeben. Dem vereinigten Homogenisat wurde 0,5% Triton X-100 zugesetzt und es folgten 3 Minuten Inkubation auf Eis. Zur Entfernung des Triton X-100 wurde die Probe mit Relaxationslösung versetzt und anschließend bei 4 °C und 2000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das

Reaktionsgefäß mit Relaxationslösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert, dieser Vorgang wurde mindestens 3x wiederholt. 200 µL der Probe wurden auf einen Objektträger pipettiert, einzelne Kardiomyozyten unter dem invertierten Mikroskop (Nikon Eclipse Ti) ausgesucht und mit Silikonkleber zwischen dem Kraftaufnehmer und dem piezoelektrischen Motor gespannt. Die passive Kardiomyozytenspannung jeder Zelle wurde im Bereich von 1,9 µm bis 2,4 µm SL in Relaxationslösung bei RT mit Hilfe einer IMPERX-Kamera bestimmt. Das Strecken der Zelle wurde anhand eines Protokolls durchgeführt, bei der die Zelle schrittweise bis zu einer maximalen *Slack* Länge durchgeführt. Die Zellen wurden von *Slack* SL (Durchschnitt, 1,9 µm) in fünf Schritten zu einer maximalen Sarkomerlänge (SL) von 2,4 µm gedehnt. Zwischen jedem Strecken wurde eine kurze Haltezeit von 10 s eingehalten. Nach der letzten *Stretch-Hold* Periode, wurden die Kardiomyozyten wieder auf die *Slack* SL gestaucht, um zu überprüfen, ob es zu einer Verschiebung der Ausgangskraft kam. Während des Stretchprotokolls wurde die Sarkomerlänge mit einer Kamera aufgenommen. Aus den Aufzeichnungen wurde die Kraft am Ende jeder Halteperiode (nahezu stationäre Kraft) bestimmt. Die ermittelten Kraftwerte wurden auf die Querschnittsfläche der Myozyte normalisiert.

2.3.3.2 Proteasomale Kinaseaktivitätsmessungen und Calpain

Kinaseaktivitätsmessungen

Die Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-like Enzymaktivität des 26S Proteasoms im humanen und Mäuseherzgewebe wurden in einem GloMax-Multi-Detektionssystem durch Modifikation des kommerziell erhältlichen *Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-like, Trypsin-like, Caspase-like Cell-based Assay* (Promega) wie zuvor beschrieben gemessen (Kötter et al., 2016). 2 - 5 mg LV Gewebe wurde in PBS + 5 µM EDTA mit Hilfe eines Homogenisators (VOS 14, VWR) für 5 Sekunden homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde die Probe 10 Sekunden lang im Ultraschallbad beschallt und anschließend 15 min lang bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Proteingehalt wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerabgeben bestimmt. Das Lysat mit 10 µg Protein wurde 1:1 mit dem Glo-Reagenz gemischt und nach 10 min Inkubationszeit bei RT luminometrisch gemessen. Das resultierende Lumineszenzsignal (relative Lichteinheiten, RLU) ist proportional zur Peptidaseaktivität.

Die Calpain I (μ) und II (m) Aktivitäten wurden mit dem *Calpain-GloTM Protease Assay* im humanen und Mäuseherzgewebe gemessen. Es wurden Lysate aus LV Proben hergestellt, wie im Abschnitt zur Messung der proteasomalen Kinaseaktivität beschrieben. Um Calpaine für die Aktivitätsmessung zu aktivieren, wurde dem Glo-Reagenz nach 30 min Inkubation bei RT 2 mM CaCl_2 zugesetzt. Die Lysate mit 10 μg Protein wurden schließlich 1:1 mit dem Glo-Reagenz gemischt und nach 10 min Inkubation bei RT luminometrisch gemessen. Die resultierenden Lumineszenzsignale (relative Lichteinheiten, RLU) sind proportional zur Peptidaseaktivität.

2.3.4 Molekularbiologische Methoden

2.3.4.1 Genexpressionsanalyse

Die Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird zur Analyse des Genexpressionlevels der aus einer Probe isolierten RNA verwendet. RNA wurde aus humanen Herzgewebe und Herzgewebe von Mäusen mit dem *RNeasy Fibrous Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert und mit dem NanodropTM 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. 350 ng der isolierten RNA wurden für die reverse Transkriptionsreaktion auf cDNA mit *Random* Primern unter Verwendung des *Quantitect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) verwendet. Die Zusammensetzung eines RT-PCR Ansatzes ist in Tab. 12 zu sehen. PCR Reaktionen wurden mit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung eines *Step One Plus Real Time Systems* (Applied Biosystems) durchgeführt. In Tab. 13 ist das Thermoprofil für die Reaktion zu sehen. Zur Normalisierung der eingesetzten RNA-Menge wurde bei jedem PCR-Lauf das *Housekeeping*-Gen GAPDH mitgeführt. Als Negativkontrollen diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase und ein Ansatz ohne Primer.

Tabelle 12: Pipettierschema für einen RT-PCR Ansatz.

Reagenzien	Volumen
cDNA (aus 350 ng, 1:20 verdünnt)	2,5 μL
SYBR-Green-Mix	12,5 μL
Primer 1	0,11 μL
Primer 2	0,11 μL
H ₂ O	9,78 μL

Tabelle 13: Thermoprofil für eine SYBR-Green-PCR.

Thermoprofil SYBR-Green-PCR		
Schritt 1	95°C	10 min
40 Zyklen	95°C	15 sec
	60°C	1 min
Schritt 2	Schmelzkurve	

2.4 Software

Für die Auswertung und Ausarbeitung dieser Arbeit wurde zusätzlich zu den im Text aufgeführten Programmen folgende Software verwendet: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, Sigma Plot 13 und Adobe Photoshop CS6, GraphPad Prism 6.

2.5 Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurden die Programme GraphPad Prism 6.0 und SigmaPlot Version 13.0 verwendet. Der Vergleich zweier Datensätze erfolgte durch den ungepaarten *Student`s-t*-Test. Bei einem Signifikanzniveau von $*p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Versuchen angezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Titin Abbaus über das Autophagie-System in kultivierten embryonalen Rattenkardiomyozyten

3.1.1 Inhibition und Aktivierung der Autophagie

Zur Untersuchung einer potentiellen Beteiligung der Autophagie beim Titin Abbau, wurde die autolysosomale Aktivität im Zellkulturmodell embryonaler Rattenkardiomyozyten (ERC) modifiziert. Chloroquine (CQ) ist eine häufig verwendete Substanz zur Hemmung der Autophagie. Es reichert sich in Lysosomen an und inaktiviert die darin enthaltenen Hydrolasen durch einen Anstieg des pH-Wertes. Darüber hinaus verhindert CQ die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom (Shintani und Klionsky, 2004). Metformin (MET) dagegen ist ein weit verbreitetes Antidiabetikum, von dem berichtet wurde, dass es den autolysosomalen Substratabbau aktiviert (Feng et al., 2014). Um die Wirksamkeit der Autophagie Inhibition bzw. Aktivierung in den ERC zu kontrollieren, wurde das Proteinlevel der lipidierten Form des LC3 per Western Blot Analyse mit einem LC3 Antikörper gemessen. Der Umsatz von LC3 zu seiner lipidierten Form LC3-II wird allgemein zur Quantifizierung des Autophagieflusses herangezogen. Die ermittelte Proteinmenge wurde dafür auf den Proteinlevel von α -Aktinin normalisiert. Schon nach einer zweistündigen Kurzzeitbehandlung der ERC mit CQ stieg das LC3-II Proteinlevel stark an. Eine längere Behandlung führte dabei zum weiteren Anstieg des LC3-II Proteinlevels (Abb. 14 A). In Abb. 14 B ist zu sehen, wie die Zugabe von MET zunächst ebenfalls zu einem erhöhten LC3-II Proteinlevel führt. Im weiteren Verlauf der Stimulation nimmt die Menge an LC3-II graduell ab. Durch die Behandlung der Zellen mit CQ über einen Zeitraum von bis zu 24h konnte ein gradueller Anstieg an K63-ubiquitiniertem Titin festgestellt werden (Abb. 14 C). Neben LC3 ist auch das Ankerprotein p62/SQSTM1 ein bekannter Marker des Autophagieflusses. Auch hier bewirkt CQ eine starke Erhöhung des p62/SQSTM1 Proteinlevels. Die Erhöhung des Proteinlevels spricht für eine Protein Akkumulation in den Zellen, da diese aufgrund der Autophagie Inhibition nicht mit dem Autophagie Vesikel abgebaut werden kann. Wohingegen MET geringeren p62/SQSTM1 Proteinlevel auslöst als unter Kontrollbedingungen, da das Protein durch die aktivierte Autophagie mit dem Autophagie Vesikel abgebaut werden kann (Abb. 14 D). Die CQ Behandlung für 24h führte auch zur Anreicherung von K63-ubiquitinierten Proteinen im

Molekulargewichtsbereich von etwa 100 bis 250 kDa (Abb. 14 E). Demnach können ubiquitinierte Substratproteine aufgrund der Autophagie Hemmung nicht degradiert werden und akkumulieren. Durch MET Zusatz konnte ein geringeres Level an K63-abhängige Ubiquitinierung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 100 bis 250 kDa als unter Kontrollbedingungen festgestellt werden, da diese über das Autophagosom degradiert werden können. Die Aktivierung der Autophagie führte auch bei Titin zur verminderten K63-Ubiquitinierung (Abb. 14 F).

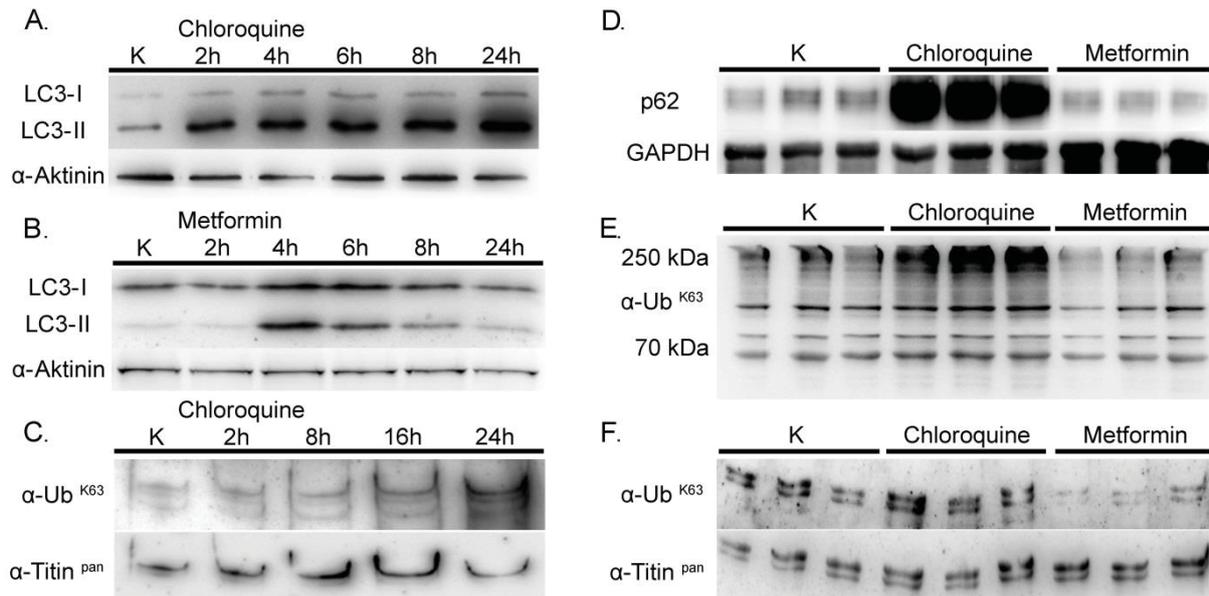


Abbildung 14: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC. Zur Inhibition der Autophagie wurden die ERC mit Chloroquine (5 μ M, 24 h) und zur Aktivierung der Autophagie mit Metformin (5 mM, 24 h) inkubiert. Western Blot Analyse zur Bestimmung (A) des LC3-I und LC3-II Proteinlevel unter Inhibition der Autophagie durch Chloroquine, (B) des LC3-I und LC3-II Proteinlevel in ERC unter Aktivierung der Autophagie durch Metformin, (C) der K63-abhängige Ubiquitinierung des Titins, (D) des p62/SQSTM1 Proteinlevel (E) der K63-Ubiquitinierung von Proteinen zwischen 70 - 260 kDa (F) der K63-Ubiquitinierung des Titins. Kontrollbedingungen (K).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Aktivierung bzw. Hemmung der Autophagie möglicherweise auch anhand der intrazellulären Lokalisation Autophagie-assoziiierter Proteine wie LC3 und p62/SQSTM1 beobachtet werden kann. Die Immunfluoreszenzfärbung in ERC unter Kontrollbedingungen zeigte für LC3 erwartungsgemäß eine zytosolische Lokalisation, die durch die Autophagie-Inhibition erhöht wurde (Abb. 15 A, Pfeile). Durch die Behandlung der ERC mit Metformin, wurde die Lokalisation von LC3 nicht beeinflusst (Abb. 15 A). Unter Kontrollbedingungen zeigte p62/SQSTM1 hauptsächlich zytosolische, aber auch partielle sarkomerische Lokalisation an der A-Bande/M-Linie (Abb. 15 B). Die Behandlung mit MET führte zu keiner Lokalisationsänderung von p62/SQSTM1 (Abb. 15 B). Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der Autophagie mit CQ

möglicherweise zu einer Störung der sarkomerische Interaktion, was die beobachtete starke Proteinakkumulation von p62/SQSTM1 im Cytosol erklären könnte. Da p62/SQSTM1 im Inneren des Autophagosoms lokalisiert ist, wird es ebenfalls mit dem Autophagie Vesikel abgebaut. Im Umkehrschluss bewirkt eine Inhibition der Autophagie die Akkumulation von p62/SQSTM1 (Hale et al., 2013).

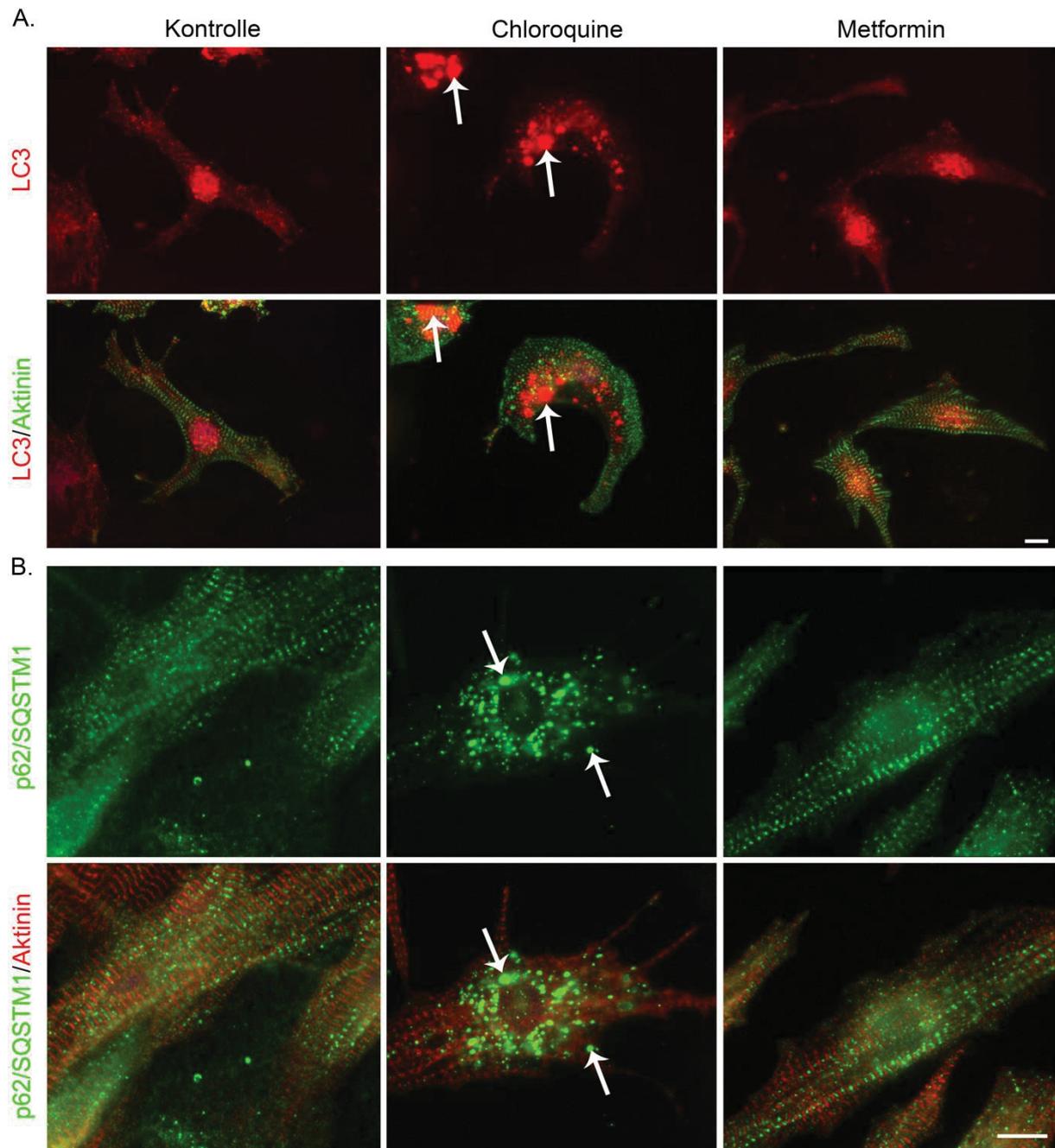


Abbildung 15: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC. Immunfluoreszenz Analyse der Lokalisation Autophagie-assoziiertes Proteine in ERC. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit von Chloroquine oder Metformin kultiviert, anschließend fixiert und mit (A) LC3 oder (B) p62/SQSTM1 sowie Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. α -Aktinin und PEVK dienten als Muskelmarkerproteine. Balkenlänge: 10 μ m. Pfeile markieren Proteinakkumulationen.

Weitere Immunfluoreszenzfärbungen an fixierten ERC dienten der Lokalisationsuntersuchung weiterer Autophagie-assoziiierter Proteine wie Beclin 1 und LAMP1. LAMP1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) gehört zu den Hauptproteinkomponenten der lysosomalen Membran und dient hier als Marker für die Lysosomenanzahl in den ERC. Die Immunfluoreszenzfärbung unserer ERC zeigte für Beclin 1 eine sarkomerische Lokalisation an der A-Bande/M-Linie, die sich durch die CQ oder MET Stimulationen nicht änderte (Abb. 16 A). LAMP1 zeigte unter allen Versuchsbedingungen eine zytosolische Lokalisation (Abb. 16 B), wobei es durch die Inhibition der Autophagie zur verstärkten Akkumulation von LAMP1 im Zytosol kam (Abb. 16 B, Pfeile).

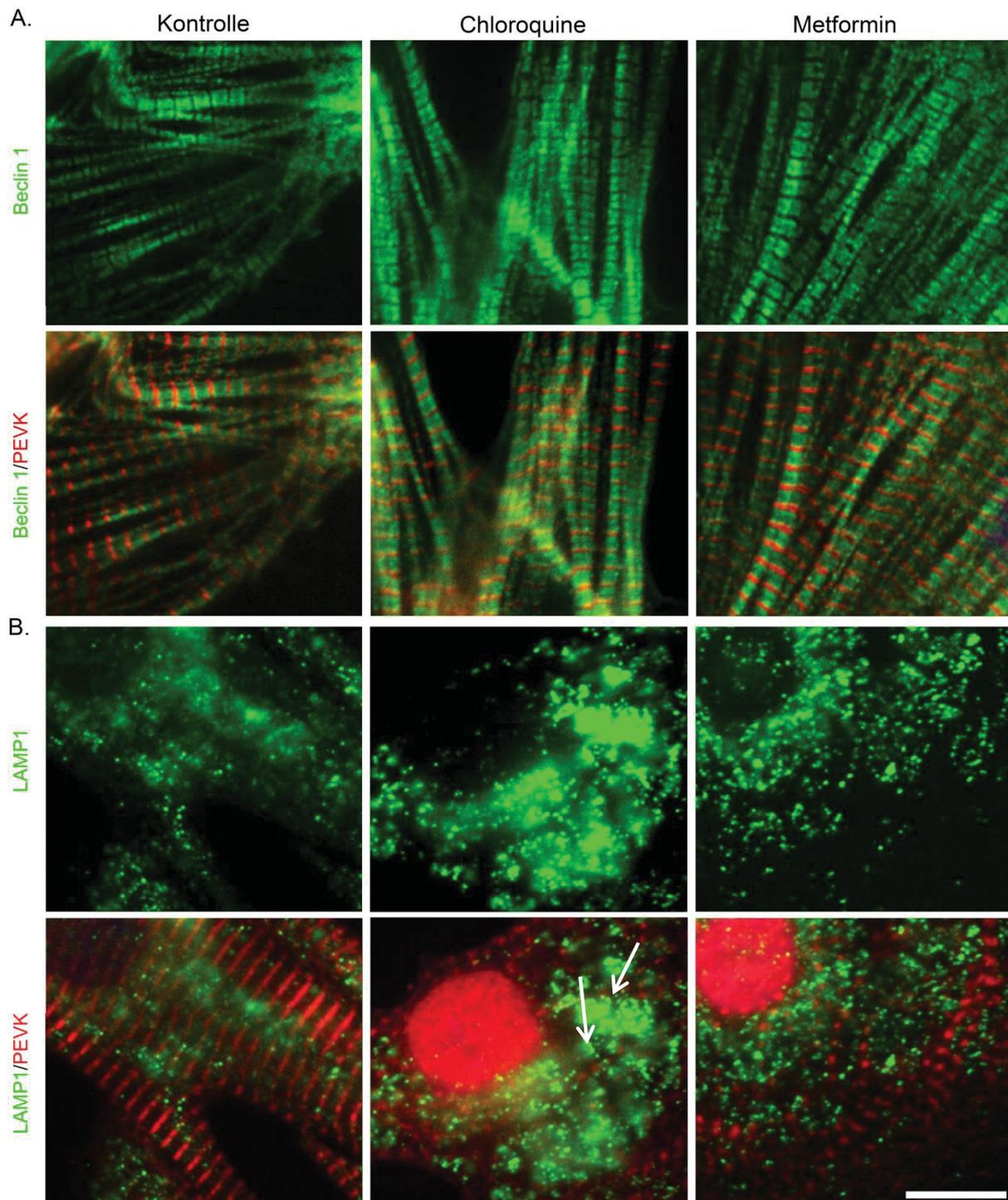


Abbildung 16: Chloroquine-induzierte Inhibition und Metformin-induzierte Aktivierung der Autophagie in ERC. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit von Chloroquine oder Metformin kultiviert, anschließend fixiert und mit (A) Beclin 1 oder (B)

Um einen potentiellen Effekt der Autophagie Inhibition und Aktivierung auf die Zusammensetzung der beiden Titin Isoformen in unseren ERC zu untersuchen, wurde das Verhältnis der N2B und der N2BA Titin Isoformen per Coomassiegefärbten 2,1% SDS-PAGE bestimmt (Abb. 17 A). Es konnten keine Unterschiede

bzgl. der Titin Isoformen Zusammensetzung aufgrund der Autophagie Inhibition bzw. Aktivierung festgestellt werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Autophagie Inhibition bzw. Aktivierung in den ERC einen Einfluss auf den Abbau des *full length* Titins (T1) zum spezifischen Titin Abbauprodukt (T2) nimmt. Untersucht wurde dies durch das T2/T1 Verhältnis auf Coomassie-gefärbte 2,1% SDS-PAGE (Abb. 17 B). Eine Veränderung des T2/T1 Verhältnisses aufgrund der Behandlung mit CQ bzw. MET könnte auf eine Beteiligung der Autophagie am Abbau des Titins hindeuten. Durch die Autophagie-Inhibition konnte ein signifikant erhöhtes T2/T1 Verhältnis in den ERC festgestellt werden (Abb. 17 B). Dies spricht für einen reduzierten Abbau des intakten *full length* Titins (T1) bedingt durch die Autophagie Aktivierung. Zwischen Kontrollbedingungen (K) und der MET-Behandlung der Zellen konnte kein Unterschied im T2/T1 Verhältnis festgestellt werden.

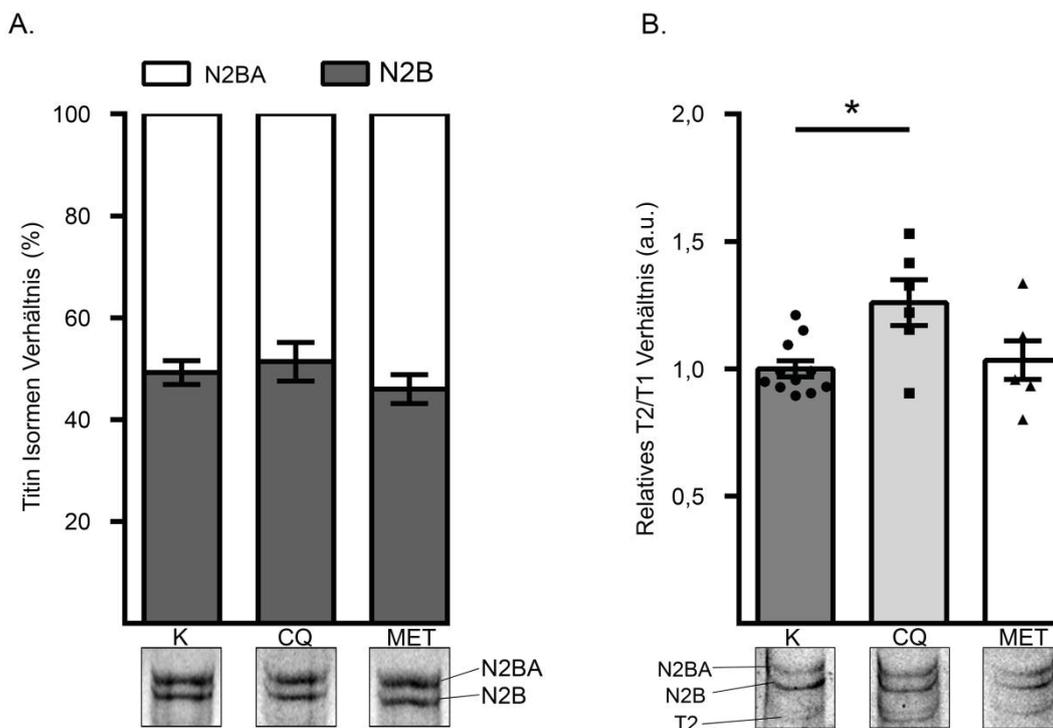


Abbildung 17: Bestimmung des Titin Isoformen Verhältnisses und des T2/T1 Verhältnisses in embryonalen Rattenkardiomyozyten. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen oder unter Behandlung mit Chloroquine (CQ, 5 μ M) bzw. Metformin (MET, 5 mM) für einen Zeitraum von 24h kultiviert. **(A)** Das durchschnittliche Titin Isoformen Verhältnis wurde als $N2BA + N2B = 100\%$ angegeben. Repräsentative Titinbanden sind unter allen Balkendiagrammen ($n = 3$ unabhängige Präparationen) dargestellt. **(B)** Bestimmung des T2/T1 Verhältnisses. Der Abbau wurde durch das Verhältnis des typischen Titin Abbauprodukts (T2) im Verhältnis zum Gesamt-Titin (T1; $N2BA + N2B$) quantifiziert. Repräsentative Blots sind unter den Balkendiagrammen dargestellt. Normiert wurden auf Daten aus Kontrollbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Zellpräparationen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * markiert, ($p < 0,05$ im One-Way-ANOVA-Test).

3.1.2 Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten

Die Ubiquitinierung von Substratproteinen erfolgt durch E3-Ligasen, die dafür in direktem Kontakt mit ihrem Substrat stehen müssen. Deshalb wurde die Lokalisation von muskelspezifischen E3-Ligasen in kultivierten ERC unter Kontrollbedingungen untersucht (Abb. 18). Neben dem bekannten Titin-Interaktionspartner MuRF3 wurde auch die Lokalisation von MuRF1, FBX32 und Stub1 untersucht. MuRF1 zeigte überwiegend eine zytosolische Lokalisation (Abb. 18 A). MuRF3 dagegen zeigte eine partielle sarkomerische Lokalisation (Abb. 18 B). FBX32 wies eine deutliche Sarkomerlokalisierung im Bereich der M-Linie/A-Bande auf (Abb. 18 C). Für Stub1 wurde eine Lokalisation an der Z-Scheibenregion der Sarkomere beobachtet (Abb. 18 D). Calpaine, insbesondere Calpain-1, werden von Ubiquitinligasen benötigt, um sarkomerische Proteine für den Abbau durch das Proteasom zu markieren (Fareed et al., 2006). Daher wurde die Lokalisation von Calpain-1 untersucht (Abb. 18 E). Hierbei zeigte sich, ähnlich wie bei Stub1, eine Z-Scheiben assoziierte, sarkomerische Lokalisation für Calpain-1.

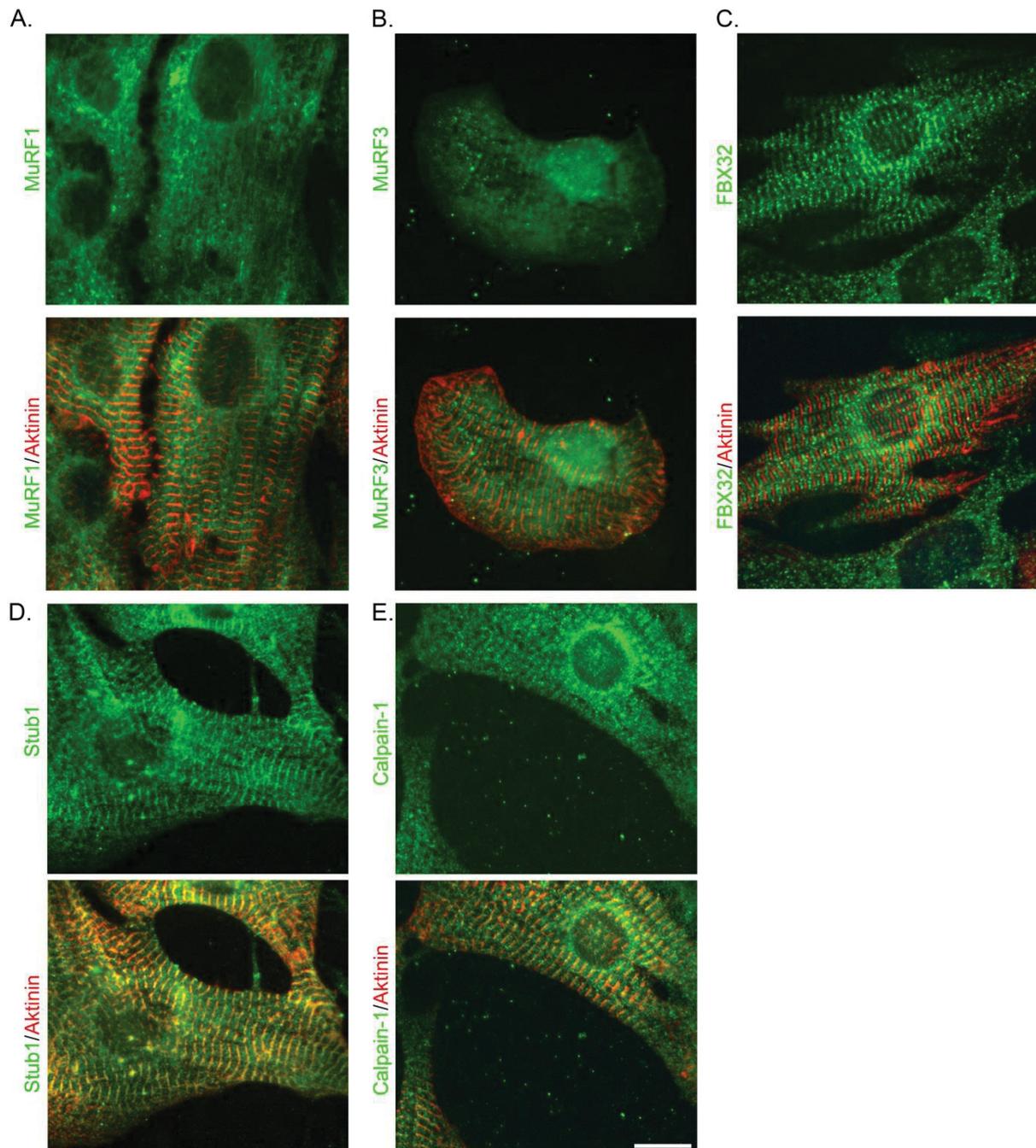


Abbildung 18: Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC). Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert, anschließend fixiert und mit (A) MuRF1, (B) MuRF3, (C) FBX32, (D) Stub1 und (E) Calpain-1, sowie Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. α -Aktinin diente als Muskelmarkerprotein. Balkenlänge: 10 μ m.

3.1.3 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem proteasomalen und dem autolysosomalen Proteinabbauweg

Neueste Studien belegen, dass eine Wechselwirkung zwischen dem proteasomalen Abbauweg und der Autophagie besteht. Es wurde berichtet, dass es zur Aktivierung der Autophagie kommt, wenn ubiquitinierte Proteine vom Proteasom nicht degradiert

werden und somit akkumulieren (Bao et al., 2017). Umgekehrt führt die Inhibition der Autophagie zur Beeinträchtigung der proteasomalen Degradation und damit auch zur Akkumulation ubiquitinerter Substrate sowie deren Aggregaten (Matsumoto et al., 2011). Zur näheren Untersuchung der molekularen Mechanismen des Titin Abbaus über die Autophagie und über das Proteasom, wurde die Wechselwirkung zwischen den beiden Abbausystemen untersucht. Dazu sollte der Einfluss der Autophagie-Inhibition auf die Regulation des Titin Abbaus über das Proteasom untersucht werden. In Abb. 19 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zu sehen. Der Proteingehalt von PSMA2 nach Inhibition und nach Aktivierung der Autophagie ist in Abb. 19 A dargestellt. PSMA2 ist ein Bestandteil des 20S Proteasoms und kann somit als Marker für die Menge an Proteasomen in den Zellen verwendet werden. Hier ist nach Inhibition der Autophagie ein signifikanter Anstieg des PSMA2 Proteingehalts festzustellen. Zur Untersuchung, ob es nach der Inhibition der Autophagie zum einem potentiellen, kompensatorischen Abbau ubiquitinerter Proteine über das Proteasom kommt, wurden die drei Enzymaktivitäten des Proteasoms gemessen (Abb. 19 B). Die Messung erfolgte nach 24-stündiger Inhibition bzw. Aktivierung der Autophagie in den ERC. Es konnte keine Enzymaktivitätsänderung nach Inhibition der Autophagie festgestellt werden, somit scheint die Inhibition der Autophagie nicht zu erhöhter proteasomaler Aktivität zu führen. Nach der Autophagie Inhibition stieg die K48-Ubiquitinierung des Titins jedoch an. Dies könnte bedeuten, dass entweder die proteasomale Aktivität durch die CQ-Stimulation beeinträchtigt ist, oder üblicherweise auch K48-ubiquitinierte Proteine über das Autophagosom abgebaut werden können (Abb. 19 C).

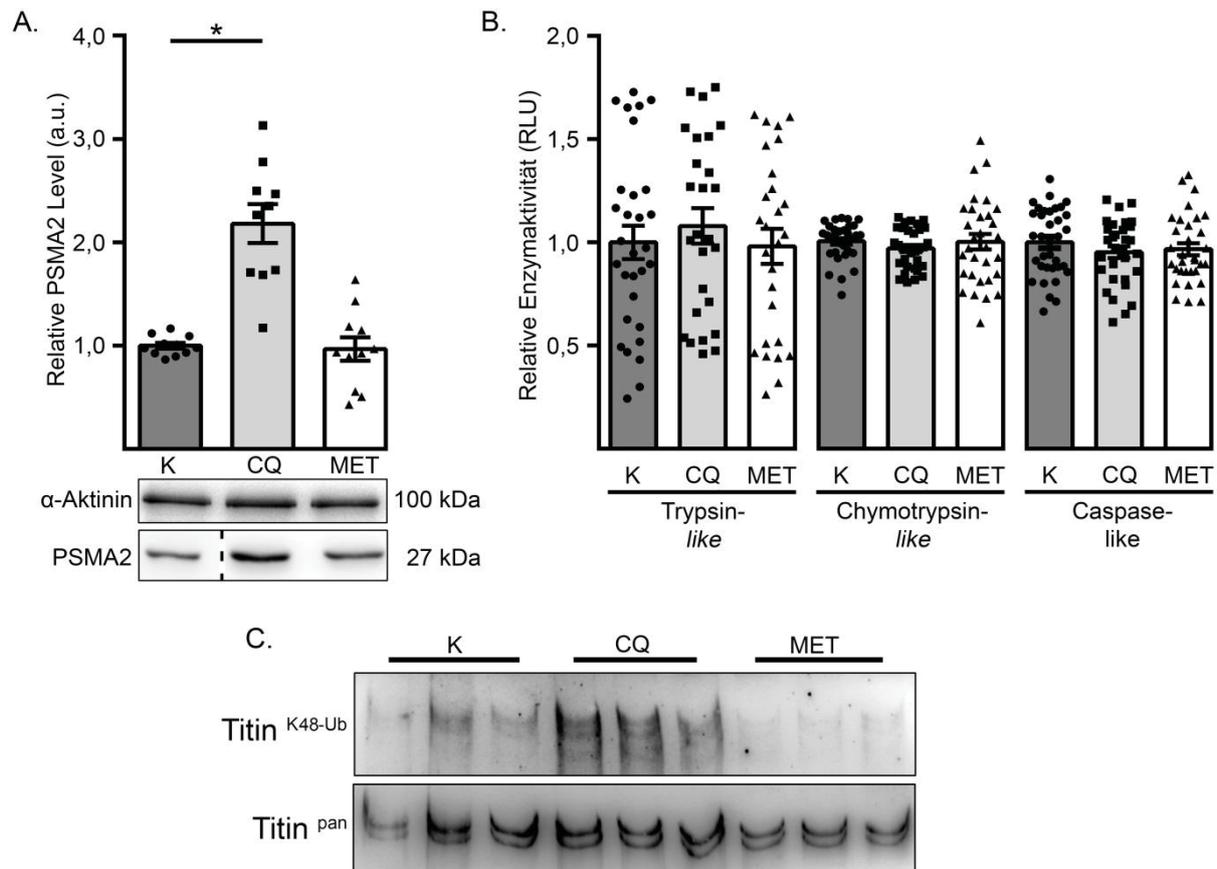


Abbildung 19: Wechselwirkung zwischen der Autophagie und dem Ubiquitin-Proteasom-System. Embryonale Rattenkardiomyozyten (ERC) wurden unter Kontrollbedingungen (K) kultiviert oder mit Chloroquine (CQ, 24h, 5 μ M) bzw. mit Metformin (MET, 24h, 5 mM) behandelt. **(A)** Western Blot Analyse des *Proteasomal subunit type-2* (PSMA2) Proteingehalts in ERC mit α -Aktinin als Beladungskontrolle. **(B)** Messung der proteasomalen Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-like Enzymaktivität in ERC. **(C)** Western Blot Analyse der K48-Ubiquitinierung (K48-Ub) des Titins in ERC. Die Gesamt-Titin Menge wurde über die Verwendung eines PEVK-Antikörpers bestimmt. Repräsentative Blots sind unter den Balkendiagrammen dargestellt. Normiert wurde auf Daten aus Kontrollbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Zellpräparationen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * markiert, ($p < 0,05$ im *Student's t-Test*).

Zur weiteren Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Autophagie und dem Ubiquitin-Proteasom-System, wurde die Lokalisation ubiquitiniertes Proteine per Immunfluoreszenzfärbung bestimmt (Abb. 20). Nach Autophagie Inhibition konnte eine stärkere Ubiquitinfärbung in den ERC beobachtet werden, da ubiquitinierte Proteine aufgrund der Hemmung des Autophagieflusses nicht abgebaut werden können und akkumulieren. Dagegen wurde die Lokalisation ubiquitiniertes Substratproteine durch die Aktivierung der Autophagie nicht geändert (Abb. 20).

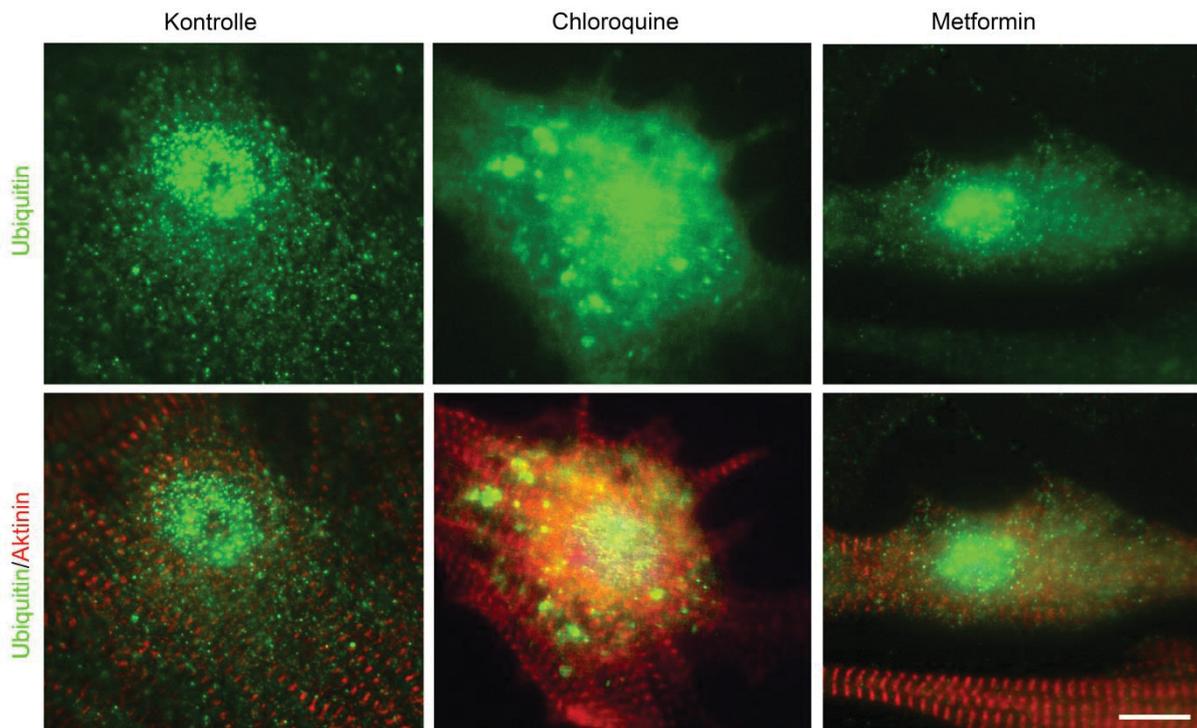


Abbildung 20: Lokalisation von Ubiquitinmolekülen in ERC. Die Zellen wurden unter Kontrollbedingungen kultiviert oder mit Chloroquine (24h, 5 μ M) bzw. mit Metformin (24h, 5 mM) behandelt fixiert und einem Ubiquitin-Antikörper, sowie Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. α -Aktinin diente dabei als Muskelmarkerprotein. Balkenlänge: 10 μ m.

In Abb. 21 ist die Beteiligung des Autophagie-Systems und des Ubiquitin-Proteasom-System am Titin Abbau schematisch dargestellt. Durch die Inhibition der Autophagie kam es zum Anstieg des p62/SQSTM1 und des LC3-II Proteinlevels. Auch die K63-Ubiquitinierung des Titins wurde aufgrund der Autophagie Inhibition gesteigert. Die Aktivierung der Autophagie dagegen führte zu einem verminderten Proteinlevel von p62/SQSTM1 und LC3-II. Auch die K63-Ubiquitinierung des Titins wurde durch die Aktivierung der Autophagie verringert. Die Modifizierung der Autophagie Aktivität hatte über eine Wechselwirkung auch einen Effekt auf den Titin Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System. Dabei bewirkte die Autophagie Inhibition eine Erhöhung des PSMA2 Proteingehalts und auch eine verstärkten K48-Ubiquitinierung des Titins. Dahingegen führte die Aktivierung der Autophagie Aktivierung zu keiner Änderung des PSMA2 Proteingehalts, aber zu einer Verminderung der K48-Ubiquitinierung des Titins. Diese Ergebnisse unterstreichen die Beteiligung der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems am Abbau des Titins.

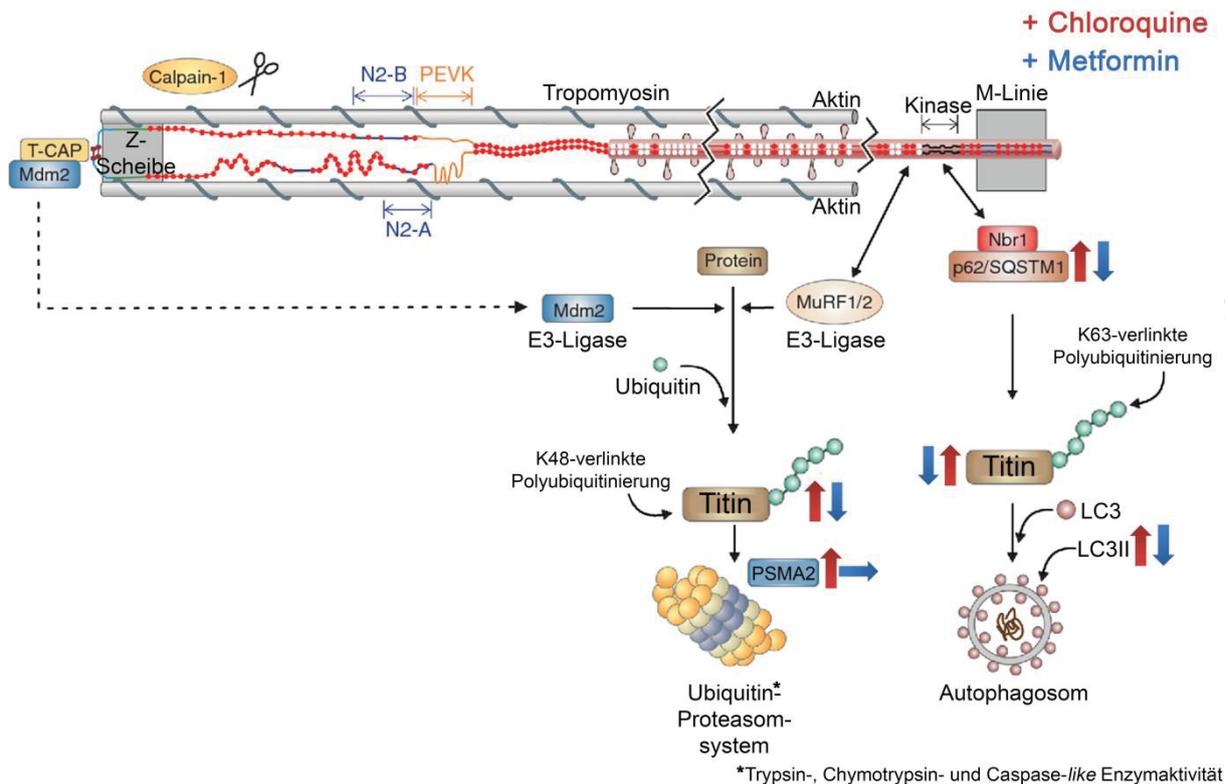


Abbildung 21: Schematischer Überblick der Regulation der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Die Inhibition der Autophagie erfolgte mit Chloroquine (rot) und die Aktivierung der Autophagie mit Metformin (blau). Die Pfeilrichtung gibt das Proteinlevel nach der jeweiligen Stimulation wieder (Pfeil nach oben = erhöhtes Proteinlevel, Pfeil nach unten = vermindertes Proteinlevel, Pfeil nach rechts = keine Änderung des Proteinlevels). Modifiziert nach Kötter et al., 2014.

3.2 Veränderungen der elastischen Titin Eigenschaften im Alterungsprozess und die Beteiligung des Protein-Qualitätskontrollsystems am Titin Abbau

3.2.1 Titin Isoformen Zusammensetzung im alternden Herzen

Linksventrikuläre Proben wurden per Coomassie-gefärbter 2,1% SDS-PAGE analysiert, um den Effekt des Alterungsprozesses auf die Titin Isoformen Zusammensetzung zu untersuchen. In Abb. 22 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zu sehen. Die jeweiligen Anteile der Titin Isoformen, N2BA und N2B, ergeben zusammen 100% des Gesamt-Titins. Die humanen Herzen von Organspendern zwischen 17-50 Jahren (<50) wurden mit humanen Herzen von 51-73 Jahren (>50) verglichen. In jungen humanen Herzen (<50) wurde ein Anteil von $66,2 \pm 0,95\%$ N2B im Vergleich zur älteren humanen Gruppe mit $65,3 \pm 0,53\%$ N2B Anteil festgestellt (Abb. 22 A). Demnach wird die Titin Isoformen Zusammensetzung in humanen Herzen nicht altersbedingt verändert. Zusätzlich wurde die

Zusammensetzung der Titin Isoformen auch in LV von jungen (6 Monate = 6m) mit alten (20 Monate = 20m) Mäuseherzen verglichen. Der N2B Anteil in Herzen junger Mäuse (6m) unterschied sich mit $79,6 \pm 0,47\%$ N2B nicht von älteren Mäusen (20m) mit $79,4 \pm 0,46\%$ N2B (Abb. 22 C). Auch hier lässt sich feststellen, dass das Altern keinen Effekt auf die Titin Isoformen Zusammensetzung hat. Als weiterer Aspekt innerhalb der humanen Proben wurde ein potentieller Einfluss von Geschlechtsunterschieden auf die Titin Isoformen Zusammensetzung analysiert, Es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen Frauen ($64,36 \pm 1,23\%$ N2B) und Männern ($66,57 \pm 2,12\%$ N2B) (Abb. 22 B).

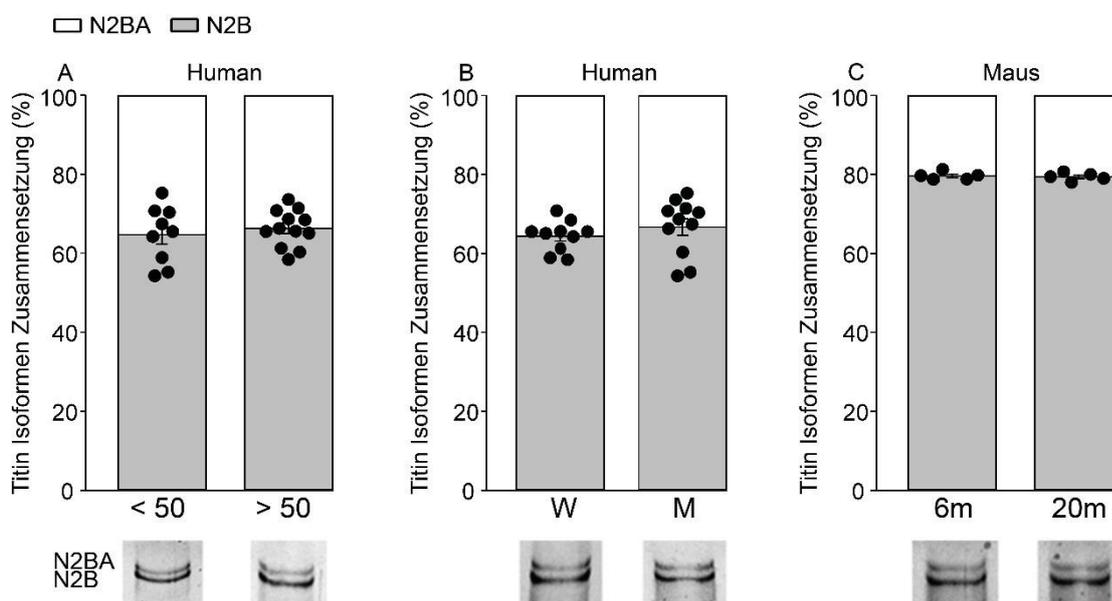


Abbildung 22: Titin Isoformen Zusammensetzung in humanen und Maus Herzgewebe (N2BA+N2B=100%). (A) Titin Isoformen Zusammensetzung in humanem Herzgewebe von 17-50 Jahren (<50) im Vergleich zu Daten aus humanen Herzen von 51-73 Jahren (>50). (B) Titin Isoformen Zusammensetzung im humanen Herzgewebe in Bezug auf das Geschlecht. (C) Titin Isoformen Zusammensetzung in Herzgewebe von 6 Monate (6m) und 20 Monate (20m) alten Mäusen. Die durchschnittliche Titin Isoformen Zusammensetzung wird als N2BA+N2B = 100% angegeben. Unterhalb der Balkendiagramme sind repräsentative Titingele dargestellt (<50 n = 9; >50 n = 12; W n = 10; M n = 11; 6m n = 5; 20m n = 5). Die Daten zur Isoformenanalyse in Abb. 22 wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Phosphorylierung der elastischen I-Bandendomäne des Titins im alternden Herzen

Die Gewebeproben aus humanen und Mäuseherzen wurden per Western Blot analysiert, um potentielle Unterschiede bezüglich der Titinphosphorylierung der elastischen I-Banden Domänen zu untersuchen. Phosphorylierungsunterschiede im I-Bandensegment können zu Unterschieden in der passiven Kardiomyozytensteifigkeit führen. Das Phosphorylierungslevel von S4010 war in

alten humanen Herzen (>50) um $0,82 \pm 0,06$ signifikant geringer als in jungen Donorherzen (<50) (Abb. 23 A). Die S4099-Phosphorylierung dahingegen war in alten Donorherzen (>50) um $3,8 \pm 0,79$ signifikant höher als in jungen humanen Herzen (<50) (Abb. 23 A). Isoliert betrachtet führt eine Hypophosphorylierung an S4010 im N2-Bus Segment zu höherer Titin-basierter Kardiomyozytensteifigkeit. Dahingegen führt eine Hyperphosphorylierung an S4099, ebenfalls im N2-Bus, zum gegenteiligen Effekt, einer Senkung der Titin-basierten passiven Kardiomyozytensteifigkeit.

Es konnte ferner eine um $0,69 \pm 0,04$ signifikant verringerte Erk1/2-Phosphorylierung in alten humanen Herzen (>50) im Vergleich zu jungen humanen Herzen (<50) festgestellt werden. Dieses Ergebnis repräsentiert somit die Hypophosphorylierung an S4010 durch eine geringere Erk1/2 Kinaseaktivität (Abb. 23 B). Die Troponin I Phosphorylierung unterschied sich mit $0,97 \pm 0,09$ in alten humanen Herzen (>50) nicht von jungen humanen Herzen (<50) (Abb. 23 C). Auch das iNOS Proteinlevel unterschied sich zwischen den beiden humanen Gruppen nicht, diese betragen in alten humanen Herzen (>50) $1,19 \pm 0,13$. (Abb. 23 D). Im PEVK Segment war die S11878-Phosphorylierung in alten humanen Herzen (<50) mit $1,28 \pm 0,18$ nicht signifikant verändert im Vergleich zu jungen humanen Herzen (<50) (Abb. 23 E). Auch das Phosphorylierungslevel an S12022 unterschied sich mit $1,74 \pm 0,25$ in alten Herzen nicht signifikant von den jungen humanen Herzen (Abb. 23 E). Basierend auf der PEVK Phosphorylierung ist demnach kein Effekt auf die Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit zu erwarten. Die Untersuchung der PKC α -Phosphorylierung lag bei $0,98 \pm 0,08$ in alten humanen Herzen (<50) und ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu alten humanen Herzen (<50) (Abb. 23 F).

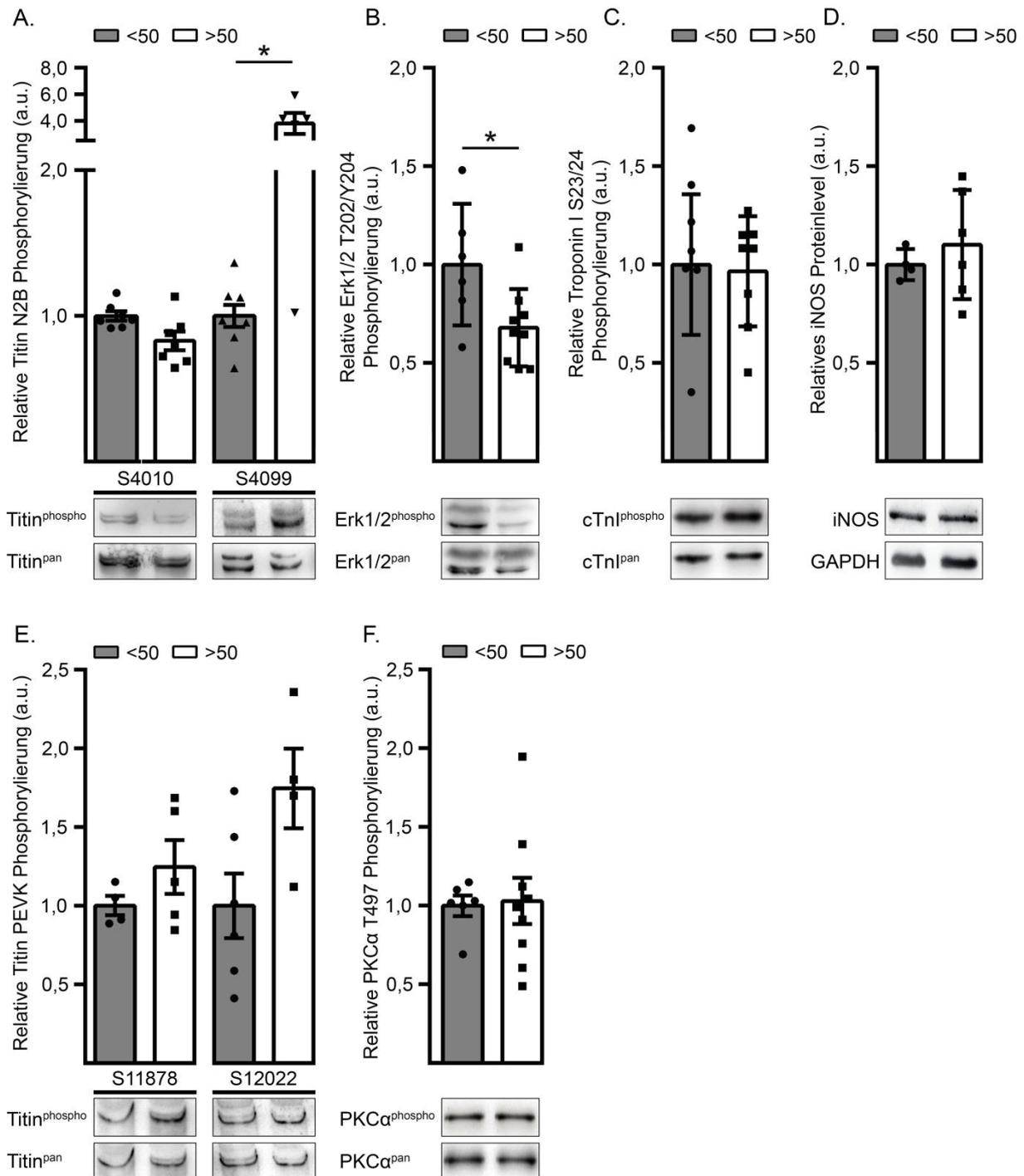


Abbildung 23: Ergebnisse der Detektion der Titin- Phosphorylierung und Kinase-Aktivität in humanen Herzgewebe. Analyse der Phosphorylierungsveränderungen des Titins im N2-B (N2-Bus) Segment an (A) Serinrest S4010 und S4099, sowie die Analyse des Phosphorylierungslevels von (B) Erk1/2 als Indikator der Erk1/2 Kinaseaktivität, (C) kardialen Troponin I als indirekter Indikator der cAMP-abhängigen Kinaseaktivität und (D) des iNOS Proteinlevels als indirekter Indikator der cGMP-abhängigen Kinaseaktivität. Analyse der relativen Phosphorylierung des PEVK Segments (Titin Domäne reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin) mit Antikörpern gegen Serinrest (E) S11878 und S12022. Analyse der (F) PKC α Phosphorylierung an T497 als direkter Indikator der PKC α Kinaseaktivität. Analysiertes humanes Herzgewebe aus <50 (17-50 Jahre) n = 4-7 und >50 (51-73 Jahre) n = 4-9. Unter den Graphen signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t*-Test). a.u. = arbitrary units. sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Statistisch

Da die N2BA-Isoform in Mäuseherzen nur schwach exprimiert wird, und daher im Western Blot Verfahren nur limitiert dargestellt werden kann, wurden lediglich die Phosphorylierungsunterschiede der Titin N2B-Isoform analysiert. Das Phosphorylierungslevel an S4010 im N2-Bus Segment des Titin in alten Mäuseherzen (20m) war um $0,73 \pm 0,08$ signifikant geringer als in jungen Mäuseherzen (6m) (Abb. 24 A). Diese Hypophosphorylierung würde isoliert von anderen Einflussfaktoren betrachtet, auch in Mäusen zu einer Erhöhung der Titin-basierten passiven Kardiomyozytensteifigkeit führen. Ein um $1,40 \pm 0,10$ signifikant erhöhtes Phosphorylierungslevel konnte an S4099 in alten Mäuseherzen im Vergleich zu jungen Mäusen (6m) festgestellt werden (Abb. 24 A) und würde zu erhöhter Titin-basierter, passiver Kardiomyozytensteifigkeit führen. Die aus den Phosphorylierungsunterschieden resultierenden Effekte auf die passive Kardiomyozytenseifigkeit sind somit gegensätzlich und sollten sich funktionell aufheben. Für Erk1/2 konnte in alten Mäuseherzen (20m) mit einem Phosphorylierungsunterschied von $0,71 \pm 0,20$ kein signifikanter Unterschied zu jungen Mäusen (6m) festgestellt werden (Abb. 24 B). Für Troponin I konnte in alten Mäuseherzen (20m) mit $0,59 \pm 0,05$ eine signifikante Hypophosphorylierung von Troponin I im Vergleich zu jungen Mäuseherzen (6m) festgestellt werden (Abb. 24 C). Das iNOS Proteinlevel lag bei $1,27 \pm 0,15$ und unterschied sich somit nicht signifikant von jungen Herzen (6m) (Abb. 24 D).

Die Analyse der PEVK-Phosphorylierung ergab an S11878 in alten Mäuseherzen (20m) mit $1,40 \pm 0,38$ keinen signifikanten Unterschied zu den untersuchten Gewebe aus jungen Mäuseherzen (6m) (Abb. 24 E). Auch an S12022 im PEVK Segment konnte bei einem Phosphorylierungslevel von $1,06 \pm 0,05$ kein signifikanter Unterschied zwischen jungen (6m) und alten Mäuseherzen (20m) nachgewiesen werden (Abb. 24 E). Somit ist basierend auf der PEVK Phosphorylierung auch in Mäusen kein Effekt auf die Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit zu erwarten. Die relative PKC α Phosphorylierung lag in alten Mäuseherzen (20m) bei $1,12 \pm 0,13$ wies im Vergleich mit jungen Mäusen (6m) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 24 F).

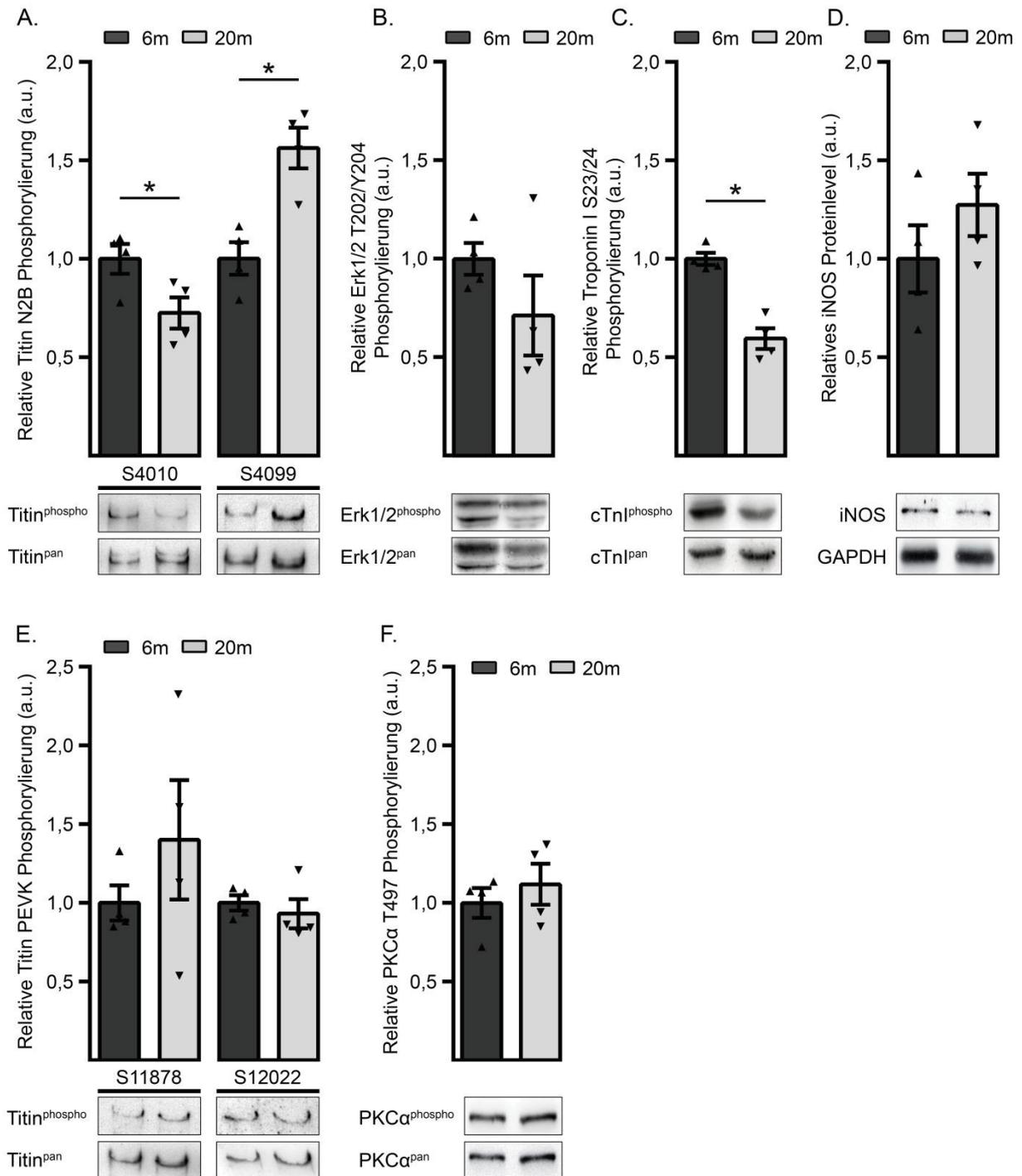


Abbildung 24: Ergebnisse der Detektion der Titin- und Kinase-Phosphorylierung in alterndem Mäuseherzgewebe mittels Western Blot. Analyse der Phosphorylierungsveränderungen des Titins im N2-B (N2-Bus) Segment an (A) Serinrest S4010 und S4099, sowie die Analyse der Phosphorylierungsniveaus von (B) Erk1/2 als Indikator der Erk1/2 Kinaseaktivität, (C) kardialem Troponin I bei S23/24 als direkter Indikator der cAMP-abhängigen Kinaseaktivität und (D) des iNOS Proteinlevels als Indikator der cGMP-abhängigen Kinaseaktivität. Analyse der relativen Phosphorylierung des PEVK Segments (Titin Domäne reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin) mit Antikörpern gegen Serinrest (E) S11878 und S12022. Analyse der (F) PKCα Phosphorylierung bei T497 als indirekter Indikator der PKCα Kinaseaktivität. Analysiertes Mäuseherzgewebe aus 6m (6 Monate) n = 4 und 20m (20 Monate) n = 4. Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test*). a.u. = arbitrary units.

3.2.3 Die Titin-abhängige passive Steifigkeit von Kardiomyozyten im Alterungsprozess

Die Messergebnisse der Titin-abhängigen passiven Spannung isolierter Kardiomyozyten sind in Abb. 25 dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass es durch den Alterungsprozess zu keiner Änderung der passiven Längen-Spannungs-Beziehung in den humanen (Abb. 25 A) und Mäuseherzen (Abb. 25 B) im Sarkomerlängenbereich von 1,9 - 2,4 μm kam. Demnach führt das Altern alleine zu keinem Unterschied in der Titin-basierten passiven Steifigkeit.

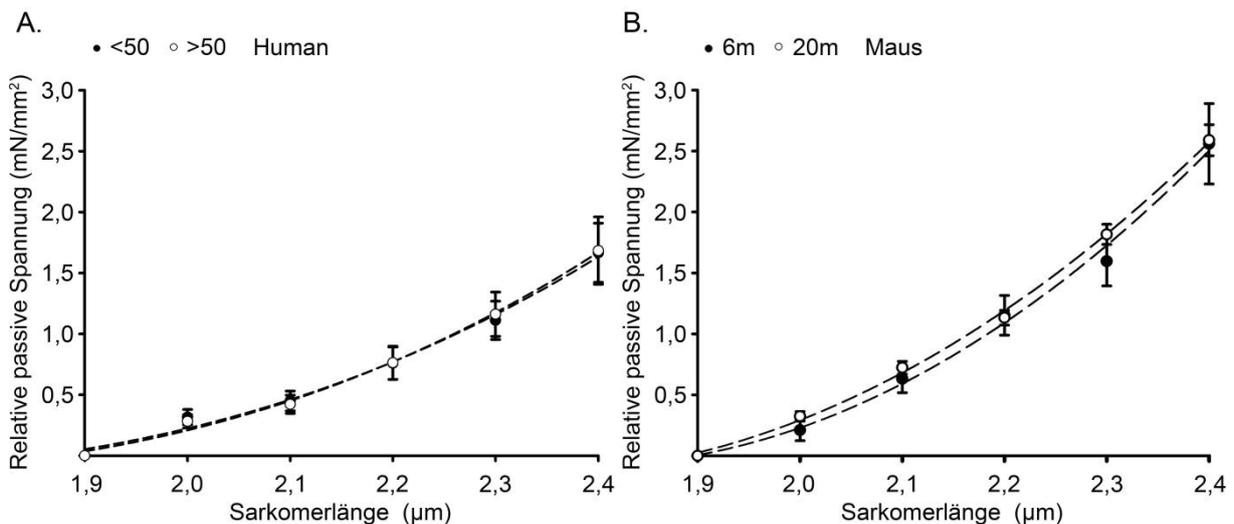


Abbildung 25: Passive Spannung gehäuteter Kardiomyozyten aus humanen- und Maus Herzgewebe. Passive Spannung versus Sarkomerlängen Beziehung für humane- und Mäusekardiomyozyten. **(A)** Analyse von humanem Gewebe von 17-50 Jahren (<50, n = 8) und 51-73 Jahren (>50, n = 11) alten Spendern. **(B)** Mäuseherzgewebe wurde von 6 Monate (6m, n = 5) und 20 Monate (20m, n = 5) alten Tieren untersucht. Die Kurven sind Polynom-Fits zweiter Ordnung zu den Mittelwerten \pm SEM. Die Daten zur Messung an isolierten Kardiomyozyten aus Mausegeweben in Abb. 25 wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Genexpression extrazellulärer Matrixproteine im alternden Herzen

Die myokardiale Steifigkeit wird zum einen durch das Titinfilament der Kardiomyozyten beeinflusst und zum anderen durch die Kollagenfasern der extrazellulären Matrix. Daher wurde eine Genexpressionsanalyse der extrazellulären Matrixproteine Kollagen 1 (Col1a1), Kollagen 3 (Col3a1) und ihrer Quervernetzerproteine Lysyloxidase 1 (LOXL1) und 2 (LOXL2) in jungen und alten humanen und Mäuseherzen durchgeführt. Abb. 26 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. Die Genexpression von Kollagen 1 veränderte sich nicht durch das Altern in humanen Herzen (Abb. 26 A). Dahingegen war die Kollagen 3 mRNA-Expression in alten humanen Herzen (>50) im Vergleich zu jungen Herzen (<50)

signifikant reduziert (Abb. 26 A). Ein Grund hierfür könnte der erhöhte Kollagen 3 Proteinanteil in den Zellen sein. Die mRNA Expression von LOXL1 und LOXL2, den Quervernetzern von Kollagen 1 und 3, veränderte sich in humanen Herzen durch den Alterungsprozess nicht (Abb. 26 A). Im Mäusegewebe zeigte die mRNA Expressionsanalyse von Kollagen 1, Kollagen 3, LOXL1 und LOXL2 keine signifikante altersbedingte Änderung auf (Abb. 26 B).

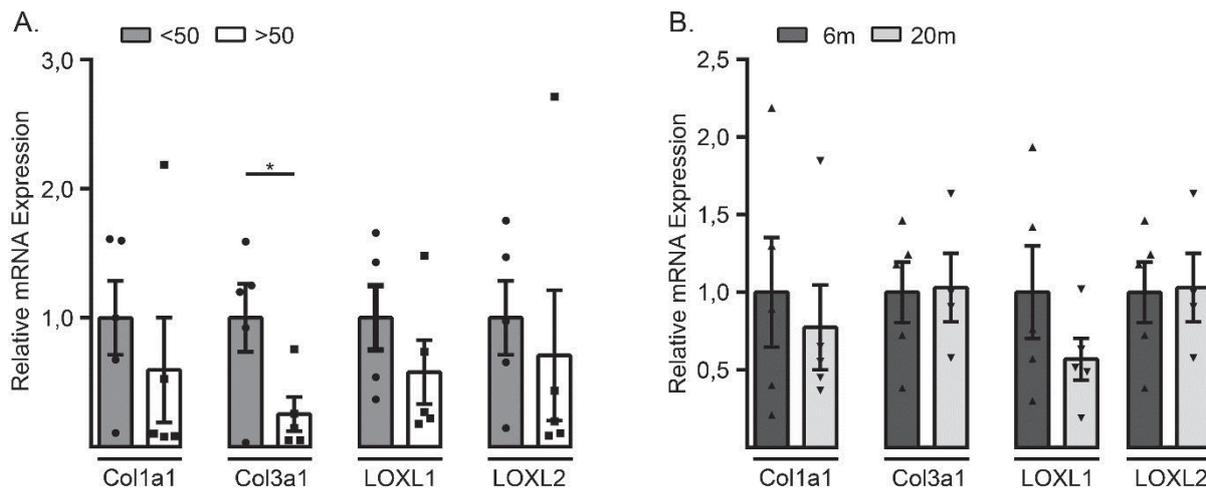


Abbildung 26: Genexpressionsanalyse extrazellulärer Matrixproteine. RT-PCR Analyse der mRNA Expression von Kollagen 1 (*Col1a1*) und Kollagen 3 (*Col3a1*), sowie von Lysloxidase 1 (LOXL1) und Lysyloxidase 2 (LOXL2) in linkventrikulären Gewebe aus (A) humanem (<50, n = 4-5; >50, n = 5) und (B) Mäuseherzgewebe (6m, n = 5; 20m, n = 5). Die Diagramme zeigen den mittleren \pm SEM. a.u. = arbitrary units. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t*-Test).

3.2.5 Die Regulation des UPS und des Calpain-Systems im alternden Herzen

Zur Analyse der Regulation des Titin Abbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) im alternden Herzen, wurden die drei proteasomalen Enzymaktivitäten (Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-like Aktivität) mittels eines Lumineszenz-basierten Assays gemessen. Abb. 27 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. In alten humanen (<50) Herzen lag die relative Trypsin-like Enzymaktivität bei $0,82 \pm 0,04$ und war somit signifikant geringer als in jungen humanen Herzen (<50) (Abb. 27 A). Die Chymotrypsin-like Enzymaktivität betrug in alten humanen Herzen (>50) $0,71 \pm 0,07$ und war somit in alten humanen Herzen (>50) im Vergleich zu jungen Herzen (<50) signifikant reduziert (Abb. 27 A). Außerdem konnte eine auf $0,59 \pm 0,09$ signifikant verringerte Caspase-like Aktivität in gealterten humanen Herzen (>50) im Vergleich zu jungen Herzen (<50) festgestellt werden (Abb. 27 A). Somit ist in

humanem Herzgewebe festzustellen, dass es zu einer altersbedingten reduzierten Aktivität aller drei proteasomalen Enzymaktivitäten kommt. Die Calpain Enzymaktivität war in alten humanen Herzen mit $0,61 \pm 0,04$ signifikant geringer als in jungen humanen Herzgewebe (<50) (Abb. 27 C). Das relative Calpain-1 Proteinlevel alter humaner Herzen lag bei $0,78 \pm 0,11$ und unterschied sich nicht im Vergleich zu jungen Herzen (<50) (Abb. 27 D) und spricht auch hier für eine altersbedingte Verringerung der Calpain Enzymaktivität in humanen Herzen. In Abb. 27 E ist das Ergebnis der Analyse des relativen PSMA2 (*proteasomal subunit alpha type-2*) Proteingehalts zu sehen. Dieser lag in alten Herzen (>50) bei $0,75 \pm 0,12$ und ergab somit keinen Unterschied im Vergleich zu jungen Herzen (<50). Um einen potenziellen Effekt der reduzierten proteasomalen Enzymaktivitäten auf den Titin Abbau zu untersuchen, wurde die K48-Ubiquitinierung des Titins untersucht (Abb. 27 F). Die relative K48-Ubiquitinierung in alten Herzen (>50) lag bei $1,38 \pm 0,25$ (Abb. 27 F) und war somit nicht signifikant anders als in den humanen jungen Herzen.

In dem untersuchten Mäuseherzgewebe lag die Trypsin-*like* Aktivität in alten Herzen (20m) bei $0,73 \pm 0,11$ und unterschied sich nicht signifikant von jungen Herzen (6m) (Abb. 27 B). Im Gegensatz dazu war die Chymotrypsin-*like* Aktivität in alten Mäuseherzen (20m) mit $0,52 \pm 0,16$ signifikant vermindert im Vergleich zu jungen Herzen (6m) (Abb. 27 B). Kein Unterschied konnte bezüglich der Caspase-*like* Aktivität zwischen den beiden untersuchten Mäusegeweben festgestellt werden. Der relative Aktivitätswert für alte Herzen lag bei $0,82 \pm 0,17$ (Abb. 27 B). Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine altersbedingte Aktivitätsverminderung des Proteasoms in Mäuseherzen, jedoch lediglich in Bezug auf die Chymotrypsin-*like* Enzymaktivität. In Mäuseherzen (20m) wurde im Vergleich zu jungen Herzen (6m) eine auf $0,72 \pm 0,06$ signifikant verringerte Calpain Enzymaktivität in alten Mäuseherzen (20m) im Vergleich zu jungen Herzen (6m) festgestellt (Abb. 27 C). Auch hier lässt sich somit eine altersbedingte Verminderung der Calpain Enzymaktivität feststellen. Die Untersuchung des Calpain-1 Proteinlevels ergab einen relativen Wert von $1,13 \pm 0,14$ für alte Mäuseherzen (20m) ohne einen signifikanten Unterschied zu jungem Gewebe (6m) (Abb. 27 D). Dahingegen konnte mit $1,36 \pm 0,13$ in alten Mäuseherzen signifikant erhöhter PSMA2 Proteingehalt im Vergleich zu jungen Geweben (6m) festgestellt werden (Abb. 27 E). Dies spricht für eine signifikant erhöhte Proteasommenge in alten Mäuseherzen. Die Untersuchung der

relativen K48-Ubiquitinierung des Titins ergab für alte Mäuseherzen (20m) einen Wert von $1,22 \pm 0,18$ und wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen auf (Abb. 27 F).

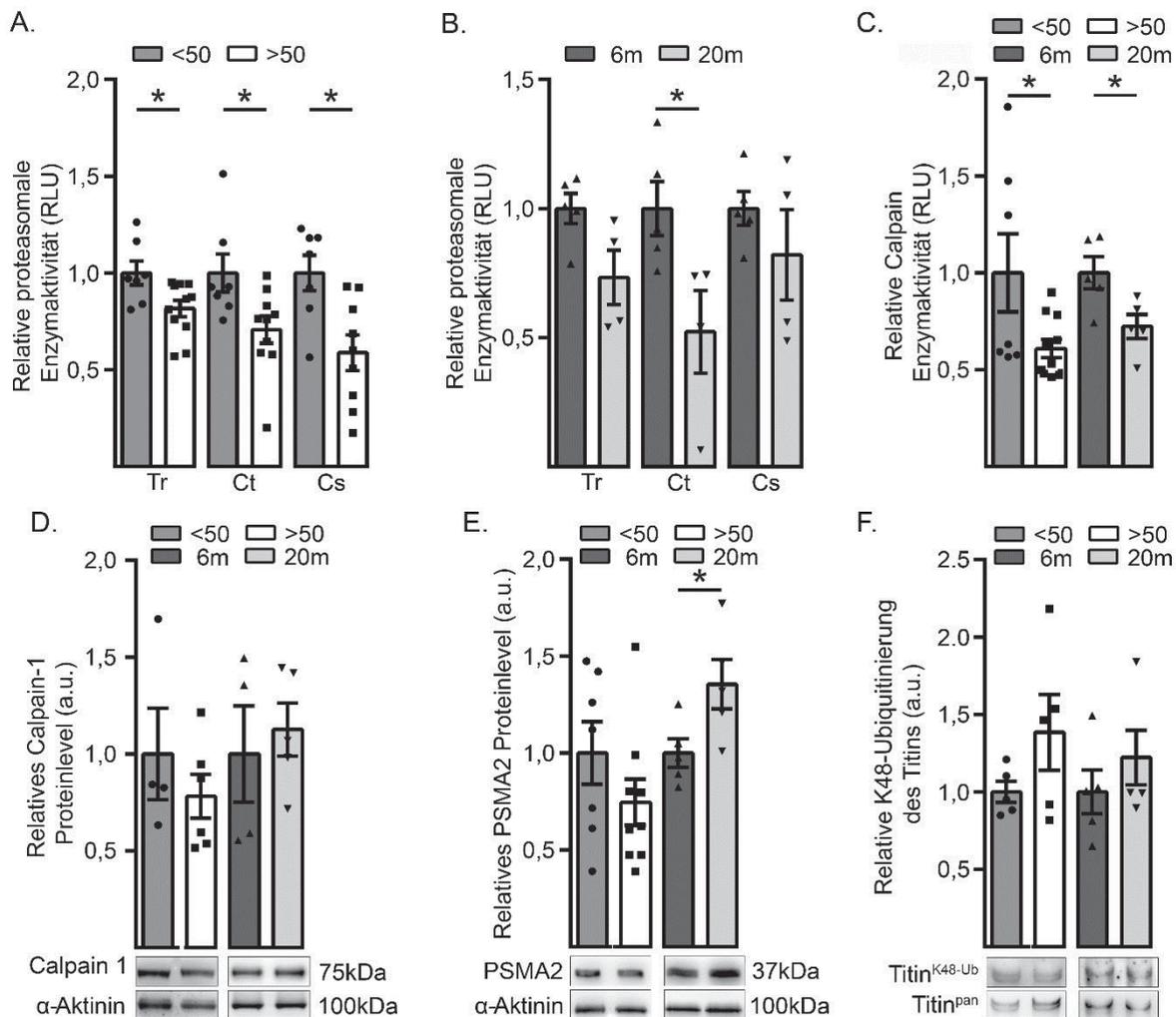


Abbildung 27: Analyse der Regulation des Ubiquitin-Proteasom und des Calpain-Systems im alternden Herzen und ihrer Beteiligung an der Titin Degradation. Messung proteasomaler Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-like Enzymaktivitäten in (A) <50 (17-50 Jahre, n = 7) und >50 (51-73 Jahre, n = 9-11) humanem Herzmuskel und (B) in 6m (6 Monate, n = 5) und 20m (20 Monate, n = 4) Mäuseherzmuskel. Die Werte wurden als relative Lichteinheiten (RLU) gemessen und auf <50 bzw. 6m Herzen normiert. (C) Messung der relativen Calpain Enzymaktivität in <50 (17-50 Jahre, n = 7) und >50 (51-73 Jahre, n = 9) humanem Herzmuskel und in 6m (6 Monate, n = 5) und 20m (20 Monate, n = 5) Mäuseherzmuskel. (D) Messung des Calpain Proteinlevels, (E) Messung des PSMA2 Proteingehalts (F) Western Blot Analyse der K48-Ubiquitinierung des Titins mit einem K48-Polyubiquitin-Antikörper (K48-Ub) von humanen (<50, n = 4-7; >50, n = 5-9) und Mäuseherzen (6m, n = 4-5; 20m, n = 4-5). Die Werte wurden als relative Lichteinheiten (RLU) gemessen und auf <50 oder 6m Herzen normiert. Unter den Graphen sind repräsentative Blots dargestellt. Die Diagramme zeigen den mittleren \pm SEM. a.u. = arbitrary units. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t*-Test).

Die Analyse der mRNA Expression von E3-Ligasen in jungen und alten humanen Donorherzen ergab keine signifikanten Unterschiede im Alter (Abb. 28 A, B). Auch die mRNA Expression der E3-Ligasen in jungen (6m) und alten (20m) Mäuseherzen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 28 C, D).

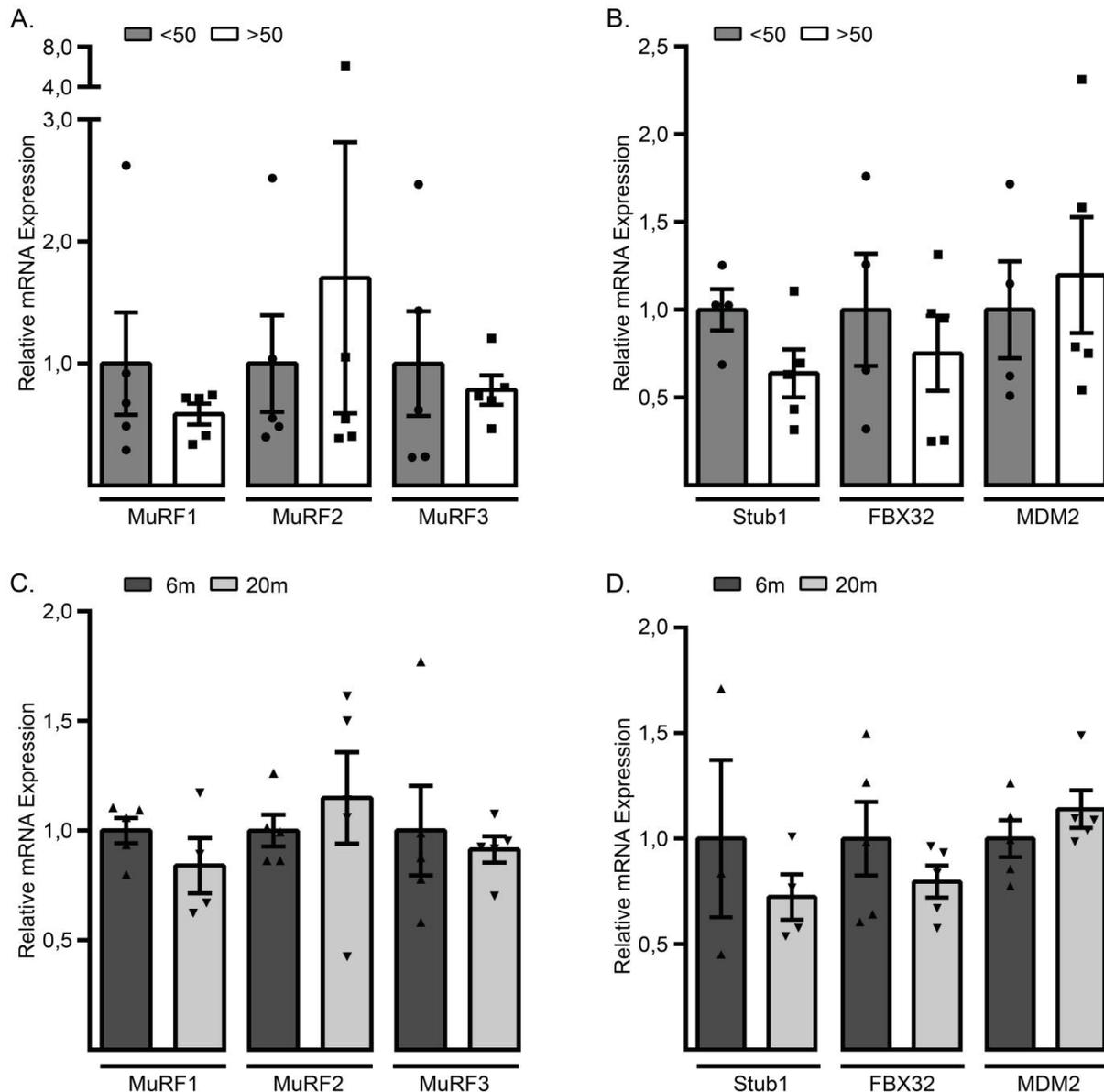


Abbildung 28: Genexpressionsanalyse von E3-Ligasen in humanen und Mäuseherzgewebe. RT-PCR Analyse der mRNA Expression von (A) MuRF1, MuRF2, MuRF3 und (B) Stub1, FBX32 und MDM2 in humanen Herzgewebe (<50, n = 4-5; >50 n = 5). RT-PCR Analyse der mRNA Expression von (C) MuRF1, MuRF2, MuRF3 und (D) Stub1, FBX32 und MDM2 in murinem Herzgewebe (6m, n = 3-5; 20m n = 4-5). Die Diagramme zeigen den mittleren \pm SEM. a.u. = arbitrary units.

3.2.6 Autophagie im alternden Herzen

In Experimenten mit embryonalen Rattenkardiomyozyten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen proteasomaler Inhibition und erhöhter Titin-Ubiquitinierung festgestellt werden. Die Zunahme der Ubiquitinierung durch die Inhibition des Proteasoms lässt den Schluss zu, dass unter normalen Bedingungen das Proteasom ubiquitiniertes Titin abbauen würde. Demzufolge erfolgt der Abbau des Titinfilaments zumindest teilweise über das Proteasom (Kötter et al., 2016). Ausgehend von dieser Feststellung wurde vermutet, dass auch das Autophagie-System am Titin Abbau

beteiligt sein könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese in Bezug auf den Alterungsprozess wurden Western Blot Analysen Autophagie-assoziiierter Proteinen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 29 dargestellt.

Die K63-Ubiquitinierung von Substraten ist ein Signal für die Degradation über die Autophagie (Tan et al., 2008). Zuvor konnte in Zellkulturversuchen mit ERC festgestellt werden, dass die Autophagie Inhibition zur deutlichen Erhöhung der K63-Ubiquitinierung von Titin führte (siehe Abschnitt 3.1.1). Das Proteinlevel des Autophagie Markers p62/SQSTM1 und das LC3-II/I Verhältnis waren nach CQ Zugabe deutlich erhöht, da diese aufgrund der Hemmung der Autophagie in den Zellen nicht degradiert werden können, sondern akkumulieren. Ausgehend von diesem direkten Hinweis für die Beteiligung der Autophagie am Titin *Turnover* wurde ihre Regulation an der Titin Degradation im alternden Herzen analysiert.

Die relative K63-Ubiquitinierung des Titins lag in alten humanen Herzen (>50) bei $0,87 \pm 0,14$ und unterschied sich nicht signifikant von jungen Herzen (<50) (Abb. 29 A). Auch das relative Proteinlevel von p62/SQSTM1 unterschied sich mit $1,12 \pm 0,11$ in gealtertem humanem Herzgewebe (>50) nicht signifikant von jungen Herzen (<50) (Abb. 29 B). Das Verhältnis von LC3-II/I lag in alten humanen Herzen (>50) bei $1,34 \pm 0,06$ und unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von jungen humanen Herzen (<50) (Abb. 29 C). Diese Ergebnisse sprechen für einen intakten Autophagiefluss im Alter in humanen Herzen. Im Herzgewebe alter Mäuse (20m) war die relative K63-Ubiquitinierung des Titins mit $1,51 \pm 0,05$ im Vergleich zu jungen Herzen (6m) signifikant erhöht (Abb. 29 A). Dies könnte auf einen reduzierten Autophagiefluss im Alter hinweisen, wodurch ubiquitiniertes Titin nicht abgebaut wird, sondern akkumuliert. Das Proteinlevel von p62/SQSTM1 war in alten Mäuseherzen (20m) $1,34 \pm 0,06$ im Vergleich zu jungem Herzgewebe (6m) signifikante erhöht (Abb. 29 B). Das erhöhte p62/SQSTM1 Proteinlevel spricht ebenfalls für einen reduzierten Autophagiefluss im Alter bei Mäusen, da die Autophagolysosome und die darin befindlichen p62/SQSTM1 Proteine nicht abgebaut werden, sondern akkumulieren. Das Verhältnis von LC3-II/I zeigte jedoch in beiden Organismen keine signifikanten altersbedingten Unterschiede. Er lag in alten humanen Herzen (20m) bei $1,37 \pm 0,17$ Herzen und bei $1,31 \pm 0,22$ in alten Mäuseherzen (20m) (Abb. 29 C).

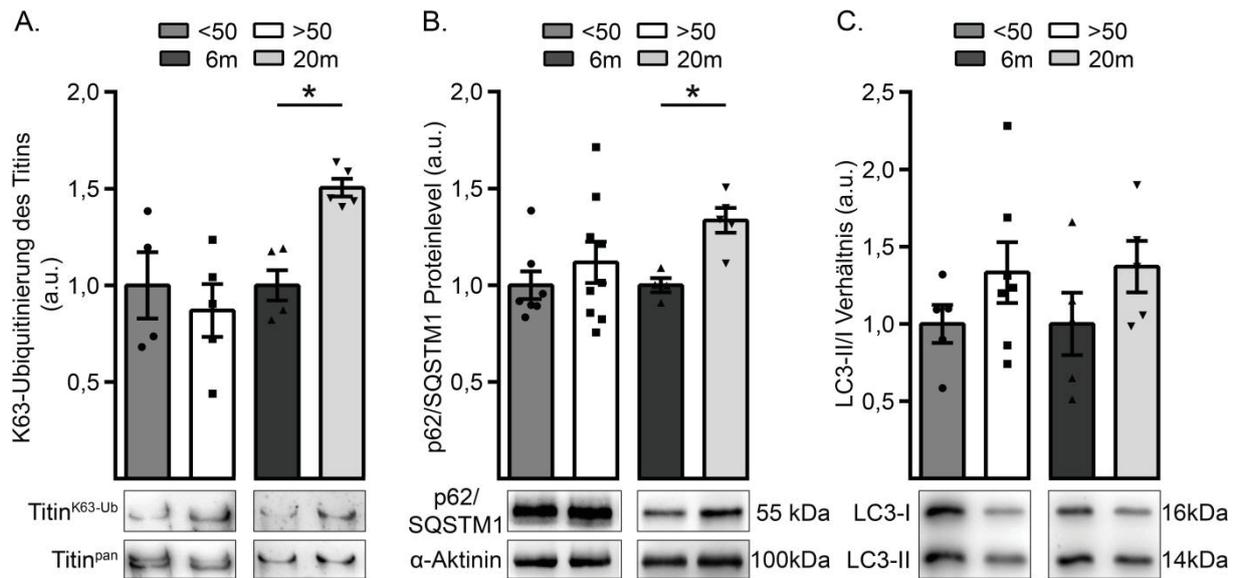


Abbildung 29: Analyse der Regulation des autophagosomalen Abbausystems im alternden Herzen und ihrer Beteiligung am Titin Abbau. Western Blot Analyse der **(A)** K63-Ubiquitinierung des Titins mit einem K63-Polyubiquitin-Antikörper (K63-Ub), **(B)** des p62/SQSTM1 Proteinlevels und des **(C)** LC3-II/I Verhältnisses in humanem (<50 , $n = 4-7$; >50 , $n = 5-9$) und Mäuseherzen (6m, $n = 4-5$; 20m, $n = 5$). Unter den Graphen sind repräsentative Blots dargestellt. Die Diagramme zeigen den mittleren \pm SEM. a.u. = arbitrary units. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test*).

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss der Autophagie Inhibition und Aktivierung auf das Titinfilament

Die Autophagie ist ein evolutionär konserviertes Recyclingsystem zur Qualitätskontrolle von Proteinen und Organellen. Sie ist unerlässlich für eine funktionierende, zelluläre Homöostase. In einer Vielzahl von Krankheitsbildern wurde ein erhöhter Autophagiefluss festgestellt. Erhöhte Autophagie-Aktivität in Kardiomyozyten ist beispielsweise präsent bei Nährstoffmangel, chronischer Ischämie und bei Ischämie/Reperfusionsschäden (Sciarretta et al., 2011). Wird die Autophagie durch Metformin Zugabe aktiviert, so führt dies zu einer verringerten K63-abhängigen Ubiquitinierung des Titins, gleichbedeutend mit einer schnelleren bzw. verstärkten Degradation. Außerdem ist im Einklang mit vorangehenden Studien ein verringertes p62/SQSTM1 Proteinlevel (Nazim et al., 2016) festzustellen, wobei sich an der M-Linie/A-Band-Region-assoziierten Lokalisation (Lange et al., 2005) nichts ändert. Die Titinkinase Domäne an der M-Linie, interagiert mit dem Adapterprotein nbr1, welches wiederum p62/SQSTM1 als Liganden binden kann (Lange et al., 2005). Unter Kontrollbedingungen lokalisierte p62/SQSTM1 in Übereinstimmung mit einer vorangegangener Studie (Lange et al., 2005) an die M-Linie/A-Band-Region des Sarkomers. Durch Inhibition der Autophagie konnte eine Translokation von p62/SQSTM1 ins Zytosol induziert werden, wo es zu Akkumulationen kam. Auch Lange et al. konnten eine Translokation von p62/SQSTM1 von der M-Linie ins Zytosol feststellen, wo es zu Akkumulationen kam, ausschlaggebend war dabei die zuvor erfolgte Überexpression des Adapterproteins nbr1 (Lang et al., 2005). Diese Ergebnisse können als Indiz dafür angesehen werden, dass speziell unter Bedingungen, in denen die Proteinhomöostase gestört ist, die Interaktion zwischen dem Titinfilament und p62/SQSTM1 nicht mehr Bestand hat und ein potentieller, nachfolgender Abbau über das Autophagosom nicht mehr möglich ist. Diese Ergebnisse könnten außerdem darauf hindeuten, dass die Colokalisation zwischen der Titinkinase Domäne und p62/SQSTM1 für eine potentielle nachfolgende Degradation über das Autophagosom nötig ist. Denkbar ist ebenfalls, dass die Lokalisation von p62/SQSTM1 an der Titinkinase Domäne essentiell für die Degradation der an die Titinkinase Domäne assoziierten Sarkomerproteine ist.

Kötter et al. (Kötter et al., 2016) haben kürzlich gezeigt, dass Titin zumindest teilweise über das Proteasom degradiert wird. Dieser Nachweis wurde über die Hemmung des Proteasoms in embryonalen Rattenkardiomyozyten erzielt, wodurch es zu einem deutlichen Anstieg der K48-Ubiquitinierung des Titins kam (Kötter et al., 2016). Äquivalent zu dieser Studie konnte hier nach Inhibition der Autophagie ein deutlicher Anstieg der K63-Ubiquitinierung des Titins nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Titin Abbau über die Autophagie durch die Chloroquine-induzierte Inhibition der Autophagie in ERC simuliert.

Zur weiteren Analyse des Titin Abbaus über die Autophagie, wurde die Titin Isoformen Zusammensetzung nach Inhibition und Aktivierung in ERC analysiert. Nach 24-stündiger Inhibition bzw. Aktivierung der Autophagie wurde kein Effekt auf die Titin Isoformen Zusammensetzung festgestellt. Nach Hemmung der Autophagie wurde ein starker Anstieg des Titin Abbauprodukts T2 beobachtet, was darauf hindeutet, dass der Titin T2 Abbau reduziert wird, wenn die Autophagie gehemmt wird. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Beteiligung der Autophagie am Titin Abbau. Allerdings bleibt der potentielle Vorverdau des *full lengths* Titins zum T2 Abbauprodukt auch bei Autophagie-Inhibition intakt.

4.2 Die Lokalisation von E3-Ligasen und Calpain-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten

Zur Durchführung der Ubiquitinierungsreaktion müssen E3-Ligasen in direktem Kontakt mit ihrem Substrat stehen, dabei legt die Art der Ubiquitin-Kettenkonfiguration fest, über welchen Mechanismus abgebaut wird. Mit der Untersuchung der Lokalisation von E3-Ligasen im Sarkomer soll ihre Interaktion mit dem Sarkomer bzw. dem Titinfilament nachgewiesen werden. Literaturangaben zu Folge lokalisieren MuRF1 und MuRF3 (Gregorio et al., 2005) an der M-Linie/A-Band Region und an der Z-Scheibe/I-Band-Domäne des Sarkomers. MuRF1 ist dabei an die A68-A170-Domäne von Titin assoziiert (Centner et al., 2001). Entgegen der Literaturangaben war MuRF1 in den hier untersuchten Zellkulturen (ERC) zytosolisch lokalisiert. Der Unterschied liegt möglicherweise am embryonalen Stadium, der hier verwendeten Rattenkardiomyozyten, denn in der Vergleichsstudie (Centner et al., 2001) erfolgte die Lokalisationsuntersuchung von MuRF1 in Kardiomyozyten aus der adulten Ratte. Die publizierte sarkomerische Lokalisation für MuRF3 dagegen konnte

in unseren ERC bestätigt werden. Für die E3-Ligase FBX32 wurde ebenfalls eine Lokalisation an der M-Linie/A-Band-Domäne nachgewiesen. Ferner wurde an der Z-Scheibe/I-Band-Domäne des Titins für die E3-Ligase Stub1 eine Lokalisation festgestellt. In den hier untersuchten Zellkulturen konnte Calpain-1, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten (Coulis et al., 2008), an der Z-Scheibe/I-Band-Domäne des Titins lokalisiert werden. Das Titin PEVK-Segment enthält viele sogenannte „PEST“-Motive, die vermutlich als intramolekulares Signal für proteolytische Degradation fungieren (Rechsteiner et al., 1990). Für den proteasomalen Abbau von Muskelproteinen ist ein Vorverdau des Proteins an der Z-Scheibe am PEVK Segment und an der M-Linie wahrscheinlich. Calpain-1 ist an diesen Regionen lokalisiert worden und wäre daher geeignet für eine initiale Proteolyse des Titinfilaments (Raynaud et al., 2005). In einer anderen Studie wurde auch für Calpain-3 eine Titin-assoziierte Lokalisation festgestellt (Beckmann und Spencer, 2009). Hier werden der Titin-Assoziation von Calpain-3 drei Funktionen zugeordnet: sie verhindert einen autokatalytischen Abbau von Calpain-3, sie hält Calpain-3 in einem proteolytisch inaktiven Zustand und letztlich ist dadurch die Nähe zu den Substraten gewährleistet (Beckmann und Spencer, 2009). Gleiches gilt vermutlich im kardialen Sarkomer für die Z-Scheiben assoziierter Lokalisation von Calpain-1. Ob die nachgewiesenen Lokalisationen der E3-Ligasen und von Calpain-1 im Sarkomer tatsächlich bedeuten, dass diese am Titin Ab- und Umbau beteiligt sind, kann zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht abschließend beantwortet werden.

4.3 Der Effekt der Wechselwirkung zwischen der Autophagie und dem proteasomalen Abbauweg auf den Titin Abbau

Die Hemmung der Autophagie kann auch den proteasomalen Abbau beeinträchtigen und dadurch zur Akkumulation ubiquitinerter Substrate führen (Matsumoto et al., 2011). Im Gegensatz dazu belegen eine Reihe von Studien, dass es zur Aktivierung der Autophagie kommt, wenn ubiquitinierte Proteine nicht ausreichend vom Proteasom verarbeitet werden können, sodass eine kompensatorische Autophagie ausgelöst wird (Bao et al., 2017). In den hier untersuchten ERC führte die Hemmung der Autophagie zu signifikant erhöhtem PSMA2 Proteingehalt und stellt somit ein Indiz für eine erhöhte Menge an Proteasomen dar, was jedoch nicht zu erhöhter proteasomaler Aktivität im Vergleich zu Kontrollbedingungen führte. In Relation

gesetzt, könnte dies im Einklang mit der Literatur (Matsumoto et al., 2011) eine geringere Aktivität jedes Proteasoms durch Akkumulationen ubiquitiniertes Proteine aufgrund der gehemmten Autophagie bedeuten. Die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine (K48- und K63-abhängig) in den Zellen nach Inhibition der Autophagie konnte in unseren Kardiomyozyten ebenfalls bestätigt werden. Es kam dabei auch zur Anhäufung K48-abhängig ubiquitiniertes Titins. Hieraus lässt sich schließen, dass die Autophagie in einer Wechselwirkung mit dem Proteasom zu stehen scheint, da ihre Hemmung zur Akkumulation ubiquitiniertes Proteine und ubiquitiniertes Titin führt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es zu einem Kompensationsversuch der proteasomalen Aktivität durch die Steigerung der Proteasommenge kommt.

Auch der Effekt der Autophagie-Aktivierung auf die Regulation des Proteasoms wurde untersucht. Hierbei kam es zu keiner Veränderung des 20S Proteasom Gehalts und der proteasomalen Enzymaktivität. Die K48-Ubiquitinierung des Titins dahingegen nahm im Vergleich zu Kontrollbedingungen stark ab. Möglicherweise kann der Abbau des K48-abhängig ubiquitiniertes Titins bei einem hohen Autophagiefluss auch durch das Autophagosom erfolgen.

4.4 Zusammenfassung und Fazit Teil I

Die Untersuchung des Titin Abbaus in embryonalen Kardiomyozyten zeigte, dass durch Aktivierung und Inhibition der Autophagie der Titin Abbau differentiell moduliert wurde. Somit konnte ein deutlicher Hinweis für die Beteiligung der Autophagie am Titin Abbau geliefert werden. Erkrankungen, die zur Veränderung des Autophagieflusses führen und auch die altersbedingte Reduktion des kardialen Autophagieflusses bewirken, könnten sich daher über einen veränderten Titin Ab- und Umbau auch auf die elastischen Eigenschaften des Myokards auswirken.

4.5 Der Alterungsprozess hat keinen Einfluss auf die Isoformen Zusammensetzung von Titin

Diastolische ventrikuläre Dysfunktion ist ein Kennzeichen des alternden Herzens, allerdings ist bislang wenig über die zugrundeliegenden molekularen Ursachen bekannt. Ein wichtiger Faktor bei der ventrikulären Füllung während der Diastole ist die passive Steifigkeit des Myokards (Borlaug, 2014). Die passive Steifigkeit wird

intrazellulär durch das sarkomerische Federelement Titin und extrazellulär durch die extrazelluläre Matrix, insbesondere Kollagen vermittelt (Anderson und Granzier, 2012). Inwiefern sich das Alter auf Funktionen des Titinfilaments auswirkt, wurde bislang nicht untersucht. Viele im Alter auftretende Veränderungen sind auch unter pathologischen Bedingungen zu beobachten. Diese Studie zielte daher darauf ab, rein altersbedingte Veränderungen der Titineigenschaften von pathologischen abgrenzen zu können. Die untersuchten humanen Mäuseherzen wurden abhängig vom Alter in zwei Gruppen eingeteilt: junge (17-50 Jahre, <50) und alte humane Herzen (51-73 Jahre, >50), sowie junge (6 Monate, 6m) und alte Mäuseherzen (20 Monate, 20m). In gesunden humanen Herzen liegt das N2BA:N2B Titin Verhältnis im Bereich von ~ 35:65% (Kötter et al., 2013) bis ~30:70% (Neagoe et al., 2002). Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Herzen lag das N2BA:N2B Verhältnis bei ~ 34:66%. Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Zusammensetzung der Titin Isoformen durch das Altern nicht verändert wird. Im Vergleich mit gesunden humanen Herzen ist das N2BA:N2B Titin Verhältnis in chronisch insuffizienten Patientenherzen erhöht (Neagoe et al., 2002). Ein ebenfalls erhöhter N2BA-Isoformen Anteil wurde in Herzen von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie im Endstadium (Neagoe et al., 2002) und in dilatativer Kardiomyopathie (DCM) (Makarenko, 2004) nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen pathologischen Veränderungen um eine adaptive Antwort zur Koordination von diastolischen und systolischen Eigenschaften *in vivo*, vermutlich um der erhöhten Fibrosierung entgegenzuwirken (Linke, 2008).

In gesunden Mäuseherzen wird mit einem Anteil von 80% vornehmlich die kurze N2B Isoform exprimiert und lediglich 20% des Gesamttitin liegt als N2BA Isoform vor (Hudson et al., 2011). Dieses Isoformenverhältnis konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt sowohl in jungen, als auch in alten Mäuseherzen bestätigt werden. Dies zeigt, wie auch in humanen Herzen beobachtet, dass das Altern in Mäuseherzen alleine keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Titin Isoformen hat.

Studien haben gezeigt, dass die Expression des Titin *splicing factors* RBM20 im Rattenmodell einen maßgeblichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Titin Isoformen Zusammensetzung hat und dass RBM20-Inhibition zu einer verminderten N2B-Isoform Expression führt (Zhu et al., 2017). Wie vorangehende Studien in embryonalen Rattenkardiomyozyten bereits festgestellt haben, scheint die Titin Isoformen Zusammensetzung weitestgehend auch von der Aktivierung des

PI3K/AKT-Signalweges abzuhängen und wird über Angiotensin II, T3 und Insulin moduliert werden (Krüger et al., 2008). Östrogen kann diese Signalkaskade ebenfalls aktivieren. In den Wechseljahren nimmt der Östrogenspiegel der Frau drastisch ab, was statistisch mit einer erhöhten Entwicklung von Herzerkrankungen verbunden ist (Zhao et al., 2014). Daher wurde postuliert, dass Östrogen ein weiterer Modulator der Titin Isoformen Zusammensetzung sein könnte und dass ein Mangel an Östrogen in postmenopausalen Herzen das Isoformenverhältnis und somit die Titin-basierte Myofilamentsteifigkeit beeinflussen könnte. In den Wechseljahren nimmt der Östrogenspiegel der Frau drastisch ab, was statistisch mit einer erhöhten Entwicklung von Herzerkrankungen verbunden ist (Zhao et al., 2014). Hier wurde daher das Isoformen Verhältnis auch nach Aufteilung der Proben nach Frauen und Männern analysiert. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Zusammensetzung der Titin Isoformen zwischen Männern und Frauen nicht generell signifikant unterscheidet. Einschränkend ist hier jedoch festzuhalten, dass aufgrund der geringen Probenverfügbarkeit ein altersabhängiger Vergleich der Geschlechter nicht möglich war.

4.6 Die Modifikation der Titin Phosphorylierung im Alter führt nicht zu Änderungen der passiven Myozytensteifigkeit

Die Analyse der Titin Phosphorylierung ergab für die PKA- bzw. Erk1/2-abhängige Phosphorylierung an Position S4010 in der N2-Bus eine altersbedingte Hypophosphorylierung in humanen und Mäuseherzen. Eine Hypophosphorylierung innerhalb der N2-Bus hat eine höhere Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit zur Folge. Dabei unterscheiden sich offenbar die der Hypophosphorylierung zugrundeliegenden Mechanismen zwischen Mensch und Maus. In humanen Herzen ist die Hypophosphorylierung voraussichtlich durch eine verringerte Erk1/2-Aktivität begründet. Die MAPK-Phosphatase (MKP) könnte zu der signifikanten verminderten Phosphorylierung von Erk1/2 beitragen (Sun et al., 1993), daher sollte das MKP-Proteinlevel und Aktivität in zukünftigen Arbeiten in den Geweben bestimmt werden. Wenn das MKP 1 Proteinlevel und die Kinaseaktivität in alten humanen Herzen reduziert wären, könnte diese eine Erklärung für die verminderte Erk1/2 Phosphorylierung sein. In Fibroblasten wurde gezeigt, dass es zu einer altersbedingten, chronischen Aktivierung des Erk1/2-MAPK Signalwegs kommt

(Tresini et al., 2001). Allerdings wurden hier seneszente Fibroblasten untersucht und Studien haben gezeigt, dass die Seneszenz in der Zellkultur nicht homolog zum physiologischen Altern im intakten Organismus ist (Cristofalo et al., 2000). In der Skelettmuskulatur älterer Spender konnte ebenfalls eine erhöhte Erk1/2 Phosphorylierung nachgewiesen werden (Williamson et al., 2003). Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz der verschiedenen Datensätze könnten zum einen, das Alter der jüngeren Gewebespende sein, die im Schnitt 28 Jahre alt waren und somit wesentlich jünger als die Herzspende in dieser Arbeit (17-50 Jahre). Zum anderen wurde in der Vergleichsstudie Muskelgewebe ausschließlich von männlichen Spendern analysiert. Potentielle geschlechtsspezifische Faktoren wurden also ausgeschlossen. Ferner spielt die Art des Muskels ebenfalls eine Rolle. In der Vergleichsstudie wurde Skelettmuskulatur analysiert. Zusätzlich wurde in der Vergleichsstudie ein Trainingsprogramm miteinbezogen, wodurch es zu weiteren Unterschieden kommen könnte. Der Unterschied zwischen kardialer und Skelettmuskulatur ist in Bezug auf das Erk1/2 Signalweg noch unzureichend beschrieben.

In älteren Mäusen dagegen scheint eine verringerte PKA-Aktivität zur Hypophosphorylierung an S4010 zu führen. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Abnahme der kardialen β -adrenergen Reaktionsfähigkeit durch verminderte Agonistenbindung von β 1-Rezeptoren, sowie veränderter G-Protein-vermittelter Signaltransduktion (White et al., 1994). Zu einer verringerten PKA-Aktivität kommt es auch bei Herzinsuffizienz im Endstadium, auch hier liegt der Grund in einer Einschränkung des β -adrenergen Signalings (van der Velden, 2011). Eingeschränkte β -adrenerge Signaltransduktion könnte demnach eine partielle, altersbedingte Einschränkung sein und nicht erst durch die Pathologie hervorgerufen werden, aber dadurch möglicherweise noch verstärkt werden.

Die in älteren humanen und Mäuseherzen festgestellte Hyperphosphorylierung an S4099 im N2-Bus Segment, sollte im Gegensatz zur Hypophosphorylierung an S4010 die Titin-basierte Kardiomyozytenteifigkeit verringern. Im Alterungsprozess liegt nach vorhandener Literatur eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit vor, wodurch die PKG-Aktivität in Kardiomyozyten und in der Skelettmuskulatur verringert wird (Kovács et al., 2016). Reduziertes NO führt zu einer Abnahme des cGMP-Spiegels, was wiederum die Aktivität der PKG in den Kardiomyozyten verringert. Niedrige PKG-Aktivität ruft eine Hypophosphorylierung des Titins hervor, was

wiederum die Kardiomyozytensteifigkeit erhöht (Paulus und Tschöpe, 2013). Steife Kardiomyozyten und erhöhte Kollagenablagerungen durch Myofibroblasten verursachen diastolische Funktionseinschränkungen des linken Ventrikels (Paulus und Tschöpe, 2013). Bislang wurde die altersbedingte Regulation des cGMP-Signalwegs nur bei HFpEF Patienten näher charakterisiert und nicht in gesunden, gealterten Herzen. In gesunden, gealterten Herzen ist die Reduktion der PKG-Aktivität möglicherweise ein partieller kompensatorischer Effekt, um den resultierenden Effekt der erhöhten Erk1/2 Kinaseaktivität auf die passive Kardiomyozytensteifigkeit auszugleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl in humanen als auch in Mäusegewebe festgestellt, dass es durch den Alterungsprozess zu keiner Änderung der PKC α -vermittelten Phosphorylierung der PEVK-Region kommt. Somit war auch durch die PEVK Phosphorylierung keine Änderung der Titin-basierten Steifigkeit zu erwarten. Zahlreiche Studien belegen, dass es zur Hyperphosphorylierung der PEVK Region bei Kardiomyopathien, wie beispielsweise bei HFpEF Patienten kommt, wodurch auch die Titin-basierte Steifigkeit erhöht war (Hamdani et al., 2013). Bisherigen Daten zufolge scheint eine Phosphorylierungsänderung am PEVK Segment stets aus pathologischen Gründen zu erfolgen, das Altern hat hier offenbar keinen unmittelbaren Effekt.

Die Analyse der passiven Myozytensteifigkeit bestätigt die aufgrund der betrachteten Phosphorylierungsmuster getroffene Annahme, dass es trotz der veränderten Titin Domänen Phosphorylierung zu keiner Veränderung der Titin-basierten passiven Steifigkeit kommt.

4.7 Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist im Alter verändert

Die extrazelluläre Matrix wurde früher als statisches Stützwerk der Myozyten betrachtet, heutzutage ist bekannt, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der kardialen extrazellulären Matrix maßgeblich zur Entwicklung der kardialen Dysfunktion mit zunehmendem Alter beitragen. Der Mechanismus der Myokardfibrose im alternden Myokard ist bislang weitestgehend unklar. Die Anhäufung von Kollagen im Myokard erhöht die Muskelsteifigkeit und beeinträchtigt so die Myokardfunktion, was sich in der Regel in einer unvollständigen Entspannung

während der frühen linksventrikulären diastolischen Relaxation auswirkt (de Souza, 2002). Die Vernetzung von Kollagen durch Lysyloxidase 1 und 2 führt nachweislich zu einer signifikanten Veränderung der Myokardsteifigkeit, ohne eine Veränderung des Gesamtkollagengehalts zu bewirken. Der Grad der myokardialen Kollagenvernetzung nimmt ebenfalls mit zunehmendem Alter zu (Thomas et al., 1992). Da kein altersabhängiger Titin-basierter Effekt auf die passive Myozytensteifigkeit zu beobachten war, wurde überprüft, ob sich die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in unseren Donor- und Mäuseherzen im Alter ändert und somit einen Effekt auf die myokardiale passive Steifigkeit ausüben könnte. Die mRNA Expression von Kollagen 1 und 3 sowie die ihrer Quervernetzer LOXL 1 und 2 wurden in den humanen und Mäuseherzen analysiert. Für Kollagen 1 sowie für LOXL 1 und 2 konnte im Alter keine Expressionsveränderung festgestellt werden. Die mRNA Expression von Kollagen 3 war im Alter in humanen Herzen dagegen signifikant vermindert. Bisherigen Studien zufolge kommt es altersbedingt entweder zur Reduktion der mRNA Expression von Kollagen 1 und 3, oder es findet keine Veränderung statt (Horn et al., 2012). Eine Studie an älteren Ratten bestätigt diese Beobachtung, hier konnten durch histologische Färbungen erhöhte LV-Kollagenablagerungen bei gleichzeitig verringerter mRNA Expression von Prokollagen 1 und 3 nachgewiesen werden (Besse et al., 1994). Eine histochemische Analyse der Kollagenmenge in den hier untersuchten Donorherzen war aufgrund der sehr limitierten Probenmenge leider nicht möglich. Daher kann nicht beantwortet werden, ob in diesen Geweben ein erhöhter Kollagengehalt vorliegt. Vermutlich erfolgt die Fibrosierung bereits zu einem früheren Zeitpunkt, sodass es zu graduellen Kollagenablagerungen kommt, weswegen eventuell kompensatorisch die mRNA Expression schließlich heruntergefahren wird. Zudem kann ein reduzierter Kollagenabbau durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) einen größeren Effekt auf die altersbedingte Fibrosierung haben, als eine erhöhte *de-novo*-Synthese (Biernacka und Frangogiannis, 2011). In den hier untersuchten alten Mäuseherzen gab es im Einklang mit vorangegangenen Studien (Horn et al., 2012) keinen altersabhängigen Effekt bezüglich der Kollagen 1 und 3 oder LOXL1 und LOXL2 mRNA Expressionslevel. Auch hier konnte eine histochemische Analyse der Kollagenmenge aufgrund der limitierten Gewebemenge nicht durchgeführt werden.

4.8 Die Regulation der Protein-Qualitätskontrolle in alternden Herzen

Ein weiteres Kennzeichen des Alterns ist der fortschreitende Rückgang der zellulären Proteostase und die daraus resultierende Akkumulation fehlgefalteter und geschädigter Proteine (Lopez-Otin et al., 2013). Der partielle Verlust der Proteasomfunktion kann die Fähigkeit der Myozyten beeinträchtigen, auf Stress angemessen zu reagieren, wodurch die Anfälligkeit des alternden Herzens für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht wird. In dieser Studie wurde der Status der Protein-Qualitätskontrolle sowie die Titin Ubiquitinierung untersucht, um Erkenntnisse über einen potentiell im Alter veränderten Titin Ab- und Umbau zu gewinnen.

In humanen Herzen kam es im Alter zur signifikanten Reduktion aller drei proteasomalen Enzymaktivitäten (Trypsin-, Chymotrypsin- und Caspase-*like*). In älteren Mäuseherzen wurde nur in der Chymotrypsin-*like* Aktivität eine signifikante Verringerung gegenüber jüngeren Herzen festgestellt. Die indirekte Bestimmung des Proteasomgehalts über den PSMA2 Proteingehalt ergab keine altersbedingte Veränderung in humanen Herzen, in Mäuseherzen wurde dagegen ein signifikant erhöhter PSMA2 Proteingehalt ermittelt. Frühere Studien belegen, dass zwar eine altersbedingte Verringerung der proteasomalen Aktivität detektiert wurde, diese aber auf ein niedrigeres 20S Proteasomlevel zurückzuführen sind (Bulteau et al., 2002). Das erhöhte 20S Proteasomlevel in alten Mäusen könnte ein Versuch sein, die reduzierte Proteasomaktivität zu kompensieren, wodurch nur eine von drei Aktivitäten reduziert ist. Bulteau et al. haben ferner eine Erhöhung an ubiquitinierten Proteinen in gealterten Rattenherzen festgestellt (Bulteau et al., 2002). Im Alter weist Titin sowohl in humanen als auch in Mäuseherzen tendenziell erhöhte K48-Ubiquitinierung auf. Die altersbedingte Verringerung der proteasomalen Enzymaktivitäten in humanen Herzen könnte möglicherweise also mit der tendenziell erhöhten Akkumulation von K48-ubiquitiniertem Titin korrelieren. Da bereits ein direkter Zusammenhang zwischen dem Proteasom und dem Titin Abbau erwiesen wurde (Kötter et al., 2016), ist eine altersbedingte Akkumulation K48-ubiquitiniertem Titin aufgrund von reduziertem proteosomalem Abbaus in humanen Herzen plausibel. Vermutlich sind zudem andere Abbauege kompensatorisch am Titin Abbau beteiligt, sodass keine signifikante Akkumulation von ubiquitiniertem Titin vorliegt. Mehreren Studien zu Folge, könnten oxidative kovalente Modifikationen (Bulteau et al., 2002), oder die Oxidation von Cysteinen (Ferrington et al., 2005) auch

zur altersbedingten Verringerung der proteasomalen Enzymaktivitäten führen. In Mäusen verhält es sich sehr ähnlich, hier liegt Titin im Alter tendenziell erhöht K48-ubiquitiniert vor, bei gleichzeitig vermindertem proteasomalen Abbau. Auch an das Titinfilament angehangene Ubiquitinmoleküle haben möglicherweise einen Einfluss auf die passive Titinfilamentsteifigkeit haben. Dieser Einfluss könnte auf Störungen der Domänenstruktur der elastischen I-Banden Domäne (vor allem aufgrund der PEST Motifs im PEVK Segment) beruhen. Die Ubiquitinmoleküle könnten die Entfaltung der Ig-Domänen einschränken und somit einen Effekt auf die diastolische Funktion des Myokards haben. Diastolische Dysfunktion ist ein Merkmal alternder Herzen (Lopez-Otin et al., 2013) und wird auch im Herzen von HFpEF-Patienten beobachtet (Sharma und Kass, 2015).

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Calpain-1 in der altersbedingten Regulation des Titin Ab- und Umbaus analysiert werden. Anders als an anderer Stelle beobachtet (Jiang et al., 2008), konnte keine altersbedingte Veränderung des Calpain-1 Proteinlevels festgestellt werden. Frühere Arbeiten haben berichtet, dass die Calpain-1 Protease Aktivität mit zunehmendem Alter steigt (Jiang et al., 2008), in den hier analysierten Geweben wurde allerdings eine altersbedingte Reduktion der Calpain Aktivität festgestellt. Die Begründung für diesen Unterschied könnte Organspezifischer Natur sein, da Jiang *et al.* ihre Versuchsergebnisse an isolierten vaskulären glatten Muskelzellen aus der Wand der gealterten Aorten erhoben haben. Die Größe des Titinfilaments und seine stabile Verankerung in der Z-Scheibe und im A-Band/M-Linie machen eine Art Vorverdau im Sarkomer notwendig, um es für die weitere Degradation zugänglich zu machen. Kandidaten für diesen Vorverdau sind Calpaine und Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Calpaine, insbesondere Calpain-1, sind werden von Ubiquitinligasen gebraucht, damit die E3-Ligasen sarkomerische Proteine für den Abbau durch das Proteasom markieren können (Fareed et al., 2006). Bei altersbedingt verminderter Calpain Aktivität könnte die Ubiquitinierung von Substratproteinen, beispielsweise von Titin nur unvollständig, bis gar nicht erfolgen. Auch für MMP-2 konnte eine Interaktion mit Titin nachgewiesen werden, es lokalisiert sowohl in humanen als auch in Rattenherzen an der Z-Scheibe des kardialen Sarkomers (Ali et al., 2010). Die Vergleichsstudie belegt ferner eine Degradation des Titins durch MMP2 (Ali et al., 2010).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA Expression von E3-Ligasen gemessen, da ein höheres Expressionslevel ebenfalls eine Veränderung des

Ubiquitinierungsmuster hervorrufen könnte. In Übereinstimmung mit anderen Studien in murinem skeletalen Muskelgewebe (Wagatsuma et al., 2016), konnte keine Änderung der mRNA Expression von E3-Ligasen im Alter festgestellt werden. In der Vergleichsstudie (Wagatsuma et al., 2016) wurden in der Skelettmuskulatur die Expression der E3-Ligasen bestimmt und dabei altersbedingt erhöhte MuRF1 Proteinlevel festgestellt. Darüber hinaus konnten ebenfalls altersbedingterhöhte Protein Ubiquitinierungen nachgewiesen werden (Wagatsuma et al., 2016).

4.9 Autophagie im alternden Herzen

Mehrere Studien zeigen, dass der Autophagiefluss mit zunehmendem Alter abnimmt (Cuervo, 2008). Diese Abnahme äußert sich oft durch die Ansammlung ubiquitiniertes Proteine, sowie der Akkumulation der Autophagiemarker LC3-II und p62/SQSTM1 (wie in Abb. 29 gezeigt). Im Herzen humaner Spender konnte keine altersbedingte Erhöhung des p62/SQSTM1 Proteinlevels nachgewiesen werden, aber es konnte ein tendenziell erhöhtes LC3-II Proteinlevel festgestellt werden. Die K63-Ubiquitinierung des Titins war im Alter nicht signifikant verändert, es konnte aber eine leichte Tendenz zur verringerten Ubiquitinierung in den alten Herzen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sprechen für einen nicht eingeschränkten Autophagiefluss im Alter in humanen Herzen. Frühere Studien hatten gezeigt, dass es zur Autophagie Aktivierung kommt, wenn ubiquitinierte Proteine vom Proteasom nicht richtig prozessiert werden (Bao et al., 2017). Möglicherweise führt die altersbedingte Reduktion der proteasomalen Enzymaktivitäten daher in alternden humanen Herzen zu einer verstärkten Proteindegradation durch Autophagie.

In alten Mäuseherzen wurde dagegen eine erhöhte Expression von p62/SQSTM1 nachgewiesen und auch die LC3-II Proteinexpression war im Alter tendenziell erhöht. Ferner kam es zu einer altersbedingten signifikant erhöhten K63-Ubiquitinierung des Titins in Mäuseherzen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Autophagiefluss in alten Mäuseherzen vermindert ist. Die Regulation der Autophagie im Alter scheint sich demnach zwischen humanen und Mäuseherzen deutlich zu unterscheiden.

4.10 Zusammenfassung und Fazit zu Teil 2

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass kein altersbedingter Effekt auf die Zusammensetzung der Titin Isoformen zu beobachten war. Auch ein geschlechtsspezifischer Aspekt mit Östrogen als potentiellen Modulator der Titin

Isoformen Zusammensetzung konnte nicht bestätigt werden. Das Altern moduliert die Phosphorylierung der elastischen N2-Bus Domäne des Titin, allerdings heben sich die jeweiligen Effekte gegenseitig auf, sodass sie in der Gesamtheit keinen Einfluss auf die Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit haben. Demnach beruhen die in Rahmen von Kardiomyopathien häufig beobachteten Veränderungen der Titin Isoformen sowie die veränderte N2B Phosphorylierung sehr wahrscheinlich auf dem jeweiligen pathologischen Hintergrund. Nichtsdestotrotz könnten die altersbedingten Anpassungen der Titineigenschaften aber auch die Ausbildung weiterer pathologischer Veränderungen begünstigen. Die Protein-Qualitätskontrolle wird altersbedingt differentiell reguliert. Das Ubiquitin-Proteasom-System erfährt dabei eine Verringerung seiner Aktivität, sodass die Titin-Ubiquitinierung und der Abbau negativ beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung

Alterungsprozesse im Herzen gehen mit morphologischen und strukturellen Veränderungen einher, die zu linksventrikulärer Hypertrophie und zur Fibrose führen können. Altersbedingte Kollagenakkumulationen im Herzen bewirken dabei eine starke Erhöhung der ventrikulären Steifigkeit, sowie eine Beeinträchtigung der diastolischen Funktion. Ferner kommt es im Alter zu einer verringerten Aktivität von Protein-Qualitätskontroll-Systemen. Dies führt zu Akkumulationen und Aggregationen defekter oder fehlgefalteter Proteine im Zytosol, wodurch zahlreiche zelluläre Funktionen beeinflusst werden können. Da das Sarkomer dynamischen Veränderungen ausgesetzt ist, wird eine funktionsfähige Proteinqualitätskontrolle auch unter basalen Bedingungen benötigt. Aufgrund verschiedener vorangegangener Studien stellen wir die Hypothese auf, dass die Degradation des Titinfilaments nicht nur durch das Ubiquitin-Proteasom-System, sondern auch durch die Autophagie katalysiert werden kann. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher der Titin Abbau über das Autophagie-System in kultivierten embryonalen Rattenkardiomyozyten näher untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass durch die Aktivierung und Inhibition der Autophagie der Titin Abbau differentiell modifiziert werden kann. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die Beteiligung der Autophagie an der Degradation des Titinfilaments. Erkrankungen in denen der Autophagiefluss verändert ist, könnten sich demnach auch auf den *Turnover* des Titins und daraus folgernd auf die elastischen Eigenschaften des Myokards auswirken. Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es herauszufinden, ob das Altern die elastischen Eigenschaften, sowie die Titin Degradation durch die intrazelluläre Proteinqualitätskontrolle beeinflusst. Die Zusammensetzung der Titin Isoformen wird durch das Altern alleine nicht beeinflusst. Ferner wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung der elastischen Titin N2-Bus Domäne im Alter differentiell verändert wird, die jeweiligen Effekte sich jedoch gegenseitig aufheben. Somit haben sie in der Gesamtheit keinen Einfluss auf die Titin-basierte passive Kardiomyozytensteifigkeit. Veränderungen der Titin Isoformen Zusammensetzung oder der passiven Kardiomyozytensteifigkeit werden auch in Kardiomyopathien beobachtet und beruhen basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit höchstwahrscheinlich auf dem jeweiligen pathologischen Hintergrund. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-System in den

untersuchten Modellen in alternden Herzen reduziert wird und dadurch auch die Titin-Ubiquitinierung und der Titin Abbau moduliert werden.

6 Summary

Aging processes in the heart are associated with morphological and structural changes that can lead to left ventricular hypertrophy and fibrosis. Age-related accumulations of collagen in the heart cause a strong increase in ventricular stiffness, as well as diastolic dysfunction of the heart. Furthermore, there is an age-dependent reduction in the activity of protein-quality-control-systems. This leads to accumulations and aggregations of defective or misfolded proteins in the cytosol and can thereby affect numerous cellular functions. The sarcomere is exposed to dynamic changes during the aging process, therefore there is a need for a functional protein-quality-control even under basal conditions. Based on various studies, we hypothesize that the degradation of the titin filament can be catalyzed not only by the ubiquitin-proteasome-system but also by autophagy. In the first part of this work, titin degradation via the autophagy system was investigated in cultured rat embryonic cardiomyocytes. It was found that activation and inhibition of autophagy can differentially modify titin degradation. This is a clear indication for the involvement of autophagy in the degradation of the titin filament. Diseases in which the autophagy flux is altered could therefore also affect the turnover of titin and consequently the elastic properties of the myocardium. The aim of the second part of this work was to investigate whether aging influences the elastic properties of titin, as well as titin degradation by intracellular protein quality control. We conclude from our data, that aging alone does not affect titin isoform composition. Furthermore, it was found that the phosphorylation of the elastic titin N2-*Bus* domain is differentially altered in aged heart tissue, but the respective effects cancel each other out. Thus, in their entirety they have no influence on titin-based passive cardiomyocyte stiffness. Common changes in the context of cardiomyopathies in isoform composition or passive stiffness are therefore most likely based on the particular pathological background. In addition, it was found that the activity of the ubiquitin-proteasome-system in the investigated models is reduced in aged heart, thereby also modulating titin ubiquitination and titin degradation.

Literaturverzeichnis

Agarkova, I. und Perriard, J.C., The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 2005. 15 (9): S. 477-485.

Alegre-Cebollada, J.; et al., S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 2014. 156 (6): S. 1235-1246.

Ali, M.A.; et al., Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2010. 122 (20): S. 2039-2047.

Allen, D.G. und Kurihara, S., The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol*, 1982. 327: S. 79-94.

Anderson, B.R. und Granzier, H., Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Prog Biophys Mol Biol*, 2012. 110 (2-3): S. 204-217.

Asnes, C.F.; et al., Reconstitution of the Frank-Starling Mechanism in Engineered Heart Tissues. *Biophys J*, 2006. 91 (5): S. 1800-1810.

Bang, M.L.; et al., 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*, 2001. 89 (11): S. 1065-1072.

Bao, X; et al., Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. *Int J Oncol*, 2017. 50 (2): S. 477-486.

Beckmann, J.S. und Spencer, M., Calpain 3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. *Neuromuscul Disord*, 2009. 18 (12): S. 913-921.

Besse, S.; et al., Nonsynchronous changes in myocardial collagen mRNA and protein during aging: effect of DOCA-salt hypertension. *Am J Phys*, 1994. 267 (6 Pt 2): S. H2237-2244.

Betteridge, D.J., What is oxidative stress? *Metabolism*, 2000. 49 (2 Suppl 1): S. 3-8.

Beyer, A., Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci*, 1997. 6 (10): S. 2043-2058.

- Biernacka, A und Frangogiannis, NG, Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis*, 2011. 2 (2): S. 158-173.
- Boerrigter, G.; et al., Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension*, 2007. 49 (5): S. 1128-1133.
- Borlaug, B.A., The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*, 2014. 11 (9): S. 507-515.
- Boron, WF. *Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders, 2005.
- Bulteau, AL; et al., Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol*, 2000, 35 (6-7): S. 767-777.
- Bulteau, AL; et al., Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch Biochem Biophys*, 2002. 397 (2): S. 298-304.
- Cazorla, O; et al., Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 2000. 86 (1): S. 59-67.
- Centner, T; et al., Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, 2001. 306 (4): S. 717-726.
- Chan, E.Y., Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxid Redox Signal*, 2012. 17 (5): S. 775-785.
- Chondroganni, N. und Gonos, E.S., Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp Gerontol*, 2005. 40 (12): S. 931-938.
- Ciechanover, A. und Schwartz, A.L., How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Trends Biochem Sci*, 1989. 14 (12): S. 483-488.
- Ciechanover, A. und Brundin, P., The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, 2003. 40 (2): S. 427-446.
- Codogno, P. und Meijer A.J., Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 2005. 12 Suppl 2: S. 1509-1518.
- Coulis, G.; et al., Calpain 1 binding capacities of the N1-line region of titin are significantly enhanced by physiological concentrations of calcium. *Biochemistry*, 2008. 47 (35): S. 9174-9183.

- Cristofalo, V.J.; et al., Use of the Fibroblast Model in the Study of cellular senescence. *Methods Mol Med*, 2000. 38: S. 23-52.
- Croall, D.E. und DeMartino, G.N., Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 1997. 71 (3): S. 813-847.
- Cuervo, A.M., Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trend Genet*, 2008. 24 (12): S. 604-612.
- de Souza, R.R., Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 2002. 3 (6): S. 325-335.
- DeQuach, J.A.; et al., Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PLoS One*, 2010. 5 (9): e13039.
- Desai, A. und Fang, J.C., Heart failure with preserved ejection fraction: hypertension, diabetes, obesity/sleep apnea, and hypertrophic and infiltrative cardiomyopathy. *Heart Fail Clin*, 2008. 4 (1): S. 87-97.
- Deveraux, Q.; et al., A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, 1994. 269 (10): S. 7059-7061.
- Fareed, M.U.; et al., Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogin-1/MAFbx and MuRF1 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 290 (6): R1589-R1597.
- Feng, Y.; et al., Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis*, 2014. 5: e1088.
- Ferrington, D.A.; et al., Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J*, 2005. 19 (6): S. 644-646.
- Finley, D., Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 2009. 78: S. 477-513.
- Fitzsimons, D.P.; et al., Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium. *J Physiol*, 1998. 513 (Pt 1): S. 171-183.

Frantz, S.; et al., Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J*, 2013. 34 (16): S. 1233-1244.

Freiburg, A.; et al., Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 2000. 86 (11): S. 1114-1121.

Fukuda, N. und Granzier, H., Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Muscle Res Cell Motil* 2005. 26 (6-8): S. 319-323.

Fukuda, N., et al., Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*, 2005. 125 (3): S. 257-271.

Fürst, D.O.; et al., The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 1988. 106 (5): S. 1563-1572.

Gaczynska, M.; et al., Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mech Ageing Dev*, 2001. 122 (3): S. 235-254.

Gallastegui, N. und Groll, M., The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in Biochem Sci*, 2010. 35 (11): S. 634-642.

Gautel, M., Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch*, 2011. 462 (1): S. 119-134.

Gordon, A.M.; et al., The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*, 1966. 184 (1): S. 170-192.

Gordon, A.M. und Ridgway, E.B., Cross-bridges affect both TnC structure and calcium affinity in muscle fibers. *Adv Exp Med Biol* 1993. 332: S. 183-192.

Greaser, M.L.; et al., Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 2002. 23 (5-6): S. 473-482.

Gregorio, C.C.; et al., Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING-finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 2005. 26 (6-8): S. 389-400.

Groll, M.; et al., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997. 386 (6624): S. 463-471.

Grützner, A.; et al., Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, 2009. 97 (3): S. 825-834.

Gustafsson, A.B. und Gottlieb, R.A., Autophagy in Ischemic Heart Disease. *Circ Res*, 2009. 104 (2): S. 150-158.

Hale, A.N.; et al., Autophagy: regulation and role in development.“ *Autophagy*, 2013. 9 (7): S 951-972.

Hamdani, N.; et al., Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 2013. 112 (4): S. 664-674.

Hanna, R.A.; et al., Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, 2008. 456 (7220): S 409-412.

Hicke, L., Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Biol*, 2001. 2 (3): S. 195-201.

Hidalgo, C.G.; et al., PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 2009. 105 (7): S. 631-638.

Hoffmann, L.; et al., Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*, 1992. 267 (31): S. 22362-22368.

Horn, M.A.; et al., Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: collagen accumulation in the young and loss in the aged. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 53 (1): S. 83-90.

Hudson, B.; et al., Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res*, 2011. 109 (8): S. 858-866.

Iwai, K.; et al., Linear ubiquitin chains: NF- κ B signalling, cell death and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. 15 (8): S. 503-508.

Jabłońska-Trypuć, A.; et al., Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016. 31 (sup1): S. 177-183.

Jiang, L.J.; et al., Increased aortic calpain-1 activity mediates age-associated angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *PLoS One*, 2008. 3 (5): e2231.

Kenessey, A.; et al., Calpain II activity and calpastatin content in brain regions of 3- and 24-month-old rats. *Neurochem Res*, 1990. 15 (3): S. 243-249.

Kirkin, V.; et al., A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 2009. 33 (4): S. 505-516.

Klinke, R.; Pape, H.C.; Kurtz, A.; Silbernagl, S., *Physiologie*. Thieme, 2005.

Kötter, S.; et al., Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 2013. 99 (4): S. 648-656.

Kötter, S.; et al., Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 2014. 395 (11): S. 1341-1352.

Kovács, Á.; et al., Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction? *Neth Heart J*, 2016. 24 (4): S.268-274.

Krüger, M.; et al., Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ Res*, 2008. 102 (4): 439-447.

Krüger, M.; et al., Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 2009. 104 (1): S. 87-94.

Kuhn, M., Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol*, 2004. 99 (2): S. 76-82.

Lahmers, S.; et al., Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res*, 2004. 94 (4): S. 505-513.

Lakatta, E.G. und Levy, D., Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*, 2003. 107 (1): S. 139-146.

Lange, S.; et al., The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 2005. 308 (5728): S. 1599-1603.

Lee, C.K.; et al., Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 1999. 285 (5432): S. 1390-1393.

Levick, J.R., *Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems*. Hüthig: Johann Ambrosius Barth Verlag, 1998.

Li, W.W.; et al., Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69 (7): S. 1125-1136.

Linke, W.A., Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 2008. 77 (4): S. 637-648.

Linke, W.A.; et al., I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, 1999. 146 (3): S. 631-644.

Linke, W.A.; et al., Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 1996. 261 (1): S. 62-71.

Linke, W.A. und Granzier, H., A spring tale: new facts on titin elasticity. *Biophys J*, 1998. 75 (6): S. 2613-2614.

Linke, W.A. und Hamdani, N., Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 2014. 114 (6): S. 1052-1068.

Linke, W.A.; et al., Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J*, 1994. 67 (2): S. 782-792.

Lopez-Otin, C.; et al., The hallmarks of aging. *Cell*, 2013. 153 (6): S. 1194-1217.

Ly, D.H.; et al., Mitotic misregulation and human aging. *Science*, 2000. 287 (5462): S. 2486-2492.

Makarenko I., Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 2004. 95 (7): S. 708-716.

Martos, R.; et al., Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*, 2007. 115 (7): S. 888-895.

Matsumoto, G.; et al., Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*, 2011. 44 (2): S. 279-289.

Mélendez, A. und Levine, B., Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*, 2009. S 1-26.

Moldoveanu, T.; et al., Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, 2008. 456 (7220): S. 404-408.

Nagueh, S.F.; et al., Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2004. 110 (2): S. 155-162.

Nazim, U.M.; et al., Activation of autophagy flux by metformin downregulates cellular FLICE-like inhibitory protein and enhances TRAIL-induced apoptosis. *Oncotarget*, 2016. 7 (17): S. 23468-23481.

Neagoe, C.; et al., Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 2002. 106 (11): S. 1333-1341.

New, S.E. und Aikawa, E., Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ J*, 2011. 75 (6): S. 1305-1313.

Olivetti, G.; et al., Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*, 1991. 68 (6): S. 1560-1568.

Opitz, C.A.; et al., Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 2004. 94 (7): S. 967-975.

Paulus, W.J. und Tschöpe, C., A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through

coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62 (4): S. 263-271.

Pickart, C.M., Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001. 70: S. 503-533.

Pyle, W.G. und Solaro, R.J., At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*, 2004. 94 (3): S.296-305.

Raskin, A.; et al., A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, 2012. 287 (35): S. 29273-29284.

Raynaud, F.; et al., Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletalmyofibril. *FEBS J*, 2005, 272 (10): S. 2578-2590.

Rechsteiner, M., PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol*, 1990. 1 (6): S. 433-440.

Ren, J.; et al., Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)*, 2010. 88 (10): S. 993-1001.

Rubinsztein, D.C.; et al., Autophagy and aging. *Cell*, 2011. 146 (5): S. 682-695.

Russell, R.C.; et al., ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 2013. 15 (7): S. 741-750.

Sciarretta, S; et al., Is autophagy in response to ischemia and reperfusion protective or detrimental for the heart?. *Pediatr Cardiol*, 2011. 32 (3): S. 275-281.

Shaid, S.; et al., Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 2013. 20 (1): S. 21-30.

Sharma, K. und Kass, D.A., Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. *Circ Res*, 2015. 115 (1): S. 79-96.

Shibutani, S.T. und Yoshimori, T., A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 2014. 24 (1): S. 58-68.

Shintani, T. und Klionsky, D.J., Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004. 306 (5698): S. 990-995.

Shirakabe, A.; et al., Aging and autophagy in the heart. *Circ Res*, 2016. 118 (10): S. 1563-1576.

Silaghi, A.; et al., Epicardial adipose tissue extent: relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy. *Obesity*, 2008. 16 (11): S. 2424-2430.

Strait, J.B. und Lakatta, E.G., Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin*, 2012. 8 (1): S. 143-164.

Sun, H.; et al., MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 1993, 75 (3): S. 487-493.

Tan, J.M.; et al., Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 2008. 17 (3): S. 431-439.

Taneike, M.; et al., Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*, 2010. 6 (5): S. 600-606.

Tang, Y.; et al., Chaperone-mediated autophagy substrate proteins in cancer. *Oncotarget*, 2017. 8 (31): S. 51970-51985.

Thomas, D.P.; et al., Aging- and training-induced alterations in collagen characteristics of rat left ventricle and papillary muscle. *Am J Physiol*, 1992. 263 (3 Pt 2): H778-783.

Thrower, J.S.; et al., Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 2000. 19 (1): S. 94-102.

Tian, L.F.; et al., MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 345 (1): S. 355-361.

Tocchi, A.; et al., Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1847 (11): S. 1424-1433.

- Tomaru, U.; et al., Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol*, 2012. 180 (3): S. 963-972.
- Tresini, M.; et al., Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Exp Cell Res*, 2001. 269 (2): S. 287-300.
- van der Velden, J., Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart. *Pflugers Arch*, 2011 462 (1): S. 155–163.
- Vernace, V.A.; et al., Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J*, 2007. 21 (11): S. 2672-2682.
- Völkel, T, und WA Linke. „Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle.“ *Pflugers Arch*, 2011. 462 (1): 143-154.
- Wagatsuma, A.; et al., Effects of ageing on expression of the muscle-specific E3 ubiquitin ligases and Akt-dependent regulation of Foxo transcription factors in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*, 2016. 412 (1-2): S. 59-72.
- Weekes, J.; et al., Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics*, 2003. 3 (2): S. 208-216.
- White, M.; et al., Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation*, 1994. 90 (3): S. 1225-1238.
- Williamson, D.; et al., Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol*, 2003. 547 (Pt 3): S. 977-987.
- Witt, S.H.; et al., MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 2005. 350 (4): S. 713-722.
- Wu, Y.; et al., Changes in titin and collagen underlie diastolic stiffness diversity of cardiac muscle. *J Moll Cell Cardiol*, 2000. 32 (12): S. 2151-2162.
- Yamasaki, R.; et al., Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 2002. 90 (11): S. 1181-1188.

Zhao, Z.; et al., Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. 306 (5): S. H628-640.

Zhu, C.; et al., Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. 1863 (9): S. 2363-2371.

Zile, M.R.; et al., Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*, 2015. 131 (14): S. 1247-1259.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Senem Salcan

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit ist mein Lebenswerk und wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen in meinem Umfeld nicht möglich. Ich möchte mich im Einzelnen bei euch bedanken.

Zunächst geht mein Dank an dich Martina, deine Tür stand immer offen und du warst immer sehr hilfsbereit. Vor allem schätze ich, dass du auch in den schwierigsten Lagen immer optimistisch warst und mich jedes Mal vom Neuen motiviert hast, nicht aufzugeben. Außerdem möchte ich mich für die vielen Naschereien bedanken, es hat immer gutgetan, Nervennahrung da zu haben. Ich möchte mich auch bei Sepp bedanken. Ohne deine guten Ideen und deine Planung hätte ich mein Projekt nicht ausbauen können. Auch du hast mir immer wieder bei Problemen geholfen und mich weitergebracht. Sabine, unsere Labormami, ohne dich und deine guten Ratschläge wäre nichts möglich gewesen. Du hast mir nicht nur mit technischem, sondern auch seelischem *Know-How* die Zeit im Labor erleichtert, Danke dafür. Gosia, ich bin so froh, dass du diese wichtige Zeit parallel mit mir verbracht hast. Unsere gemeinsamen Konferenzen werden wir immer in Erinnerung bleiben, Danke für deine Gesellschaft. Lukas und Kathi möchte ich ebenfalls Danken, ihr habt mir das erste Jahr in Düsseldorf verschönert, nicht nur im Labor, sondern auch auf Sardinien.

Herr Aberle, auch bei Ihnen möchte ich mich herzlichst bedanken. Sie hatten immer sehr viel Interesse an meinem Projekt und ihre Tür stand stets offen.

Der AG Gödecke und der AG Klöcker möchte ich ebenfalls danken, da sie unserer AG immer Zugang zu Gerätschaften gewährt haben. Susanne Küsters (AG Gödecke) möchte ich ganz besonders für ihre Hilfe und ihr offenes Ohr danken.

Meinen Eltern möchte ich ebenfalls danken, Danke dass ihr da seid und mich immer unterstützt, ohne euch wäre nichts möglich gewesen. Ajitha, danke für deine mentale Unterstützung während des Schreibens unserer Dissertationen. Ivy, auch dir danke ich, Danke, dass du mir immer zuhörst und für mich da bist.

Zuletzt möchte ich mich bei den zwei wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken, bei meinem Mann und meiner Schwester. Ihr habt so viel mitgemacht in den letzten 3 Jahren und 9 Monaten, vielen Dank für eure Geduld, vor allem in der Endphase.