

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

Der Einfluss von Metformin-Stimulation auf den Titin-Isoformen-*Switch* in
embryonalen Rattenkardiomyozyten in Abhängigkeit von Autophagie-
Aktivität und Expression des Spleißfaktors RBM20

Dissertation

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

vorgelegt von
Katharina Anna Bärthlein

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Maria Grandoch

Zusammenfassung

Metformin ist seit Jahrzehnten das weltweit am weitesten verbreitete orale Antidiabetikum. Für das Pharmakon konnte eine verbesserte Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels, also eine erhöhte Elastizität während der Diastole, gezeigt werden. Das muskuläre Strukturprotein Titin definiert die diastolische passive Spannung maßgeblich, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass mechanische Titin-Eigenschaften durch Metformin direkt beeinflusst werden. In Kardiomyozyten wird Titin in der langen und elastischen N2BA- und in der kürzeren und damit steiferen N2B-Isoform koexprimiert. Die Titin-basierte Rigidität von Kardiomyozyten kann unter anderem über Änderungen dieses Titin-Isoformen-Verhältnisses beeinflusst werden. Perinatal findet ein sogenannter Isoformen-*Switch* statt, bei dem eine fötale N2BA-Isoform sukzessive durch die adulten N2BA- und N2B-Isoformen ersetzt wird. Diese Isoformen-Transition ist maßgeblich durch den Spleißfaktor RBM20 reguliert. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Metformin auf den Titin-Isoformen-*Switch* zu untersuchen. Dazu wurden embryonale Rattenkardiomyozyten in An- und Abwesenheit von Metformin im Zellkulturmodell kultiviert und das Isoformen-Verhältnis durch SDS-Gelelektrophorese zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. So zeigten Metformin-behandelte Zellen zu frühen Kultivierungszeitpunkten signifikant höhere Level der N2B-Isoform, zu späteren Zeitpunkten hingegen einen signifikant niedrigeren N2B-Anteil. Dies gilt auch bei späterem Stimulationsbeginn ab Tag 7 in Kultur. Zusätzlich wurde die Proteinexpression des Spleißfaktors RBM20 mittels Western Blot untersucht. So korrelierte der *Switch* hin zu signifikant höheren N2B-Leveln unter Metformin zu frühen Kultivierungszeitpunkten mit signifikant erhöhten Proteinleveln von RBM20, also vermutlich einer hohen Spleiß-Aktivität. Zu späten Kultivierungszeitpunkten wurden, den signifikant geringeren N2B-Leveln unter Metformin entsprechend, signifikant niedrigere RBM20-Level festgestellt. Da Metformin im Allgemeinen als Aktivator der Autophagie bekannt ist, wurde Autophagie als Mediator des invertierten Metformin-Effekts angenommen. Anhand von Autophagie-Markern wurde eine hohe Metformin-vermittelte Autophagie-Aktivität mit erhöhtem N2B-Anteil auf Titin-Isoform-Ebene in Verbindung gebracht, geringerer N2B-Anteil mit niedriger Autophagie-Aktivität.

Die Metformin-Wirkung auf die kardiale Titin-Isoform-Komposition und Autophagie-Aktivierung differierte je nach Kultivierungsdauer und ist damit vermutlich vom Entwicklungsstadium der Zellen abhängig. Möglicherweise findet in diesem Versuchsaufbau ein metabolischer *Switch* von embryonaler Glykolyse hin zur Energiegewinnung durch β -Oxidation statt, was eine reduzierte Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten mit sich bringt. Dieser Wechsel bedingt womöglich den veränderten Effekt von Metformin auf die Autophagie-Aktivierung und auf die Zusammensetzung der Titin-Isoformen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Metformin-Wirkung vermutlich nicht nur je nach Gewebe unterscheidet, sondern auch in ein und derselben Zelle je nach Metabolismus und Proliferationsraten unterschiedliche Effekte nach sich ziehen kann.

Abstract

To date metformin is the worldwide most common orally applied antidiabetic pharmacological agent and has been associated with improved left ventricular elasticity and thus relaxation during diastole. As the scaffolding protein titin is a main predictor of diastolic passive tension in cardiomyocytes, it is hypothesized that metformin directly influences mechanical titin properties. In cardiomyocytes two titin isoforms are co-expressed: the long and therefore elastic N2BA-isoform as well as the shorter and stiffer N2B-isoform. A variation of this isoform ratio leads to modification of titin-based rigidity of cardiomyocytes. During perinatal heart development a fetal N2BA isoform is gradually replaced by adult N2BA- and N2B-isoforms. This process, which is referred to as titin-isoform-switch, is largely regulated by the splicing factor RBM20.

The objective of this thesis is to examine the impact of metformin stimulation on the titin-isoform-switch. To this end, embryonic rat cardiomyocytes are cultivated in presence as well as in absence of metformin and the isoform ratio is analyzed via SDS-gel electrophoresis at different points in time of cell culture. While metformin stimulated cells exhibit a significantly increased level of the shorter and stiffer N2B-isoform during the first days in culture, N2B-levels drop significantly with the duration of cultivation. This observation still holds in cases where metformin stimulation only starts after 7 days in culture. Furthermore, the protein expression of the splicing factor RBM20 is examined using Western Blot analysis. In metformin treated cells RBM20 protein expression correlates with the titin-isoform-composition: the switch towards significantly higher N2B-levels in metformin stimulated cells during early cultivation is consistent with significantly higher RBM20-levels and thus presumably high splicing activity. The significantly lower N2B-levels in metformin treated cells after longer cultivation correlate with significantly reduced RBM20-levels. As metformin is generally known as an activator of autophagy, the autophagic process is assumed to be a mediator of the reversed metformin effect on titin properties. Autophagy markers show a connection between high autophagy activity and elevated N2B-levels, whereas lower N2B-levels can be associated with reduced autophagic activation.

The metformin effect varies depending on cultivation duration and presumably on maturity level of embryonic rat cardiomyocytes. Possibly, a metabolic switch occurs in this experimental set-up. Embryonic ATP-production via glycolysis is replaced by fatty acid oxidation in mature cardiomyocytes, which leads to lower proliferation rates of the cells. This switch possibly causes the reversed effect of metformin on the autophagy activation and hence on the titin-isoform-composition. In summary, the metformin effect on titin properties is not only tissue dependent but may also vary depending on the metabolic and proliferative conditions.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B; Gene: <i>AKT1</i> , <i>AKT2</i> , <i>AKT3</i>
AL	Autolysosom
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
Atg	<i>Autophagy related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTRL	Kontrolle (<i>control</i>)
D	Tag
Da	Dalton
DCM	Diabetische Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ERC	<i>Embryonic rat cardiomyocytes</i>
et al.	<i>Et alii</i> (und andere)
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FIP200	<i>focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
GTP	Guanosintriphosphat
H₂O_{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
l	Liter
LV	Linker Ventrikel
M	Molar/Mol
MDM2	<i>mouse-double-minute 2</i>
MET	Metformin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MuRF	<i>Muscle-specific RING Finger E3 ligase</i>
N2-Bus	<i>N2-B unique sequence</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Nbr1	<i>Neighbor-of-BRCA1-gene-1</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-1,4,5-trisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Rapa	Rapamycin
RBM20	<i>RNA binding motif protein 20</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i>)
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
Std.	Stunde(n)
T2-Diabetiker	Typ-2-Diabetiker
T3	Trijodthyronin
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
T-cap	Titin-cap/Telethonin
TEMED	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
ULK	<i>Uncoordinated-51 Like Kinase</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	<i>unique sequence</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Metformin: Indikation und Entwicklung zum breit eingesetzten Pharmakon	1
1.2	Möglicher Wirkmechanismus von Metformin	2
1.3	Die Position von Titin innerhalb eines Sarkomers	5
1.4	Die Struktur und Funktion des Makroproteins Titin	6
1.5	Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit des Myokards durch Veränderungen der Isoform-Komposition	8
1.6	Die Rolle von Insulin und T3 beim Titin-Isoformen- <i>Switch</i>	9
1.7	Metformin und Autophagie	11
1.7.1	Prozess und Induktion der Autophagie	11
1.7.2	Autophagie als möglicher Mediator des Metformin-Effekts auf Titin	15
2	Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Chemikalien	18
3.1.2	Puffer und Lösungen	19
3.1.3	Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten	21
3.1.4	Laborgeräte	21
3.1.5	Antikörper	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten	23
3.2.2	Proteinbiochemie	25
3.2.3	Software	29
3.2.4	Datenanalytische Statistik	29

4	Ergebnisse	30
4.1	Experimenteller Ansatz 1	30
4.1.1	Metformin-Stimulation beeinflusst die Titin-Isoform-Komposition in kultivierten ERC	30
4.1.2	Metformin aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Akt.....	31
4.1.3	Metformin beeinflusst die mTOR-Phosphorylierung sowie die RBM20-Proteinexpression.....	32
4.1.4	mTOR-Inhibition durch Rapamycin beeinflusst Effekte der Metformin-Stimulation	34
4.1.5	Der Zusammenhang zwischen Metformin und Autophagie-Induktion	36
4.2	Experimenteller Ansatz 2.....	39
4.2.1	Metformin bewirkt einen signifikant reduzierten N2B-Anteil in ERC bei Stimulation ab Tag 7	39
4.2.2	Metformin aktiviert die Ser-/Thr-Kinase Akt in ERC bei Stimulation ab Tag 7	40
4.2.3	Metformin bewirkt eine signifikant verringerte RBM20-Proteinexpression bei Stimulation ab Tag 7	41
5	Diskussion	43
5.1	Metformin bewirkt unterschiedliche Effekte auf Titin-Isoform-Komposition	43
5.2	Metformin-bedingte RBM20-Proteinlevel kohärieren mit N2B-Isoform-Anteil	46
5.3	Metformin wirkt nicht nur über den PI3K-Akt-Signalweg auf Titin-Isoformen.....	47
5.4	mTOR-Inhibition durch Rapamycin beeinflusst Metformin-Wirkung auf Titin.....	49
5.5	Metformin-induzierte mTOR-Aktivität korreliert mit Autophagie-Inhibition	50
5.6	Schlussfolgerung.....	56
6	Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Metformin: Indikation und Entwicklung zum breit eingesetzten Pharmakon

In Deutschland sind derzeit rund 6,5 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Mit über 95% macht Typ 2-Diabetes mellitus (DMT2) den weit überwiegenden Anteil aus (Jacobs et al., 2017). Dabei kommt es zu einer Störung der Glukosehomöostase, die hauptsächlich auf periphere Insulinresistenz zurückzuführen ist. So ist zunächst zwar Insulin vorhanden und die pankreatischen β -Zellen können die Resistenz durch erhöhte Insulinproduktion kompensieren. Später kann diese Kompensation allerdings nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu Hyperglykämien (Marín-Peñalver et al., 2016). Durch diesen langsam progredienten Anstieg des Blutglukose-Niveaus verursacht DMT2 nur sehr schleichend Symptome. In vielen Fällen wird ein DMT2 daher erst nach Jahren diagnostiziert, was eine hohe Dunkelziffer vermuten lässt (Jacobs et al., 2017). Dass dies ein ernstzunehmendes Problem darstellt, liegt besonders an lebensbedrohlichen Langzeitkomplikationen wie Myokardinfarkt, Kardiomyopathie und Nierenversagen (Ripsin et al., 2009; Marín-Peñalver et al., 2016). Wird ein DMT2 festgestellt, so ist laut Leitlinien nach einem erfolglosen Versuch der Lebensstilmodifikation eine Metformin-Verordnung der erste medikamentös-therapeutische Schritt (Matthaei et al., 2009).

Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Pflanze *Galega officinalis* in der Volksmedizin als Diabetes-Heilmittel eingesetzt (An und He, 2016). Wie sich später herausstellte, ist das darin enthaltene Guanidin verantwortlich für die blutglukosesenkende Wirkung (Watanabe, 1918). Im Jahre 1929 wurde das Biguanid-Derivat Metformin synthetisiert, was im Gegensatz zur ursprünglichen Substanz deutlich reduzierte Toxizität besaß und nun für den klinischen Gebrauch geeignet war (An und He, 2016). Mittlerweile wird Metformin seit mehr als 60 Jahren medizinisch eingesetzt und ist das am weitesten verbreitete orale antidiabetische Pharmakon, das jährlich von über 150 Millionen Patienten eingenommen wird (An und He, 2016). Trotz dieser klinischen Langzeiterfahrung ist der genaue Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

1.2 Möglicher Wirkmechanismus von Metformin

Zahlreiche Studien belegen, dass Metformin seine blutglukosesenkende Wirkung hauptsächlich durch Hemmung der Glukoneogenese entfaltet (Stumvoll et al., 1995; Hundal et al., 2000; Takashima et al., 2010). Dieser Stoffwechselprozess findet in Hepatozyten sowie in Nierenzellen statt und ist eine wichtige Einflussgröße des Blutzuckerspiegels. Der ohnehin schon erhöhte Blutzuckerspiegel bei Typ-2-Diabetikern wird durch Hemmung dieser endogenen Glukoseproduktion nicht noch weiter gesteigert. Metformin kann diesen Prozess auf verschiedenen Wegen inhibieren. Zum einen kann Metformin in hohen Konzentrationen ($\geq 5\text{mM}$) den mitochondrialen Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette hemmen, was zu einer reduzierten Energiebereitstellung in Form von ATP führt (Hollunger, 1955; El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000). So wurde festgestellt, dass Metformin zelluläre ATP-Level senkt und zugleich die ATP-Ausgangsstoffe ADP und AMP akkumulieren lässt, was ein erhöhtes AMP/ATP- und ADP/ATP-Verhältnis zur Folge hat (Cao et al., 2014; El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000). Da die Glukoneogenese ein Energie-verbrauchender Prozess ist, der für die Synthese eines Moleküls Glukose 4 Moleküle ATP sowie 2 Moleküle GTP verbraucht, führt die Reduktion von zellulärem ATP-Gehalt zur Hemmung der Glukoneogenese (An und He, 2016). Zudem wurde beobachtet, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase, ein Hauptenergiesensor der Zelle, durch erhöhte AMP/ATP- sowie ADP/ATP-Quotienten aktiviert wird und die Glukoneogenese-Hemmung verstärkt (Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011; Gowans et al., 2013; Cao et al., 2014). Die Konzentrationen, die eine Hemmung des Komplexes I der Atmungskette und damit eine Erhöhung des AMP/ATP- und ADP/ATP-Quotienten nach sich ziehen, sind allerdings durch therapeutische Dosierungen von Metformin nicht zu erreichen (Cao et al., 2014; Foretz et al., 2014; Wilcock und Bailey, 1994; He und Wondisford, 2015). Daher ist anzunehmen, dass - obwohl Jahrzehnte lang vermutet - die Hemmung des mitochondrialen Komplexes für die blutzuckersenkende Wirkung nicht zwingend erforderlich ist. Metformin kann jedoch auch in Konzentrationen, wie sie nach oraler Applikation physiologisch vorkommen, zur Aktivierung der AMP-Kinase führen (Zhou et al., 2001). Dies geschieht durch Stimulation einer AMPK vorgeschalteten Kinase, der *Liver kinase B1* (LKB1), die AMPK an der Stelle Thr172 phosphoryliert und damit aktiviert (Shaw et al., 2005; Cao et al., 2014).

Es gibt Hinweise, dass die aktivierte AMP-Kinase die Glukoneogenese-Genexpression inhibiert und damit die endogene Glukoseproduktion hemmt (He et al., 2009). Eine weitere potentielle Erklärung der antihyperglykämischen Wirkung von Metformin liegt in einer Erhöhung der Insulinsensitivität. Unter physiologischen Bedingungen bewirkt Insulin den Einbau des Glukosetransporters GLUT-4 in die Membran von Adipozyten, Skelett- und Herzmuskelzellen, wodurch die zelluläre Glukoseaufnahme erleichtert wird und der Blutglukosespiegel sinkt. Diverse Publikationen diskutieren Metformin in diesem Zusammenhang als Verstärker des Insulin-vermittelten GLUT4-Einbaus (Fischer et al., 1995; Yang und Holman, 2006). So wird zum einen beschrieben, dass erhöhte Insulin-vermittelte Glukoseaufnahme in Herzmuskelzellen durch Metformin nur in sehr hohen Dosierungen *in vitro* erreicht wurde (Fischer et al., 1995). Zum anderen wird diskutiert, dass Metformin den Abbau von GLUT-4 hemmen könnte und durch die längere Verweildauer des Transporters die Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten erhöht (Yang und Holman, 2006). Eine zusammenfassende Studie konnte eine Erhöhung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme durch Metformin hingegen nicht bestätigen (Natali und Ferrannini, 2006). Der molekulare Mechanismus, der hinter dieser möglichen Erhöhung der Insulinsensitivität steckt, ist noch immer kontrovers diskutiert und Gegenstand intensiver Forschung. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die beschriebenen möglichen Metformin-Wirkmechanismen. Gesammelt betrachtet, führt Metformin *in vivo* vermutlich sowohl durch die Glukoneogenese-Hemmung, als auch durch Optimierung der Insulinwirkung zur Verbesserung von Hyperglykämien bei Patienten (An und He, 2016). Es ist davon auszugehen, dass Metformin in unterschiedlichen Geweben über unterschiedliche Wirkmechanismen zu verschiedenen Wirkungen führt (An und He, 2016; Fischer et al., 1995; Yang und Holman, 2006).

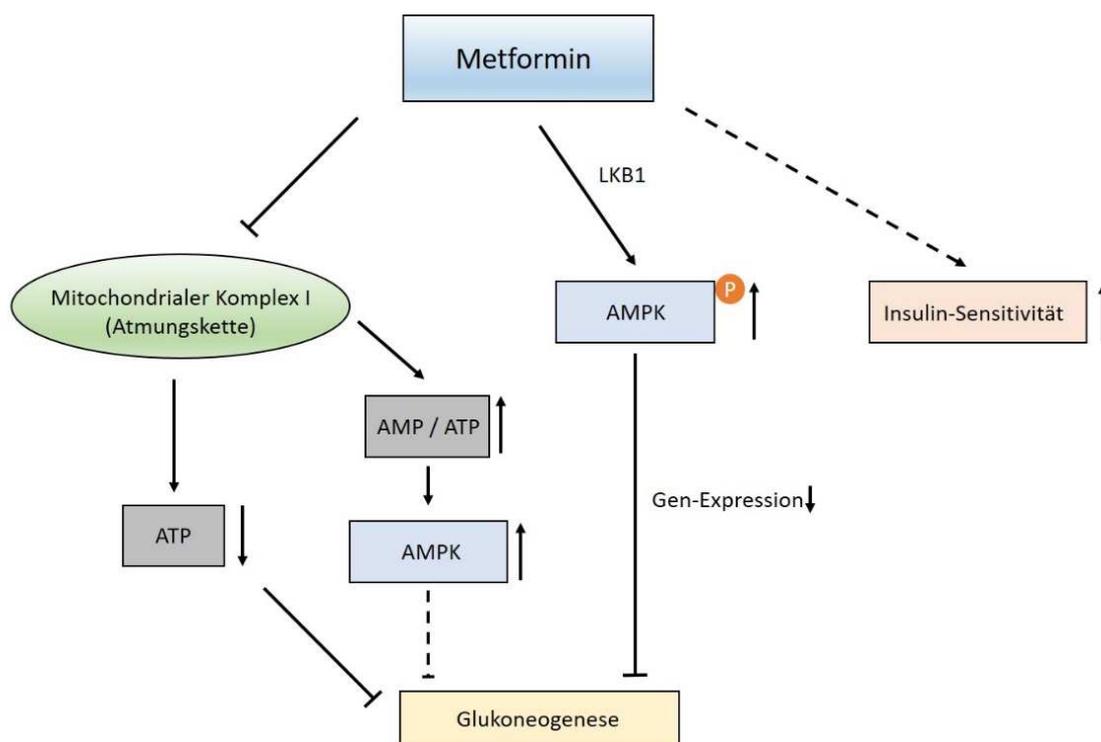


Abb. 1: Mögliche Mechanismen der antihyperglykämischen Wirkung von Metformin. Mitochondrialer Komplex I der Atmungskette, NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase; ATP, Adenosinriphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat; AMPK, AMP-aktivierte Kinase; LKB1, *Liver kinase B1*.

Im Gegensatz zur molekularen Wirkung sind die Kenntnisse über die klinische Wirkung von Metformin zahlreich. Das Präparat wird als das Antidiabetikum mit dem günstigsten kardiovaskulären Profil angesehen. Es gilt als erwiesen, dass Metformin zu einer signifikanten Reduktion von kardialen Ereignissen führt (UKPDS Group, 1998). Darüber hinaus hat eine klinische Studie gezeigt, dass Metformin-Einnahme bei Typ 2-Diabetikern mit einer signifikant verbesserten diastolischen Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels einhergeht (Anderssen et al., 2010). So scheint Metformin Einfluss auf elastische Eigenschaften von Herzmuskelzellen zu nehmen.

1.3 Die Position von Titin innerhalb eines Sarkomers

Die Kontraktionsfähigkeit eines quergestreiften Muskels beruht auf Längenvariation der kleinsten kontraktile Einheiten, den sogenannten Sarkomeren. Sie bestehen im Wesentlichen aus einer Trias an Myofilamenten: den dicken Myosinfilamenten, den dünnen Aktinfilamenten, sowie aus den elastischen Titinfilamenten. Alternierend und überlappend angeordnet, sind diese Filamente für die Verkürzung des Sarkomers verantwortlich und verleihen dem Muskel seine charakteristische Querstreifung.

Der schematische Aufbau eines Sarkomers ist in Abbildung 2 gezeigt. Ein Sarkomer erstreckt sich zwischen zwei Z-Scheiben, die als Aufhängeapparat für die dünnen Aktinfilamente sowie für die Titinfilamente fungieren und eine wesentliche Rolle bei der Verknüpfung von Zytoskelett und kontraktilem Apparat spielen (Pyle und Solaro, 2004). Ein einziges Titin-Molekül durchspannt die Hälfte des Sarkomers von der Z-Scheibe bis zum M-Band und ist unter anderem bei der Zentrierung der Myosinfilamente zur optimalen aktiven Kraftentwicklung von Bedeutung (Fürst et al., 1988; Horowitz et al., 1989). Die charakteristische Anordnung der Myofilamente bedingt das mikroskopische Lichtbrechungsverhalten eines Sarkomers, welches wiederum namensgebend für einzelne Regionen dessen ist. Der Bereich, der die Z-Scheiben umgibt und vorwiegend aus Aktin- sowie aus Titinfilamenten besteht, nennt sich aufgrund seiner einfach lichtbrechenden Eigenschaften I-Band (isotrop). Je nach Dehnungs- beziehungsweise Kontraktionsstatus, verbreitert oder verschmälert sich das I-Band. Die Myosin-haltigen Regionen gelten aufgrund ihres doppelt lichtbrechenden Verhaltens im Polarisationsmikroskop als A-Band (anisotrop). Die mediane Verdichtung innerhalb dieses A-Bands wird als M-Band bezeichnet und resultiert aus einer Quervernetzung der Myosinfilamente untereinander (Knappeis und Carlsen, 1968; Agarkova und Perriard, 2005). Das Ineinandergleiten der Filamente bewirkt – trotz konstanter Eigenlänge der Myosin- und Aktinfilamente - eine Verkürzung des Sarkomers und somit die Muskelkontraktion und wird als Gleitfilamenttheorie bezeichnet (Huxley und Hanson, 1954). Der Querbrückenzyklus ermöglicht dieses Ineinandergleiten und beruht auf Änderungen der chemischen Konfiguration der Myosinköpfe. Diese können ihren Winkel zum Rest des Moleküls verändern und durch Bindung an Aktin die Filamente gegeneinander verschieben.

Die Lösung des Myosinköpfchens von Aktin verlangt Energie in Form von ATP (Maruyama, 1995). Titin verändert im Zuge der Muskelkontraktion seine Länge, überwiegend im elastischen I-Bandbereich (Linke et al., 1996, 1999).

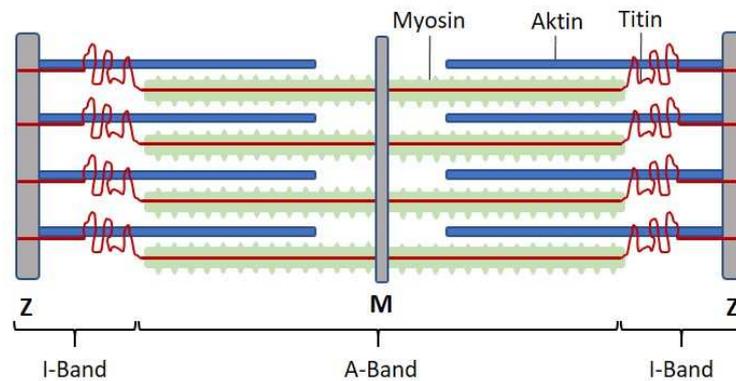


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. Myosin und Aktin bewirken durch Ineinandergleiten eine Verkürzung des Sarkomers. Ein einzelnes Titin-Molekül durchspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band. A-Band (anisotropes Band), I-Band (isotropes Band), M-Band (mediale Verdichtung der Myosinfilamente), Z-Streifen (laterale Begrenzung des Sarkomers und Aufhängeapparat für Aktin- und Titinfilamente).

1.4 Die Struktur und Funktion des Makroproteins Titin

Mit einer molekularen Masse von bis zu 3700kDa gilt Titin nach heutigem Stand als das größte bekannte Protein. Trotz seiner Dimension wird das Makroprotein durch ein einziges Gen kodiert, welches 363 Exons enthält und auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert ist (Bang et al., 2001). Durch differentielles Spleißen werden im Herzmuskel die lange und elastische N2BA- (ca. 3200 – 3700kDa) und die kürzere und damit steifere N2B-Titin-Isoform (ca. 3000kDa) koexprimiert (Freiburg et al., 2000; Bang et al., 2001).

Titin besteht aus aneinandergereihten Immunglobulin (Ig)- und Fibronectin Typ 3-ähnlichen Domänen, sowie aus individuellen Sequenzabschnitten, den *unique sequences*, und einer nahe des M-Bands gelegenen Titinkinase-Domäne (Bang et al., 2001; Labeit et al., 1992; Labeit und Kolmerer, 1995; Gautel, 2011). Durch seine Zusammensetzung aus diesen verschiedenen Modulen mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften kann Titin verschiedenste Konfigurationen annehmen und leistet neben Kollagenfasern der Extrazellulärmatrix einen entscheidenden Beitrag zur myokardialen Elastizität (Prado et al., 2005; Makarenko et al., 2004).

Titin erstreckt sich über das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band (Fürst, 1988). Während das Makroprotein in der Z-Scheibe und im A-Band fest integriert und daher nicht extensibel ist, beinhaltet der I-Bandbereich elastische Elemente (Linke et al., 1996, 1999; Trombitás et al., 1998). Dieses Segment setzt sich aus Ig-Domänen, sowie zweier einzigartiger Sequenzen (*unique sequences*) zusammen. Die sogenannte PEVK-Domäne, eine *unique sequence*, ist reich an Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) und ist beidseits flankiert durch eine Region bestehend aus seriell gekoppelten Ig-Domänen (Krüger und Kötter, 2016; Labeit und Kolmerer, 1995). Alle anderen Exons des elastischen I-Band-Titins werden alternativ gespleißt und so verschiedene Isoformen exprimiert, die sich in ihrer Dimension unterscheiden (Freiburg et al., 2000). Die kardialen Isoformen unterscheiden sich demnach insbesondere im I-Bandenbereich (siehe Abbildung 3). N2BA und N2B enthalten hier zusätzlich ein herzspezifisches N2B-Element, das eine längere *unique sequence* (N2-Bus) beinhaltet (Freiburg et al., 2000). Die Dimension und höhere Elastizität der N2BA Isoform ist bedingt durch eine längere PEVK-Domäne, zusätzliche Ig-Segmente, sowie durch das Vorkommen eines sogenannten N2A-Elements, welches Ig-Domänen und kurze *unique sequences* enthält (Freiburg et al., 2000; Labeit und Kolmerer, 1995; Bang et al., 2001; Greaser et al., 2002).

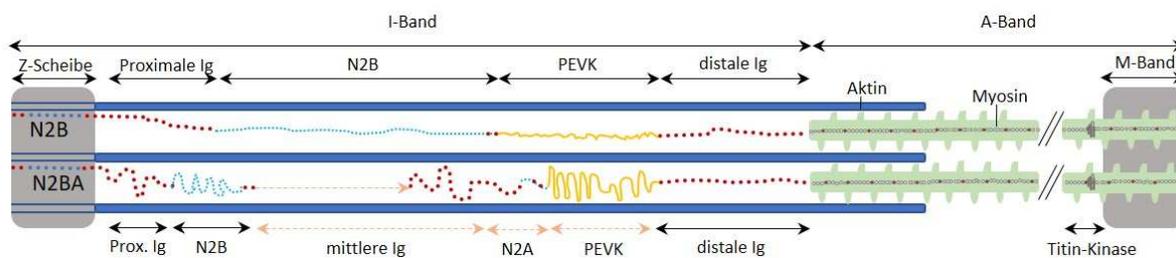


Abb. 3: Schematische Darstellung der Titin-Isoformen N2B und N2BA in einem kardialen Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zum M-Band. Gezeigt ist der jeweilige Aufbau der Isoformen im Kontext des Halbsarkomers. Proximale und distale (in Bezug zur Z-Scheibe) Ig-Domäne, sowie PEVK und das herzspezifische N2B-Element kommen in beiden kardialen Isoformen vor. Die N2BA-Isoform enthält zusätzliche Ig-Segmente sowie ein N2A-Segment.

Die Dimension und die zentrale Position im Sarkomer bringen multiple Funktionen des Makroproteins Titin mit sich. So fungiert Titin als Strukturprotein bei der Anordnung der einzelnen Filamente untereinander und bewirkt eine Zentrierung der dicken Filamente, um optimale Kraftentwicklung zu gewährleisten (Tskhovrebova und Trinick, 2010; Ehler und Gautel, 2008; Horowitz et al., 1989). Am wohl bekanntesten ist die mechanische Eigenschaft Titins als sogenannte molekulare Feder, welche sich auf das I-Band konzentriert (Linke et al., 1996, 1999; Trombitás et al., 1998). Die seriell gekoppelten elastischen Segmente des I-Band-Titins (prox. und dist. Ig-Domäne – in N2BA auch das mittlere Ig-Domänensegment -, PEVK-Segment und herzspezifische N2-Bus) weisen unterschiedliche Rigiditäten auf und entfalten sich sequentiell (Krüger und Linke, 2011). Im Zuge der Diastole, also bei Sarkomerdehnung, werden zunächst die *linker sequences* in den proximalen und distalen Ig-Domänen extendiert (Linke et al., 1996). Bei weiterer Dehnung entfalten sich das PEVK-Segment sowie die N2-Bus-Region. Dabei kommt es zu einer erhöhten passiven Spannung und es entstehen elastische Rückstellkräfte ähnlich einer molekularen Feder (Linke et al., 1999; Granzier et al., 1997). Die durch Titin generierten Rückstellkräfte verursachen so den Großteil der myokardialen Steifigkeit im Bereich von physiologischen Sarkomerlängen (bis etwa 2,2 μm). Die Kollagen-vermittelte Steifigkeit der Extrazellulärmatrix ist erst bei Sarkomerlängen über 2,2 μm von größerer Bedeutung (Linke et al., 1994; Granzier und Irving, 1995; Prado et al., 2005).

1.5 Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit des Myokards durch Veränderungen der Isoform-Komposition

Die passive Steifigkeit von Titin kann durch verschiedene Mechanismen moduliert werden. Während posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und oxidativer Stress kurzfristige Variationen der Titin-Rigidität zur Folge haben, bewirken Isoform-Wechsel längerfristige Veränderungen der Titin-basierten Steifigkeit (Krüger und Kötter, 2016). Der physiologische N2BA:N2B-Quotient in adulten humanen Herzen beläuft sich auf etwa 30:70 (Neagoe et al., 2002). Im Rahmen von schweren dilatativen Kardiomyopathien oder kardialen Ischämien konnten Veränderungen dieses Isoformen-Verhältnisses beobachtet werden. So zeigt sich in beiden Fällen ein erhöhter N2BA-Anteil, was eine reduzierte Titin-basierte passive Spannung zur Folge hat (Makarenko et al., 2004; Neagoe et al., 2002).

Bei adulten Nagern ist der Anteil von N2BA relativ gering. So überwiegt bei adulten Ratten mit etwa 90% die kürzere N2B-Isoform und bewirkt ein steiferes Myokard als beim Menschen (Opitz et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Im embryonalen Stadium präsentiert sich in Rattenkardiomyozyten hingegen fast ausschließlich eine 3700kDa große fötale N2BA-Isoform, die ab der perinatalen Periode sukzessive durch adulte N2B- (ca. 3000kDa) und N2BA-Isoformen (ca. 3200 – 3700kDa) ersetzt wird, bis das entsprechende Verhältnis von etwa 90% N2B nach etwa 12 Tagen erreicht ist (Opitz et al., 2004).

Im Zellkulturmodell mit embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) kann dieser sogenannte Titin-Isoformen-*Switch* ebenfalls beobachtet werden, ist allerdings bei hormonreduziertem Medium weniger schnell und effektiv als *in vivo* (Krüger et al., 2008; 2010). Ein Titin-Isoformen-*Switch* hin zu N2B erhöht die myofibrilläre passive Steifigkeit (Cazorla et al., 2000), während bei einer Erhöhung des N2BA-Anteils die passive Spannung sinkt (Neagoe et al., 2002). Diese Prozesse finden vermutlich als adaptive Reaktion auf sich verändernde systolische und diastolische Gegebenheiten im Organismus statt (Makarenko et al., 2004; LeWinter et al., 2007).

1.6 Die Rolle von Insulin und T3 beim Titin-Isoformen-*Switch*

Sowohl für Insulin als auch für das Thyroidhormon Trijodthyronin (T3) konnte bereits ein Effekt auf den Titin-Isoformen-*Switch* in ERC nachgewiesen werden (Krüger et al., 2008; 2010). Das Schilddrüsenhormon T3 - essentiell für die kardiale Entwicklung (Klein und Ojamaa, 2001) – fördert die Titin-Isoformen-Transition von der embryonalen N2BA-Isoform hin zu überwiegend N2B-Anteil. Ähnlich wie bei T3-Stimulation werden auch unter Insulin-Einfluss bereits zu früheren Kultivierungszeitpunkte höhere N2B-Level festgestellt (Krüger et al., 2008; 2010;). Als verantwortlicher Signalweg wurde für beide Hormone die PI3K-Akt-Kaskade identifiziert (Krüger et al., 2008; 2010).

Der PI3K-Akt-Signalweg (siehe Abb. 4) ist in multiplen Zellprozessen, die Zellproliferation und -stoffwechsel regulieren, involviert. Am Anfang steht dabei die Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), beispielsweise durch Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. PI3K aktiviert wiederum die Serin-/Threonin-Kinase Akt. Akt, auch als Proteinkinase B bezeichnet, ist dann aktiviert, wenn der Threoninrest an Position 308 und der Serinrest an Position 473 phosphoryliert sind.

Akt ist ein wesentlicher Bestandteil vieler zellulärer Signalwege. Über die nachgeschaltete mTOR-Kinase (*mammalian target of rapamycin*) kann die Aktivierung der Proteintranslation und -synthese reguliert werden (Ma und Blenis, 2009; Dennis et al., 1999). Die vermehrte Aktivierung von mTOR in Zusammenhang mit der Titin-Isoformen-Transition konnte für T3 und Insulin gezeigt werden (Krüger et al., 2008; 2010).

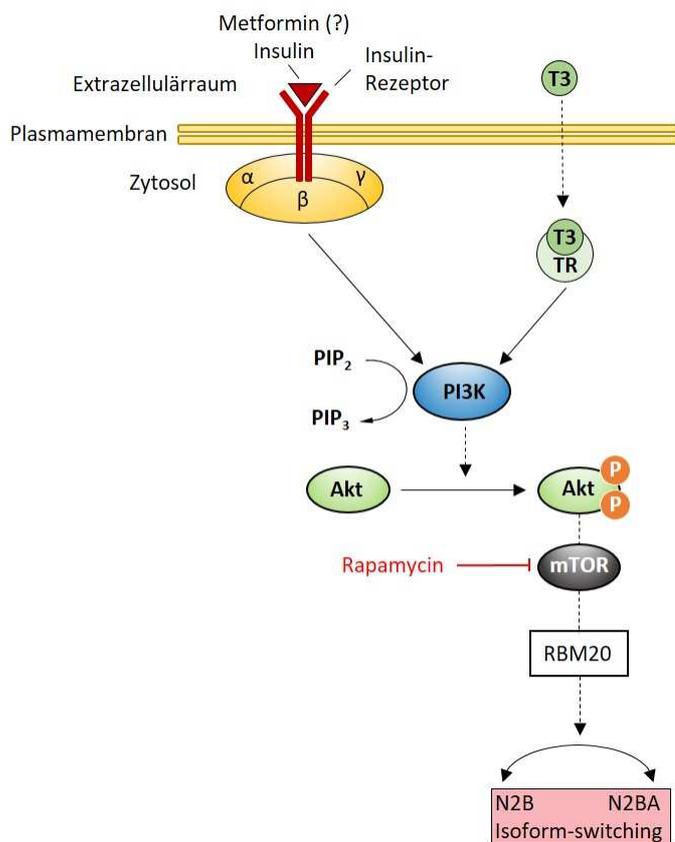


Abb. 4: Der PI3K-Akt-Signalweg und seine Einbindung in den Titin-Isoformen-Switch (nach aktuellem Wissensstand). Insulin und T3 (Triiodthyronin) sind nachgewiesene Agonisten des PI3K-Akt-Signalwegs in Zusammenhang mit Titin-Isoformen-Switching (Krüger et al., 2008; 2010). TR, Thyroidhormon-Rezeptor; PI3K, Phosphatidyl-Inositol-3-OH-Kinase; PIP₂, Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat; PIP₃, Phosphatidyl-Inositol-1,4,5-trisphosphat; RBM20, *RNA binding motif protein 20*, Regulator des alternativen Titin-Spleißens; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; Rapamycin, Inhibitor der Kinase mTOR.

Alternatives Spleißen ist die Ursache für die Expression verschiedener Titin-Isoformen (Freiburg et al., 2000). Der einzige bis dato bekannte Spleißfaktor des Titins ist das *RNA binding motif protein 20* (RBM20). Bei adulten Ratten mit einer *loss-of-function*-Mutation des für RBM20-kodierenden Gens persistiert einzig eine gigantische Titin-Isoform (N2BA-G; 3830kDa) und eine Isoformen-Transition wird nicht beobachtet (Guo et al., 2012). Daher wird RBM20 in Zusammenhang mit dem Titin-Isoformen-Switch eine immense Rolle beigemessen (Guo et al., 2012).

Zudem wurde im Zusammenhang mit der Insulinwirkung auf den Titin-Isoformen-*Switch* eine Verbindung zwischen PI3K-Akt/mTOR-Aktivierung und gesteigerter RBM20-Proteinexpression festgestellt (Krüger et al., 2008; 2010; Zhu et al., 2017). Diese Erkenntnisse suggerieren, dass die RBM20-Proteinexpression ebenfalls durch die PI3K-Akt/mTOR-Signalkaskade gesteuert werden könnte (Zhu et al., 2017).

1.7 Metformin und Autophagie

1.7.1 Prozess und Induktion der Autophagie

Die Instandhaltung von Muskelstruktur und -funktion verlangt ein präzise reguliertes Gleichgewicht aus Proteinsynthese und -degradation. Die Autophagie ist ein solch kataboler Prozess, durch den fehlerhafte und gealterte Proteine sowie Zellorganellen abgebaut und wiederaufbereitet werden, um die zelluläre Energiehomöostase aufrechtzuerhalten (Hale et al., 2013; Sandri, 2013). Im Allgemeinen werden drei verschiedene Autophagie-Mechanismen beschrieben: Makroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) sowie Mikroautophagie. Im Hinblick auf muskuläre Strukturproteine spielt die Makroautophagie die entscheidende Rolle, weshalb im Folgenden lediglich auf Makroautophagie eingegangen und diese hiernach nur als „Autophagie“ bezeichnet wird (Bonaldo und Sandri, 2013). Der Prozess der Autophagie unterteilt sich in verschiedene Etappen. Zunächst formiert sich eine C-förmige Doppelmembran-Struktur, vermutlich vom endoplasmatischen Retikulum abstammend, welche als Phagophore bezeichnet wird (Shaid et al., 2013). Diese Doppelmembran auf Lipidbasis umschließt intrazelluläre Fracht und extendiert solange, bis sich die losen Enden treffen, um ein sogenanntes Autophagosom zu bilden (siehe Abb. 5). Durch eine Fusion von Autophagosom und Lysosom formiert sich ein Autolysosom (AL), dessen Hydrolasen den Inhalt des AL zersetzen (Hale et al., 2013; Shibutani und Yoshimori, 2014).

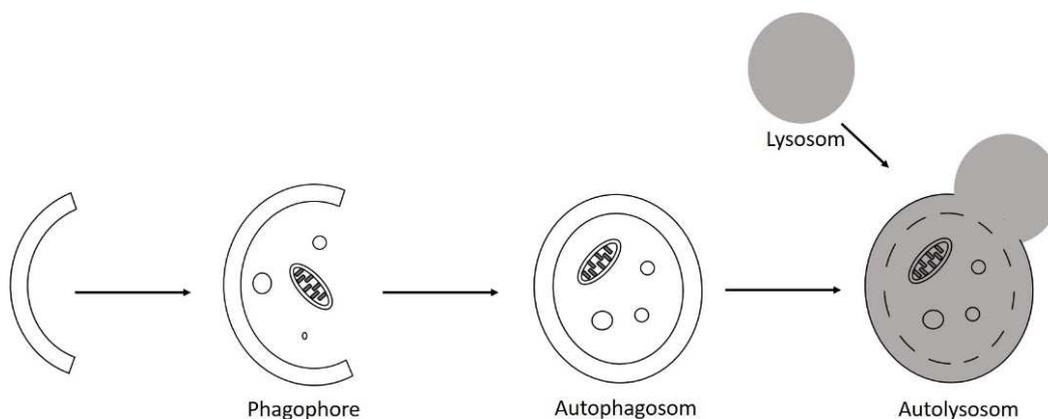


Abb. 5: Schema der Autophagosomen-Bildung. Eine C-förmige Doppelmembran-Struktur entwickelt sich zum Phagophore. Die Enden der Doppelmembran extendieren bis das Autophagosom die abzubauenen Zellbestandteile vollständig umschließt. Durch Verschmelzung mit einem Lysosom kommt es zur Zersetzung des Inhalts durch lysosomale Hydrolasen.

Die Bildung von Autophagosomen ist höchst induzierbar und durch komplexe Signalwege reguliert. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die bisher bekannten Wege der Autophagie-Aktivierung und ist in Abbildung 6 zusammenfassend dargestellt. Nährstoffdeprivation führt beispielsweise zur Autophagie-Aktivierung, was den Zweck hat, durch den Abbau momentan nicht benötigter zellulärer Strukturen, Energie und Bausteine für essentielle Biosynthesen bereitzustellen (Shibutani und Yoshimori, 2014). Andererseits ist eine überschießende Autophagie-Induktion mit schweren Pathologien, wie Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus, assoziiert (Bonaldo und Sandri, 2013; Mizushima und Komatsu, 2011).

Über die Aktivität der Proteinkinasen mTOR und AMPK regulieren Energie-, Nährstofflevel, sowie zahlreiche weitere Signale physiologischerweise den Autophagieprozess (Lamb et al., 2013; Shibutani und Yoshimori, 2014). Das Protein mTOR ist der Autophagie-Induktion vorgeschaltet, wirkt als zellulärer Energiesensor, reguliert Zellwachstum und -überleben und fungiert als Inhibitor der Autophagie (Hale et al., 2013). mTOR nachgeschaltet ist der *autophagy related protein 1*-Komplex (Atg1), dessen zentrale Kinase ULK (*Uncoordinated-51 Like Kinase*) darstellt. Weitere strukturelle Bestandteile davon sind die Proteine Atg13, FIP200 (*focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*) und Atg101, die mit ULK einen stabilen Komplex bilden. Die unter nährstoffreichen Bedingungen gesteigerte mTOR-Aktivität resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung von ULK an der Stelle Ser757, was in der Summe eine Autophagie-Inhibition bewirkt (Chan, 2012).

Im Gegensatz dazu bewirkt eine Bindung und Phosphorylierung von ULK durch AMPK eine Induktion der Autophagie und findet unter Nährstoffdeprivation statt. Phosphorylierung findet dabei an der Position Ser555 statt (siehe Abb. 6) (Chan, 2012). Die Autophagie-Steuerung über ULK ist außerdem durch AMPK-mTOR-Interaktion beeinflusst. So bewirkt, bei hoher Aminosäure-Verfügbarkeit, die mTOR-vermittelte Phosphorylierung von ULK Ser757 eine Destabilisierung der AMPK-ULK-Bindung, was eine Phosphorylierung von ULK Ser555 durch AMPK verhindert (Chan, 2012; Hale et al., 2013). Im Falle einer Autophagie-Aktivierung kommt es durch ULK zu einer Phosphorylierung von Beclin-1, ebenfalls Bestandteil eines Proteinkomplexes (III PI3K-Komplex). Ist AMPK in Nährstoffmangelsituationen aktiviert, so ist die Kinase auch in der Lage, Autophagie unter Umgehung von ULK, durch direkte Phosphorylierung von Beclin-1, zu initiieren (Zhang et al., 2016).

Der Beclin-1-enthaltende Proteinkomplex, III PI3K-Komplex, umfasst unter anderem die Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), ein Bestandteil der Autophagosomen-Membran, produziert (Shibutani und Yoshimori, 2014; Russell et al., 2013). Dem aktivierten III PI3K-Komplex wird eine maßgebliche Rolle in der Rekrutierung von Komplexen, Proteinen und Lipiden, die die Autophagosom-Membran formieren, beigemessen (Hale et al., 2013). Ein solches Protein ist das *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3), welches bei aktiver Autophagie durch proteolytische Spaltung und Lipidierung in seine aktive Form, LC3-II, überführt wird. Dazu wird zunächst proLC3 durch Atg4 proteolytisch gespalten, wodurch das im Zytoplasma ubiquitär vorkommende LC3-I entsteht (Tanida et al, 2008). LC3-I wird wiederum durch Atg3 und 7 in einem der Ubiquitinierungsreaktion ähnlichen Prozess mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert und die lipiderte Form LC3-II entsteht (Hale et al., 2013; Tanida et al, 2008). Bei der Bildung des Phagophores wird LC3-II selektiv in die Doppelmembran eingebaut. Sobald das Autophagosom mit dem Lysosom fusioniert, kommt es zur Degradierung von demjenigen LC3-II, welches in der inneren Membran lokalisiert ist. Das in der Außenmembran enthaltene LC3-II dissoziiert infolge der Bildung des Autolysosoms und wird recycelt (Hale et al., 2013; Shibutani und Yoshimori, 2014).

Um selektiv Zellbestandteile zu autophagieren, ist das Binden an die innere Oberfläche des wachsenden Phagophores notwendig. Dieser Prozess wird über Adapter-Proteine, die sowohl mit dem im Phagophore verankerten LC3-II, als auch mit dem Substrat interagieren, vermittelt. p62, auch *Sequestosome-1* genannt, ist ein solches Adapter-Protein und spielt daher eine zentrale Rolle in der Erkennung und Beladung von Substraten in die Autophagosomen (Hale et al., 2013; Chen et al., 2014). Da p62 in seiner Funktion als Adapter-Protein im Inneren des Autophagosoms lokalisiert ist, wird es folglich im Zuge des Autophagie-Prozesses selbst degradiert. Im Umkehrschluss bewirkt eine Inhibition der Autophagie die Akkumulation von p62 (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013).

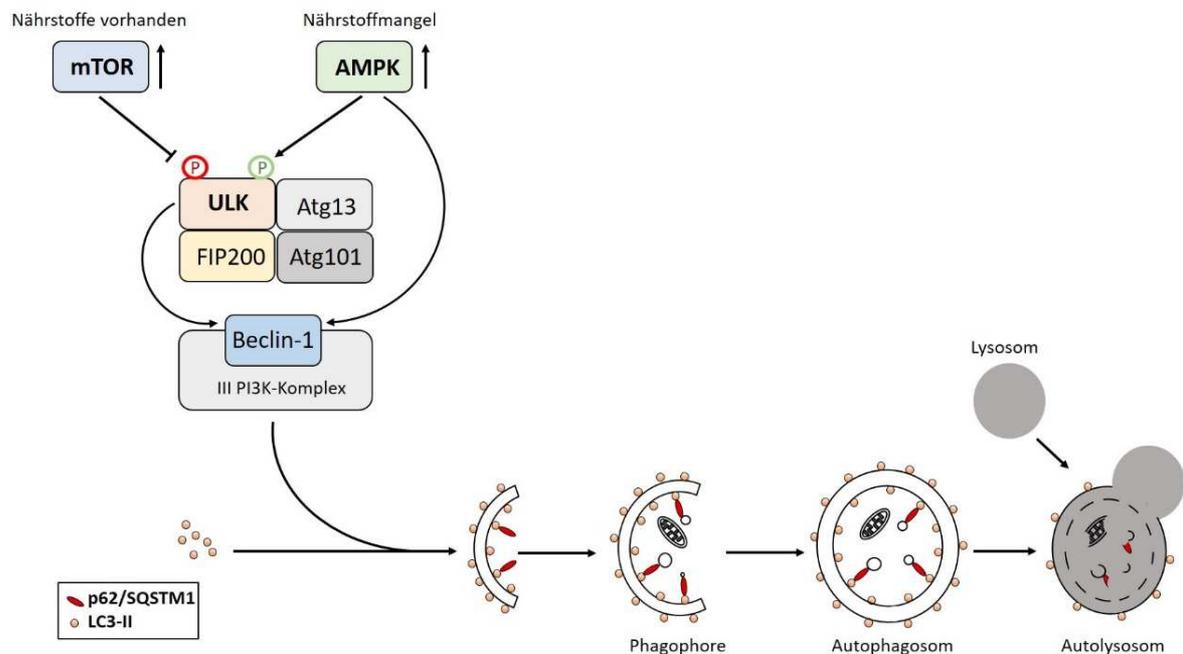


Abb. 6: Induktion und Inhibition der Autophagosom-Bildung. Die Proteinkinasen mTOR und AMPK phosphorylieren ULK an verschiedenen Stellen und bewirken dadurch eine Induktion bzw. eine Inhibition des Autophagie-Prozesses. ULK aktiviert Beclin-1, einen Bestandteil des Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase-Komplexes (III PI3K). Beclin-1 kann auch durch AMPK direkt phosphoryliert werden. Es folgt eine Rekrutierung von Doppellipidmembran-Bestandteilen, wie p62/SQSTM1 und LC3II.

1.7.2 Autophagie als möglicher Mediator des Metformin-Effekts auf Titin

Der Titin-Isoformen-Switch hin zu einem höheren N2B-Gehalt könnte in den ersten Kultivierungstagen durch Zellwachstum der ERC und den Einbau neuer N2B-Titinfilamente erklärt werden. Aufgrund der Lebensdauer des Titinfilaments von nur etwa 3 bis 5 Tagen, ist spätestens nach der entsprechenden Zeit in Kultur mit Ab- und Umbau von Titin zu rechnen. Zahlreiche Hinweise belegen bereits einen Zusammenhang zwischen Titin und Instanzen der Proteinqualitätskontrolle (Kötter et al., 2014). So wird im Folgenden auf den Bezug von Titin zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und dem autolysosomalen Proteinabbau eingegangen. Das UPS hat zum Ziel, fehlgefaltete Proteine im Proteasom, einem Proteinkomplex mit mehreren proteolytisch aktiven Zentren, abzubauen. Selektivität wird durch den Vorgang der sogenannten Ubiquitinierung, die in drei Schritten abläuft, erreicht. Ubiquitin wird durch das E1-Enzym aktiviert und danach auf das E2-Enzym (Ubiquitin-konjugierend) übertragen. E3-Ligasen vermitteln schließlich die Ubiquitinierung des Zielproteins. Während Polyubiquitinketten, die durch Lysin (K) 48 verbunden sind, für die proteasomale Degradation markiert sind, ist eine Konjugation durch K63 in der Regel ein Signal für autolysosomalen Abbau (Thrower et al., 2000; Barriere et al., 2007). Der Zusammenhang von Titin mit der Proteinqualitätskontrolle ist in Abbildung 7 dargestellt. So wurden für Titin-Domänen im M-Band Interaktionen mit den E3-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 (*Muscle-specific RING Finger E3 ligase*), die an der proteasomalen Degradation von zahlreichen Muskelproteinen beteiligt sind, gezeigt (Witt et al., 2005; Kötter et al., 2014). Mit *mouse-double-minute 2* (MDM2) wurde eine weitere E3-Ligase, die mit Titin im Bereich der Z-Scheibe (*titin-cap/telethonin*) interagiert, identifiziert (Tian et al., 2006; Kötter et al., 2014). Im Gegensatz zum UPS ist das autolysosomale System in der Lage, größere Proteine und sogar gesamte Zellorganellen abzubauen. Es konnte eine Verbindung von Titin zu einem Komplex aus p62/SQSTM1-Nbr1 gezeigt werden (Lange et al., 2005). Das Protein p62, selbst Ubiquitin-bindend, lässt so eine direkte Kopplung des Makroproteins mit dem Prozess der Autophagie vermuten. Im Großen und Ganzen geht man aufgrund der Dimension von Titin und seiner komplexen Integration ins Sarkomer von einem dynamischen Umbau, unter anderem über die Proteindegradationssysteme UPS und Autophagie, aus (Kötter et al., 2014).

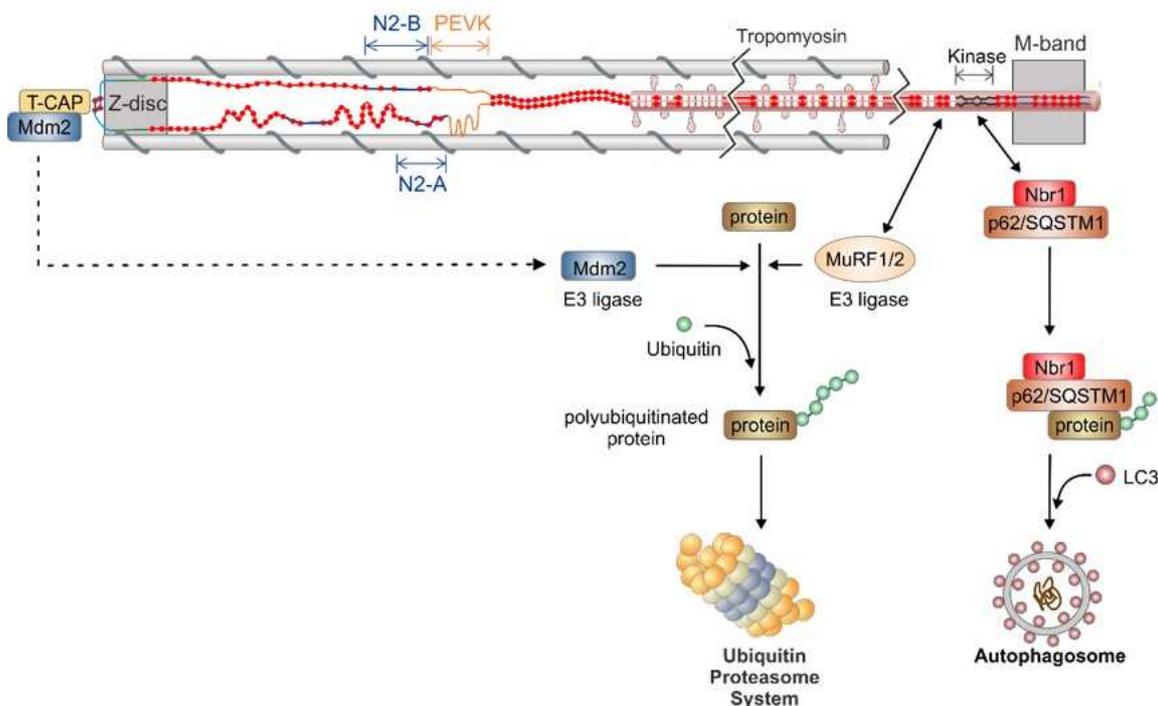


Abb. 7: Verbindung der Proteinqualitätskontrolle mit dem Makroprotein Titin. Für Titin konnte durch eine Interaktion mit den E3-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 (*Muscle-specific RING Finger E3 ligase*) eine Verbindung mit dem UPS gezeigt werden. Im Bereich der Titin-Kinase-Domäne ist das Makroprotein mit dem Komplex aus p62/SQSTM1/Nbr1 assoziiert und könnte so eine Verbindung mit dem Autophagie-Lysosomen-System darstellen. MDM, *mice-double-minute 2*; T-CAP, telethonin (titin-cap); Nbr1, *neighbor-of-BRCA1-gene-1*. (verändert nach Kötter et al., 2014).

2 Zielsetzung

Typ 2-Diabetiker, die mit Metformin behandelt wurden, zeigten im Rahmen einer klinischen Studie eine signifikant verbesserte diastolische linksventrikuläre Funktion, also eine höhere Elastizität des LV (Andersson et al., 2010). Da das Strukturprotein Titin ein wesentlicher Prädiktor der diastolischen passiven Spannung der Kardiomyozyten in Bereichen der physiologischen Sarkomerlängen (bis 2,2 μ m) ist (Linke et al., 1994; Granzier und Irving, 1995), liegt der Verdacht nahe, dass Metformin direkten Einfluss auf Titin nimmt. Krüger et al. (2008; 2010) beschrieben für T3 und Insulin bereits direkte Effekte auf den Titin-Isoformen-*Switch* im Zellkulturmodell aus primären embryonalen Rattenkardiomyozyten. Für beide Hormone wurde, vermittelt durch den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, eine Verschiebung hin zur steiferen N2B-Isoform nachgewiesen (Krüger et al., 2008; 2010; Zhu et al., 2017). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Metformin auf den Titin-Isoformen-*Switch* zu bestimmen und mögliche verantwortliche Signalkaskaden zu identifizieren.

Mittels SDS-Gelelektrophorese sollte am Modell kultivierter embryonaler Rattenkardiomyozyten der Einfluss Metformins auf das Titin-Isoformen-Verhältnis bestimmt werden. Die Aktivität verschiedener Kinasen des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs, sowie die Proteinexpression des Spleißfaktors RBM20 sollte mittels Western Blot Analysen untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung der Proteine an der Metformin-Signaltransduktion zu klären. Um Abhängigkeiten der Metformin-Stimulation von Entwicklungsstadium und Stimulationsdauer zu überprüfen, sollte die Metformin-Behandlung in zwei experimentellen Ansätzen erfolgen: im ersten Ansatz sollte die Stimulation ab dem ersten Tag nach Gewebe-Präparation beginnen, im zweiten Ansatz nach einer Woche in Kultur, ab Tag 7 nach Präparation.

Metformin ist im Allgemeinen als Aktivator der Autophagie bekannt (Hur und Lee, 2015). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Änderungen der Autophagie-Aktivität sich auch auf den Titin-Isoformen-*Switch* ausüben könnten. So wurde schließlich der Prozess der Autophagie als Mediator des Metformin-Effekts auf den Titin-Isoformen-*Switch* angenommen. Die Aktivität von Autophagie sollte durch die Marker AMPK, LC3, p62, sowie ULK mit den Phosphorylierungsstellen Ser757 und Ser555, ebenfalls mittels Western Blot Analysen, in An- und Abwesenheit von Metformin untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 1 genannten Chemikalien verwendet.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid /Bisacrylamid	Roth
Acrylamid /Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (<i>Western blotting detection reagent</i>)	Cyanagen
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
<i>Imperial protein stain</i>	Thermo Scientific
Isofluran	Piramal Healthcare
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kollagenase Typ II	Biochrom
Metforminhydrochlorid	Sigma
Methanol	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Natriumchlorid	Roth

Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nonident P40	Sigma
Penicillin / Streptomycin	Biochrom
Phenolrot	Sigma
Rapamycin	Sigma
Salzsäure 32%	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

3.1.2 Puffer und Lösungen

Im Rahmen der Versuche wurde mit den Puffern und Lösungen aus Tabelle 2 gearbeitet.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10 x SDS - Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10 x -TBST (pH 7,4)	0,2M Tris / HCl 1,5M NaCl 1% Tween - 20
4 x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

4 x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300mM Tris / HCl 100mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1 x -TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300mM Aminocapronsäure 30mM Tris / HCl
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	150mM Natriumchlorid 2,5mM Kaliumchlorid 1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat 3mM Natriumdihydrogenphosphat
PVDF <i>destain</i>	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
PVDF <i>stain</i>	0,075% Serva Blue in Methanol
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea 2M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05M Tris / HCl
<i>Stripping Buffer</i>	6M Guanidinhydrochlorid 20mM Tris 0,2% Nonident P40 0,1M β -Mercaptoethanol
Verdaupuffer (pH 7,35-7,45)	137mM NaCl 10mM D-Glucose 2,7mM Potassium chloride 406 μ M Natriumdihydrogenphosphat 12mM Natriumhydrogencarbonat 190U/mL Kollagenase Typ II 1512USP-U/mL Trypsin Phenolrot

3.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Die embryonalen Rattenkardiomyozyten wurden in den in Tabelle 3 aufgeführten Kulturmedien kultiviert.

Tabelle 3: Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium 20% FBS 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 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)

3.1.4 Laborgeräte

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Laborgeräte verwendet.

Tabelle 4: Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Brutschrank	Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr

Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikroskop	AE 2000	Motic
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
PC Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Reagentienschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	PF-5500	Grant
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

3.1.5 Antikörper

Antikörper, die für Western Blot Analysen verwendet wurden, sind in Tabelle 5 verzeichnet.

Tabelle 5: Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Akt (pan)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4691
AMPK α	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2532
GAPDH	1:5000	Maus	Sigma Aldrich, #G8795
LC3B	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2775
mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2972
Phospho-Akt (Ser473)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4060

Phospho-Akt (Thr308)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2965
Phospho-AMPK α (Thr172)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2531
Phospho-mTOR (Ser2448)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2971
Phospho-ULK1 (Ser555)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5869
Phospho-ULK1 (Ser757)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #6888
RBM20	1:1000	Kaninchen	Biorbyt, #orb1364
SQSTM1/p62	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5114
ULK1	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #8054
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-mouse IgG, horseradish-peroxidase- linked	1:10000	Pferd	Cell Signaling, #7076
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase- linked	1:10000	Ziege	Cell Signaling, #7074

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten

Um embryonale Kardiomyozyten für das Zellkulturmodell zu isolieren, wurden trächtige Wistar-Ratten (Gestationstag 18) eingesetzt. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Über einen abdominalen Schnitt wurden die Embryonen entnommen und zügig dekapitiert. Die embryonalen Thoraces wurden mittels Scherenschnitt eröffnet und die Embryonenherzen mit einer Pinzette vorsichtig entnommen, um anschließend in einem mit PBS gefüllten Mikroreaktionsgefäß auf Eis gesammelt zu werden. Die Tötung der Versuchstiere sowie die Organentnahme erfolgten durch fachkundige Mitarbeiter und erfolgte nach den Vorgaben der örtlichen Behörden. Das gemäß Versuchstiermeldeverordnung vergebene Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität lautet O 29/11.

Um die Kardiomyozyten aus ihrem Zellverband zu lösen, wurden die Herzen zunächst mechanisch per Skalpell zerkleinert. Darauf folgte eine enzymatische Dissoziation durch einen Trypsin und Kollagenase enthaltenden Verdauopuffer. Der Verdauvorgang dauerte 45 bis 60 Minuten und fand im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ statt. In regelmäßigen Abständen von 15 Minuten wurde die Zellsuspension schonend auf- und abpipettiert. Im nächsten Schritt wurde das Zellgemisch zusammen mit 10ml Kulturmedium (20% FBS) durch ein 70µm Sieb filtriert, um nicht-verdaute Gewebstücke zu extrahieren. Die entstandene Lösung wurde bei 1000rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die sich als Pellet absetzenden Kardiomyozyten konnten so vom Überstand getrennt und resuspendiert werden.

Entsprechend der Größe des Pellets konnte die Zellsuspension wiederum mit 20% FBS-haltigem Kulturmedium auf eine Konzentration von etwa 10⁵ Zellen/ml aufgefüllt und auf zuvor mit Gelatine beschichtete 6-Well-Platten verteilt werden. Die Platten wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Innerhalb von etwa 24 Stunden setzte sich der Großteil der embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) am Grund der 6-Well-Platten ab. Um embryonale Fibroblasten mitotisch zu inaktivieren, wurden die Zellen an Tag 1 nach Präparation für 30-45 Minuten mit Mitomycin C (10µl/ml 20% FBS-haltigem Kulturmedium) behandelt und daraufhin mit vorgewärmtem PBS ausgewaschen. Im Anschluss wurde das 20%ige Medium durch Aktivkohle-gefiltertes und damit hormonreduziertes Kulturmedium mit 1% FBS-Anteil ersetzt. Ziel war es, mögliche Effekte, die auf Hormoneinfluss beruhen, so gering wie möglich zu halten und Stimulationsauswirkungen möglichst isoliert betrachten zu können. Je nach Versuchsansatz wurde die Hälfte der Zellen direkt im Anschluss ab Tag 1 oder ab Tag 7 nach Präparation mit Metformin stimuliert. Das hierfür verwendete Stimulationsmedium bestand aus Kulturmedium (1% FBS) und Metformin in einer Konzentration von 1µM und wurde wie auch das Kulturmedium täglich gewechselt. Im Rahmen des Versuchsansatzes 1 (Stimulation ab Tag 1) wurden zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten von Tag 3 bis Tag 9 nach Präparation täglich sowohl Kontroll- als auch Metformin-stimulierte Zellen in SDS-Probenpuffer geerntet. Beim Versuchsansatz 2 (Stimulation ab Tag 7) erfolgte die Stimulation entsprechend eine Woche nach Präparation und die Zellen wurden wiederum nach 3 bis 5 Tagen Metformin-Behandlung geerntet. Eine Zeitachse ist in Abbildung 8 dargestellt.

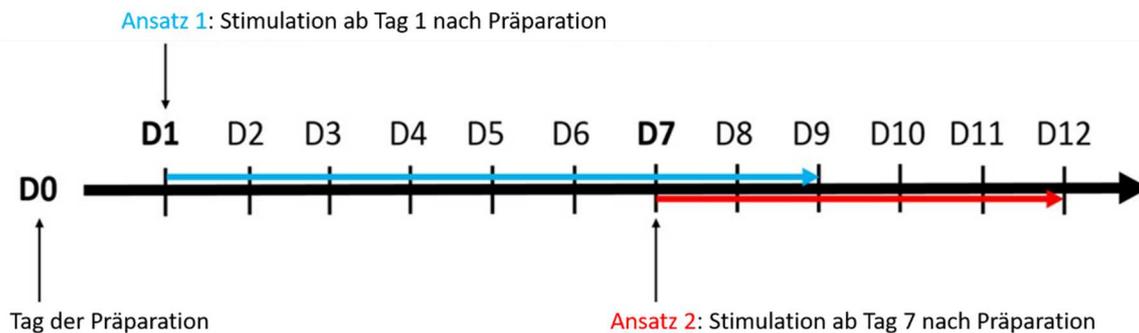


Abb. 8: Zeitachse zur Darstellung der Stimulationszeitpunkte. Im Ansatz 1 wurde die Metformin-Stimulation an Tag 1 (D1) nach Präparation begonnen und Kontroll- sowie stimulierte Zellen ab Tag 3 (D3) bis einschließlich Tag 9 (D9) täglich geerntet. Beim zweiten Ansatz wurde die Stimulation eine Woche nach Präparation gestartet und die Zellen nach 3, 4 und 5 Tagen Stimulation, folglich nach 10, 11 und 12 Tagen in Kultur geerntet.

3.2.2 Proteinbiochemie

3.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinanalyse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese angewendet. Dabei werden Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die in Probenpuffer asservierten Zellen wurden zur Auffaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen für etwa 3 Minuten auf 98°C erhitzt und im direkten Anschluss auf die entsprechenden Gele aufgetragen. Zur Größenauftrennung von Titin und seinen Isoformen wurden Agarose-stabilisierte Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamidanteil von 2,10% verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden zunächst alle Komponenten (siehe Tabelle 6) außer APS und Agarose in einem 50ml-Falcongefäß vermischt und im Wasserbad auf 48°C erwärmt. Sobald diese Temperatur erreicht war, wurde zunächst der Radikalstarter APS und anschließend die zuvor in der Mikrowelle verflüssigte Agarose hinzugefügt und das Gemisch zügig auf- und abpipettiert, um daraufhin zwischen zwei Glasplatten mindestens zwei Stunden auszupolymerisieren. Für die Titingele wurden die Gelelektrophoresesysteme Mini-Twin des Herstellers Biometra und Mini-PROTEAN der Firma Biorad eingesetzt. Die Proteinauftrennung erfolgte in 1 x-Laufpuffer bei Stromstärken von 2-4mA pro Gel.

Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingele

Lösung	Titingel 2,1%
30% Acrylamidlösung	1,40ml
H ₂ O _{bidest}	6,67ml
4 x SDS - Trenngelpuffer	5ml
SDS 20%	100µl
TEMED	11,5µl
APS	150µl
Agarose 1,5%	6,67ml
Gesamtvolumen	20ml

Zur Auftrennung von Proteinen deutlich geringer Größe als Titin wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese angewendet. Hierzu wurde zunächst ein Trenngel mit 7,5%, 10% oder 12,5% Acrylamidgehalt gemäß Tabelle 7 hergestellt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Mit der Zugabe von TEMED und APS wurde die Polymerisation begonnen, die etwa 45 Minuten andauerte und unter Abschluss von Sauerstoff durch Isopropanol stattfand. Das Trenngel wurde daraufhin mit einem nach Tabelle 7 angefertigten Sammelgel übergossen. Die SDS-PAGE lief in 1 x-Laufpuffer bei Stromstärken von 15-30mA pro Gel ab. Auch hier wurden die oben genannten Elektrophoreseapparaturen Mini-Twin und Mini-PROTEAN verwendet.

Tabelle 7: Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele / Sammelgele

Lösung	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	3,75ml	5ml	6,25ml	0,667ml
H ₂ O _{bidest}	7,5ml	6,25ml	5ml	3,025ml
4 x-SDS- Trenngelpuffer	3,75ml	3,75ml	3,75ml	-
4 x-SDS- Sammelgelpuffer	-	-	-	1,25ml
TEMED	7,5µl	7,5µl	7,5µl	15µl
APS	75µl	75µl	75µl	50µl
Gesamtvolumen	15ml	15ml	15ml	5ml

3.2.2.2 Imperial Protein Stain

Zur Analyse der Isoform-Komposition wurden die entsprechenden Titingele nach Durchlauf in der Elektrophoreseapparatur für mindestens eine Stunde in *Imperial Protein Stain*, einer Coomassie-basierten Proteinfärbelösung, gefärbt. Es folgte die Entfärbung mit deionisiertem Wasser. Die Gele wurden anschließend mit einem Durchlichtprogramm des Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) digitalisiert und die Banden entsprechend ihrer Pixeldichte mit der Software Image J quantitativ bestimmt. Bei jeder Probe wurden beide Isoformen addiert und die einzelne Isoform (N2BA und N2B) als prozentualer Anteil des Gesamt-Titins angegeben. Abbildung 9 zeigt ein exemplarisches Titingel mit den beiden Isoformen N2BA und N2B und entsprechenden Molekulargewichten.

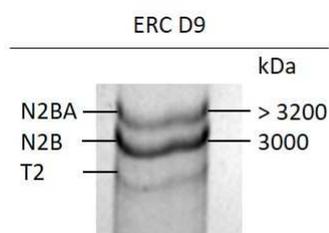


Abb. 9: Exemplarisches Titingel aus kultivierten embryonalen Rattenkardiomyozyten an Tag 9 in Kultur. Ein in *Imperial Protein Stain* gefärbtes Titingel zeigt die nach Molekulargewicht aufgetrennten Titin-Isoformen in ERC an Tag 9 in Kultur. Das Molekulargewicht der größeren und damit elastischeren Isoform N2BA beträgt 3200-3700kDa. Die kleinere und steifere Titin-Isoform N2B hat ein Molekulargewicht von etwa 3000kDa. T2 markiert ein proteolytisches Titinfragment.

3.2.2.3 Western Blot

Zur weiteren Proteinanalyse wurden die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels *semidry*-Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wurden 5 in Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur gelegt und die in Methanol aktivierte PVDF-Membran darauf platziert. Das Polyacrylamidgel wurde wiederum auf der Membran zentriert, um anschließend von 5 in Kathodenpuffer getränkten *Whatman*-Papieren bedeckt zu werden. Nach dem Schließen der *Blotting*-Kassette mit der Kathodenplatte wurde ein elektrisches Feld senkrecht zur PVDF-Membran aufgebaut und hierdurch der Proteintransfer initialisiert. Bei einer Stromstärke von 1,5A und einer maximalen Spannung von 20V nahm dieser Vorgang 12 Minuten in Anspruch. Anschließend wurde durch etwa 30-sekündige Färbung mit *PVDF-Stain* und folgender Entfärbung durch *PVDF-Destain* der Proteintransfer auf die PVDF-Membran kontrolliert. Zum Auswaschen der in *PVDF-Destain* enthaltenen Essigsäure wurde 1 x – TBST verwendet.

Um die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde ein für die Antikörper nicht erkennbares Protein eingesetzt. Die Membranen wurden dabei für mindestens eine Stunde in 2%ige Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) eingelegt. Anschließend erfolgte eine mindestens 3-stündige Inkubation mit einem primären Antikörper (siehe Tabelle 5), welcher wiederum in 2%iger BSA-Lösung verdünnt wurde. Danach wurden mindestens drei 10-minütige Waschvorgänge mit 1 x- TBST durchgeführt. Ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, wurde anschließend für mindestens eine Stunde auf den Western Blot gegeben und danach wiederum in 3 Schritten mit 1 x- TBST gewaschen. Die jeweiligen Proteine, gegen die der primäre Antikörper gerichtet ist, können durch Chemilumineszenz visualisiert werden. Hierfür wurden die Western Blots mit dem zuvor im Verhältnis 1:1 vermischten Chemilumineszenzreagenz 1 und 2 vollständig bedeckt und die Signale durch den Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) detektiert.

Der Phosphorylierungsstatus von Proteinen wurde mit Hilfe von Phospho- und pan-Antikörpern bestimmt. Dabei wurden beide Antikörper nacheinander auf ein und demselben Western Blot analysiert. Hierfür wurde zunächst der phosphorylierte Anteil am entsprechenden Protein durch den Phospho-Antikörper detektiert. Anschließend wurde dieser Phospho-Antikörper durch mit β -Mercaptoethanol versetzten *Stripping Buffer* vom Western Blot gelöst. Derselbe Blot wurde daraufhin erneut blockiert und der pan-Antikörper entsprechend eingesetzt und analysiert. Das Gesamtprotein wurde dadurch im Sinne einer Beladungskontrolle bestimmt. So konnte ein Verhältnis von phosphoryliertem und Gesamtprotein ermittelt werden. Wenige Antikörper (Phospho-ULK Ser555, Phospho-ULK Ser757, pan-ULK) erlaubten aufgrund Qualitätseinbußen durch die Anwendung von *Stripping Buffer* dieses Vorgehen nicht. In diesen Fällen wurden zwei Gele identisch beladen, die Elektrophorese parallel in derselben Apparatur durchgeführt und das Blotting-Protokoll ohne Unterschied umgesetzt. Anschließend wurde ein Blot mit dem Phospho-Antikörper und der zweite, identisch beladene Blot mit dem pan-Antikörper behandelt. Die Phospho- und pan-Antikörpersignale wurden mit dem Programm Image J über Pixeldarstellung quantifiziert und das Phospho-Signal mit dem jeweiligen pan-Signal desselben (oder identischen) Blots ins Verhältnis gesetzt. Die so errechneten Signale wurden normiert, indem sie durch den Mittelwert der Kontrollen des jeweiligen Blots dividiert wurden und sind daher als relative Werte angegeben.

3.2.3 Software

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

3.2.4 Datenanalytische Statistik

Für die statistische Verarbeitung der Daten wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) über die jeweils angegebene Anzahl an unabhängigen Experimenten (n) bestimmt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Sigma Plot durch den *Student's t-test* beziehungsweise den *Mann-Whitney Rank Sum Test*. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt und statistische Signifikanz angenommen.

4 Ergebnisse

Die Stimulation kultivierter embryonaler Rattenkardiomyozyten (ERC) wurde in zwei experimentellen Ansätzen durchgeführt: Im Rahmen des Versuchsansatzes 1 (Stimulation ab D1) wurden zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten von Tag 3 bis einschließlich Tag 9 nach Präparation täglich sowohl Kontroll- als auch Metformin-stimulierte Zellen in SDS-Probenpuffer geerntet. Beim Versuchsansatz 2 (Stimulation ab D7) erfolgte die Stimulation entsprechend eine Woche nach Präparation und die Zellen wurden wiederum nach 3 bis 5 Tagen Metformin-Behandlung geerntet.

4.1 Experimenteller Ansatz 1

4.1.1 Metformin-Stimulation beeinflusst die Titin-Isoform-Komposition in kultivierten ERC

Die Ergebnisse der Titin-Isoform-Analyse des Versuchsansatzes 1 (Stimulation ab Tag 1 nach Präparation bis einschließlich Kultivierungstag 9) sind in Abbildung 10 dargestellt. Kultivierte ERC zeigten mit zunehmender Kultivierungsdauer einen im Mittel stetig ansteigenden N2B-Anteil und demnach einen konkordant sinkenden N2BA-Gehalt. Metformin (MET)-stimulierte Zellen präsentierten zu frühen Kultivierungszeitpunkten von Tag 3 bis einschließlich Tag 5 im Mittel einen signifikant höheren N2B-Gehalt als Kontrollzellen (CTRL). Während Kontrollzellen an Tag 5 nach Präparation einen N2B-Anteil von $42,26 \pm 0,48\%$ (Mittelwert \pm SEM) aufwiesen, erreichten MET-behandelte Zellen $50,18 \pm 0,56\%$ N2B. Ab Tag 6 bis einschließlich Tag 9 in Kultur präsentierten Zellen unter MET-Einfluss im Mittel einen signifikant niedrigeren N2B-Gehalt. So wiesen ERC unter Kontrollbedingungen an Tag 6 in Kultur $57,62 \pm 0,30\%$ N2B auf, wohingegen MET-stimulierte Kardiomyozyten mit $53,68 \pm 0,28\%$ einen signifikant niedrigeren N2B-Anteil zeigten. Zum Ende der Kultivierungsperiode an Tag 9 wurde bei Kontrollzellen der in diesem Versuchsansatz maximale N2B-Gehalt von $66,88 \pm 0,84\%$ beobachtet, MET-stimulierte Zellen wiesen auch zu diesem Zeitpunkt mit $63,66 \pm 0,86\%$ (D9) einen signifikant niedrigeren Anteil auf.

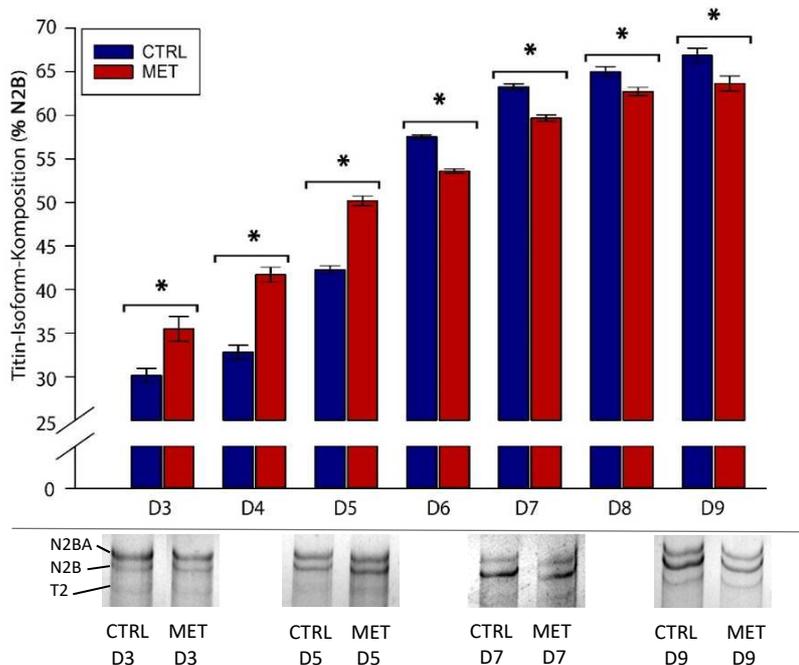


Abb. 10: Einfluss von Metformin auf den Titin-Isoformen-Switch in ERC bei MET-Stimulation ab D1. Zusammenfassung der Ergebnisse von ERC unter Kontrollbedingungen (CTRL) und in Anwesenheit von Metformin (MET, 1 μ M) nach 3 (D3), 4 (D4), 5 (D5), 6 (D6), 7 (D7), 8 (D8) und 9 Tagen (D9) in Kultur. Säulendiagramme zeigen den relativen Anteil der N2B-Isoform am Gesamt-Titin (Mittelwert \pm Standardfehler); (n=9 bis 26). Repräsentative Titingele mit Isoform-Auftrennung (N2BA und N2B) sind selektiv für die Kultivierungszeitpunkte D3, D5, D7 und D9 gezeigt. T2 markiert ein proteolytisches Titinfragment. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt und bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen (markiert durch Asterisken).

4.1.2 Metformin aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Akt

Als zentrale Kinase des PI3K-Akt-Signalwegs wurde Akt hinsichtlich des Phosphorylierungs- und damit Aktivierungsgrades unter MET-Einfluss untersucht. Ziel war es, eine Kohärenz zwischen Isoformen-Transition und PI3K-Akt-Signalweg-Aktivierung zu überprüfen. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Phosphorylierungsanalysen der Akt-Kinase an den Positionen Ser473 und Thr308 dargestellt. Zu allen untersuchten Kultivierungszeitpunkten zeigte sich im Mittel eine deutliche Tendenz der verstärkten Phosphorylierung von Akt an den Positionen Ser473 und Thr308 und damit einer vermehrten Aktivierung unter MET-Behandlung. Die Position Thr308 wies an den Tagen 5, 7, 8 und 9 signifikant erhöhte Phosphorylierungslevel unter MET-Einfluss auf. An Tag 7 erreichte der Unterschied zwischen CTRL und MET-Zellen hierbei das Maximum mit einer relativen Steigerung des Phosphorylierungslevels um den Faktor $6,24 \pm 1,66$ bei MET-behandelten ERC.

Die Phosphorylierungsstelle Ser473 zeigte signifikante Unterschiede an den Tagen 4, 6, 7, 8 und 9. Die größte Differenz zwischen CTRL und MET-stimulierten ERC präsentierte sich hier an Tag 8 mit einem relativen Anstieg der Phosphorylierung auf das $4,59 \pm 0,50$ -fache unter MET-Einfluss.

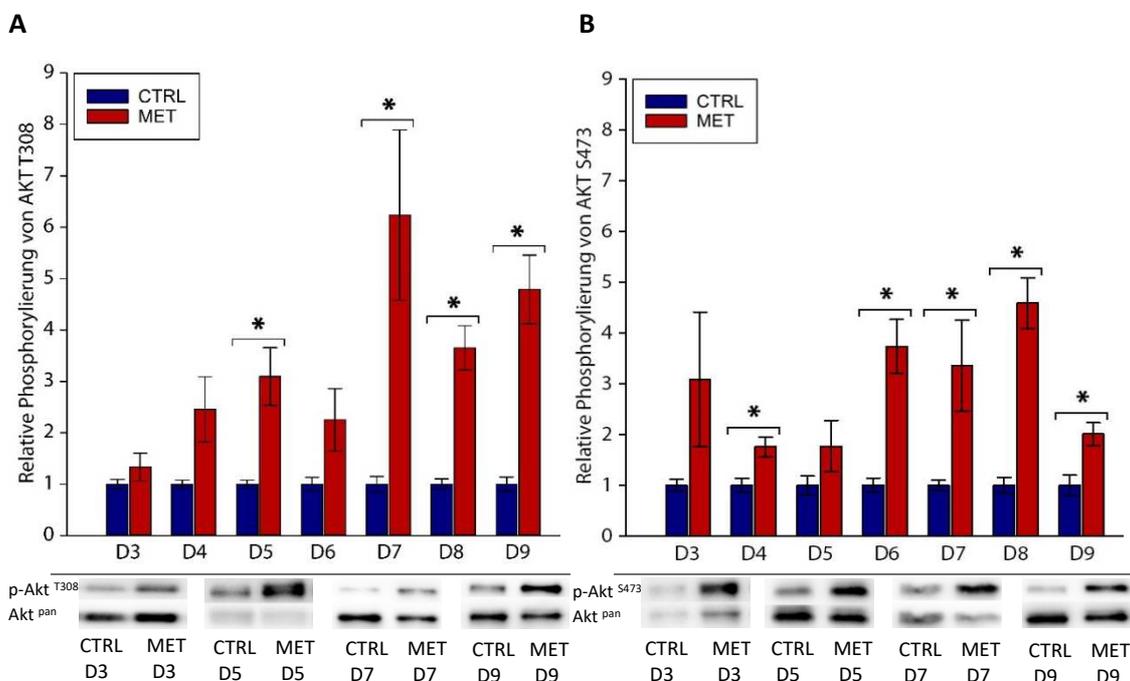


Abb. 11: Aktivität von Akt (Ser473 / Thr308) in An- und Abwesenheit von Metformin bei Stimulation ab D1. (A) Relative Phosphorylierung von Akt an der Position Thr308 (n=9-13). (B) Relative Phosphorylierung von Akt an der Position Ser473 (n=9-12). Repräsentative Western Blots sind selektiv für die Zeitpunkte D3, D5, D7 und D9 abgebildet. Die Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die Phospho-Antikörpersignale mit den pan-Antikörpersignalen ins Verhältnis gesetzt. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und gegebenenfalls durch Asterisken markiert.

4.1.3 Metformin beeinflusst die mTOR-Phosphorylierung sowie die RBM20-Protein-Expression

Im PI3K-Akt-Signalweg ist mTOR der Serin-/Threonin-Kinase Akt nachgeschaltet. Die Aktivität von mTOR unter MET-Einfluss wurde durch Phosphorylierungsanalyse an der Position Ser2448 überprüft und die Ergebnisse in Abbildung 12 (A) dargestellt. Zu frühen Kultivierungszeitpunkten (D3 bis D5) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und MET-stimulierten Zellen hinsichtlich der mTOR-Phosphorylierung festzustellen. Ab Tag 6 bis einschließlich Tag 9 in Kultur zeigte sich unter MET-Behandlung im Mittel tendenziell eine verstärkte Phosphorylierung.

Während sich an den Tagen 6, 7 und 9 lediglich ein Trend abzeichnete, wurden an Tag 8 unter MET-Einfluss signifikant erhöhte Phosphorylierungslevel ($1,80 \pm 0,18$) nachgewiesen. Abbildung 12 (B) zeigt die Ergebnisse der RBM20-Proteinexpressions-Analyse. Als einziger bis dato bekannter Spleißfaktor von Titin reguliert das *RNA binding motif protein 20* (RBM20) über differentielles Spleißen die Isoform-Expression des Titins (Guo et al., 2012). MET-Stimulation bewirkte von Tag 3 bis einschließlich Tag 5 in Kultur im Mittel signifikant erhöhte RBM20-Proteinlevel. Die maximale Differenz wurde an Tag 5 verzeichnet, an dem MET-behandelte Zellen um den Faktor $2,45 \pm 0,44$ erhöhte RBM20-Proteinlevel aufwiesen. Ab Tag 6 präsentierte sich dagegen im Mittel eine tendenziell verminderte RBM20-Proteinexpression unter MET-Einfluss. Eine signifikante Abweichung wurde hierbei zum Kultivierungszeitpunkt Tag 9 beobachtet, wo die relative RBM20-Proteinexpression unter MET-Stimulation auf das $0,58 \pm 0,09$ -fache reduziert war.

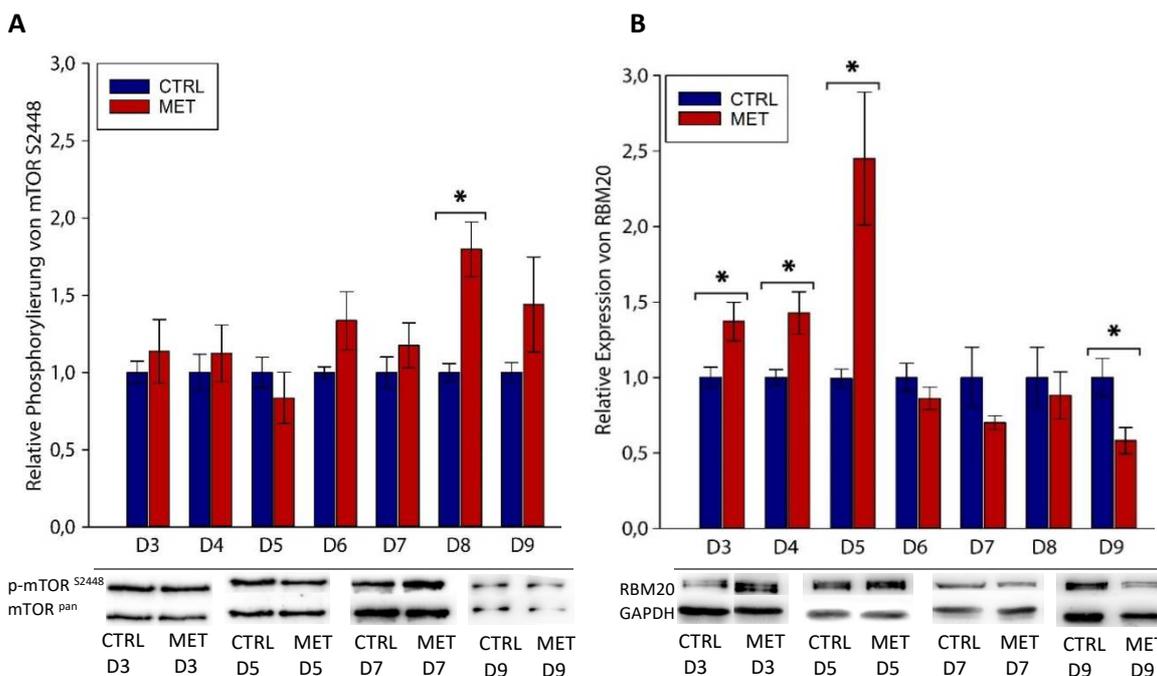


Abb. 12: Einfluss von MET-Stimulation auf mTOR-Phosphorylierung und RBM20-Proteinexpression. (A) Relative Phosphorylierung von mTOR an der Position Ser2448 in An- und Abwesenheit von Metformin (n=9-18). (B) Relative RBM20-Expression mit MET-Behandlung und unter Kontrollbedingungen; (n=9-16). Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Diagramme zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler. Repräsentative Blot-Ausschnitte von D3, D5, D7 und D9 sind selektiv abgebildet. Signifikante Differenzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt und bei $p < 0,05$ mit Asterisken gekennzeichnet.

4.1.4 mTOR-Inhibition durch Rapamycin beeinflusst Effekte der Metformin-Stimulation

Für mTOR wurde eine Tendenz der vermehrten Aktivierung unter MET-Stimulation ab Kultivierungstag 6 gezeigt. Ab eben diesem Zeitpunkt bewirkte MET-Behandlung auf Isoform-Ebene einen verringerten N2B-Anteil im Gegensatz zu früheren Kultivierungszeitpunkten. In Zusammenschau dieser Ergebnisse wurde mTOR, beziehungsweise die mTOR-Signalkaskade, als potentieller Einflussfaktor auf den sich verändernden Effekt der Metformin-Stimulation vermutet. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde mTOR-Aktivität von Tag 5 auf Tag 6 für 24 Stunden blockiert, indem sowohl CTRL- als auch MET-Zellen zusätzlich mit $1\mu\text{M}$ Rapamycin inkubiert wurden (siehe Abb. 13 D). Die Wirkung von Rapamycin wurde durch die Analyse der mTOR-Phosphorylierung gezeigt. Außerdem wurde der Effekt der mTOR-Inhibition auf die RBM20-Expression sowie auf die Titin-Isoform-Komposition untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 (A-C) präsentiert.

Rapamycin bewirkte eine signifikant verringerte Phosphorylierung von mTOR sowohl bei Kontroll- als auch bei MET-stimulierten Zellen (Abbildung 13 A).

Während die relative RBM20-Expression an Tag 6 unter alleiniger MET-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell verringert war ($0,86 \pm 0,08$), bewirkte die 24-stündige zusätzliche Rapamycin-Inkubation (D5 auf D6) eine tendenziell erhöhte Expression des Spleißfaktors auf das $1,17 \pm 0,27$ -fache (Abb. 13 B). Jedoch wurde für keine der beiden Bedingungen eine statistische Signifikanz erreicht.

Der an Tag 6 durch MET-Stimulation signifikant reduzierte N2B-Anteil wurde durch zusätzliche Rapamycin-Behandlung (von D5 auf D6) wieder auf den Level der Kontrollen erhöht (Abb. 13 C). So wiesen MET-behandelte Zellen an Tag 6 einen N2B-Gehalt von $53,61 \pm 0,26\%$ auf, wohingegen MET + Rapa -stimulierte Zellen mit $57,73 \pm 0,54\%$ eine signifikante Steigerung des N2B-Anteils erreichten. Kontrollzellen zeigten im Mittel einen N2B-Gehalt von $57,54 \pm 0,22\%$, der durch zusätzliche Rapamycin-Behandlung (CTRL + Rapa) nicht signifikant verändert wurde. Mit $56,80 \pm 0,58\%$ präsentierten CTRL + Rapa -Zellen im Gegenteil einen marginal verringerten N2B-Anteil.

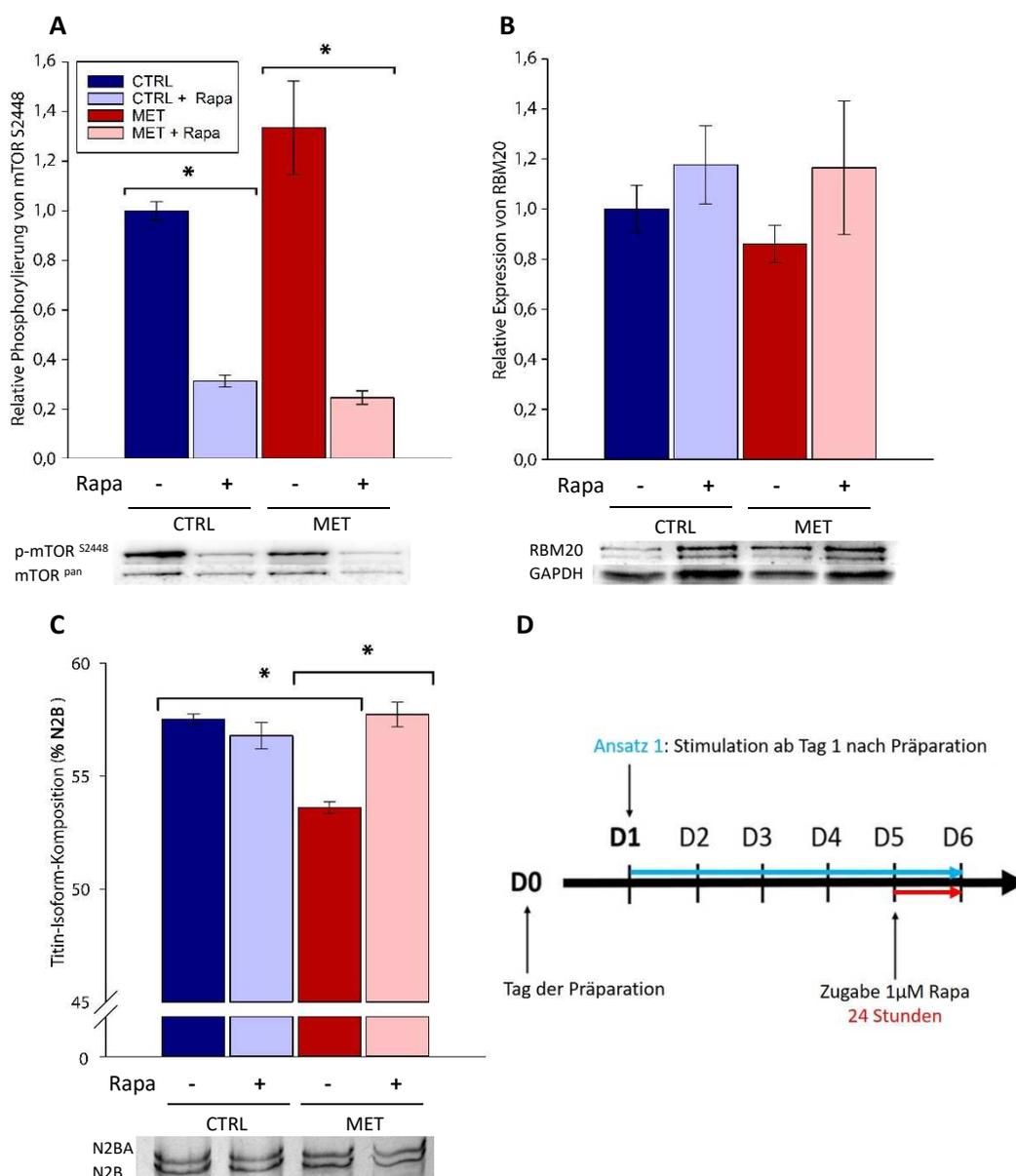


Abb. 13: Effekt der mTOR-Inhibition durch Rapamycin auf RBM20-Proteinexpression und die Titin-Isoform-Komposition. (A) Relative Phosphorylierung von mTOR an der Position Ser2448 in An- und Abwesenheit von Metformin sowie mit und ohne Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin (Rapa; n=9-18) für 24 Std. ab D5. (B) Relative Expression des Spleißfaktors RBM20 in An- und Abwesenheit von MET und Rapamycin. RBM20 ist mit GAPDH in Relation gesetzt (n=9-16). (C) Prozentualer Anteil der N2B-Isoform am Gesamt-Titin mit und ohne Rapamycin-Zugabe (n=10-32). Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Western Blots / Titingele dargestellt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM. Asterisken markieren statistische Signifikanzen (ermittelt durch *Student's t-test*; angenommen bei $p < 0,05$). (D) Zeitschema zur Darstellung von Zeitpunkt und -dauer der Rapamycin-Behandlung.

4.1.5 Der Zusammenhang zwischen Metformin und Autophagie-Induktion

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Autophagie und Metformin-Effekt auf Isoform-Ebene zu ermitteln, wurden wesentliche Autophagie-Marker in An- und Abwesenheit von Metformin untersucht. Ein Überblick über den Gesamtzeitraum in Kultur und insbesondere über das Intervall, in dem der Metformin-Effekt invertiert (von D5 auf D6), wurde gewonnen, indem jeweils die Kultivierungszeitpunkte Tag 3 (D3), Tag 5 (D5), Tag 6 (D6) und Tag 8 (D8) analysiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 (A-C) dargestellt.

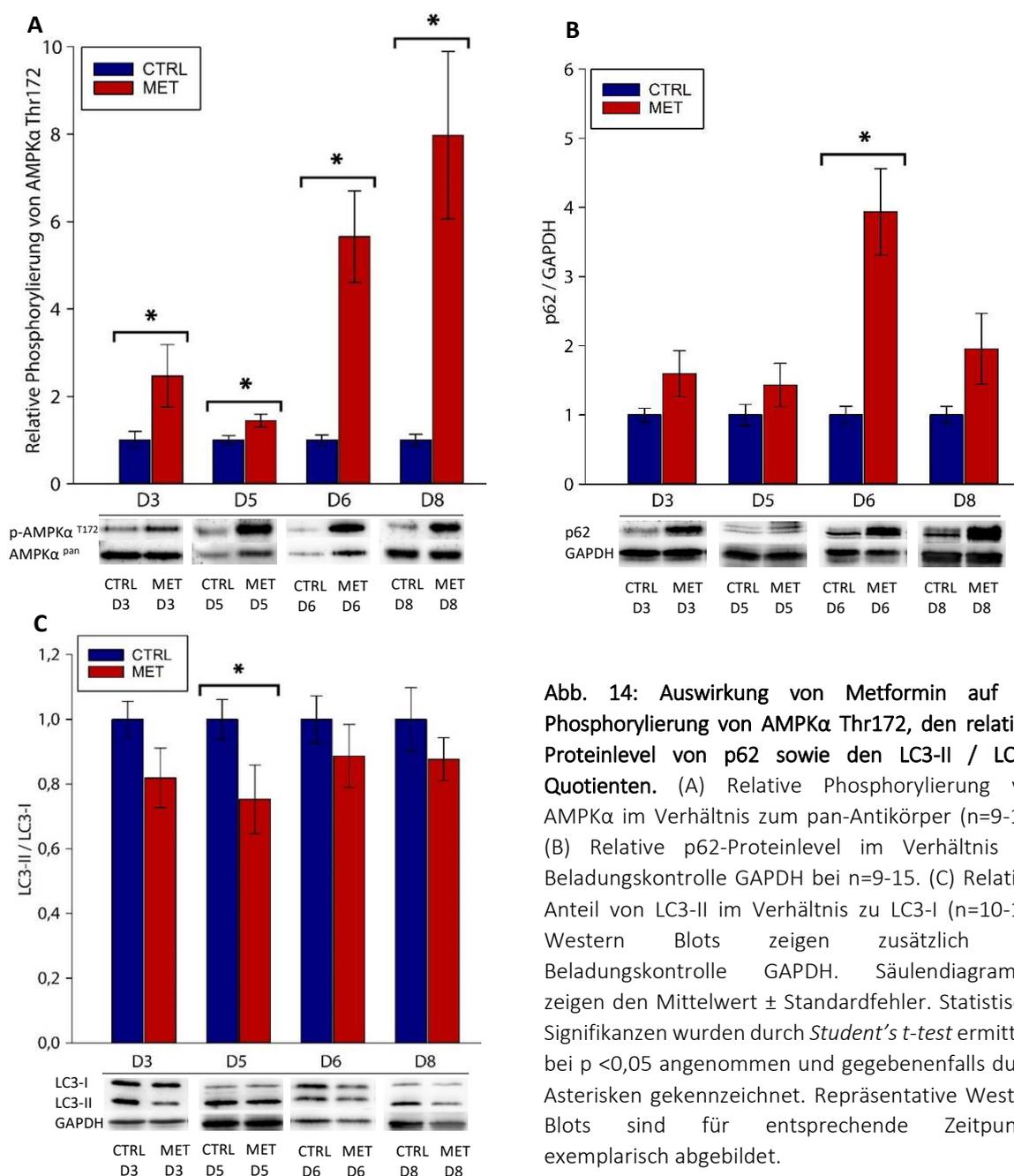


Abb. 14: Auswirkung von Metformin auf die Phosphorylierung von AMPK α Thr172, den relativen Proteinlevel von p62 sowie den LC3-II / LC3-I-Quotienten. (A) Relative Phosphorylierung von AMPK α im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=9-12). (B) Relative p62-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle GAPDH bei n=9-15. (C) Relativer Anteil von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I (n=10-12). Western Blots zeigen zusätzlich die Beladungskontrolle GAPDH. Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Statistische Signifikanzen wurden durch *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und gegebenenfalls durch Asterisken gekennzeichnet. Repräsentative Western Blots sind für entsprechende Zeitpunkte exemplarisch abgebildet.

Als zentraler Aspekt der Autophagie-Induktion wurde die AMP-Kinase bezüglich der Phosphorylierung an Position Thr172 und damit auf ihre Aktivierung getestet. Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte im Mittel eine signifikante Aktivitätssteigerung durch Metformin-Stimulation festgestellt werden. Insbesondere die späten Kultivierungszeitpunkte Tag 6 und Tag 8 zeigten eine Steigerung des Phosphorylierungslevels um den Faktor $5,66 \pm 1,05$ (D6) beziehungsweise $7,98 \pm 1,92$ (D8). Das Ubiquitin-bindende Protein p62 fungiert ebenfalls als Autophagie-Marker. Ist der Autophagie-Prozess inhibiert, so akkumuliert p62 (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). An Tag 3 und Tag 5 in Kultur waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und stimulierten Zellen bezüglich p62-Kumulierung festzustellen. Die ERC zeigten in Gegenwart von Metformin zu den späten Kultivierungszeitpunkten Tag 6 und Tag 8 eine Anhäufung des Proteins. An Tag 6 wurden unter MET-Einfluss $3,94 \pm 0,62$ -fach erhöhte Proteinlevel von p62 beobachtet und damit ein signifikanter Unterschied festgestellt. Ebenso zeigte sich an Tag 8 mit einer um den Faktor $1,95 \pm 0,51$ gesteigerten Proteinexpression unter MET-Einfluss ein Trend der p62-Akkumulation, der jedoch keine statistische Signifikanz zeigt.

Als gängiger Autophagie-Indikator wurde der LC3-II/LC3-I -Quotient unter Metformin-Einfluss und unter Kontrollbedingungen betrachtet. Die zytosolische Form des *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* LC3-I wird im Zuge des Autophagie-Prozesses an Phosphatidylethanolamin konjugiert, um die lipidierte Form LC3-II zu bilden. So wird bei aktiver Autophagie einerseits vermehrt LC3-II gebildet, andererseits wird es im Zuge Autolysosom-Bildung teilweise selbst degradiert (Tanida et al, 2008; Hale et al., 2013; Shibutani und Yoshimori, 2014). Im Mittel zeigte sich ein tendenziell reduzierter LC3-II-Anteil im Verhältnis zu LC3-I bei den MET-stimulierten ERC. Ein signifikanter Unterschied präsentierte sich an Tag 5. Zu diesem Zeitpunkt rief Metformin-Stimulation eine Reduktion des LC3-II/LC3-I -Verhältnisses auf das $0,75 \pm 0,11$ -fache hervor.

Ergänzend wurde die Phosphorylierung der *Unc-51-Like* -Kinase (ULK) an den Phosphorylierungsstellen Ser555 und Ser757 betrachtet. Während Position Ser555 durch die AMP-Kinase phosphoryliert wird, erfolgt die Phosphorylierung von Ser757 durch mTOR (Chan, 2012). Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. An Position Ser555 führte Metformin-Stimulation zum Zeitpunkt Tag 3 (D3) und Tag 5 (D5) im Mittel zu signifikant erhöhten Phosphorylierungsniveaus. So war an Tag 3 die relative Phosphorylierung unter Metformin auf das $2,26 \pm 0,44$ -fache gesteigert, an Tag 5 um den Faktor $3,84 \pm 2,00$. Zu späteren Kultivierungszeitpunkten zeigten stimulierte Zellen keine signifikanten Abweichungen.

Die Phosphorylierungsstelle Ser757 präsentierte zu frühen Zeitpunkten (D3 und D5) keine signifikanten Unterschiede zwischen CTRL- und MET-behandelten ERC. Ab Tag 6 bewirkte Metformin-Stimulation signifikante Effekte an Position Ser757. So zeigten sich an Tag 6 im Mittel relative Phosphorylierungssteigerungen auf das $1,70 \pm 0,23$ -fache sowie an Tag 8 auf das $1,80 \pm 0,22$ -fache.

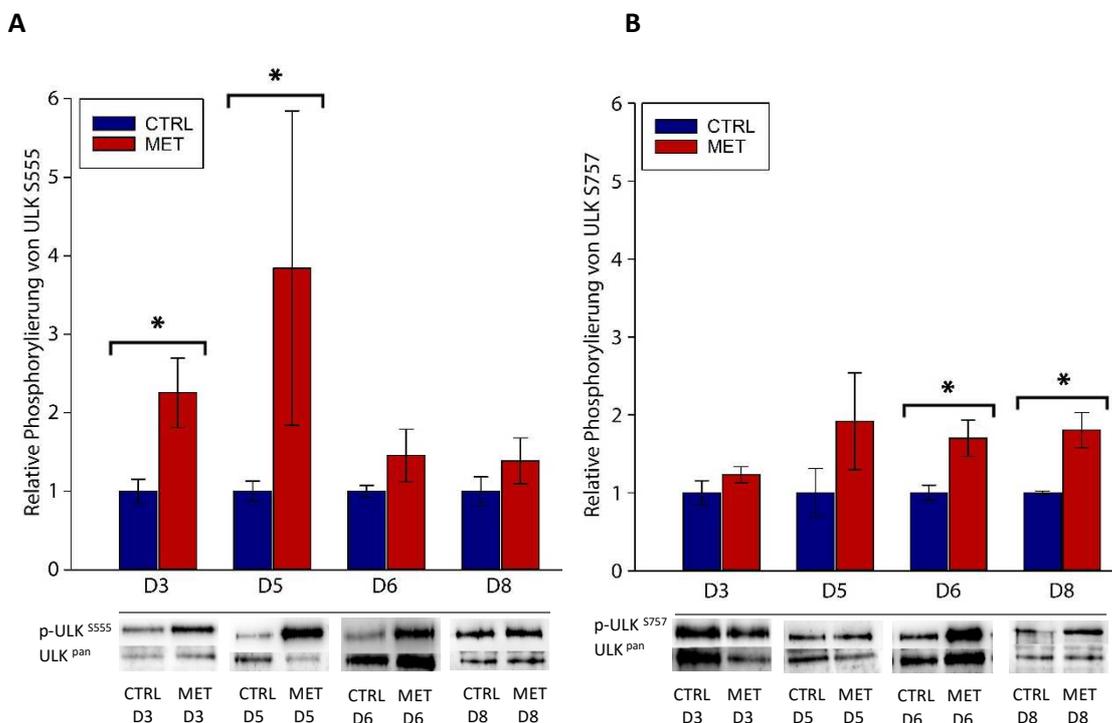


Abb. 15: Ergebnisse der Phosphorylierungsanalyse von ULK an den Positionen Ser555 und Ser757 in An- und Abwesenheit von Metformin. (A) Relative Phosphorylierung von ULK Ser555 im Verhältnis zum pan-Antikörper bei einer n-Zahl von 6 bis 9. (B) Relative Phosphorylierung von ULK Ser757 in Relation zum pan-ULK-Antikörper (n=6-9). Diagramme mit Mittelwerten und SEM erstellt; auf Kontrollen normiert. Asterisken kennzeichnen statistische Signifikanzen, die mittels *student's t-test* ermittelt wurden und für p-Werte <0,05 angenommen wurden. Western Blot-Ausschnitte sind exemplarisch für entsprechende Kultivierungszeitpunkte abgebildet.

4.2 Experimenteller Ansatz 2

Im zweiten experimentellen Ansatz erfolgte die Metformin-Stimulation eine Woche (D7) nach Präparation der ERC. So entwickelten die Kardiomyozyten binnen einer Woche in Kultur eine annähernd adulte Titin-Isoform-Komposition, ehe die Stimulation gestartet wurde. Ziel war es außerdem, die im Versuchsansatz 1 beobachtete Umkehr des Metformin-Effekts von Tag 5 auf Tag 6 in Abhängigkeit vom Stimulationszeitpunkt zu beurteilen. So sollte geklärt werden, ob das Kultivierungsalter der Zellen einen Einfluss auf den Metformin-Effekt hat. Die Zellen wurden nach Stimulationsbeginn an Tag 7 nach weiteren 3 bis 5 Tagen, also nach 72 bis 120 Stunden Metformin-Stimulation geerntet.

4.2.1 Metformin bewirkt einen signifikant reduzierten N2B-Anteil in ERC bei Stimulation ab Tag 7

Bei Stimulationsbeginn an Tag 7 in Kultur zeigte sich zu allen anschließend betrachteten Zeitpunkten (D10, D11, D12 / 72, 96, 120 Stunden MET-Stimulation) ein signifikant reduzierter N2B-Anteil im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 16). So wiesen Kontrollzellen an Tag 10 in Kultur (nach 72 Std. MET-Stimulation) einen N2B-Anteil von $70,25 \pm 0,48\%$ auf, während sich bei MET-behandelten Zellen mit $67,48 \pm 0,55\%$ ein signifikant geringerer N2B-Gehalt herausstellte. Ebenso zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollen bei MET-stimulierten ERC an Tag 11 (96 Std. MET) mit $66,55 \pm 0,73\%$ (CTRL $69,27 \pm 0,71\%$) und an Tag 12 (120 Std. MET) mit $66,39 \pm 0,81\%$ (CTRL $70,04 \pm 0,75\%$) signifikante Abweichungen.

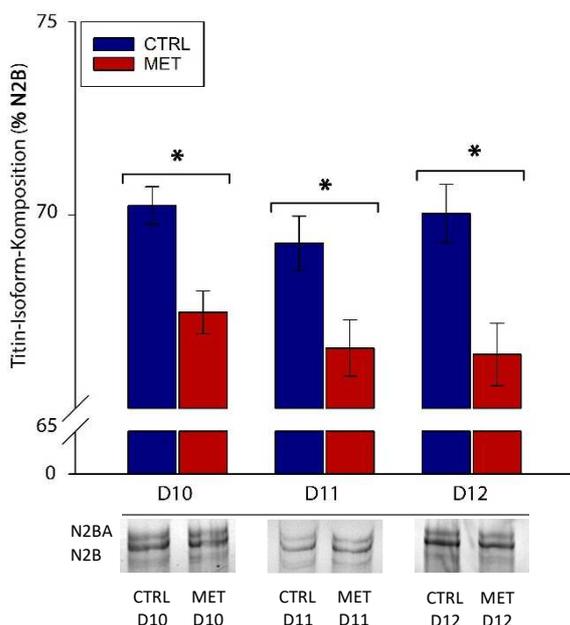


Abb. 16: Titin-Isoform-Komposition mit und ohne MET (1 μ M) -Zugabe bei Beginn der Stimulation zu Kultivierungszeitpunkt Tag 7. Prozentualer Anteil der N2B-Isoform am Gesamt-Titin (N2BA + N2B) in An- (MET) und Abwesenheit (CTRL) von Metformin (n=9-27). Säulendiagramme präsentieren Mittelwerte sowie Standardfehler. Repräsentative Titingele sind abgebildet. Asterisken kennzeichnen statistische Signifikanzen ermittelt durch *Student's t-test* bei einem p-Wert <0,05.

4.2.2 Metformin aktiviert die Ser-/Thr-Kinase Akt in ERC bei Stimulation ab Tag 7

Auch in diesem Versuchsansatz wurde die Aktivität der Akt-Kinase in An- und Abwesenheit von Metformin überprüft. So erwiesen sich beide Positionen Ser473 und Thr308 unter MET-Einfluss als vermehrt phosphoryliert und die Akt-Kinase damit als aktiviert (siehe Abb. 17). Die Phosphorylierungsstelle Thr308 zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten durch Metformin eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung. Die größte Abweichung von Kontrollzellen wurde hierbei im Mittel an Tag 11 (96 Std. MET) beobachtet, wo die relative Phosphorylierung unter MET um den Faktor $10,99 \pm 2,05$ gesteigert war. An Position Ser473 konnte zu allen Zeitpunkten ein Trend der verstärkten Phosphorylierung unter MET-Einfluss festgestellt werden. Signifikante Unterschiede stellten sich hier an Tag 10 (72 Std. MET) und an Tag 11 (96 Std. MET) dar, die Phosphorylierungslevel stiegen hier unter MET-Behandlung auf das $4,78 \pm 0,99$ -fache (D10 / 72 Std. MET) beziehungsweise $3,39 \pm 0,91$ -fache (D12 / 120 Std. MET).

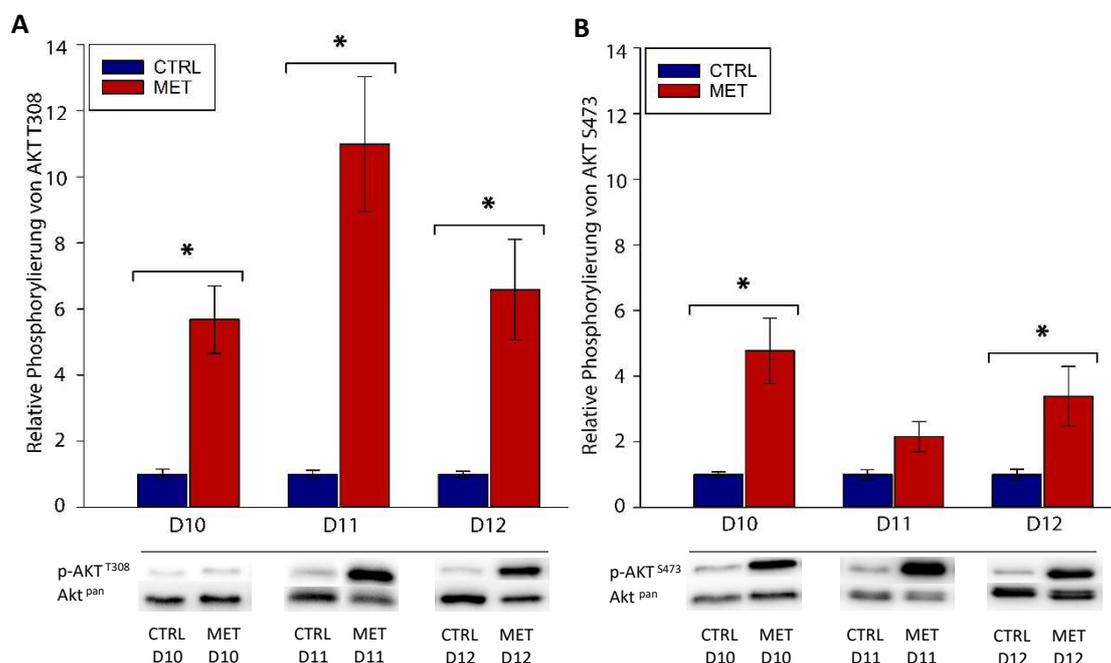


Abb. 17: Relative Phosphorylierung von Akt an Position Thr308 und Ser473 bei Metformin-Stimulation ab Tag 7. (A) Relative Phosphorylierung von Akt Thr308 zu den Kultivierungszeitpunkten Tag 10 (D10 / 72 Std. MET), Tag 11 (D11 / 96 Std. MET) und Tag 12 (D12 / 120 Std. MET) bei Kontrollzellen (CTRL) und MET-stimulierten Zellen bei einer n-Zahl von 9 bis 15. (B) Relative Phosphorylierung von Akt an Position Ser473 in An- und Abwesenheit von MET bei einer n-Zahl von 12 bis 17. Säulendiagramme zeigen den Mittelwert und den Standardfehler, auf Kontrollen normiert. Western Blots sind exemplarisch abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und gegebenenfalls durch Asterisken gekennzeichnet.

4.2.3 Metformin bewirkt eine signifikant verringerte RBM20-Proteinexpression bei Stimulation ab Tag 7

Bei einer Metformin-Stimulation ab Tag 7 in Kultur zeigten ERC an den Tagen 10, 11 und 12 (nach 72, 96 und 120 Std. MET-Stimulation) eine tendenziell vermehrte Aktivierung von mTOR (siehe Abb. 18 A). Mit einer gesteigerten Phosphorylierung um den Faktor $1,99 \pm 0,66$ an Tag 10 (72 Std. MET) sowie um den Faktor $2,03 \pm 0,50$ an Tag 12 (120 Std. MET) zeichnete sich ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter, Trend ab. An Tag 11 (96 Std. MET) konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen Kontrollen und MET-stimulierten Zellen festgestellt werden.

Im Hinblick auf RBM20 bewirkte die Metformin-Behandlung ab Tag 7 in Kultur zu allen betrachteten Zeitpunkten (D10, D11, D12 / 72, 96, 120 Std. MET) im Mittel signifikant reduzierte Proteinlevel (siehe Abb. 18 B). So zeigten an Tag 10 die für 72 Stunden stimulierten Zellen auf $0,66 \pm 0,05$ signifikant verringerte RBM20-Proteinlevel, an Tag 11 (96 Std.) war die Expression des Spleißfaktors unter MET auf $0,51 \pm 0,06$ signifikant reduziert. Diese Daten (D10 und D11) wurden bereits im Vorfeld in der Arbeitsgruppe erhoben und freundlicherweise zur Vervollständigung zur Verfügung gestellt. An Tag 12 (120 Std. MET) konnte bei den MET-behandelten ERC mit einer relativen Reduktion der RBM20-Proteinexpression auf $0,69 \pm 0,06$ eine signifikante Abweichung verzeichnet werden.

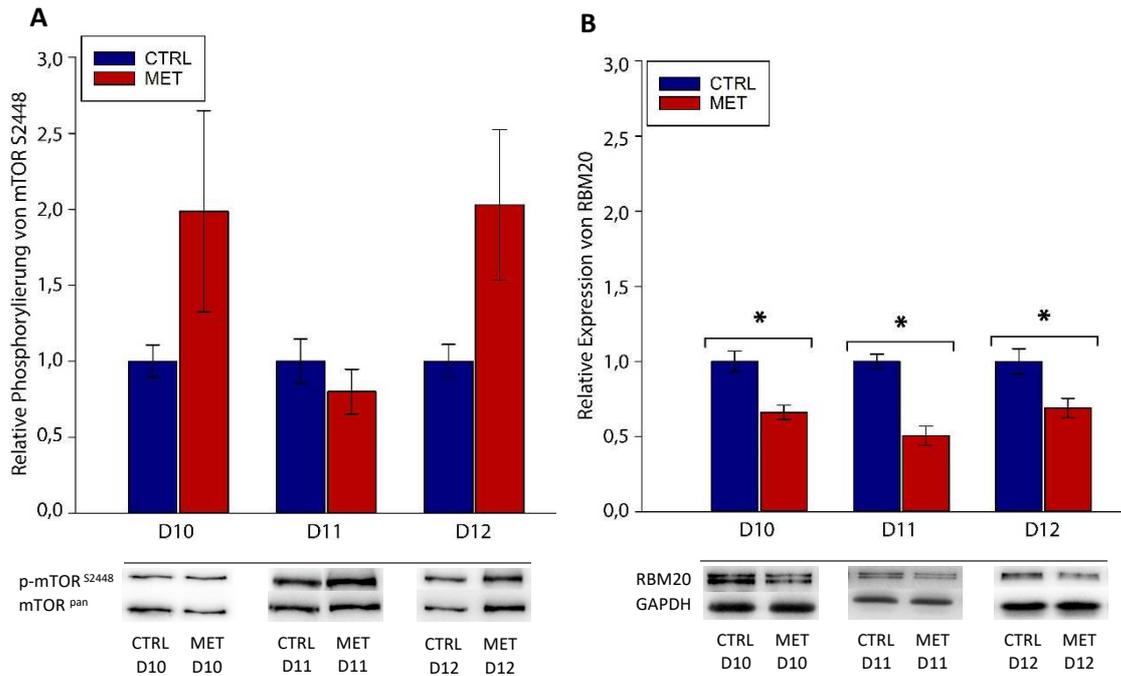


Abb. 18: Relative mTOR-Phosphorylierung sowie RBM20-Expression bei Versuchsansatz 2 (MET-Stimulation ab Tag 7). (A) Relative Phosphorylierung von mTOR an der Position Ser2448 unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart von MET bei Stimulationsbeginn an Tag 7 (n=9-19). (B) Relative RBM20-Expression in An- und Abwesenheit von MET (n=9-15). Repräsentative Western Blots der entsprechenden Kultivierungszeitpunkte sind abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und durch Asterisken gekennzeichnet.

5 Diskussion

5.1 Metformin bewirkt unterschiedliche Effekte auf Titin-Isoform-Komposition

In der vorliegenden Studie konnte ein eindeutiger Effekt des Antidiabetikums Metformin auf das Titinfilament nachgewiesen werden. Als orales Antidiabetikum mit nachgewiesener kardioprotektiver Wirkung, hat sich Metformin zum Grundpfeiler der Typ 2-Diabetes-Therapie entwickelt (Hong et al., 2013; Johnson et al., 2002; King et al., 1999). Immer mehr Hinweise legen nahe, dass dieser kardioprotektive Effekt von Metformin nicht allein auf die blutglukosesenkende Wirkung des Agens zurückzuführen ist. Dafür spricht unter anderem, dass andere blutzuckersenkende Medikamente diese Wirkung nicht zeigen können (Gundewar et al., 2009; Matthaei et al., 2009). Metformin wirkt vermutlich auch direkt über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden auf Kardiomyozyten und führt so zu kardialen Umbau- und Anpassungsprozessen (Gundewar et al., 2009; Yin et al., 2011). Für Typ 2-Diabetiker, die mit Metformin behandelt wurden, konnte eine verbesserte diastolische linksventrikuläre Funktion, also eine höhere Elastizität des LV, gezeigt werden (Andersson et al., 2010). Als wesentlicher Prädiktor der diastolischen passiven Spannung der Kardiomyozyten in Bereichen der physiologischen Sarkomerlängen (Linke et al., 1994; Granzier und Irving, 1995), lag der Verdacht nahe, dass Metformin direkten Einfluss auf das Strukturprotein Titin nehmen könnte. Krüger et al. (2008; 2010) beschrieben für T3 und Insulin bereits direkte Effekte auf den Titin-Isoformen-Switch im Zellkulturmodell aus primären ERC. Für beide Hormone wurde durch Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs eine schnellere Verschiebung hin zur steiferen N2B-Isoform nachgewiesen. Das vorliegende Projekt wurde auf Basis dieser Erkenntnisse entwickelt, um den Einfluss von Metformin auf das Titinfilament zu analysieren und mögliche verantwortliche Signalkaskaden zu identifizieren.

Die Ergebnisse der Titin-Isoform-Analyse (Abb. 10; 16) zeigten nach 3 bis einschließlich 5 Tagen Stimulation einen signifikant erhöhten N2B-Isoform-Anteil im Vergleich zu Kontrollen bei Stimulationsbeginn ab Tag 1. Im Gegensatz dazu präsentierten ERC, die ab Tag 7 für den gleichen Zeitraum stimuliert wurden, einen signifikant niedrigeren N2B-Anteil. Der Metformin-Effekt auf ERC scheint daher nicht unbedingt von der Dauer der Metformin-Stimulation abzuhängen. Vermutlich basiert die Metformin-Wirkung in höherem Maße auf dem Kultivierungsalter und Entwicklungsstadium der ERC, zumal ab Tag 1 stimulierte ERC ab Tag 6 in Kultur ebenfalls einen signifikant niedrigeren N2B-Gehalt als

Kontrollen aufwiesen (Abb. 10). So stellt sich die Frage, ob Veränderungen der ERC nach einer gewissen Zeit in Kultur stattfinden und, ob diese zur veränderten Wirkung von Metformin auf die Titin-Isoform-Komposition führen könnten. Es ist bekannt, dass in der Entwicklung von embryonalen hin zu adulten Kardiomyozyten eine Umstellung des Energie-Substrat-Metabolismus stattfindet (Lopaschuk und Jaswal, 2010). Im frühen embryonalen Stadium sind die Kardiomyozyten stark auf anaerobe Glykolyse als Energiequelle angewiesen und der mitochondriale oxidative Metabolismus ist erst rudimentär entwickelt (Chung et al., 2007; 2010; Lopaschuk und Jaswal, 2010). Im Zuge der embryonalen Kardiogenese nehmen die mitochondrialen oxidativen Kapazitäten immer weiter zu, sodass im reifen Herzen mehr als 90% des Energiebedarfs durch den Abbau von Fettsäuren über β -Oxidation gedeckt wird (Chung et al., 2007; 2010; Lopaschuk und Jaswal, 2010). Dazu werden die Produkte der β -Oxidation $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 für die ATP-Produktion in die Atmungskette eingeschleust, während das entstehende Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeht. Interessanterweise ist die Energiegewinnung mittels Glykolyse mit einem proliferativen Zustand der Kardiomyozyten assoziiert, während die Zellteilungsrate bei ausgereiftem Metabolismus stark reduziert ist. Zellwachstum findet dann vorwiegend über Hypertrophie statt (Chung et al., 2007; 2010; Lopaschuk und Jaswal, 2010). Vermutlich findet in dem hier angewandten Versuchsaufbau während der Kultivierung nach etwa 5 Tagen ebenfalls ein metabolischer *Switch* von der embryonalen Glykolyse hin zur Fettsäureoxidation statt. Damit könnte sich entsprechend die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten stark reduzieren (Lopaschuk und Jaswal, 2010). Möglicherweise entfaltet Metformin seine Wirkung hin zum höheren N2BA-Titin-Isoform-Anteil erst bei ATP-Produktion über β -Oxidation. In diesem Zusammenhang ist auch die durch Metformin aktivierte AMP-Kinase von Interesse. Metformin bewirkte zu allen untersuchten Kultivierungszeitpunkten eine signifikante Aktivierung der AMPK (Abb. 14 A). Insbesondere an den Tagen 6 und 8, an denen auf Titin-Isoform-Ebene bereits eine Verschiebung hin zu N2BA stattfindet, fällt ein weiterer Anstieg (mindestens um den Faktor 2) der relativen Phosphorylierung unter Metformin im Vergleich zu den Tagen 3 und 5 auf. Für die AMP-Kinase ist bekannt, dass sie in aktiviertem Zustand die Fettsäureoxidation stimuliert (Russell et al., 1999; Winder und Hardie, 1999; Wang et al., 2011). Die noch stärker ausgeprägte Aktivierung der AMPK ab Tag 6 könnte die Ausreifung des mitochondrialen oxidativen Apparates und damit den metabolischen *Switch* markieren und

Metformin-bedingt die Fettsäureoxidation zusätzlich stimulieren. Vermutlich besteht auch ein Zusammenhang zwischen Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten und Metformin-Wirkung. So könnte der mit einer metabolischen Umstellung verbundene Wechsel des Zellwachstums von Hyperplasie zur Hypertrophie (Chung et al., 2007; 2010; Lopaschuk und Jaswal, 2010) die verschiedenen Effekte von Metformin auf die Titin-Isoform-Komposition bedingen. Damit konsistent, konnte zu frühen Kultivierungszeitpunkten mikroskopisch eine Steigerung der Zellzahl festgestellt werden, während nach etwa 5 Tagen in Kultur die Anzahl an Kardiomyozyten weitestgehend stagnierte und die Zellen im Sinne einer Hypertrophie an Größe zunahmten. Im Folgenden werden Zellen nach 5 Tagen in Kultur daher als „nicht mehr proliferierende Zellen“ bezeichnet, unabhängig vom Zeitpunkt der Stimulation. Unter diesen Aspekten betrachtet, führt Metformin-Stimulation in nicht mehr proliferierenden Zellen vermutlich – unabhängig vom Zeitpunkt des Stimulationsbeginns – zur signifikanten Verminderung des N2B-Isoform-Anteils (und damit Erhöhung des N2BA-Gehalts). Um diese Hypothesen zu verifizieren, müsste überprüft werden, inwieweit ein metabolischer *Switch* stattfindet und, ob dieser mit dem Zeitpunkt des *Switches* der Metformin-Wirkung auf Titin-Isoform-Ebene korreliert. Ebenfalls könnte eine Untersuchung der Proliferationsrate der ERC Aufschluss über die Art des Zellwachstums geben und Zusammenhänge mit der Metformin-Wirkung aufzeigen.

Die im vorliegenden Versuchsansatz erhobenen Daten zeigen deutlich Metformin als Einflussfaktor des erhöhten N2BA-Anteils bei nicht mehr proliferierenden Kardiomyozyten. Diese Titin-Isoformen-Transition hin zur elastischeren N2BA-Isoform könnte im klinischen Einsatz *in vivo* als Metformin-induzierte Kompensation einer gängigen Pathologie unter Diabetikern, der diabetischen Kardiomyopathie, verstanden werden (Fang et al., 2004; Wang et al., 2011). Die diabetische Kardiomyopathie geht klassischerweise mit einer erhöhten Kollagen-basierten passiven Steifigkeit des Herzmuskels einher und führt damit häufig zunächst zur diastolischen Dysfunktion (Fang et al., 2004). Eine Metformin-vermittelte Transition hin zur elastischeren Titin-Isoform N2BA könnte womöglich dieser diastolischen Dysfunktion entgegenwirken und damit zum günstigen kardialen Profil des Pharmakons beitragen.

5.2 Metformin-bedingte RBM20-Proteinlevel kohärieren mit N2B-Isoform-Anteil

Veränderungen der Titin-Isoformen-Zusammensetzung werden durch alternatives Spleißen der Titin-mRNA induziert. Als einziger bis dato bekannter Spleißfaktor nimmt RBM20 daher eine entscheidende Rolle im Titin-Isoformen-*Switch* ein (Freiburg et al., 2000; Guo et al., 2012; Zhu et al., 2017). So bewirken natürlich vorkommende RBM20-Mutationen bei Patienten und ebenso im Ratten-Modell geringe RBM20-Proteinlevel und die Expression lediglich einer langen, höchst elastischen N2BA-Titin-Isoform (Guo et al., 2012). Metformin-stimulierte ERC zeigten alles in allem eine zur Titin-Isoformen-Entwicklung konkordante Expression des Proteins RBM20. So korrelierte der *Switch* hin zu N2B unter Metformin zu frühen Kultivierungszeitpunkten (D3-D5; Abb. 12 B) mit signifikant erhöhten Proteinleveln von RBM20, also vermutlich einer hohen Spleiß-Aktivität. In nicht mehr proliferierenden ERC waren die RBM20-Proteinlevel reduziert, was geringere Spleiß-Aktivitäten vermuten lässt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Insulin-vermittelte Erhöhung des N2B-Gehalts mit einer signifikanten Erhöhung der RBM20-Proteinexpression einhergeht (Krüger et al., 2010; Zhu et al., 2017). Auch wurde ein RBM20-*knockout* mit einer Aufhebung des Insulin-Effekts und einer Stagnation der Titin-Isoform-Komposition in Verbindung gebracht (Zhu et al., 2017). Für Metformin konnten diese kohärenten Expressionsmuster des RBM20-Proteins und der Titin-N2B-Isoform in ERC bestätigt werden.

Möglicherweise korrelieren hohe RBM20-Proteinlevel und damit ein aktiver Spleiß-Vorgang unter Metformin mit erhöhtem Proteinumsatz und gesteigerter Zellproliferation, was eine Beschleunigung des Titin-Isoformen-*Switches* hin zu einem höheren N2B-Anteil bedeuten könnte. Die für die Zellproliferation notwendige Energie könnte durch Aktivierung der Autophagie bereitgestellt werden. Momentan nicht benötigte Zellbestandteile könnten dabei abgebaut werden und es könnten vermehrt Energie und Aminosäuren zur Verfügung stehen, um RBM20 und Titinfilamente zu generieren. Dieser Prozess findet vermutlich sowohl in proliferierenden Kontroll- als auch in Metformin-stimulierten Zellen statt, Metformin hat als Autophagie-Aktivator (zumindest in proliferierenden Zellen) jedoch vermutlich einen leicht fördernden Effekt (Hur und Lee, 2015; Feng et al., 2014).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Spleiß-Faktor in engem Zusammenhang zur Metformin-vermittelten Titin-Isoformen-Transition steht und Metformin-Stimulation direkt oder auch indirekt durch Autophagie-Aktivierung (in proliferierenden ERC) die RBM20-Proteinexpression beeinflussen könnte. Ob Metformin auf die Transkription und damit die RBM20-mRNA-Expression oder auf die Translation von mRNA in Aminosäuresequenzen wirkt, bleibt zu untersuchen.

5.3 Metformin wirkt nicht nur über den PI3K-Akt-Signalweg auf Titin-Isoformen

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass Metformin einen signifikanten Einfluss auf die Titin-Isoformen-Zusammensetzung und die RBM20-Proteinexpression nimmt. Die Frage nach dem molekularen Wirkmechanismus im Zusammenhang mit Titin bleibt jedoch zunächst offen. Auch konnte bislang generell kein Rezeptor identifiziert werden, über den Metformin seine Wirkung entfaltet. Die therapeutische Wirkung von Metformin beruht *in vivo* in erster Linie auf Inhibition der Glukoneogenese (Stumvoll et al., 1995; Hundal et al., 2000; Takashima et al., 2010). Durch die Hemmung dieser endogenen Glukose-Produktion wird die zusätzliche Steigerung des ohnehin schon erhöhten Blutglukosespiegels bei Typ 2-Diabetikern verhindert und Hyperglykämien gemildert (An und He, 2016). Dieser Effekt ist allerdings in Kardiomyozyten zu vernachlässigen, da lediglich Leber- und Nierenzellen die Fähigkeit zur Glukoneogenese besitzen (Stumvoll et al., 1995; Hundal et al., 2000; Takashima et al., 2010; Exton, 1972). Auch ist in diesem Versuchsaufbau nicht von einer Hemmung des mitochondrialen Komplexes I der Atmungskette durch Metformin auszugehen, da die dafür notwendigen Konzentrationen von über 5mM, die auch in therapeutischen Dosierungen *in vivo* nicht erreicht werden, deutlich oberhalb der hier applizierten Konzentrationen liegen (Hollunger, 1955; El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000).

Im Vorfeld wurde die Hypothese formuliert, Metformin entfalte seine Wirkung auf Titin über den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, da für T3 und Insulin eine Aktivierung von Akt und mTOR mit einem beschleunigten Isoformen-Switch in Verbindung gebracht werden konnte (Krüger et al., 2008; 2010; Zhu et al., 2017). Auch wurde unter Insulin-Einfluss ein direkter Zusammenhang von aktiviertem mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), dem Rapamycin-sensitiven Komplex von mTOR, und einer erhöhten Expression von RBM20 und der N2B-Isoform gezeigt (Zhu et al., 2017).

Metformin-Stimulation bewirkte ebenfalls gesteigerte Aktivität von Akt an beiden Phosphorylierungsstellen (Thr308 und Ser473) über die gesamte Stimulationsperiode (Abb. 11; 17). So konnte sowohl im Zeitraum, in dem Metformin, ähnlich T3 und Insulin, einen beschleunigten Switch hin zu N2B zeigte (Krüger et al., 2008; 2010), als auch zu späteren Kultivierungszeitpunkten in nicht mehr proliferierenden ERC signifikant vermehrte Aktivierung von Akt an Thr308 und Ser473 beobachtet werden.

Als PI3K und Akt nachgeschaltete Kinase wurde außerdem mTOR untersucht. Die Kultivierungszeitpunkte Tag 3 bis Tag 5 zeigten kaum Unterschiede zwischen Kontroll- und Metformin-behandelten Zellen. Bei nicht mehr proliferierenden ERC wurde tendenziell erhöhte mTOR-Aktivität unter Metformin-Einfluss festgestellt (Abb. 12 A).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gibt es zahlreiche Publikationen, in denen Metformin als Inhibitor des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs beschrieben wird (Liu et al., 2015; Zakikhani et al., 2010; Nair et al., 2014; Aljada und Mousa, 2012). Diese Daten beziehen sich allerdings in erster Linie auf entartete Tumorzellen, die in hohem Maße proliferativ sind und einen charakteristisch veränderten Metabolismus, genannt Tumor-Metabolom, aufweisen (Liu et al., 2015; Zakikhani et al., 2010; Mazurek et al., 2002; Mazurek und Eigenbrodt, 2003). Dem PI3K-Akt-mTOR-Signalweg wird dabei als positiver Regulator der Translations-Initiation eine wesentliche Rolle in der Zellproliferation beigemessen. So werden Metformin als möglicher mTOR-Inhibitor in kanzerösen Zellen antiproliferative Effekte zugeschrieben, was das Pharmakon in der Tumorthherapie immer interessanter werden lässt (Aljada und Mousa, 2012). In embryonalen Kardiomyozyten konnte diese PI3K-Akt-mTOR-Inhibition jedoch nicht bestätigt werden. Dies stützt die Hypothese, dass die Metformin-Wirkung in höchstem Maße von metabolischen und proliferativen Rahmenbedingungen abhängt.

Auch konnten Unterschiede zur Insulinwirkung (Krüger et al., 2010; Zhu et al., 2017) auf Titin festgestellt werden. Metformin-vermittelte Steigerung der mTOR-Aktivität (Vgl. CTRL) (Abb. 12 A) konnte hier im Gegensatz zu Insulin mit verringerter RBM20- sowie N2B-Isoform-Expression assoziiert werden (Abb. 10; 12 B). Die vorliegenden Ergebnisse der Metformin-Stimulation weisen folglich darauf hin, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg nicht der einzige Effektor des Isoformen-*Switches* sein kann. Würde unter Metformin-Einfluss mTOR lediglich über die PI3K-Akt-Signalkaskade angesteuert werden, so wären ähnliche Aktivitätsmuster wie in der Akt-Phosphorylierungs-Analyse zu erwarten. Allerdings differiert die Metformin-vermittelte Aktivität von Akt und mTOR besonders zu den frühen Kultivierungszeitpunkten in noch proliferierenden Zellen, an denen ein Isoformen-*Switch* hin zu einem höheren N2B-Anteil stattfindet (Abb. 11 A und B; 12 A). Dennoch korrelierte der Umkehrzeitpunkt des Metformin-Effekts auf Titin-Isoform-Ebene mit dem Zeitpunkt verstärkter mTOR-Aktivität unter Metformin (Abb. 10; 12 A). Vermutlich entfaltet mTOR seine Metformin-vermittelte Wirkung daher nicht primär in der Rolle als PI3K-Akt-nachgeschaltete Kinase, sondern könnte durch andere Instanzen in seiner Aktivität moduliert werden. So ist anzunehmen, dass mTOR - durch die zeitliche Korrelation der vermehrten Aktivität mit der Inversion des Metformin-Effekts auf Isoform-Ebene - eine zentrale Rolle in der Metformin-Signalgebung bezüglich der Titin-Isoformen-Zusammensetzung einnimmt.

5.4 mTOR-Inhibition durch Rapamycin beeinflusst Metformin-Wirkung auf Titin

Um die Rolle von mTOR unter Metformin-Einfluss hinsichtlich der Titin-Isoform-Komposition zu überprüfen, wurde mTORC1 von Tag 5 auf Tag 6 (Stim. ab D1) in Kultur durch Rapamycin inhibiert. Im Vergleich zur alleinigen Metformin-Behandlung führte gleichzeitige Rapamycingabe nicht zu einem verminderten N2B-Anteil an Tag 6. Kontrollzellen, die zusätzlich mit Rapamycin behandelt wurden (CTRL+Rapa), wiesen hingegen kaum Veränderungen der Titin-Isoform-Komposition (Vgl. CTRL) auf (Abb. 13 C). Auch die RBM20-Proteinexpression war durch Rapamycin (MET+Rapa) - konkordant zum N2B-Gehalt - nicht erniedrigt (Abb. 13 B).

Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass die verstärkte mTOR-Aktivierung ab Tag 6 unter Metformin (Abb. 12 A) eng mit dem reduzierten N2B-Anteil auf Titin-Isoform-Ebene zusammenhängt. Während Insulin-Stimulation in Kardiomyozyten über eine mTOR-Aktivierung eine gesteigerte RBM20-Proteinexpression und folglich einen erhöhten N2B-Isoform-Anteil bewirkt (Krüger et al., 2010; Zhu et al., 2017), verhält es sich bei Metformin-Behandlung gegensätzlich. So ist hierbei erhöhte mTOR-Aktivität mit reduzierter RBM20- und N2B-Isoform-Expression assoziiert. Demzufolge ist denkbar, dass mTOR von weiteren zellulären Entitäten beeinflusst wird.

5.5 Metformin-induzierte mTOR-Aktivität korreliert mit Autophagie-Inhibition

Möglicherweise vermittelt mTOR seine Wirkung auf die Titin-Isoformen-Zusammensetzung in der Rolle als Autophagie-Inhibitor (Jung et al., 2010; Wong et al, 2015). Autophagie hat prinzipiell zum Ziel, in Energiemangelsituationen die Integrität der Zelle zu wahren und durch den Abbau zellulärer Strukturen Energie und Bausteine für Biosynthesen bereitzustellen (Shibutani und Yoshimori, 2014), und geht vermutlich mit einem erhöhten Proteinumsatz einher. Bislang unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe Krüger geben Hinweise darauf, dass Titin zumindest zum Teil über das Autolysosomale System abgebaut wird. So wurde die These formuliert, dass zu frühen Kultivierungszeitpunkten (D3-D5) unter Metformin-Stimulation Autophagie aktiviert sein könnte, was möglicherweise einen erhöhten Proteinumsatz und dadurch einen beschleunigten Titin-Isoformen-*Switch* hin zu N2B zur Folge hat. So könnte die erhöhte Autophagie-Aktivität dazu führen, dass mehr Baumaterial für die Produktion von Titinfilamenten zur Verfügung steht oder auch der Abbau der fötalen N2BA-Isoform beschleunigt ist und diese folglich schneller durch adulte Isoformen ersetzt wird. Der verminderte N2B-Anteil unter Metformin in nicht mehr proliferierenden Zellen (D6-D9 und bei Stim. ab D7 D10-D12) könnte im Umkehrschluss durch mTOR-vermittelte Hemmung der Autophagie erklärt werden. Da mTOR als Autophagie-Inhibitor bekannt ist, könnte eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin folglich zur Autophagie-Induktion führen (Kapuy et al., 2014). Dieser Sachverhalt könnte in diesem Zusammenhang wiederum erklären, warum Metformin und Rapamycin-stimulierte Zellen (MET+Rapa) im Vergleich zu Metformin-behandelten Zellen (MET) einen signifikant

höheren N2B-Anteil aufweisen (Abb. 13 C). Diese Aufrechterhaltung der Autophagie-Aktivität könnte somit den Isoformen-*Switch* positiv beeinflussen.

Um Autophagie als möglichen Mediator des Metformin-Effekts zu identifizieren, wurden weitere Autophagie-Marker in An- und Abwesenheit des Pharmakons untersucht. Die AMP-aktivierte Kinase wird in der Literatur als Energie-Sensor beschrieben, der durch Energiemangel aktiviert wird und das Zell-Recycling-Programm Autophagie initiiert (Hardie, 2011; Hur und Lee, 2015). Als im Allgemeinen bekannter AMPK-Aktivator ist Metformin entsprechend als Autophagie-Induktor anerkannt (Hur und Lee, 2015; Feng et al., 2014). Zu den Zeitpunkten Tag 3 und Tag 5 zeigten sich durch Metformin sowohl eine signifikant verstärkte Aktivierung von AMPK (Abb. 14 A), als auch signifikant erhöhte Phosphorylierungslevel von ULK an Ser555 (Abb. 15 A). Gleichzeitig wurde durch Metformin zu diesen frühen Kultivierungszeitpunkten (D3-D5) weder mTOR noch ULK Ser757 signifikant verstärkt phosphoryliert (Abb. 12 A; 15 B). Daraus lässt sich ableiten, dass es durch Metformin vermutlich zu einer AMPK-vermittelten ULK-Phosphorylierung (Ser555) und dadurch zur Autophagie-Initiation kommt (Chan, 2012; Hale et al., 2013). Außerdem ist AMPK in der Lage, Beclin-1 direkt zu phosphorylieren und damit Autophagie zu initiieren (Zhang et al., 2016). Der Phosphorylierungsstatus von Beclin-1 wurde hier zwar nicht untersucht, die Aktivierung von ULK Ser555 durch AMPK spricht allerdings für eine Autophagie-Aktivierung, die womöglich durch direkte AMPK-Wirkung auf Beclin-1 noch verstärkt wird (Zhang et al., 2016; Chan, 2012; Hale et al., 2013).

Für Autophagie-Aktivität unter Metformin in ERC mit erhaltener Proliferationsfähigkeit (D3-D5; Stim. ab D1) sprechen außerdem die Proteinlevel des Adapterproteins p62, die kaum Unterschiede zu den Kontrollzellen aufwiesen (Abb. 14 B). Bei Inhibition der Autophagie wäre mit einer Akkumulation des Proteins zu rechnen (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). Die Ergebnisse könnten auch bedeuten, dass Autophagie in proliferierenden ERC ohnehin vermehrt aktiv ist und Metformin nur einen leicht fördernden Effekt beiträgt. Der LC3-II/LC3-I -Quotient zeigte sich zu den frühen Kultivierungszeitpunkten unter Metformin verringert (D5 signifikant; Abb. 14 C). In der Literatur wird LC3-II als Autophagie-Marker unterschiedlich interpretiert. So wird zum einen eine Erhöhung des LC3-II/LC3-I -Quotienten bei aktiver Autophagie beschrieben, da zur Bildung des Autophagosoms erhöhter Bedarf am lipidierten Protein besteht und dementsprechend vermehrt LC3-II gebildet wird (Tanida et al., 2008).

Andererseits werden diejenigen LC3-II-Proteine, die in der inneren Membran des Autophagosoms lokalisiert sind, im Zuge der Autophagie durch lysosomale Hydrolasen selbst degradiert (Tanida et al., 2008; Shibutani und Yoshimori, 2014). Allein durch LC3 als Autophagie-Marker kann keine eindeutige Aussage getroffen werden (Mizushima und Yoshimori, 2007). Die erhöhte AMPK-vermittelte ULK-Phosphorylierung an Ser555 unter Metformin, sowie die konstanten p62-Proteinlevel (Vgl. CTRL) sprechen in Zusammenschau (Abb. 14; 15 A) hier für einen aktiven Autophagie-Prozess an den Kultivierungstagen 3 und 5 unter Metformin-Stimulation. Dies lässt wiederum den Rückschluss zu, dass in diesem Versuchsansatz LC3-II bei aktiver Autophagie vermutlich in stärkerem Maße degradiert als produziert wird (Abb. 14 C). Dass allerdings keine eindeutigen Effekte bei p62-Proteinleveln im Vergleich zu Kontrollen feststellbar waren, könnte, wie bereits erwähnt, an einer basal schon hohen Autophagie-Aktivität liegen, die durch Metformin nur leicht gesteigert wird. Hormonreduziertes Medium mit 1% Serum stellt für ERC vermutlich ein herausforderndes Milieu dar, welchem die Zellen womöglich generell mit aktivierter Autophagie zur Energiehomöostase begegnen.

In nicht mehr proliferierenden ERC (D6 und D8; Stim. ab D1) konnten unter Metformin-Einfluss neben einer tendenziell vermehrten mTOR-Aktivierung (Abb. 12 A) weiterhin auch signifikant erhöhte AMPK-Phosphorylierungslevel festgestellt werden (Abb. 14 A). Im Hinblick auf die Autophagie-Steuerung bewirken die beiden Kinasen konkurrierende Effekte an ULK (Chan, 2012; Hale et al., 2013). Während ULK Ser555 hier – trotz signifikant erhöhter AMPK-Aktivität - unter Metformin (Abb. 14 A) keine signifikant verstärkten Phosphorylierungslevel zeigte, wurde ULK an der Position Ser757 zu diesen Zeitpunkten (D6 und D8) signifikant verstärkt phosphoryliert (Abb. 15 B). Sind sowohl AMPK als auch mTOR aktiv, so scheint mTOR in nicht mehr proliferierenden ERC in seiner Wirkung auf ULK zu überwiegen. Damit übereinstimmend lassen einige Forschungsergebnisse vermuten, dass die AMPK-vermittelte ULK-Phosphorylierung nicht nur durch das Nährstoffangebot direkt, sondern auch durch AMPK-mTOR-Interaktion determiniert wird (Chan, 2012; Jung et al., 2010). Phosphoryliert mTOR bei hoher Aminosäure-Verfügbarkeit ULK an der Position Ser757, so wird die AMPK-ULK-Interaktion limitiert und die AMPK-abhängige Phosphorylierung von ULK an Ser555 verhindert (Chan, 2012). Nichtsdestotrotz ist eine limitierte AMPK-ULK-Interaktion nicht automatisch gleichbedeutend mit einer Hemmung der Autophagie. Da die AMP-Kinase in der Lage ist, ULK zu umgehen, ist durchaus denkbar,

dass Beclin-1 direkt durch AMPK phosphoryliert wird und damit der Autophagie-Prozess induziert wird (Zhang et al., 2016). Allerdings sprechen auch die weiteren untersuchten Autophagie-Marker für eine Autophagie-Inhibition in nicht mehr proliferierenden ERC (D6 und D8; Stim. ab D1). So bewirkte Metformin-Stimulation zu späten Kultivierungszeitpunkten erhöhte p62-Proteinlevel (an Tag 6 signifikant), die mit gehemmter Autophagie assoziiert sind (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). Der LC3-II/LC3-I -Quotient zeigte sich an Tag 6 und Tag 8 im Vergleich zu den früheren Kultivierungszeitpunkten unter Metformin tendenziell höher (Abb. 14 C). So könnte, der oben ausgeführten Argumentation folgend, der autolysosomale Abbau von LC3-II zu diesen späteren Kultivierungszeitpunkten vermindert sein (Tanida et al., 2008; Shibutani und Yoshimori, 2014; Mizushima und Yoshimori, 2007). Dies könnte als ein weiteres Indiz für Autophagie-Inhibition durch Metformin in nicht mehr proliferierenden Zellen (D6 und D8; Stim. ab D1) betrachtet werden.

In Anbetracht der in der Literatur beschriebenen Destabilisierung der AMPK-ULK-Bindung durch mTOR bei Aminosäure-Verfügbarkeit (Chan, 2012), liegt der Verdacht nahe, dass die ebenfalls signifikante AMPK-Aktivierung durch Metformin zu den späteren Kultivierungszeitpunkten (Abb. 14 A) nicht unbedingt in der Rolle als Autophagie-Induktor stattfindet. Dafür spricht zudem, dass die weiteren Autophagie-Marker, allen voran p62, deutlich für einen gehemmten Autophagie-Prozess sprechen (Abb. 14 B; Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). Womöglich ist die vermehrte Aktivierung von AMPK zu diesen späten Kultivierungszeitpunkten (D6 und D8), wie oben beschrieben, in der Funktion als Stimulator der Fettsäureoxidation zu verstehen (Russell et al., 1999; Winder und Hardie, 1999; Wang et al., 2011). In diesem Zusammenhang ist auch denkbar, dass die in diversen Publikationen beschriebene Autophagie-Induktion durch Metformin (Feng et al., 2014; Tomic et al., 2011) vom Metabolismus und der Proliferationsrate der Zelle abhängt. So fußen auch Erkenntnisse der Autophagie-Aktivierung durch Metformin in vielen Fällen auf entarteten und damit höchst proliferativen Zellen mit verändertem Stoffwechsel (Feng et al., 2014; Tomic et al., 2011; Mazurek et al., 2002; Mazurek und Eigenbrodt, 2003).

Gesammelt betrachtet, konkurrieren vermutlich über den gesamten betrachteten Zeitraum in Kultur verschiedene zelluläre Bedürfnisse, die zusätzlich durch Metformin beeinflusst werden. So überwiegen zu frühen Kultivierungszeitpunkten - womöglich in Zusammenhang mit der erhaltenen Proliferationsfähigkeit der ERC - vermutlich diejenigen zellulären Bedürfnisse und Signale, die zur Autophagie-Induktion führen. Durch Metformin könnte diese Autophagie-Aktivierung noch leicht gesteigert werden. Damit kommt es womöglich zu einem erhöhten Proteinumsatz, was erhöhte Verfügbarkeit von Aminosäuren und weiteren zellulären Baumaterialien zur Folge hat. Sowohl die Proteinexpression als auch die Spleiß-Aktivität von RBM20 wird damit vermutlich gesteigert und könnte so zum erhöhten Anteil der N2B-Isoform führen. Bei veränderten metabolischen Bedingungen und reduzierter Zellteilung nach etwa 5 Tagen in Kultur verhält es sich vermutlich gegensätzlich. So kommt es durch Metformin möglicherweise zur Inhibition der Autophagie, was letztendlich zur verminderten RBM20-Proteinexpression führt und dadurch den geringeren N2B-Anteil am Gesamt-Titin bedingt. Abbildung 19 zeigt einen Überblick über die diskutierten möglichen Einflussgrößen der Metformin-Wirkung auf die Titin-Isoform-Komposition.

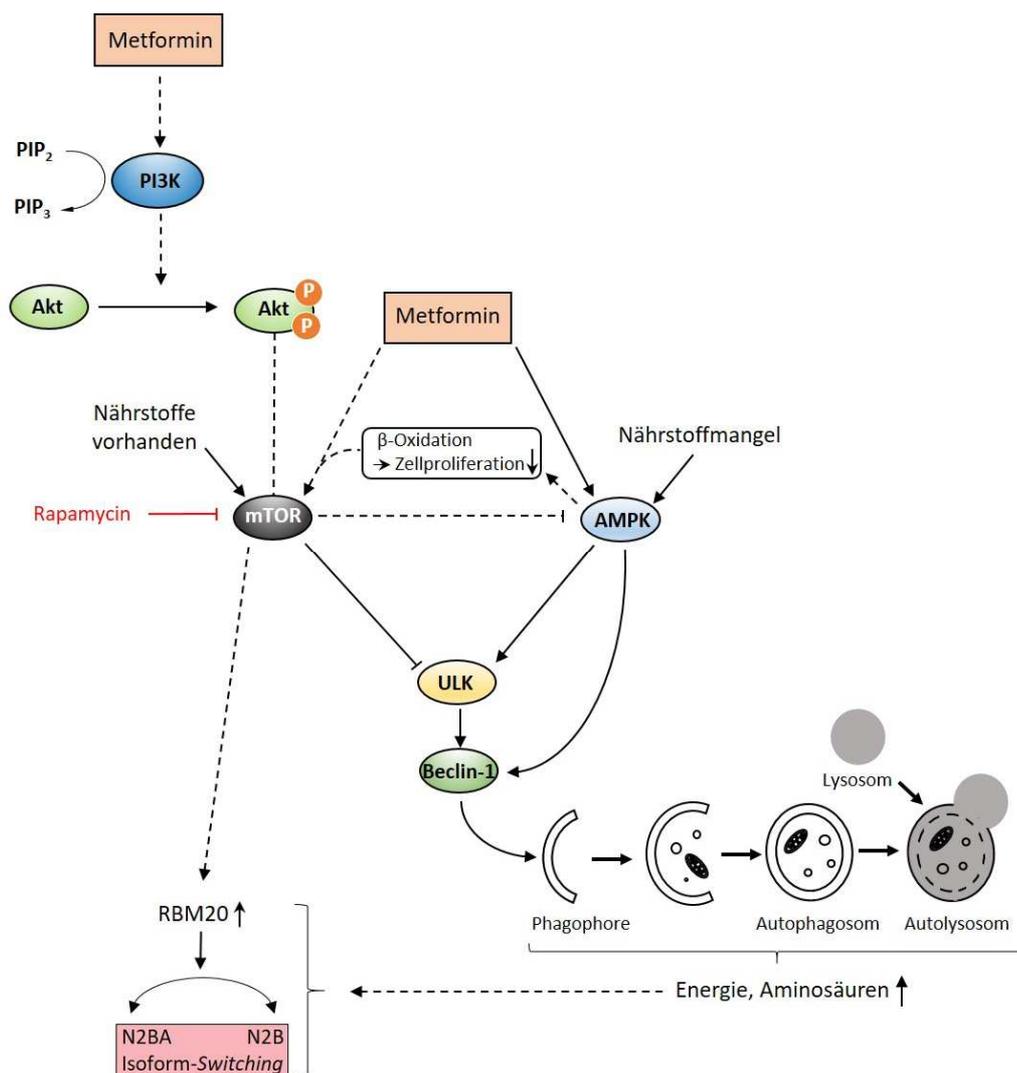


Abb. 19: Überblick über die mögliche Metformin-Signalingebung in Bezug auf den Titin-Isoformen-Switch. In ERC bewirkte MET-Stimulation eine Aktivierung von Akt (Thr308 und Ser473). Die nachgeschaltete Kinase mTOR wird vermutlich von multiplen Faktoren beeinflusst und inhibiert womöglich bei aktiver β -Oxidation und reduzierter Zellproliferation den Autophagie-Prozess. Die Metformin-aktivierte AMP-Kinase fungiert zwar als Autophagie-Induktor, mTOR-Aktivierung wirkt in Bezug auf ULK bei Aminosäureverfügbarkeit jedoch dominant (Hur und Lee, 2015; Feng et al., 2014; Chan, 2012). AMPK ist zudem in der Lage, Beclin-1 direkt zu phosphorylieren (Zhang et al., 2016). Bei aktivierter Autophagie könnte es zu einem erhöhten Proteinumsatz und verstärkter RBM20-Expression kommen. Die erhöhte Spleiß-Aktivität könnte einen modifizierten Titin-Isoformen-Switch bewirken. Für Insulin konnte eine Verbindung zwischen mTOR und RBM20 identifiziert werden, für Metformin konnte diese hier nicht bestätigt werden.

5.6 Schlussfolgerung

Die Metformin-Wirkung ist in ihrer Komplexität noch nicht vollends verstanden. So ist davon auszugehen, dass Metformin je nach Gewebe vermutlich über unterschiedliche Wirkmechanismen zu verschiedenen Effekten führt (An und He, 2016; Natali und Ferrannini, 2006; Hur und Lee, 2015). Der Metformin-Effekt auf die kardiale Titin-Isoform-Komposition differierte je nach Kultivierungsdauer und ist damit vermutlich vom Entwicklungsstadium der ERC abhängig. Möglicherweise findet, ähnlich wie unter *in vivo* Bedingungen, auch in diesem Versuchsaufbau ein metabolischer Switch von embryonaler Glykolyse hin zur Energiegewinnung durch β -Oxidation statt, was eine reduzierte Proliferationsfähigkeit der ERC mit sich bringt (Chung et al., 2007; 2010; Lopaschuk und Jaswal, 2010). Diese metabolischen und proliferativen Veränderungen bedingen womöglich den veränderten Effekt von Metformin auf die Zusammensetzung der Titin-Isoformen. Die dafür verantwortlichen Signalkaskaden unterliegen vermutlich komplexen Wechselwirkungen (Abb. 19). Die durch Metformin aktivierte AMP-Kinase bewirkt zu den frühen Kultivierungszeitpunkten bei erhaltener Proliferationsfähigkeit der ERC vermutlich in der Summe eine Autophagie-Induktion, was zu erhöhtem Proteinumsatz führt. So könnten vermehrt Energie und Aminosäuren zur Verfügung stehen, was eine gesteigerte RBM20-Proteinexpression ermöglicht und durch vermehrte Spleiß-Aktivität einen höheren N2B-Anteil am Gesamt-Titin zur Folge hat. AMPK stimuliert ebenfalls - hier vermutlich nach etwa 5 Tagen in Kultur - die Fettsäureoxidation (Russell et al., 1999; Winder und Hardie, 1999; Wang et al., 2011). Unter diesen veränderten metabolischen Bedingungen wird vermutlich auch die Proliferationsfähigkeit der ERC eingeschränkt (Lopaschuk und Jaswal, 2010). Möglicherweise infolgedessen, führte Metformin in ERC zu einer Aktivierung von mTOR, was wiederum vermutlich eine Inhibition der Autophagie nach sich zieht (Jung et al., 2010). Im Umkehrschluss könnte dies zur geringen Energie- und Aminosäuren-Bereitstellung führen und den signifikant verringerten N2B-Anteil in nicht mehr proliferierenden ERC erklären.

Aller Voraussicht nach wird auf die Metformin-Signalkaskaden in Bezug auf den Titin-Isoformen-*Switch* durch zahlreiche weitere Rahmenbedingungen Einfluss genommen. So spielt vermutlich unter anderem die Nährstoffversorgung der Zelle eine entscheidende Rolle (Jung et al., 2010; Hale et al, 2013), was Metformin-vermittelte Autophagie-Steuerung angeht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Metformin-Wirkung nicht nur je nach Gewebe und Zelltyp unterscheidet, sondern auch in ein und derselben Zelle je nach Metabolismus und Nährstoffversorgung unterschiedliche Effekte bewirken kann.

6 Literaturverzeichnis

- Agarkova, I., Perriard, J.C. **(2005)**. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 15(9):477-485.
- Aljada, A., Mousa, S.A. **(2012)**. Metformin and neoplasia: implications and indications. *Pharmacol. Therapeut.* 133:108-115.
- An, H., He, L. **(2016)**. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J. of Endocrinol.* 228:97-106.
- Andersson, C., Sogaard, P., Hoffmann, S., Hansen, P.R., Vaag, A., Major-Pedersen, A., Fritz, T.F., Bech, J., Kober, J., Torp-Pedersen, C., Gislason, G.H. **(2010)**. Metformin is associated with improved left ventricular diastolic function measured by tissue Doppler imaging in patients with diabetes. *European Journal of Endocrinology.* 163:593-599.
- Bang, M.L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A.J., Gotthard, M., Mc-Nabb, M., Witt, C.C., Labeit, D., Gregorio, C.C., Granzier, H., Labeit, S. **(2001)**. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.* 89:1065-1073.
- Barriere, H., Nemes, C., Du, K., Lukacs, G.L. **(2007)**. Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol. Biol. Cell.* 18:3952-3965.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., Johansen, T. **(2009)**. Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 452:181-197.
- Bonaldo, P., Sandri, M. **(2013)**. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model Mech.* 6:25-39.
- Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith-Fickas, K., Xiong, L., Cole, R.N., Radovick, S., Wondisford, F.E., He, L. **(2014)**. Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* 289:30.

- Cazorla, O., Freiburg, A., Helmes, M., Centner, T., McNabb, M., Wu, Y., Trombitás, K., Labeit, S., Granzier, H. **(2000)**. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ. Res.* 86:59-67.
- Chan, E.Y. **(2012)**. Regulation and function of Uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 17:775–785.
- Chen, S., Zhou, L., Zhang, Y., Leng, Y., Pei, X.-Y., Lin, H., Jones, R., Orlowski, R.Z., Dai, Y., Grant, S. **(2014)**. Targeting SQSTM1/p62 induces cargo loading failure and converts autophagy to apoptosis via NBK/Bik. *Mol. Cell. Biol.* 34:3435-3449.
- Chung, S., Arrell, K., Faustino, R.S., Terzic, A., Dzeja, P.P. **(2010)**. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48:725-734.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., Terzic, A. **(2007)**. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4:60-67.
- Dennis, P.B., Fumagalli, S., Thomas, G. **(1999)**. Target of rapamycin (mTOR): balancing the opposing forces protein synthesis and degradation. *Current Opinion in Genetics & Development.* 9:49-54.
- Ehler, E., Gautel, M. **(2008)**. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 642:1-14
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., Leverve, X. **(2000)**. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275:223-228.
- Exton, J.H. **(1972)**. Gluconeogenesis. *Metabolism.* 21:945-990.
- Fang, Z.Y., Prins, J.B., Marwick, T.H. **(2004)**. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 25:543-567.
- Feng, Y., Ke, C., Tang, Q., Dong, H., Zheng, X., Lin, W., Ke, J., Huang, J., Yeung, S.-C.J., Zhang, H. **(2014)**. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death and Disease.* 5:E1088.

- Fischer, Y., Thomas, J., Rösen, P., Kammermeier, H. **(1995)**. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology*. 136:412-420.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., Viollet, B. **(2010)**. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* 120:2355-2369.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougère, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J.S., Gregorio, C.C., Granzier, H., Labeit, S. **(2000)**. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ. Res.* 86:1114-1121.
- Fürst, D.O., Osborne, M., Nave, R., Weber, K. **(1988)**. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell Biol.* 106:1563-1572
- Gautel, M. **(2011)**. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch.* 462:119-134.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., Hardie, D.G. **(2013)**. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metabolism*. 18:556-566.
- Granzier, H., Kellermayer, M., Helmes, M., Trombitás, K. **(1997)**. Titin elasticity and mechanism of passive force development in cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophys. J.* 73:2043-2053.
- Granzier, H., Irving, T.C. **(1995)**. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys. J.* 68:1027-1044.
- Greaser, M.L., Berri, M., Warren, C.M., Mozdziak, P.E. **(2002)**. 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.* 23 (5-6):473-482.

- Gundewar, S. Calvert, J.W., Jha, S., Toedt-Pingel, I., Ji, S.Y., Nunez, D., Ramachandran, A., Anaya-Cisneros, M., Tian, R., Lefer, D.J. **(2009)**. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ. Res.* 104:403-411.
- Guo, W., Schafer, S., Greaser, M.L., Radke, M.H., Liss, M., Govindarajan, T., Maatz, H., Schulz, H., Li, S., Parrish, A.M., Dauksaite, V., Vakeel, P., Klaassen, S., Gerull, B., Thierfelder, L., Regitz-Zagrosek, V., Hacker, T.A., Saupe, K.W., Dec, G.W., Ellinor, P.T., MacRae, C., Spallek, B., Fischer, R., Perrot, A., Özcelik, C., Saar, K., Hubner, N., Gotthardt, M. **(2012)**. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nature Medicine.* 18:766-773.
- Hale, A.N., Ledbetter, D.J., Gawriluk, T.R., Rucker, E.B. **(2013)**. Autophagy regulation and role in development. *Landes Bioscience.* 9:951-972.
- Hardie, D.G. **(2011)**. AMPK and autophagy get connected. *EMBO J.* 30:634-635.
- He, L., Sabet, A., Djedjos, S., Miller, R., Sun, X., Hussain, M.A., Radovick, S., Wondisford, F.E. **(2009)**. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis by inhibiting cAMP signaling through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell.* 137:635-646.
- He, L., Wondisford, F.E. **(2015)**. Metformin action: concentrations matter. *Cell Metabolism.* 21:159-162.
- Hollunger, G. **(1955)**. Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacologica et Toxicologica.* 11:1-84.
- Hong, J., Zhang, Y., Lai, S., Lv, A., Su, Q., Dong, Y., Zhou, Z., Tang, W., Zhao, J., Cui, L., Zou, D., Wang, D., Li, H., Liu, C., Wu, G., Shen, J., Zhu, D., Wang, W., Shen, W., Ning, G. **(2013)**. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care.* 36:1304-1311.
- Horowitz, R., Maruyama, K., Podolsky, R.J. **(1989)**. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J.CellBiol.*109, 2169–2176.

- Hundal, R.S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S.E., Schumann, W.C., Petersen, K.F., Landau, B.R., Shulman, G.I. **(2000)**. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 49(12):2063-2069.
- Hur, K.Y., Lee, M.-S. **(2015)**. New mechanisms of metformin action: focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig*. 6:600-609.
- Huxley, H., Hanson, J. **(1954)**. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173:973-976.
- Jacobs, E., Tamayo, T., Rathmann, W. **(2017)**. Epidemiologie des Diabetes in Deutschland. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017 Die Bestandsaufnahme. 2017:10-21.
- Johnson, J.A. Majumdar, S.R., Simpson, S.H., Toth, E.L. **(2002)**. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 25:2244-2248.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., Kim, D.-H. **(2010)**. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 584:1287-1295.
- Kapuy, O., Vinod, P.K., Bánhegyi, G. **(2014)**. mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress – an experimental and modeling study. *FEBS Open Bio*. 4:704-713.
- King, P., Peacock, I., Donnelly, R. **(1999)**. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 48:643-648.
- Klein, I., Ojamaa, K. **(2001)**. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med*. 344:501-509.
- Knappeis, G.G., Carlsen, F. **(1968)**. The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle. *J. Cell Biol*. 38:202-211.
- Kötter, S., Andresen, C., Krüger, M. **(2014)**. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol. Chem*. 395:1341-1352.

- Krüger, M., Babicz, K., von Frieling-Salewsky, M., Linke, W.A. **(2010)**. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 48:910-916.
- Krüger, M., Kötter, S. **(2016)**. Titin, a central mediator for hypertrophic signaling, exercise-induced mechanosignaling and skeletal muscle remodeling. *Front. Physiol.* 7:76.
- Krüger, M., Linke, W.A. **(2011)**. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 286:12.
- Krüger, M., Sachse, C., Zimmermann, W.H., Eschenhagen, T., Klede, S., Linke, W.A. **(2008)**. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidyl-3-kinase/AKT pathway. *Circ. Res.* 102:439-447.
- Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., Trinick, J. **(1992)**. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* 11:1711-1716.
- Labeit, S., Kolmerer, B. **(1995)**. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270:293-296.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A. **(2013)**. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews*. 14:759-774.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B., Gautel, M. **(2005)**. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*. 308:1599-1603.
- LeWinter, M.M., Yiming, W., Labeit, S., Granzier, H. **(2007)**. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clinica Chimica Acta* 375:1-9.
- Linke, W., Hamdani, N. **(2014)**. Gigantic business titin properties and function through thick and thin. *Circ. Res.* 114:1052-1068.
- Linke, W., Ivemyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Rüegg, J.C., Labeit, S. **(1996)**. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J. Mol Biol.* 261:62-71.

- Linke, W., Rudy, D.E., Centner, T., Gautel, M., Witt, C., Labeit, S., Gregorio, C.C. **(1999)**. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J. Cell Biol.* 146:631-644.
- Linke, W.A., Popov, V.I., Pollack, G.H. **(1994)**. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophysical J.* 67:782-792.
- Liu, Y., Zhang, Y., Jia, K., Dong, Y., Ma, W. **(2015)**. Metformin inhibits the proliferation of A431 cells by modulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Exper. Therapeut. Med.* 9:1401-1406.
- Lopaschuk, G.D., Jaswal, J.S. **(2010)**. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 56:130-140.
- Ma, X.M., Blenis, J. **(2009)**. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews.* 10:307-318.
- Makarenko, I., Opitz, C.A., Leake, M.C., Neagoe, C., Kulke, M., Gwathmey, J.K., del Monte, F., Hajjar, R.J., Linke, W.A. **(2004)**. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ. Res.* 95:708-716.
- Marín-Peñalver, Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Javier, del Cañizo-Gómez, F.J. **(2016)**. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 7:354-395.
- Maruyama, K. **(1995)**. Birth of the sliding filament concept in muscle contraction. *J. Biochem.* 117:1-6.
- Matthaei, S., Bierwirth, R., Fritsche, A., Gallwitz, B., Häring, H.-U., Joost, H.-G., Kellerer, M., Kloos, C., Kunt, T., Nauck, M., Scherthaner, G., Siegel, E., Thienel, F. **(2009)**. Medikamentöse antihyperglykämische Therapie des Diabetes mellitus Typ2; Update der Evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft. *Diabetologie.* 4:32-64.
- Mazurek, S., Eigenbrodt, E. **(2003)**. The tumor metabolome. *Anticancer Res.* 23:1149-1154.

- Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C.B., Vaupel, P., Eigenbrodt, E. **(2002)**. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Brit. J. Nutr.* 87:23-29.
- Mizushima, N., Komatsu, M. **(2011)**. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 147:728-741.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. **(2007)**. How to interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy.* 3:542-545.
- Nair, V., Sreevalsan, S., Basha, R., Abdelrahim, M., Abudayyeh, A., Hoffmann, A.R., Safe, S. **(2014)**. Mechanism of metformin-dependent inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Ras activity in pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* 289:27692-27701.
- Natali, A., Ferrannini, E. **(2006)**. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia.* 49:434-441.
- Neagoe, C., Kulke, M., del Monte, F., Gwathmey, J.K., de Tombe, P.P., Hajjar, R.J., Linke, W.A. (2002). Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circ.* 106:1333-1341.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., Kemp, B.E. **(2011)**. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science.* 332:1433-1435.
- Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V., Linke, W.A. **(2004)**. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal Heart. *Circ. Res.* 94:967-975.
- Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P. **(2000)**. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348:607-614.
- Prado, L.G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C.A., Linke, W. **(2005)**. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J. Gen. Physiol.* 126:461-480.
- Pyle, W.G., Solaro, R.J. **(2004)**. At the crossroads of myocardial signaling the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* 94:296-305.

- Ripsin, C.M., Kang, H., Urban, R.J. **(2009)**. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am. Fam. Physician.* 79:29-36.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chan, Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., Guan, K.-L. **(2013)**. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15:741-750.
- Russell, R.R. III, Bergeron, R., Shulman, G.I., Young, L.H. **(1999)**. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 277:H643-649.
- Sandri, M. **(2013)**. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *J. Biochem. Cell Biol.* 45:2121-2129.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I. **(2013)**. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation.* 20:21-30.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Montminy, M., Cantley, L.C. **(2005)**. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 310:1642-1646.
- Shibutani, S.T., Yoshimori, T. **(2014)**. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 24:58-68.
- Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich, J.E. **(1995)**. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 333(9):550-554.
- Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., Senga, Y., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Kasuga, M. **(2010)**. Role of KLF 15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes.* 59:1608-1615.
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. **(2008)**. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.* 445:77-88.
- Thrower, J.S., Hoffmann, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. **(2000)**. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94-102.

- Tian, L.-F., Li, H.-Y., Jin, B.-F., Pan, X., Man, J.-H., Zhang, P.-J., Li, W.-H., Liang, B., Liu, H., Zhao, J., Gong, W.-L., Zhou, T., Zhang, X.-M. **(2006)**. MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 345:355-361.
- Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., Gounon, P., Allegra, M., Bertolotto, C., Bereder, J.M., Tartare-Deckert, S., Bahadoran, P., Auberger, P., Ballotti, R., Rocchi, S. **(2011)**. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* 2:e199.
- Trombitás, K., Greaser, M., Labeit, S., Jin, J.P., Kellermayer, M., Helmes, M., Granzier, H. **(1998)**. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and unfolded molecular segments. *J. Cell Biol.* 140:853-859.
- Tskhovrebova, L., Trinick, J. **(2010)**. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:612482.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group **(1998)**. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352:854-865.
- Wang, X.-F., Zhang, J.-Y., Li, L., Zhao, X.-Y., Tao, H.-L., Zhang, L. **(2011)**. Metformin improves cardiac function in rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Clin. Exper. Pharm. Physiol.* 38:94-101.
- Watanabe, C.K. **(1918)**. Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *J. Biol. Chem.* 33:253-265.
- Wilcock, C., Bailey, C.J. **(1994)**. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica.* 24:49-57.
- Winder, W.W., Hardie, D.G. **(1999)**. AMP-activated kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277:E1-10.
- Witt, S.H., Granzier, H., Witt, C.C., Labeit, S. **(2005)**. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol.* 350:713-722.

- Wong, P.-M., Feng, Y., Wang, J., Shi, R., Jiang, X. **(2015)**. Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nature Com.* 6:8048. DOI: 10.103
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., Saiu, P., Howell, S.A., Aasland, R., Martin, S.R., Carling, D., Gamblin, S.J. **(2011)**. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature.* 472:230-233.
- Yang, J., Holman, G.D. **(2006)**. Long-term metformin treatment stimulates cardiomyocyte glucose transport through an AMP-activated protein kinase-dependent reduction in GLUT4 endocytosis. *Endocrinology.* 147:2728-2736.
- Yin, M., van der Horst, I.C.C., van Melle, J.P., Qian, C., van Gilst, W.H., Silljé, H.H.W., de Boer, R.A. **(2011)**. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301:H459-H468.
- Zakikhani, M., Blouin, M.-J., Piura, E., Pollak, M.N. **(2010)**. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 123:271-279.
- Zhang, D., Wang, W., Sun, X., Xu, D., Wang, C., Zhang, Q., Wang, H., Luo, W., Chen, Y., Chen, H., Liu, Z., **(2016)**. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy.* 12:1447-1459.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. **(2001)**. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108:1167-1174.
- Zhu, C., Yin, Z., Tan, B., Guo, W. **(2017)**. Insulin regulates pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta.* 1863:2363-2371.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Auch für die Teilnahme an der European Muscle Conference möchte ich mich herzlich bedanken. Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Schmitt und an die Mitglieder des Prüfungskomitees der Medizinischen Fakultät für die Begutachtung meiner Arbeit. Ein besonderer Dank geht an Dr. Sebastian Kötter (Sepp), der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, für die Durchsicht meiner Arbeit und für überaus hilfreiche Kommentare und Ratschläge. Auch möchte ich mich herzlich bei Sabine bedanken, die mich nicht nur bei der Laborarbeit großartig unterstützt hat, sondern auch mit guten Gesprächen außerhalb des Labors. Für die immer gute Stimmung und die tolle Zusammenarbeit möchte ich mich außerdem bei Gosia, Lukas und der gesamten Arbeitsgruppe Krüger bedanken, mit denen die Laborarbeit immer leichtfiel. Senem gilt ebenfalls ein besonderer Dank für die großartige Zusammenarbeit im Labor und für unsere Freundschaft.

Damit möchte ich ganz besonders Rafael danken, den ich ohne diese Doktorarbeit nie kennengelernt hätte und der mich jeden Tag aufs Neue bedingungslos unterstützt. Allen voran möchte ich meiner Familie danken: meiner Schwester Eva, die ausnahmslos zu mir hält und mir schon immer ein Vorbild war. Insbesondere dankbar bin ich meinen Eltern, die immer für mich da sind, mir Rückhalt geben und auf die ich mich immer verlassen kann.