

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

**Der Einfluss eines hyperkaliämischen Zellarrests auf die
Degradation und den Isoform-*Switch* des Titinfilaments in
embryonalen Rattenkardiomyozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Jakob Béla Schalla
2021

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

gez.:

Dekan:	Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin:	Prof. Dr. Martina Krüger
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Joachim Schmitt

Zusammenfassung

Die longitudinalen Myofibrillen der Muskulatur lassen sich in transversale kontraktile Einheiten, genannt Sarkomere, unterteilen. Das Grundgerüst dieser Sarkomere basiert neben Aktin und Myosin auf dem Strukturprotein Titin, welches im Herzen in der längeren und elastischeren N2BA- und der kürzeren und steiferen N2B-Isoform koexprimiert wird. Hier erfolgt perinatal neben dem Abbau der fötalen N2BA-Isoform ein Isoform-*Switch* zugunsten der steiferen N2B-Form, weshalb insbesondere in embryonalen Kardiomyozyten ein erhöhter Turnover des Titinfilaments stattfindet. Dieser basiert vermutlich auf einer Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und Autophagie. Jener Turnover sollte in unserem Ansatz über mechanische Arretierung und Induktion der zellulären Protein Qualitätskontrollmechanismen herbeigeführt werden, wobei die Inaktivierung zudem einen akzelerierenden Effekt auf den Titinisoform-*Switch* besitzen könnte. Hierfür haben wir das Modell der embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) gewählt und die spontane Kontraktion der Zellen durch Kultivierung in einem hyperkaliämischen Nährmedium ab Tag 1 mechanisch unterbunden. Dabei bieten ERC aufgrund ihrer hohen Kontraktionsfrequenz und des ausgeprägten Titinisoform-*Switchs* die idealen Versuchsbedingungen. Während die Degradation und Isoform-Komposition des Titins per SDS-Gelelektrophorese detektiert wurde, quantifizierten wir repräsentative Abbaumarker durch Western Blots und stellten diese zusätzlich durch immunhistochemische Färbung dar.

Tatsächlich wiesen die arretierten Kardiomyozyten eine verstärkte Titin-Degradation auf und präsentierten zudem einen reduzierten Titin-Gehalt. Neben der erhöhten K48- und K63-Ubiquitinierung des Titinfilaments konnte in den Versuchszellen eine erhöhte Anzahl an Proteasomen und eine verstärkte Autophagie-Aktivität nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich der Titinisoform-*Switch* in den arretierten ERC beschleunigt. Hierbei könnte fehlende muskuläre Nutzung die beobachtete Degradation des Titinfilaments erklären, wobei Titin im Vergleich zu anderen Sarkomerproteinen bevorzugt abgebaut wurde. Dies wird in den arretierten Kardiomyozyten nach erfolgter Ubiquitinierung des Titinfilaments vermutlich durch komplementäre Aktivierung des UPS und der Autophagie vermittelt. Des Weiteren könnte der beschleunigte Titinisoform-*Switch* auf den vermehrten Abbau der embryonalen N2BA-Isoform und den reaktiven Einbau der N2B-Bande zurückgeführt werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der Zellarrest vermutlich über Beteiligung des UPS und Autophagie zu einem erhöhten Abbau des Titinfilaments und zeitgleich zu einem beschleunigten Isoform-*Switch* führt.

Abstract

The longitudinal myofibrils of the musculature can be subdivided into transverse contractile units, called sarcomeres. In addition to actin and myosin, the backbone of these sarcomeres is based on the giant protein titin, which is co-expressed in the heart in the longer and more elastic N2BA- and the shorter and stiffer N2B-isoform. In addition to the perinatal degradation of the fetal N2BA-form an isoform-switch in favor of the stiffer N2B-isoform occurs. Therefore, an increased turnover of the titin filament takes place, especially in embryonic cardiomyocytes. Here, evidence suggests an involvement of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy. As there is little known about this process, we wanted to investigate the breakdown of the titin filament in more detail. Via mechanical arrest we induced an increased turnover of the titin filament by activation of the protein quality control, which could also affect the titin-isoform-switch. For this purpose, we chose the embryonic rat cardiomyocyte (ERC) model and mechanically prevented spontaneous contraction of the cells by culturing them in a hyperkalemic growth medium from day 1. Here, ERCs provide the ideal experimental conditions because of their high contraction frequency and pronounced titin-isoform-switch. While titin-degradation and isoform-composition were detected by SDS gel-electrophoresis, we quantified the degradation markers by Western blots and visualized them by additional immunohistochemical staining. Indeed, arrested cardiomyocytes showed an enhanced titin degradation signal and reduced titin content. In addition to increased K48- and K63-ubiquitination of the titin filament, enhanced levels of proteasomes and amplified autophagic activity were detected in the experimental cells. Moreover, the titin-isoform-switch was shown to be accelerated in arrested ERCs. Lack of muscular utilization could explain the observed degradation of the titin filament, with titin being preferentially degraded compared with other sarcomeric proteins. This is presumably mediated in arrested cardiomyocytes after successful ubiquitination of the titin filament by complementary activation of the UPS and autophagy. Furthermore, the accelerated titin-isoform-switch could be attributed to increased degradation of the embryonic N2BA-isoform and increased incorporation of the N2B-band. Thus, it can be concluded that the cardioplegic cell arrest probably leads to increased degradation of the titin filament and an accelerated isoform-switch due to enhanced proteasomal and autophagosomal activity.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B, Gene: AKT1,2 und 3
ATG	<i>Autophagy-related-gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphat</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphat</i>
CTRL	Kontrolle (<i>control</i>)
D	Tag (<i>day</i>)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ERC	<i>Embryonic rat cardiomyocytes</i>
Et al.	<i>Et alii</i> (und andere)
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HFpEF	<i>Heart failure with preserved ejection fraction</i>
I-Band	Isotropes Band
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
KCl	Kaliumchlorid

LAMP	<i>Lysosomal-associated-membrane-protein</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein light-chain3</i>
LIR	<i>LC3-interacting-region</i>
M-Band/M-Linie	Mittel-Band/Mittel-Linie
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
Mdm2	<i>Mouse-double-minute 2</i>
µL	Mikroliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MuRF	<i>Muscle RING-finger protein</i>
mV	Millivolt
N2-Bus	<i>N2-B unique sequence</i>
NaCl	Natriumchlorid
Nbr1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
nm	Nanometer
Page	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PQC	<i>Protein quality control</i>
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA/PKC/PKD	Proteinkinase A/C/D

p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RBM20	<i>RNA binding motif protein 20</i>
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Rpn	<i>Regulatory particle non ATPase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i>)
SQSTM1	<i>Sequestosome1</i>
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTN	Titin-Gen
T3	Trijodthyronin
UBD	Ubiquitin-bindende Domäne
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Herz	1
1.2 Die Muskulatur	1
1.2.1 Aufbau der Muskulatur	2
1.2.2 Muskelkontraktion	3
1.3 Eigenschaften des Titinfilaments	4
1.3.1 Isoformen und Struktur Titins	4
1.3.2 Funktion des Titinfilaments	6
1.4 Zelluläre Abbausysteme	8
1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	8
1.4.2 Autophagie	10
1.4.2.1 Autophagosomale Mechanismen	11
1.5 Pathologien der PQC.....	13
1.6 Interaktion des Titinfilaments mit der PQC	14
1.7 Apoptose.....	16
1.8 Kardioplegie	17
1.9 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten	22
2.1.4 Laborgeräte	22
2.1.5 Antikörper	23

2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten	24
2.2.2	Proteinbiochemie	25
2.2.2.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.2.2	Imperial Protein Stain	27
2.2.2.3	Western Blot	27
2.2.2.4	Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen	28
2.2.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	28
2.2.2.4.2	BCA-Proteinbestimmung	29
2.2.3	Immunhistochemie	29
2.2.3.1	Fixierung und Färbung	29
2.2.4	Caspase 3/7 Assay	30
2.2.5	Software	30
2.2.6	Datenanalytische Statistik	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Hyperkaliämie induziert eine vermehrte Degradation des Titinfilaments	31
3.2	Polyubiquitinierung des Titinfilaments wird durch mechanische Arretierung getriggert.....	34
3.3	PSMA2-Proteinlevel sind in den Versuchszellen erhöht	35
3.4	ERC besitzen bei Inaktivierung reduzierte p62-Proteinlevel	36
3.5	Arretierte Kardiomyozyten weisen keine veränderte Immunhistochemie auf	38
3.6	Kultivierung in hyperkaliämischem Medium nimmt keinen Einfluss auf die Zellvitalität	41
3.7	Arretierung beschleunigt den Titinisoform-Switch kultivierter embryonaler Rattenkardiomyozyten	42
3.8	Arretierung von ERC ab Tag 7 bewirkt am Titinfilament keine Veränderung	44
4	Diskussion	46
4.1	Mechanische Inaktivierung induziert die Degradation des Titinfilaments und führt zu reduziertem Titin-Gehalt	46

4.2	Die kardioplegisch arretierten Versuchszellen weisen eine erhöhte Titin-Ubiquitinierung auf	47
4.3	Die Inaktivierung der Kardiomyozyten führt zu erhöhten PSMA2- und erniedrigten p62-Leveln	48
4.4	Der Degradation des Titinfilaments liegt keine Aktivierung der zellulären Apoptose zugrunde	50
4.5	Hyperkaliämie beschleunigt bei embryonalen Rattenkardiomyozyten den Titinisoform-Switch	51
4.6	Die mechanische Inaktivierung der ERC ab Tag 7 hat keinen Einfluss auf den Abbau und die Isoform-Komposition Titins	53
4.7	Schlussfolgerung	54
5	Literaturverzeichnis	57

1 Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz bildet zusammen mit den nachgeschalteten Gefäßen das kardiovaskuläre System und versorgt als physiologische Pumpe den Körper mit Blut (Sequeira and van der Velden, 2015). Es besteht aus drei Schichten, dem inneren epithelialen Endokard, dem dicken Myokard und dem äußeren Epikard, welches aus Fett- und Bindegewebe gebildet wird. Das Myokard enthält hauptsächlich mechanisch und elektrisch gekoppelte Kardiomyozyten, die durch ihre Integrität eine geordnete Herzerregung ermöglichen. (Onwuka et al., 2018).

Makroskopisch ist das Herz aus zwei Vorhöfen (Atrium) und zwei Kammern (Ventrikel) aufgebaut. Hierbei garantieren zwei Segelklappen zwischen Atrium und Ventrikel, sowie zwei Taschenklappen zwischen Ventrikel und Gefäßsystem einen orthograden Blutfluss (Onwuka et al., 2018). Der Sinusknoten generiert als Schrittmacher des Herzens rhythmisch und spontan Aktionspotentiale, die durch elektrophysiologische Weiterleitung zu den Ventrikeln eine synchronisierte Herzarbeit gewährleisten (Onwuka et al., 2018) und den Herzzyklus mit Diastole und Systole koordinieren (Sequeira and van der Velden, 2015). Das in der Systole ausgeworfene Herzzeitvolumen kann physiologisch durch den Frank-Starling-Mechanismus, Veränderung der Herzfrequenz und Herzkraft oder der Nachlast an verschiedenste Bedingungen angepasst werden (Sequeira and van der Velden, 2015). Eine Dysfunktion des Herzens kann zu Herzinsuffizienz führen, einer multifaktoriellen Krankheit, die durch inadäquate kardiale Kontraktion zu einer reduzierten Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Körpers sowie zur Akkumulation von Stoffwechselprodukten führt (Stienen, 2015). Ätiologisch wird Herzinsuffizienz hauptsächlich durch ischämische Herzkrankheiten, Klappenerkrankungen (Onwuka et al., 2018) und Kardiomyopathien ausgelöst (van der Velden et al., 2015).

1.2 Die Muskulatur

Muskulatur macht im menschlichen Körper circa 40% des Körpergewichts aus und enthält 50-75% aller Proteine (Frontera and Ochala, 2015). Die Hauptfunktion der Muskulatur liegt in der Transduktion von chemischer in mechanische Energie und somit in der Generierung von Kraft und Bewegung. Zusätzlich erfüllt sie metabolische Aufgaben, so kann beispielsweise durch Sezernierung von Aminosäuren bei hypoglykämischen Zuständen und Nahrungskarenz die Blutglukosekonzentration aufrechterhalten werden (Wolfe, 2006). Dementsprechend sind Muskeln kein statisches Konstrukt; ständiger Proteinaustausch sowie mechanische und metabolische Muskelbeanspruchung führen zu einer

kontinuierlichen Adaption (Henderson et al., 2017). Faktoren wie Ernährungs- und Hormonstatus, körperliche Aktivität und Krankheiten beeinflussen den muskulären Proteinmetabolismus und somit die Muskelmasse des Körpers. Eine Reduktion der Muskelmasse schränkt im Umkehrschluss die Reaktionsfähigkeit des Körpers auf Stress und pathologische Veränderungen ein (Frontera and Ochala, 2015).

1.2.1 Aufbau der Muskulatur

Die Muskelmasse des Körpers differenziert sich in quergestreifte und glatte Muskulatur, wobei sich erstere in Herz- und Skelettmuskulatur unterteilt (Sweeney and Hammers, 2018). Myozyten der quergestreiften Muskulatur bestehen aus parallel arrangierten, longitudinalen Myofibrillen, die transversal in kontraktile Einheiten, genannt Sarkomere, unterteilt werden (Lopes and Elliott, 2014). Mutationen im sarkomerischen Zytoskelett sind mit schwerwiegenden Pathologien assoziiert und können über eine beeinträchtigte kontraktile Funktion kardiale oder skelettale Myopathien verursachen (Henderson et al., 2017). Diese Veränderungen führen im Herzen zu hypertrophen, dilatativen und restriktiven Kardiomyopathien (HCM, DCM, RCM), während Skelettmuskeln muskuläre Dystrophien wie die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) entwickeln (Henderson et al., 2017).

Ein einzelnes Sarkomer lässt sich in eine Z-Scheibe, ein zentrales anisotropes Band (A-Band), zwei halbe flankierende isotrope Bänder (I-Band) und ein Mittel-Band (M-Linie) unterteilen (Abb. 1). Im Elektronenmikroskop erscheint das I-Band weniger dicht, da hier lediglich die bis zum A-Band reichenden, dünnen Aktinfilamente vorliegen. Die proteinreiche Z-Scheibe verankert die Aktinfilamente und transduziert die generierte Kraft entlang der Myofibrille (Sweeney and Hammers, 2018). Während das I-Band durch die variable Länge des I-Band-Titins hauptsächlich zur Elastizität des Sarkomers beiträgt (Kötter et al., 2014, Krüger and Kötter, 2016), fungiert das A-Band durch das Motorprotein Myosin als zentrale Region der Kraftentwicklung. Hier liegt Myosin zusammen mit Aktin und Titin vor, weshalb es im Elektronenmikroskop dichter wirkt. Im Zentrum des A-Bandes befindet sich die M-Linie, die über Quervernetzungen die dicken Myosinfilamente miteinander verbindet und die Struktur des Sarkomers stabilisiert (Sweeney and Hammers, 2018). Weitere Bestandteile des Sarkomers sind der an Aktin gebundene regulierende Tropomyosin/Troponin-Komplex und das Titinfilament (Kötter et al., 2014).

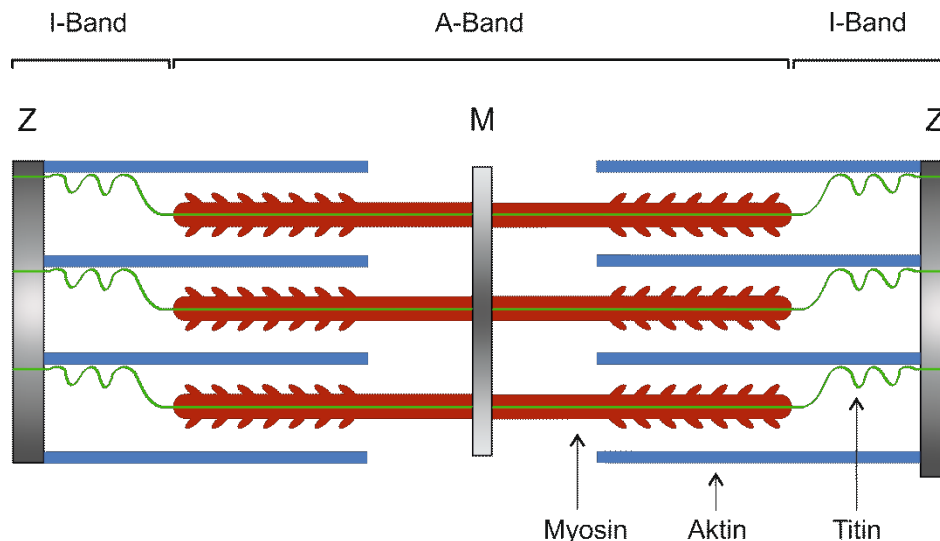


Abb. 1: Schematische Darstellung des Sarkomers: Die Muskelfilamente Aktin und Myosin ermöglichen durch gegenläufiges Verschieben die Muskelkontraktion. Das Titinfilament erstreckt sich innerhalb eines Halbsarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Das dichte A-Band setzt sich aus Myosin, Aktin und Titin zusammen, wobei im Bereich der M-Linie (M) die Quervernetzung der Myosinmoleküle erfolgt. Flankiert wird es auf beiden Seiten durch das I-Band, welches Aktin und Titin enthält. Beide Filamente sind im Bereich der Z-Scheibe (Z) verankert.

1.2.2 Muskelkontraktion

Eine durch ein Aktionspotential generierte Muskelkontraktion beinhaltet die Verschiebung von Aktin- und Myosinfilamenten. Die Assoziation, Kontraktion und Dissoziation von Aktin und Myosin wird Querbrückenzyklus genannt (Lopes and Elliott, 2014). Nachdem im Zuge eines Aktionspotentials Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird (Sweeney and Hammers, 2018), bindet es an niederaffine Bindungsstellen der Troponin-Untereinheit TnC (Sweeney and Hammers, 2018, Gillis et al., 2007, Langer, 1992). Eine Calcium-Bindung initiiert im Troponin-Komplex über die Untereinheiten TnI und TnT eine Konformationsänderung, welche Tropomyosin aus seiner inhibitorischen Position löst und eine Aktin/Myosin-Interaktion ermöglicht. Dabei ziehen die Myosinköpfe die Aktinfilamente durch den sogenannten Kraftschlag in Richtung der M-Linie (Sweeney and Hammers, 2018), verkürzen das I-Band und nähern in der Folge beide Z-Scheiben an (Lopes and Elliott, 2014). Die parallele und repetitive Anordnung der Sarkomere ermöglicht die Entwicklung von Kraft entlang der Achse des Filaments, die über die Länge der Myofibrille weitergeleitet wird (Gautel and Djnovic-Carugo, 2016).

1.3 Eigenschaften des Titinfilaments

1.3.1 Isoformen und Struktur Titins

Titin ist das größte bekannte Protein im menschlichen Körper und fungiert als elastische Feder, Stützprotein der Myofibrillen und Teil der Signaltransduktion in Kardiomyozyten (Kötter et al., 2014). Codiert wird es vom humanen Titin-Gen *TTN* mit einer potenziellen Größe von 4,2 MDa. Durch alternatives Spleißen entstehen muskel- und spezienspezifische Isoformen im Größenbereich von 3-3,7 MDa. Das Spleißen erfolgt hauptsächlich im I-Band-Anteil Titins, zu geringen Mengen auch im Bereich der M-Linie und der Z-Scheibe (Krüger and Linke, 2011). Die Identifizierung des muskelspezifischen Spleißingfaktors RBM20 als Hauptakteur des *Titinsplittings* in der quergestreiften Muskulatur lieferte neue Evidenz der molekularen Mechanismen (Guo et al., 2012, Zhu et al., 2017). Während eine erhöhte RBM20-Aktivität die vermehrte Expression der kürzeren N2B-Isoform triggert, führt RBM20-Mangel im Tiermodell zur Expression der größeren und elastischeren Titinisoform N2BA (Guo et al., 2012).

Im Herzen von Säugetieren sind zwei, durch Spleißen entstandene Isoform-Typen bekannt. Zum einen die längere und elastischere N2BA-Isoform (3,2-3,7 MDa) und die kürzere und steifere N2B-Isoform (3,0 MDa) (Freiburg et al., 2000, Opitz et al., 2004). Beide werden innerhalb eines Halbsarkomers koexprimiert, wobei die Zusammensetzung des Gesamttitins durch variable Expression beider Isoformen bestimmt wird (Krüger and Linke, 2011). Während der embryonalen Kardiogenese wird ausschließlich die embryonale N2BA-Isoform synthetisiert, welche prä- und perinatal durch kleinere adulte N2BA- und N2B-Formen ersetzt wird (Opitz et al., 2004). Im Laufe der Herzentwicklung nimmt der Anteil an N2B kontinuierlich zu, sodass im adulten Herzen ein Verhältnis von 65%:35% zugunsten der N2B-Isoform vorliegt. Im Vergleich dazu weisen adulte Rattenkardiomyozyten ein Isoformverhältnis N2B:N2BA von 90%:10% auf (Neagoe et al., 2002).

Ein einzelnes Titinmolekül erstreckt sich mit 0,9-1,5 µm (Krüger and Linke, 2011) über die Länge eines halben Sarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Abb. 2) (Kötter et al., 2014). Die Struktur wird aus segmentalen Anordnungen von Immunglobulin-ähnlichen Bereichen (Ig-Domänen), Fibronectin-3-Domänen, verschiedenen einzigartigen Sequenzen (*unique sequences*) und einer Titin-Kinase-Domäne am Carboxyl-Terminus gebildet (Bang et al., 2001). Bedingt durch seine enorme Länge wird Titin in verschiedene Abschnitte mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften unterteilt. Die Strukturproteine Nebulin, alpha-Actinin 2 und Telethonin verankern den Amino-Terminus des Titins an der Z-Scheibe des Sarkomers (Krüger and Kötter, 2016, Witt et al., 2006, Labeit et al., 2006). Die zusätzliche Vernetzung mit Aktin hebt in diesem Bereich die

Dehnbarkeit von Titin auf (Krüger and Linke, 2011). Der I-Band-Bereich besteht aus multiplen Ig-Domänen, der herzspezifischen N2-Bus-Domäne, der N2A-Domäne und der PEVK-Region, welche durch hohe Anteile an Prolin, Glutamin, Valin und Lysin charakterisiert ist. Die elastischen Eigenschaften gehen hauptsächlich auf den I-Band-Bereich Titins zurück. Dieser wird bei Streckung des Sarkomers vornehmlich gedehnt und ermöglicht somit eine Längenänderung (Linke et al., 1996, Linke et al., 1999, Trombitás et al., 1998, Li et al., 2002). Der A-Band-Bereich stellt mit ca. 2,0 MDa den größten Abschnitt des Titinfilaments dar (Bang et al., 2001) und ist eng mit Myosin und dem Myosin-bindenden Protein C verknüpft. Dieses Netzwerk fixiert Myosin zentral im Sarkomer und gewährleistet eine optimale Kraftentwicklung (Krüger and Linke, 2011). Im M-Band-Bereich befindet sich am Ende des Carboxyl-Terminus eine Titin-Kinase-Domäne, die für viele der Interaktionen und Signaltransduktionen verantwortlich ist. Mechanischer Stress aktiviert möglicherweise über eine Konformationsänderung die Titin-Kinase (Gräter et al., 2005), welche durch Interaktion mit den Ubiquitin-assoziierten Zinkfingerproteinen nbr1 (*neighbor of BRCA-Gene-1*), p62/SQSTM1 (*Sequestosome-1*) und den E3-Ligasen MuRF 1-3 (*muscle RING-finger protein*) Einfluss auf hypertrophe Signalkaskaden und proteasomale und autophagosomale Degradation nehmen kann (Lange et al., 2005, Kötter et al., 2014).

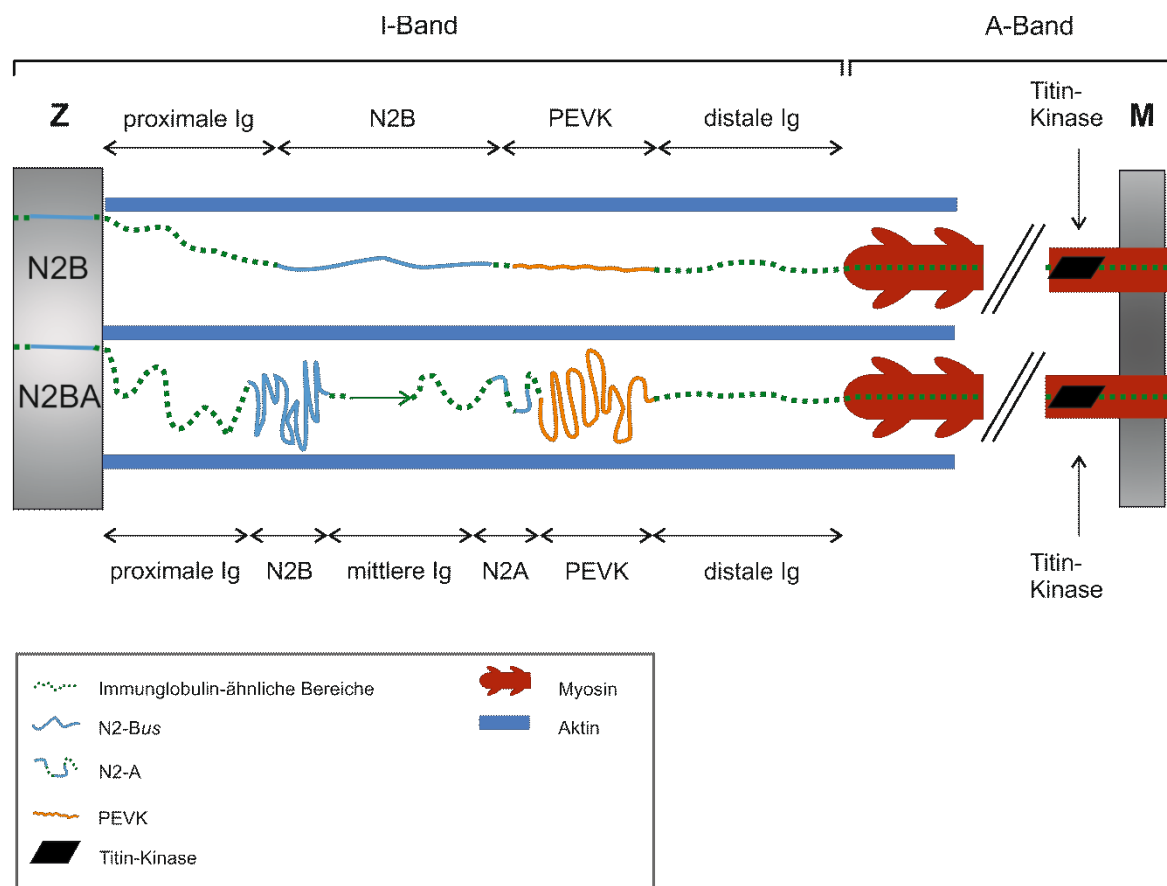


Abb. 2: Exemplarische Darstellung des Halbsarkomers mit Betonung des Titinfilaments und seiner kardialen Isoformen. Sowohl N2B als auch N2BA sind an der Z-Scheibe (Z) verankert und erstrecken sich bis zur M-Linie (M). Im M-Linien-Bereich Titins befindet sich jeweils eine Titin-Kinase-Domäne. Beide Isoformen enthalten proximale und distale Immunglobulin-ähnliche Bereiche, eine PEVK-Region und ein herzspezifisches N2B-Segment. Die N2BA-Form beinhaltet zusätzlich neben zwischengeschalteten Ig-Domänen noch ein N2A-Segment.

1.3.2 Funktion des Titinfilaments

Obwohl Titin neben Myozyten auch beispielsweise in Erythrozyten und Fibroblasten exprimiert wird, ist eine Funktion bis dato nur im Sarkomer bekannt (Krüger and Linke, 2011). Als Gerüstprotein des Sarkomers stabilisiert Titin dessen Struktur und fungiert als subsidiäres Element der Sarkomerneogenese. Zugleich wirkt Titin durch reversible Dehnung des I-Band-Bereichs bei mechanischer Krafteinwirkung als elastische Feder der Myofibrillen (Kötter et al., 2014). Für diese Funktion sind besonders die Ig-Domänen, die N2-Bus-Region und die PEVK-Region von elementarer Bedeutung (Krüger and Linke, 2011). Während Faltung und Entfaltung der Ig-Domänen die systolische Kontraktion und diastolische Relaxation unterstützen, optimiert die federähnliche passive Ausweitung der PEVK-Region die Füllung während der Diastole (Dadson et al., 2017). Zudem werden bei der Dehnung von Titin elastische und intramolekulare Rückstellkräfte aufgebaut (Krüger and Linke, 2011). Gemeinsam unterstützen die genannten Eigenschaften über den Frank-Starling-Mechanismus die aktive Kraftentwicklung der Kardiomyozyten (Krüger and Linke, 2011), wobei die elastischen Rückstellkräfte zum Teil durch visköse Titin-Aktin-Interaktionen abgeschwächt werden (Opitz et al., 2003). Das Frank-Starling-Gesetz beschreibt die Beziehung zwischen Ventrikelfüllung und Kraftentwicklung (Chaui-Berlinck and Monteiro, 2017). Zunehmende ventrikuläre Füllung maximiert durch Dehnung der Sarkomere die Spannungs- und Kraftentwicklung, wodurch der kardiale Auswurf gesteigert wird (Sequeira and van der Velden, 2015). Bei gedehnten Sarkomeren führen verringerte Interfilamentabstände zwischen Aktin und Myosin zu einer vermehrten Ausbildung von Querbrückenzyklen, welche die aktive Kraftentwicklung verstärken (Kobirumaki-Shimozawa et al., 2014). Nach der Kontraktion gehen die Sarkomere leichter in ihre ursprüngliche Ausgangsstellung zurück und werden beispielsweise bei der frühdiastolischen Relaxation unterstützt. Insgesamt sind die durch Titin aufgebauten, elastischen Rückstellkräfte für 50% der totalen passiven Spannung in nicht-aktivierten Kardiomyozyten verantwortlich (Krüger and Linke, 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Titin maßgeblich für die passiven Eigenschaften des Myokards verantwortlich ist. Die Ausprägung der Elastizität wird einerseits durch das

Isoformverhältnis N2B:N2BA, sowie andererseits durch diverse posttranslationale Modifikationen des Titinfilaments bestimmt. Eine erhöhte Expression der längeren und elastischeren N2BA-Isoform reduziert bei Zustand nach Myokardinfarkt beispielsweise die passive Steifigkeit des Myokards (Krüger and Linke, 2011, Neagoe et al., 2002). Bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie führt eine erhöhte Expression des N2BA-Titins über reduzierte myofibrilläre Steifigkeit und erhöhte Ventrikel-Compliance zu einer zunehmenden Toleranz der Patienten gegenüber vermehrter Herzarbeit (LeWinter and Granzier, 2014, Neagoe et al., 2002).

Isoform-unabhängig kann die passive Steifigkeit auch durch eine veränderte posttranslationale Titinphosphorylierung der N2B- und PEVK-Region modifiziert werden (Krüger and Linke, 2011). Die cAMP/cGMP-abhängigen Proteinkinasen A und G und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II bewirken über eine Phosphorylierung der N2B-Domäne (Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2013, Hidalgo et al., 2013, Kötter et al., 2014) eine Zunahme der Persistenzlänge dieses Bereichs, verlängern dadurch das elastische I-Band und senken die Steifigkeit des Myokards um 20%. Möglicherweise stellt die Phosphorylierung über PKA/PKG eine Folge der beta-adrenergen Stimulation des Sympathikus zur Anpassung der Steifigkeit bei erhöhter Herzleistung dar (Krüger and Linke, 2011). Bei Vergleich der Herzen von DCM- und HFpEF (*heart failure with preserved ejection fraction*)-Patienten im Endstadium mit gesunden Spenderherzen konnten reduzierte basale Phosphorylierungslevel der PKA nachgewiesen werden (Hidalgo and Granzier, 2013, LeWinter and Granzier, 2014, Krüger et al., 2009). Im Gegensatz dazu phosphoryliert die, durch den alpha1-adrenergen Signalweg aktivierte (LeWinter and Granzier, 2014), Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C die PEVK-Region. Über Reduzierung der Persistenzlänge dieses Bereichs und der einhergehenden Verkürzung des I-Band-Titins kommt es zu einer Zunahme der passiven myokardialen Steifigkeit (Hidalgo et al., 2009). Die Erkenntnis, dass bei PEVK-Knockout-Mäusen die PKC keinen Effekt auf die passive Spannung besitzt, bestätigt deren physiologische Wirkung (LeWinter and Granzier, 2014, Hudson et al., 2010). Die unterschiedlichen Phosphorylierungseffekte werden vermutlich durch die verschiedenen Ladungseigenschaften der modifizierten Bereiche bedingt. Die eher negativ geladene N2B-Region und die eher positiv geladene PEVK-Region reagieren möglicherweise unterschiedlich auf das Anhängen eines negativ geladenen Phosphatrests (Kötter et al., 2013).

1.4 Zelluläre Abbausysteme

Das Sarkomer ist eine hochdynamische Komponente der Muskelfunktion und benötigt eine ständige Kontrolle und Neusynthese seiner Bausteine und einen Abbau seiner funktionsunfähigen Bestandteile. Innerhalb des Sarkomers kann Titin binnen 14 Stunden komplett ausgetauscht werden, was für ein Protein seiner Größe außergewöhnlich schnell ist. Einen Auslöser stellt beispielsweise der postnatale Titinisoform-Switch dar, der neben dem Einbau neuer Titinfilamente auch die Aktivierung zellulärer Abbausysteme zur Degradation embryonaler Isoformen erfordert (Kötter et al., 2014). In eukaryotischen Zellen sorgen drei Abbaumechanismen für die Beseitigung dysfunktionaler oder beschädigter Zellbestandteile. Zum einen das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches substratspezifisch Zielproteine mit Ubiquitin für den proteasomalen Abbau markiert. Zum anderen das Autophagosom, was größere Zellaggregate lysiert, und die Ca^{2+} -abhängigen Calpaine (Kötter et al., 2014). Das UPS und Autophagie sind für 80-90% (UPS) und 10-20% (Autophagie) des zellulären Abbaus verantwortlich. Während das UPS die markierten Substrate proteasomal hydrolysiert, degradiert Autophagie die cytosolischen Aggregate in Autolysosomen (Kwon and Ciechanover, 2017). Im folgenden Abschnitt sollen beide Systeme genauer erläutert werden.

1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System dient in eukaryotischen Zellen als selektives proteolytisches Abbausystem, welches durch Markierung von Zielproteinen mit Polyubiquitinketten einen Abbau durch das 26S Proteasom induziert (Abb. 3) (Kwon and Ciechanover, 2017). Substrate sind fehlerhaft gefaltete oder synthetisierte Proteine, deren Abbau die Zelle vor Interaktionen mit abnormen Proteinen bewahrt (Su and Wang, 2010). Das Markerprotein Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert (Shaid et al., 2013). Vermittelt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das Ubiquitin-transferierende-Enzym E2 und die Ubiquitin-Ligase E3 wird eine kovalente Bindung von Ubiquitin mit dem Zielprotein katalysiert. E1 aktiviert unter ATP-Verbrauch Ubiquitin, wobei das daraus entstandene, aktivierte Ubiquitin-Adenylat über eine Thioesterbindung auf das konjugierende Enzym E2 transferiert wird. Die an das Zielprotein gebundene Ligase E3 katalysiert die finale Übertragung des Ubiquitinmoleküls auf das Substrat, bzw. auf das vorherige Ubiquitin (Kwon and Ciechanover, 2017). Durch Verbinden des C-Terminus von Ubiquitin mit der Aminosäure Lysin des vorherigen Ubiquitins wird eine kovalente Bindung geschaffen (Su and Wang, 2010). Ubiquitin besitzt an der 6., 11., 27., 29., 33., 48. und 63. Position Lysin-Reste; eine Verbindung ist über jede der genannten

Positionen möglich. Die Verkettung der Moleküle über K48 (Lysin-Rest der 48. Position) stellt die dominante Form des UPS dar und führt wie fast alle anderen zum Abbau der Substrate im Proteasom (Su and Wang, 2010, Peng et al., 2003, Xu et al., 2009). Im Gegensatz dazu initiiert eine Kopplung über K63 den autophagosomalen Abbau, kann jedoch auch DNA-Reparaturen, Proteinkinasen und Proteintransporte aktivieren (Kwon and Ciechanover, 2017, Pickart and Fushman, 2004). Der Vorgang der Ubiquitinierung wird bis zur Entstehung polyubiquitinerter Zielsubstrate wiederholt, die zur Proteolyse im Proteasom bereit sind (Portbury et al., 2011). Die hohe Substratspezifität des UPS wird durch ein breites Spektrum von circa 800 E3 Ligasen (Kwon and Ciechanover, 2017) im menschlichen Genom gewährleistet, wodurch eine Markierung verschiedenster Substrate möglich ist (Portbury et al., 2011).

Die ubiquitinierten Moleküle werden anschließend im 26S Proteasom abgebaut. Über Diffusion, Shuttles oder Proteasom-Translokation erreichen die Substrate das Proteasom, binden an Ubiquitin-bindende-Domänen (UBD) und werden in der 20S Untereinheit hydrolysiert. Die Adapter-Moleküle Rpn 10/5 besitzen beispielsweise als Bestandteile der 19S Kappe Rezeptoren für Ubiquitin (UBD) und vermitteln die Aufnahme polyubiquitinerter Moleküle ins Proteasom (Su and Wang, 2010). Um einen unkontrollierten Abbau zellulärer Proteine zu verhindern, wird das UPS erst durch bestimmte Degradationssignale aktiviert. Phosphorylierungen, Glykosylierungen und oberflächliche hydrophobe Aminosäuren können hierbei Initiatoren für einen proteasomalen Abbau sein (Su and Wang, 2010).

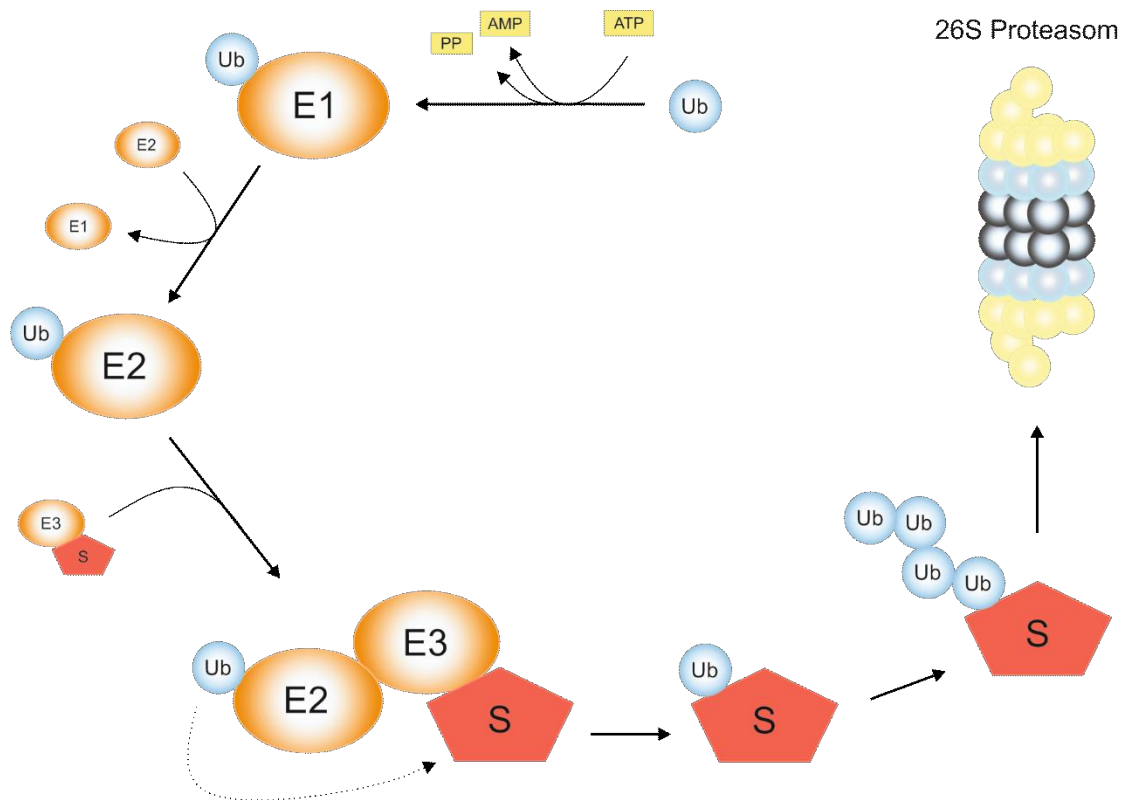


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Das Enzym E1 aktiviert unter ATP-Verbrauch Ubiquitin, welches im Folgenden auf das konjugierende Enzym E2 übertragen wird. Die an das Zielsubstrat gebundene Ligase E3 katalysiert den Transfer des Ubiquitin-Moleküls auf das zu degradierende Substrat. Nach mehrmaliger Ubiquitinierung (via K48) werden die polyubiquitinierten Substrate im 26S Proteasom hydrolysiert.

1.4.2 Autophagie

Bei Entdeckung der Autophagie ging man zunächst von einem durch Nährstoffmangel induzierten, nicht selektiven Abbauprozess aus. Mittlerweile ist bekannt, dass Autophagie als intrazelluläre Qualitätskontrolle fungiert (Shaid et al., 2013) und unter lysosomal vermitteltem Abbau (Portbury et al., 2011) Bestandteile innerhalb der Zelle degradiert und recycelt (Zhang et al., 2018). Es wird zwischen drei verschiedenen Arten von Autophagie unterschieden, wobei Makroautophagie die am besten erforschte Form darstellt. Ausgelöst durch eine Kaskadenreaktion von ATG-Proteinen (*autophagy-related-gene*) (Portbury et al., 2011) beinhaltet sie die *De-novo*-Synthese eines Autophagosoms um die abzubauenen Organellen herum (Parzych and Klionsky, 2014). Durch anschließende lysosomale Fusion kommt es zur Degradation des Substrats (Portbury et al., 2011). Während es bei Mikroautophagie zur direkten Aufnahme zellulärer Bestandteile über die Lysosomenmembran kommt, werden bei der Chaperon-vermittelten Autophagie Substrate

über LAMP-2 (*lysosomal-associated-membrane-protein*) an zytosolische Chaperone gebunden und abgebaut. Diese werden anschließend ins Lysosom aufgenommen (Zhang et al., 2018).

1.4.2.1 Autophagosomale Mechanismen

Ziel der Makroautophagie ist die Neubildung eines zytosolischen Vesikels, der die abzubauenen Organellen zum Lysosom transportiert (Abb. 4). Ausgehend von sogenannten *Phagophore Assembly Sites* (PAS), welche mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind (Parzych and Klionsky, 2014), wird die Bildung einer Isolationsmembran initiiert (Portbury et al., 2011). Mögliche Quellen für deren Bauteile sind zelleigene Plasmamembranen, das Endoplasmatische Retikulum, Golgi-Komplexe oder Mitochondrien (Parzych and Klionsky, 2014). Durch Elongation entsteht eine Doppelmembran, die sogenannte Phagophore. Die Basis der Phagophore bildet das Molekül LC3-II, welches zuvor durch Konjugation von LC3-I mit Phosphatidylethanolamin aktiviert wird (Parzych and Klionsky, 2014, Ichimura et al., 2000) und in der äußeren und inneren Membran lokalisiert ist (Su and Wang, 2010). Zusätzlich werden, vermittelt durch die katalytischen ATG-Proteine 3,7 und 10, über Lysin-Reste ATG 12/5/16- oder LC3/ATG8-Komplexe gebildet, die ebenfalls die Synthese der autophagosomalen Doppelmembran unterstützen (Portbury et al., 2011). Die Phagophorenmembran expandiert bis zur vollständigen Umhüllung der Substrate weiter, bis ein komplettes Autophagosom entstanden ist (0,5-1,5µm). Dessen äußere Membran fusioniert mit der lysosomalen Membran und bildet ein Autolysosom. Das saure Lumen und die internen Hydrolasen führen zum Abbau der inneren Membran des Autophagosoms und der eingeschlossenen Organellen. Lysosomale Permeasen transportieren anschließend die zerlegten Bestandteile ins Cytoplasma der Zelle zurück (Parzych and Klionsky, 2014).

Trigger der Entstehung von Autophagosomen ist eine Akkumulation von Proteinaggregaten (Portbury et al., 2011, Tannous et al., 2008), sogenannter Inklusionskörperchen. Meist führt eine Übersättigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems zu einer erhöhten Ansammlung von intrazellulären Proteinen (Shaid et al., 2013). Selektive Autophagierezeptoren, wie beispielsweise der Komplex aus p62/SQSTM1 und nbr1, vermitteln den gezielten Abbau dieser Proteinaggregate (Shaid et al., 2013, Bjørkøy et al., 2005, Kirkin et al., 2009). Sie sind multifunktionale Adapterproteine und besitzen spezifische Bindungsstellen für Ubiquitin (Ubiquitin-assoziierte Domäne – UBA) und LC3 (LC3-*interacting-region* – LIR). Somit können sie spezifisch die via K63 ubiquitinierten Substrate binden und über

Interaktion mit dem Membranmolekül LC3 dem Autophagosom zuführen (Shaid et al., 2013, Kirkin et al., 2009, Pankiv et al., 2007).

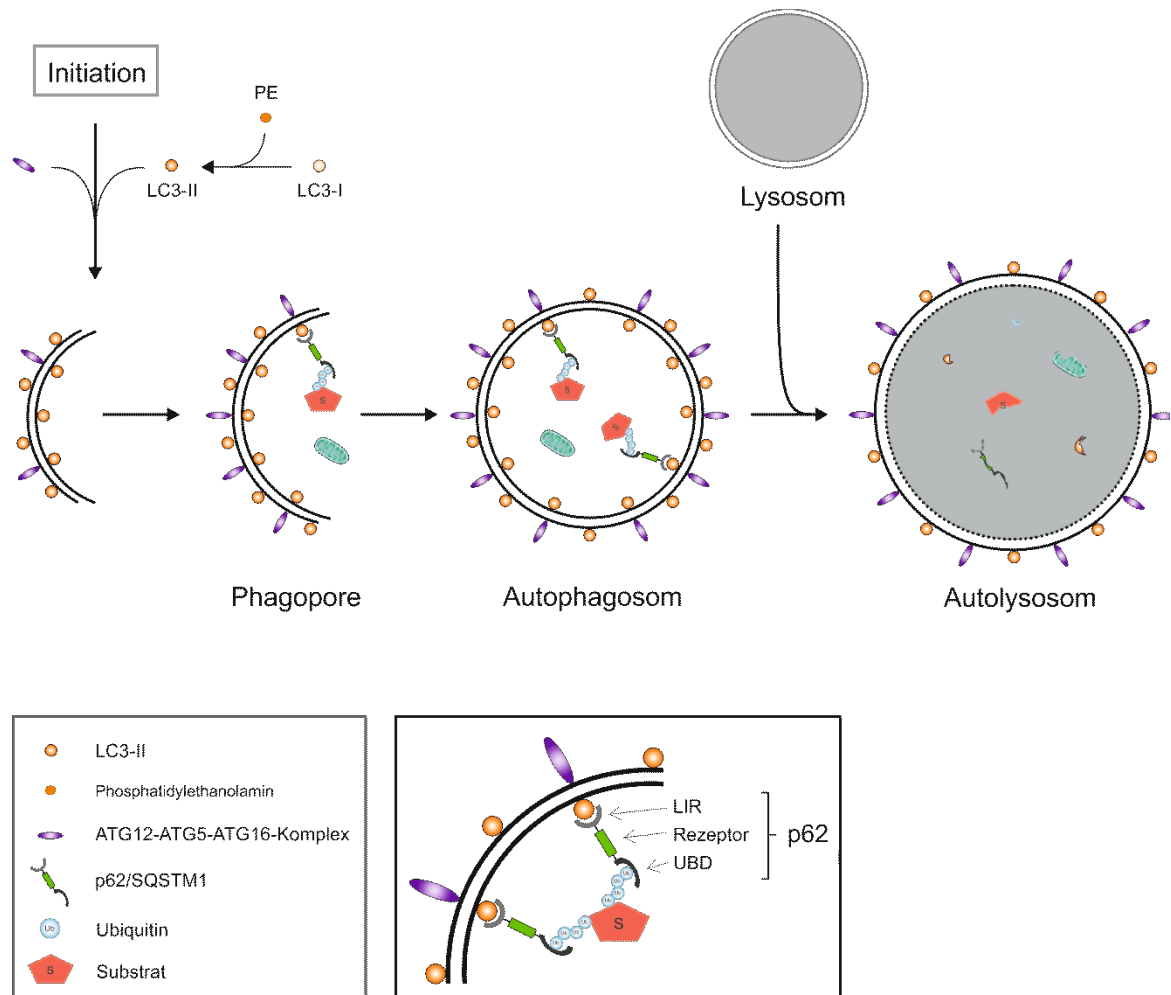


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bildung von Autophagosomen und Beschreibung der selektiven Substratdegradation. Nach Aktivierung des Initiationskomplexes kommt es unter Rekrutierung der Membranbestandteile ATG12-ATG5-ATG16 und LC3-II zur Synthese der Phagophorenmembran. Das aktivierte LC3-II wird zuvor durch die Konjugation von LC3-I mit Phosphatidylethanolamin gebildet. Nach Elongation der Phagophorenmembran entsteht das Autophagosom, welches durch Fusion mit dem Lysosom das Autolysosom bildet. Hier erfolgt die Degradation eingeschlossener Substrate. Das Adapterprotein p62 ermöglicht hierbei den selektiven autophagosomalen Abbau. Während es über seine Ubiquitin-bindende Domäne (UBD) mit polyubiquitinierten Substraten (via K63) interagiert, ermöglicht die LC3-interacting-region (LIR) die Interaktion mit den LC3-Molekülen des Autophagosoms.

1.5 Pathologien der PQC

Wie bereits erläutert, hängt die zelluläre Homöostase und Integrität maßgeblich von einer adäquaten Protein Quality Control (PQC) ab. Insbesondere bei Kardiomyozyten, die kaum replikative Kapazität besitzen, kann proteasomale und autophagosomale Dysfunktion durch proteotoxische Proteinakkumulationen zur Pathogenese von Herzkrankheiten beitragen (Wang and Hill, 2015, Zheng and Wang, 2010).

Die proteasomale Degradation kardialer Myofibrillen wurde erstmals von Solomon & Goldberg durch ein Modell UPS-getriggelter kardialer Atrophie nachgewiesen (Solomon and Goldberg, 1996). Hierdurch konnte die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an kardialer Atrophie, Vermeidung von Hypertrophie und dem Remodeling nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Portbury et al., 2011, Razeghi et al., 2003, Depre et al., 2006). Während im Tiermodell eine Überexpression der E3-Ligasen mdm2 und MuRF-1 bei Mäusen zu reduzierter Hypertrophie und geringerem Zelltod führt (Zheng and Wang, 2010, Toth et al., 2006), geht eine Dysfunktion des proteasomalen Abbausystems mit kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie einher (Kötter et al., 2014). Hierbei unterstreicht die kardiale Akkumulation von UPS-Markern bei Patienten mit DCM die Auswirkung einer insuffizienten proteasomalen Degradation auf die Homöostase von Kardiomyozyten (Zheng and Wang, 2010).

Zugleich wird unter physiologischen Bedingungen ein konstant niedriges Level an zellulärer Autophagie aufrechterhalten (Portbury et al., 2011). Die kontinuierliche Aktivität des Degradationssystems garantiert durch Elimination schädlicher Organellen (Parzych and Klionsky, 2014) die zelluläre Integrität (Parzych and Klionsky, 2014). Dementsprechend spielt Autophagie bei der menschlichen Krankheitsentwicklung und -bekämpfung eine wichtige Rolle. Bei Pathologien wie Hypertrophie, Herzinsuffizienz und dem Remodeling nach Myokardinfarkt kommt es zur physiologischen und kompensatorischen Steigerung der Autophagie-Aktivität (Portbury et al., 2011). Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die krankheitsbedingt eine kardiale Akkumulation fehlgefalteter und -synthetisierter Proteine aufweisen, zeigen erhöhte Autophagie-Level. Bei Entlastung des Herzens durch Implantation eines *left ventricular assisting device* (LVAD) konnte in der Folge eine geringere autophagosomale Aktivität in den biopsierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Dies distinguert Autophagie als funktionell adaptive Antwort der PCQ auf kardiale Krankheiten (Zheng and Wang, 2010, Kassiotis et al., 2009). Durch Dysfunktion des Systems können Pathologien wie Lungen-, Leber- und Herzkrankheiten, Myopathien, Tumore oder metabolische Krankheiten wie Diabetes entstehen (Parzych and Klionsky, 2014).

Beide für Kardiomyozyten unerlässliche Systeme wurden bis vor kurzem für separate Degradationspfade der PCQ gehalten (Nam et al., 2017). Veränderte UPS- und Autophagie-Level bei kardialer Dysfunktion implizieren indessen eine, bei eigener inadäquater Funktion eintretende, kompensatorische Aktivierung des komplementären Abbauweges (Zheng and Wang, 2010). Ein erster möglicher Hinweis auf die Verbindung beider Systeme stellt die Verwendung des gemeinsamen Degradationsmarkers Ubiquitin dar. Wie bereits erläutert, vermitteln beim UPS die spezifischen Enzyme E1, E2 und E3 die Ubiquitinierung und den Abbau, während Adapterproteine wie p62 oder nbr1 polyubiquitinierte Moleküle erkennen und zur autophagosomalen Degradation rekrutieren (Nam et al., 2017, Zheng and Wang, 2010). Dieser Cross-Link könnte unter anderem die kompensatorische Aktivierung des komplementären Systems ermöglichen. So erhöht beispielsweise eine Sättigung des UPS bzw. eine Hemmung der proteolytischen Funktion durch Bortezomib die zelluläre Autophagie kompensatorisch (Ji and Kwon, 2017, Nam et al., 2017, Shen et al., 2013). Überladung oder Inhibition von Autophagie triggert wiederum die Aktivität des UPS, möglicherweise durch eine Akkumulation von p62 (Shaid et al., 2013, Ji and Kwon, 2017, Nam et al., 2017, Pandey et al., 2007). Demzufolge trägt das koordinierte Zusammenspiel beider Degradationspfade essentiell zur zellulären Protektion bei (Wang and Hill, 2015).

1.6 Interaktion des Titinfilaments mit der PQC

Die Adaption von Kardiomyozyten an veränderte Herzarbeit erfordert Sensoren, die variierende mechanische Arbeit erkennen (Gautel, 2011). Titin kann als elementarer Bestandteil des Sarkomers Stress detektieren und Hypertrophie sowie Degradation durch Signaltransduktion beeinflussen (Gautel, 2011, Kötter et al., 2014). Die Degradationssysteme der zellulären Protein Quality Control können über diverse Hauptbindungsstellen mit Titin interagieren (Abb. 5) (Kötter et al., 2014).

Im Abschnitt des Z-Scheiben-Titins bindet die E3-Ligase mdm2 (*mice-double-minute2*) an das Ankerprotein Telethonin (Tian et al., 2006), welches bei Mutation zur Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie führen kann (Kötter et al., 2014, Hayashi et al., 2004). Zusätzlich interagiert Telethonin mit der muskelspezifischen E3-Ligase MuRF-1 (Witt et al., 2005), die ebenso an spezielle Domänen des M-Band-Titins binden kann (Gregorio et al., 2005, Witt et al., 2005). MuRFs (*muscle RING-finger protein*) sind E3-Ligasen, die bei der strukturellen und funktionellen Regulation der quergestreiften Muskulatur eine wichtige Rolle spielen und an der Degradation weiterer Sarkomerbestandteile wie Tropomyosin, Troponin T und der *Myosin-Light-Chain* involviert sind (Portbury et al., 2011, Witt et al.,

2005). Als Hauptregulator der PKC-gekoppelten Hypertrophie (Zheng and Wang, 2010) trägt MuRF-1 zur Muskelatrophie und Inhibition der Hypertrophie bei (Zheng and Wang, 2010, Portbury et al., 2011, Bodine et al., 2001, Willis et al., 2009). Defizienz von MuRF-1 und 2 führt im Skelett- und Herzmuskel zu hypertrophen muskulären Zuständen (Witt et al., 2008), während eine Überexpression durch vermehrte Degradation des M-Band-Titins das Sarkomer destabilisiert (McElhinny et al., 2002). Schließlich befindet sich am Carboxyl-Terminus des M-Band-Titins mit der Titin-Kinase-Domäne eine weitere Relation zur PQC. Zwei mögliche Liganden sind die Ubiquitin-assoziierten Zinkfingerproteine nbr1 (*neighbor of BRCA1-gene-1*) und p62/SQSTM1. Nach primärer Interaktion mit nbr1 kommt es unter Assoziation von p62/SQSTM1 zur Komplexbildung (Gautel, 2011, Lange et al., 2005). P62 besitzt einerseits als Substrat für MuRF-1, 2 und 3 Einfluss auf den proteasomalen Abbau (Gautel, 2011, Lange et al., 2005), vermittelt andererseits über Bindung des Membranankers LC3 und von K63-ubiquitinierten-Molekülen die Degradation im Autophagosom (Kötter et al., 2014, Pankiv et al., 2007, Waters et al., 2009). Inhibitorische Mutationen der Titin-Kinase führen durch einen insuffizienten Proteinabbau zu Myopathien mit Aggregaten von p62/SQSTM1 und vesikulärer Akkumulation von nbr1 (Lange et al., 2005). Diese pathophysiologischen Veränderungen legen nahe, dass die Titin-Kinase als sarkomerischer Rezeptor für Proteine des zellulären Remodelings fungiert und zum belastungsabhängigen Umbau des Muskels beiträgt (Gautel, 2011).

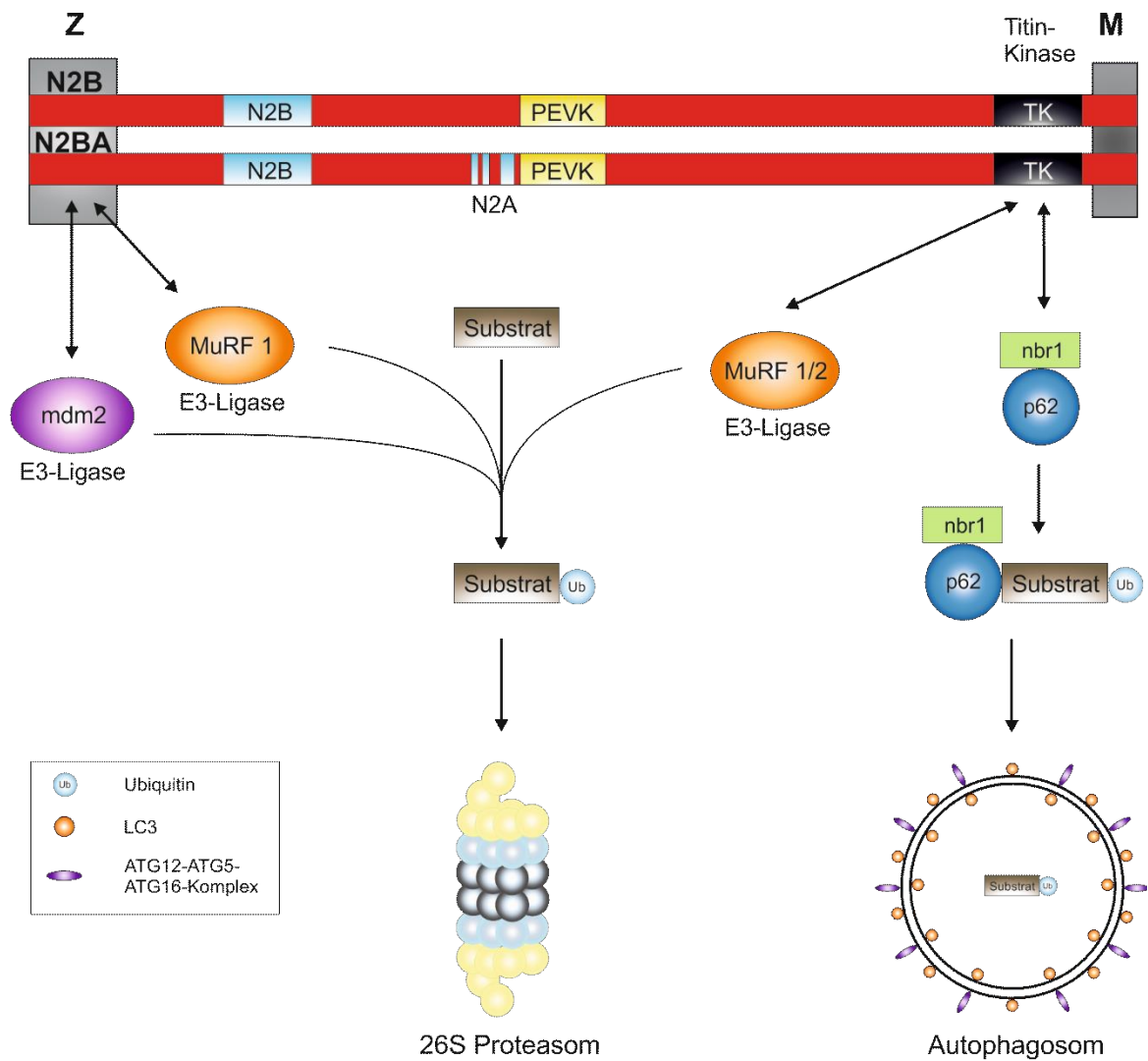


Abb. 5: Schematische Darstellung beider Titin-Isoformen mit Beschreibung der Interaktionspartner. Z=Z-Scheibe. M=M-Linie. Im Abschnitt des Z-Scheiben-Titins interagieren die E3-Ligasen mdm2 und MuRF-1 mit dem Titinfilament. Zudem kann es im Bereich der Titin-Kinase-Domäne zur Bindung von MuRF-1 und 2 kommen. Die Interaktion mit den E3-Ligasen stellt eine mögliche Verbindung zum proteasomalen Abbau dar. Weitere Interaktionspartner der Titin-Kinase-Domäne sind die autophagosomalen Adapterproteine p62 und nbr1. Diese können ubiquitinierte Substrate binden und dem Autophagosom zuführen.

1.7 Apoptose

Die Homöostase eukaryotischer Organismen wird durch die Balance zwischen der Synthese neuer und der Entfernung gereifter und geschädigter Zellen garantiert (D'Arcy, 2019). Im Rahmen der Beseitigung dysfunktionaler Bestandteile beschreibt Apoptose einen morphologisch definierten Zelltod, der selektiv und energieabhängig einzelne Zellen und Zellgruppierungen entfernen kann (D'Arcy, 2019, Elmore, 2007). Dieser „kontrollierte Zelltod“ führt über intrinsische und extrinsische Aktivierung kataboler Proteasen

(sogenannter Caspasen) zur raschen Beseitigung zellulärer Strukturen und Organellen (Mukhopadhyay et al., 2014, D'Arcy, 2019, Elmore, 2007). Die Initiator-Caspasen 8 und 9 stimulieren die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 (D'Arcy, 2019), welche über Freisetzung von Endonukleasen den Nukleus und das Zytoskelett fragmentieren und zur Formation von Apoptose-Körperchen führen (Elmore, 2007). Hierbei können Zellschrumpfung, nukleäre Chromatinkondensation (Pyknose) und nukleäre Fragmentation (Karyorrhexis) beobachtet werden (Maiuri et al., 2007). Aufgrund der elementaren Bedeutung des Systems für den Organismus bedarf die Regulation apoptotischer Mechanismen einer strikten Kontrolle. Während eine erhöhte Apoptose-Aktivität zu Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson führt, begünstigen geringe Apoptose-Raten durch unkontrolliertes Zellwachstum die Tumorgenese (D'Arcy, 2019).

1.8 Kardioplegie

Im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe ermöglichte die kardioplege Lösung eine kardiale Arretierung für die Dauer der Operation. Damit hierdurch keine Folgeschäden ausgelöst werden, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein (Oliveira et al., 2014). Während das Myokard im relaxierten Zustand einen minimalen ATP- und Phosphokreatininverbrauch besitzen soll (Chambers and Fallouh, 2010), muss sich der Zellarrest protektiv auf die Kardiomyozyten auswirken, reversibel sein (Oliveira et al., 2014) und darf keine toxischen Effekte auf das Herz oder andere Organe besitzen (Chambers and Fallouh, 2010). Unter Erfüllung dieser Grundsätze arretiert die kardioplege Lösung durch Hyperkaliämie Kardiomyozyten in der Entspannungsphase der Diastole. Dabei führt die anhaltende Depolarisation zur Inaktivierung von Ionenkanälen, wodurch eine Transduktion des Aktionspotentials verhindert und die elektrische Herzerregung gestoppt wird. Hierfür werden extrazelluläre Kalium-Konzentrationen von 10 bis 40 mmol/L verwendet (Chambers, 2003).

In Ruhe liegt das Membranpotential von ventrikulären Kardiomyozyten mit -85mV (Oliveira et al., 2014) nahe dem Gleichgewichtspotential von Kalium (Chambers and Fallouh, 2010). Die Erregung über *gap junctions* oder durch spontane Aktivierung depolarisiert die Zelle und generiert ein Aktionspotential. Schnelle spannungsabhängige Natrium-Kanäle werden geöffnet und führen zu einer Positivierung des Membranpotentials bis +20mV. Durch das veränderte Potential wird über L-Typ-Calcium-Kanäle (sog. Dihydropyrimidinrezeptoren, DHPR) ein Calcium-Einstrom in die Zelle erzeugt. Dieser aktiviert intrazelluläre Calcium-Kanäle (sog. Ryanodinrezeptoren), die Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freisetzen. Der sogenannte *calcium-induced-calcium-release* (CICR) erhöht die

intrazelluläre Calcium-Konzentration und hält, zusammen mit Reduktion der Kalium-Leitfähigkeit, die Plateauphase des kardialen Aktionspotentials aufrecht. Eine Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeit und Inhibition der L-Typ-Calcium-Kanäle durch zu hohe Calcium-Konzentrationen leitet letztendlich die Repolarisation ein (Chambers and Fallouh, 2010).

Eine künstlich erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration führt zu einer Positivierung des Membranpotentials auf -65 bis -40mV (Oliveira et al., 2014). Bei dieser Spannung kommt es zu einer Inaktivierung der schnellen, spannungsabhängigen Natrium-Kanäle, wodurch der initiierte Ioneneinstrom verhindert wird (Chambers and Fallouh, 2010) und der erwünschte depolarisierte Zellarrest der Kardiomyozyten eintritt (Oliveira et al., 2014).

1.9 Ziele der Arbeit

Als zentrales Thema dieser Arbeit sollte die Degradation des Titinfilaments durch mechanische Arretierung induziert und die beteiligten Abbaumechanismen näher untersucht werden. Zudem wurde analysiert, ob der erhöhte Abbau Auswirkungen auf den Titinisoform-Switch besitzt. Über eine ab Tag 1 begonnene Kultivierung von embryonalen Rattenkardiomyozyten in hyperkaliämischer DMEM-Lösung (35 mM KCl) konnte unter kardioplegen Bedingungen die Kontraktionsfähigkeit der Versuchszellen aufgehoben werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Nicht-Nutzung der inaktivierten Sarkomere zu einem erhöhten Turnover nicht benötigter Zellebestandteile, insbesondere von Titin führt. Hierbei sollte eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Autophagie an der Degradation des Titinfilaments geprüft werden. Zudem wurde der potenzielle Einfluss von Apoptose auf den Titinabbau näher beleuchtet. Die Untersuchung des Titinisoform-Switch im arretierten Sarkomer sollte aufzeigen, ob die mechanische Inaktivität der Kardiomyozyten den Abbau der N2BA- und Einbau der N2B-Isoform erleichtert und zu einem beschleunigten Isoform-Switch führen könnte. Durch mechanische Arretierung ab Tag 7 sollte in einem alternativen Versuchsansatz zusätzlich geprüft werden, ob bei fortgeschrittenerem Isoform-Switch ein ähnlicher Effekt beobachtet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid /Bis	Roth
Acrylamid /Bis 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent)	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
Metformin hydrochloride	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
Temed	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Triton x-100	Appli Chem
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x SDS - Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x -TBST (pH 7,4)	0,2 M Tris / HCl 1,5 M NaCl 1% Tween - 20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris / HCl 100 mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x -TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocapronsäure 30 mM Tris / HCl
Phosphate buffered saline (PBS)	150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid

	1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 3 mM 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 0,05 M Tris / HCl
<i>Stripping Buffer</i>	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol
Verdaupuffer (pH 7,35-7,45)	137 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,7 mM Potassium chloride 406 μ M Natriumdihydrogenphosphat 12 mM Natriumhydrogencarbonat 190 U/mL Kollagenase Typ II 1512 USP-U*/mL Trypsin Phenolrot

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

2.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Tab. 3: Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

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

2.1.4 Laborgeräte

Tab. 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
Fluoreszenzmikroskop	BZ-9000	Biorevo
Fluorometer, Luminometer	Glomax-Multi+ Detection System	Promega
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

2.1.5 Antikörper

Die bei den Western Blots verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 zu finden.

Tab. 5: Antikörper Western Blots

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Alpha-Actinin	1:5000	Maus	Sigma, #A7732
Beclin	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #3738
K48 Polyubiquitin	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #8081
K63 Polyubiquitin	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5621
LC3B	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2775
PEVK-total	1:30000	Kaninchen	Eurogentec
PSMA2	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #11864
SQSTM1/p62	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5114
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-mouse IgG,	1:5000	Pferd	Cell Signaling, #7076

horseradish-peroxidase-linked			
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:5000	Ziege	Cell Signaling, #7074

Die bei der Immunhistochemie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 zu finden.

Tab. 6 Antikörper Immunhistochemie

Primärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Alpha-Actinin	1:1000	Maus	Sigma, #A7732
Beclin	1:200	Maus	Ori Gene (Acris), #TA502517
LAMP-1	1:500	Maus	Santa Cruz, #sc20011
LC3B	1:500	Kaninchen	Cell Signaling, #2775
PEVK-total	1:500	Kaninchen	Eurogentec
SQSTM1/p62	1:100	Maus	Abcam, #56416
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-Mouse IgG, Fab2, Alexa Fluor 488 Conjugate	1:1000	Maus	Cell Signaling, #4408
Anti-Rabbit IgG, Fab2, Alexa Fluor 555 Conjugate	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #4413

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten

Für die Kultivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten wurden trächtige Ratten am 18. Tag ihrer Schwangerschaft präpariert (Tierversuchsgenehmigung: 84-02.04.2017.A145). Durch Injektion von Ketamin/Xylazin (100 mg/kg Ketamin, 10 mg/kg Xylazin) wurden die Ratten anästhesiert und die Embryonen per Kaiserschnitt entnommen und umgehend dekapitiert. Die adulte Ratte wurde anschließend in Narkose durch Dekapitation getötet.

Die Herzen der 8 bis 16 Embryos wurden mit einer Pinzette entnommen und in PBS gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die entnommenen Herzen mit einem Skalpell zerkleinert und in einem Trypsin- (2 mg/ml) und kollagenasehaltigen (1 mg/ml) Verdauopuffer aufgelöst. Dies erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für 60 Minuten. Um eine bessere Dissoziation der Kardiomyozyten zu gewährleisten, wurde die Zelllösung in 15-minütigen Abständen vorsichtig auf und ab pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension durch einen 70 µm Sieb filtriert. Durch anschließendes Zentrifugieren der Lösung bei 1000 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in DMEM + 20% FBS resuspendiert und die Zellen auf mit Gelatine beschichteten 6-Well-Platten verteilt (Tag 0). Für den zweiten Versuchsansatz, der Immunfluoreszenz, wurden 6-Well-Platten mit 4 Deckgläschen/Well ausgestattet und ebenfalls mit Gelatine beschichtet. Die für den Caspase Assay verwendeten Zellen wurden auf 12-Well-Platten kultiviert. Alle Platten wurden für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Um eine Vermehrung der Fibroblasten zu vermeiden, wurden an Tag 1 alle Zellen für 60 Minuten mit Mitomycin (10 µL/mL 20%iges FBS DMEM) behandelt. Hierbei inhibiert Mitomycin bei embryonalen Fibroblasten die Proliferation. Anschließend wurde das Mitomycin mit warmen PBS ausgewaschen. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit von 35 mM KCl kultiviert. Die Nährmedien wurden täglich ausgetauscht. Im dritten Versuchsansatz wurden die Versuchszellen für 7 Tage mit 1%igem FBS DMEM kultiviert. Erst ab Tag 7 erhielten sie DMEM + 35 mM KCl.

2.2.2 Proteinbiochemie

2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinanalyse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet, bei der Proteine ihrer Molekülmasse nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die in SDS-Probenpuffer geernteten und bei -20°C aufbewahrten Zellen wurden für 3 Minuten auf 98°C erhitzt, wodurch sich die Proteine räumlich entfalten konnten. Die vorbereiteten Zellen wurden anschließend auf Gele aufgetragen. Um die Titinisoformen aufzutrennen, wurden 2,1%ige Acrylamidgele verwendet, die zusätzlich mit 0,75% Agarose stabilisiert wurden. Dafür wurden alle Komponente (siehe Tab. 7) in einem 50 ml Falcon gründlich vermengt und im Wasserbad auf mindestens 48°C erwärmt. Anschließend wurde zügig APS und zuvor erwärmte Agarose dem Gemisch beigelegt. Nach mehrmaliger Resuspendierung wurde die Flüssigkeit zwischen zwei Glasplatten pipettiert. Das gegossene Gel musste vor Verwendung mindestens zwei Stunden

auspolymerisieren. Für die Gelelektrophorese wurden die Systeme Mini-Twin von Biometra und Mini-PROTEAN von Biorad verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 3-6 mA pro Gel, pro Tasche wurden ca. 20 µL der Zelllösung aufgetragen.

Tab.7: Pipettierschema für 2 Titingele

Lösung	Titingel 2,1 %
30% Acrylamidlösung	1,40 mL
H₂O_{bidest}	6,67 mL
4x SDS - Trenngelpuffer	5 mL
SDS 20%	100 µL
TEMED	11,5 µL
APS	150 µL
Agarose 1,5%	6,67 mL
Gesamtvolumen	20 mL

Zur Auftrennung kleinerer Proteine wurden Standardgele verwendet, die aus einem Anteil an Trenn- und Sammelgel bestanden. Das Trenngel enthielt, abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine, einen Acrylamidgehalt von 6%-12,5% (siehe Tab. 8). Nach Vermengen aller Komponenten wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und musste unter Abschluss von Sauerstoff durch Isopropanol 45 Minuten auspolymerisieren. Anschließend wurde das angefertigte Sammelgel (Tab. 8) über das Trenngel gegossen. Nach weiteren 10 Minuten konnte das Gel mit 5-10 µL Probe pro Tasche beladen werden und in 1x-Laufpuffer bei 30-60 mA pro Gel laufen. Dabei wurden die oben genannten Geräte verwendet.

Zur Darstellung des Titin/Myosin-Verhältnisses wurden spezielle Mixgele, bestehend aus Anteilen an Titin- und Trenngel, angefertigt. Anstelle des Sammelgels wurde ein 2,1%iges Titingel auf das 6%ige Trenngel aufgetragen. Nach stattgefundener Polymerisierung konnten die Proben bei 3 mA pro Gel die Gelelektrophorese durchlaufen.

Tabelle 8: Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele / Sammelgele

Lösung	Trenngel 6%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	3 mL	5 mL	6,25 mL	0,667 mL
H₂O_{bidest}	8,25 mL	6,25 mL	5 mL	3,025 mL
4x SDS - Trenngelpuffer	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	-
4x-SDS-Sammelgelpuffer	-	-	-	1,25 mL
TEMED	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	15 µL
APS	75 µL	75 µL	75 µL	50 µL
Gesamtvolumen	15 mL	15 mL	15 mL	5 mL

2.2.2.2 Imperial Protein Stain

Zum Untersuchen der Isoformen und des Titin/Myosin-Verhältnisses wurden die 2,1% Titingele und Mixgele nach Durchlaufen der Gelelektrophorese für eine Stunde in Imperial Protein Stain gefärbt, einer Coomassie-basierten Proteinfärbelösung. Anschließend wurden die Gele mehrmals mit deionisierten Wasser gewaschen, bis Banden sichtbar wurden.

Die Bandenstärke wurde mit dem Durchlichtprogramm FX Imager (Vilbert & Lourmat) digitalisiert und durch das Programm Image J quantitativ erfasst. Unter Addition der einzelnen Isoformbanden (N2BA und N2B) konnte der Gesamtanteil an Titin sowie der prozentuale Anteil der einzelnen Isoformen angegeben werden. Ebenso konnte die Titin-spezifische-Abbaubande T2 und bei Mixgelen die sarkomerische Myosin-Bande erfasst werden.

2.2.2.3 Western Blot

Um die jeweiligen Proteinbanden mithilfe von Antikörpern nachzuweisen, wurden die Proteine mittels *semidry*-Western Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Der Prozess erfolgte bei einer Stromstärke von 1,5 A und Spannung von maximal 20 mV für 12-20 Minuten. Um den Bandentransfer zu visualisieren, wurde die Membran 20 Sekunden lang mit PVDF-Stain gefärbt und anschließend 5 Minuten mit PVDF-Destain wieder entfärbt. Damit wurden allein die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Destain-Lösung wurde mehrmals mit 1x-Laufpuffer ausgewaschen. Voraussetzung für eine spezifische

Antikörperbindung an die jeweiligen Proteinbanden ist dabei eine Blockierung aller unspezifischen Bindungsstellen. Dafür wurden die Membranen für mindestens eine Stunde in TBST + 2% Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) gelagert. Nach erfolgter Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen mit primären Antikörpern, verdünnt in 1xTBST + 2%iger BSA-Lösung, über Nacht inkubiert (Tab. 5). Um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Blots am nächsten Tag 3-mal für je 10 Minuten mit 1x-TBST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper für mindestens eine Stunde auf die Blots gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen ebenfalls 3-mal für 10 Minuten mit 1x-TBST gewaschen.

Um die Expression der Antikörper-bindenden Strukturen zu visualisieren, wurde ein im Verhältnis 1:1 vermischtes Chemiluminiszenzreagenz auf die Western Blots gegeben und im Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) detektiert.

Zum Normieren der Signalstärke und Quantifizieren der Proteinmenge wurde zusätzlich ein Antikörper für definierte Strukturproteine hinzugegeben. Erst durch Verrechnen beider Signalstärken konnte eine Aussage über eine erhöhte oder erniedrigte Antikörperbindung getroffen werden. Dafür wurde das Programm Image J verwendet. Ubiquitin- und strukturspezifische Titinantikörper binden aber beim Western Blot an die gleiche Stelle. Hier musste zur Quantifizierung der Proteinmenge nach Signalerfassung der ubiquitinspezifische Antikörper durch mit β -Mercaptoethanol versetzten Stripping-Puffer von der Membran gelöst werden. Im oben beschriebenen Verfahren wurde ein neuer strukturspezifischer Antikörper auf den Blot transferiert, der die Gesamtmenge des enthaltenen Proteins detektiert.

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen

2.2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden die in SDS-Probenpuffer geernteten Zellen für 3 Minuten auf 98°C erhitzt. Anschließend wurden jeweils 2 μ L der erwärmten Proben im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurden 2 μ L mit 800 μ L Wasser und 200 μ L Bradford-Reagenz vermengt, die Lösung in eine Eppendorf-Küvette überführt und die Absorption im Glomax-Multi+ (Promega) photometrisch bei 595 nm gemessen.

2.2.2.4.2 BCA-Proteinbestimmung

Die in Lysepuffer (siehe 1.2.4) geernteten Zellen wurden aufgetaut und pro Probe wurden 2 µL mit 8 µL Wasser verdünnt. Nach Pipettieren der Lösungen in eine 96-Well-Platte wurden zusätzliche 10 µL Wasser pro Probe hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben mit 200 µL BCA-Reagenz (Reagent A: Reagent B 50:1) versetzt, mit Parafilm-Folie versiegelt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Absorption photometrisch im Glomax-Multi+ bei 562 nm gemessen.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Fixierung und Färbung

Vor Färbung der auf Deckgläschen kultivierten Zellen war eine Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) nötig. Dafür wurden die Zellen 1x mit kaltem PBS gespült und für 10 Minuten mit 4% PFA in PBS inkubiert. Nach zwei weiteren Spülungen mit PBS konnten die Zellen bei -4°C aufbewahrt werden.

Für Zellfärbungen wird eine permeable Zellmembran benötigt. Diesbezüglich wurden die Zellen 10 Minuten in 0,5%iger Triton-X-100-PBS Lösung inkubiert. Die tritonhaltige Lösung wurde 2x für 5 Minuten mit PBS abgewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen der fixierten Zellen wurden mit 3%iger BSA Lösung für eine halbe Stunde blockiert. Anschließend wurden die Zellen für 1-2 Stunden mit einem primären Antikörper inkubiert (Tab. 6). Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper für 1-2 Stunden. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt, da Lichteinfall das Signal des sekundären Antikörpers beeinflussen kann. Abschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, durch Einbettmedium auf Objektträgern fixiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Analysiert wurden die Zellen unter dem Biorevo Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), welches die Signale der zwei verschiedenen Antikörper aufzeichnete. Da die Kulturen neben Kardiomyozyten auch geringe Mengen anderer Zelltypen wie Fibroblasten oder Endothelzellen enthalten können, wurden zusätzlich Antikörper gegen Sarkomerproteine verwendet, um Kardiomyozyten eindeutig zu identifizieren. Zum Erfassen des Zellumfangs wurden die Durchlicht- und Immunfluoreszenzbilder der Zellen übereinandergelegt und mit dem Programm Image J ausgemessen.

2.2.4 Caspase 3/7 Assay

Für den Caspase Assay (Promega) wurden die in 12-Well-Platten kultivierten Zellen pro Well mit 50 µL des 1%NP40-haltigen PBS-Lysepuffer geerntet. Nach 5-minütigem Kühlen auf Eis wurden die Lysate bei 4°C mit 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Behälter transferiert und die Proteinkonzentration wurde per BCA Assay bestimmt. Die definierte Proteinmenge von 10 µg/50 µL wurde eingestellt und mit 50 µL des Caspase-Glo3/7 versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Lumineszenz der Proben im Glomax-Multi+ gemessen werden.

2.2.5 Software

Zusätzlich zu den im Text genannten Programmen waren bei der Auswertung und Analyse der Daten noch Microsoft Excel, Sigma Plot 13 und Adobe Photoshop CS6 beteiligt.

2.2.6 Datenanalytische Statistik

Über die Anzahl der unabhängigen Experimente (n) wurde für die Daten der Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Analysiert wurden die Daten durch den *Student's t-test* beziehungsweise den *Mann-Whitney Rank Sum Test* durch Verwendung des Programms Sigma Plot 13.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt und statistische Signifikanz angenommen.

3 Ergebnisse

Die Kultivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten (ERC) erfolgte ab Tag 1 entweder in Kontrollmedium oder in einem 35 mM-haltigen KCl-Medium. Zwischen den Tagen 2 bis 9 wurden sowohl die unter Kontroll- als auch unter hyperkaliämischen Bedingungen kultivierten Zellen in SDS-Probenpuffer geerntet oder immunhistochemisch gefärbt. In einem alternativen Versuchsansatz wurden die Versuchszellen ab Tag 7 in hyperkaliämischem Medium kultiviert und an den Tagen 9 und 10 in SDS-Probenpuffer geerntet. Bis auf diesen alternierenden Ansatz (siehe 3.8) wurden alle weiteren Versuche unter den oben genannten Standardbedingungen (Hyperkaliämie ab Tag 1) durchgeführt (Abb. 6).

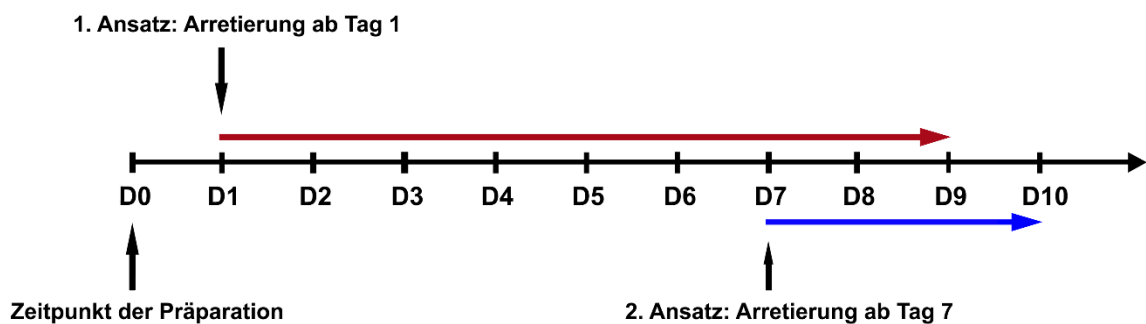


Abb. 6: Zeitachse mit Darstellung der Kultivierungszeiträume in hyperkaliämischem Nährmedium: Im ersten Ansatz wurden embryonale Rattenkardiomyozyten ab Tag 1 arretiert, wobei der letzte Kultivierungs- und Untersuchungszeitpunkt der 9. Tag war. Im alternativen Versuchsmodell fand die Arretierung zwischen dem 7. und dem 10. Tag statt.

3.1 Hyperkaliämie induziert eine vermehrte Degradation des Titinfilaments

Der folgende Abschnitt untersucht den Einfluss des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf den Abbau des Titinfilaments. Die mechanische Inaktivität der Sarkomere könnte unserer Hypothese nach zu einem erhöhten Turnover nicht benötigter Sarkomerbestandteile, insbesondere von Titin, führen. Die Analyse der Degradationsbande T2 und des relativen sarkomerischen Titinanteils sollte dahingehend Evidenz erbringen. Der Einfluss von Hyperkaliämie auf die Titin-spezifische Degradationsbande T2 sowie die Relation von Titin zu Myosin und Aktinin in embryonalen Rattenkardiomyozyten ist in Abbildung 7 dargestellt. Die arretierten Versuchszellen präsentierten von Beginn an eine signifikante Erhöhung des relativen T2-Anteils. Gemessen wurde hierbei das Verhältnis

zum Gesamttitin T1, bestehend aus N2BA und N2B. Während die Kontrollzellen an Tag 2 und 4 eine T2/T1-Ratio von $0,23 \pm 0,02$ und $0,18 \pm 0,01$ besaßen, wiesen die in KCl kultivierten Kardiomyozyten ein gesteigertes Verhältnis von $0,39 \pm 0,03$ und $0,47 \pm 0,02$ auf. Auch an Tag 7 zeigten die arretierten Kardiomyozyten mit $0,42 \pm 0,03$ zu $0,14 \pm 0,02$ im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte T2/T1-Level, welche an Tag 9 mit $0,30 \pm 0,02$ zu $0,17 \pm 0,03$ ebenfalls detektiert wurden (Abb. 7a).

Simultan zu den obigen Veränderungen wiesen die in KCl kultivierten Kardiomyozyten signifikant reduzierte Titin/Myosin-Verhältnisse auf. Dabei wurde T1 auf die Myosin-Bande bezogen. So zeigten die Kontrollzellen an den Tagen 4 und 7 relative Werte von $0,40 \pm 0,02$ und $0,38 \pm 0,02$, während die Versuchszellen erniedrigte Quotienten von $0,23 \pm 0,03$ und $0,24 \pm 0,01$ besaßen. Auch an Tag 9 wiesen die arretierten Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine mit $0,16 \pm 0,02$ zu $0,33 \pm 0,02$ erniedrigte Ratio auf (Abb. 7b).

Ähnlich verhielt sich die Beziehung von T1 zu Aktinin. Diese Daten wurden von Sebastian Kötter analysiert und für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt. Während die Kontrollzellen an den Tagen 7 und 9 ein Titin/Aktinin-Verhältnis von $0,44 \pm 0,06$ und $0,62 \pm 0,07$ zeigten, konnte in den arretierten Versuchszellen mit $0,17 \pm 0,03$ und $0,28 \pm 0,02$ eine signifikant reduzierte Ratio festgestellt werden (Abb. 7c).

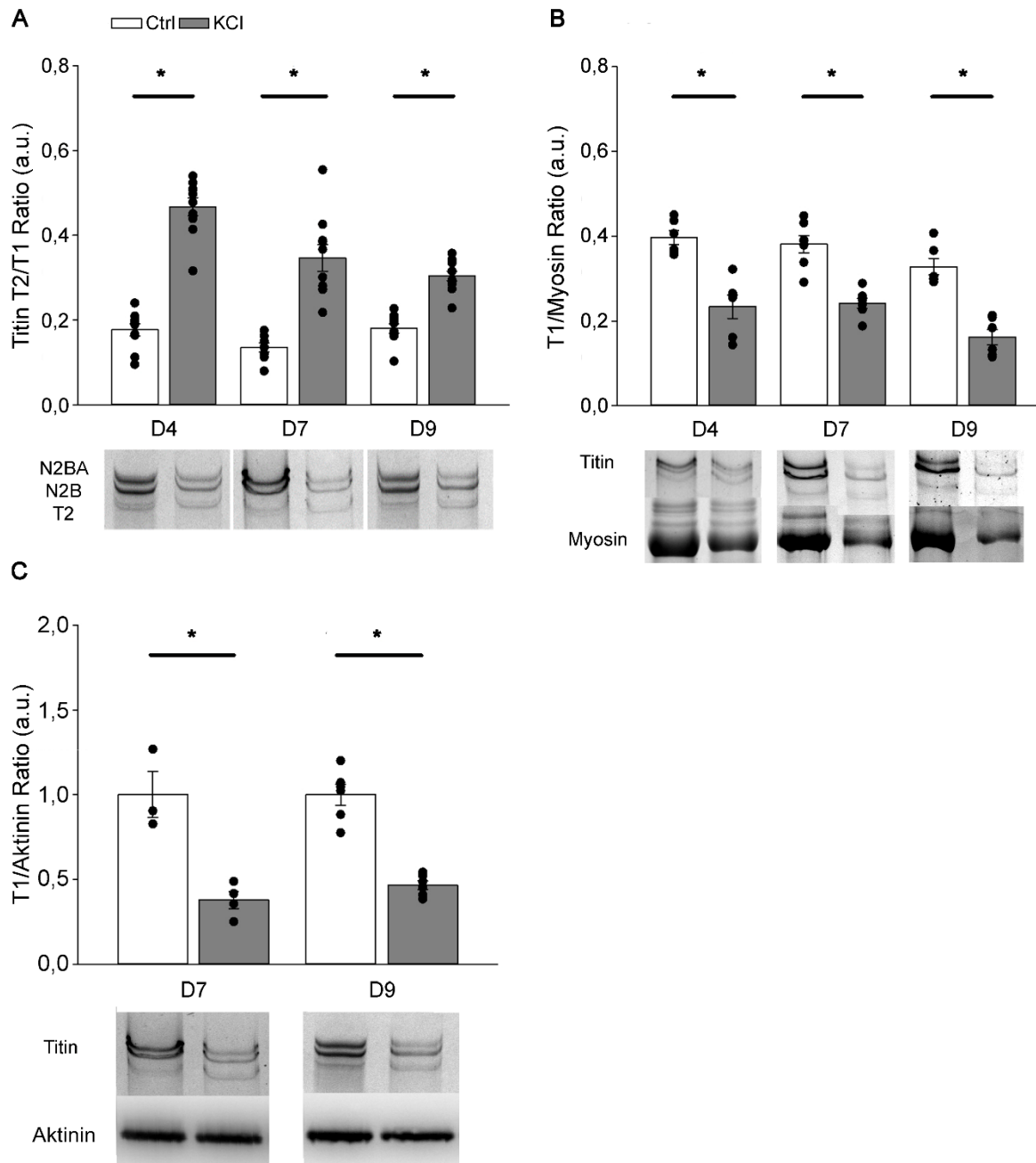


Abb. 7: Einfluss des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf die Titin-Degradation, die Titin/Myosin- und die Titin/Aktinin-Ratio in embryonalen Rattenkardiomyozyten. (A) Relative Verhältnis der Degradationsbande T2 zum Gesamtittin (T1 = N2BA+N2B) (n=6 bis 11). (B) Relative Relation des Gesamtittins T1 (N2BA+N2B) zu Myosin (n=6 bis 7). (C) Relative Verhältnis des Gesamtittins T1 (N2BA+N2B) zu Aktinin (n=3 bis 6). Gegenüberstellung der Zellen unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen. Diagramme zeigen die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Tage 4, 7 und 9. Die repräsentativen Gele stellen das Gesamtittin, die Degradationsbande T2 und Myosin dar. Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken/Sterne markiert. Die Daten des Graphen (C) wurden von Sebastian Kötter unter identischen Versuchsbedingungen ermittelt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2 Polyubiquitinierung des Titinfilaments wird durch mechanische Arretierung getriggert

Die vorherigen Ergebnisse lieferten Evidenz für einen erhöhten Titinabbau in arretierten embryonalen Rattenkardiomyozyten. Im Folgenden soll der Ubiquitinierungsstatus des Titinfilaments Auskunft über eine mögliche Markierung zur Degradation geben. Die Auswirkungen des hyperkaliämisch induzierten Zellarrests auf die Titin-Ubiquitinierung sind in Abbildung 8 abgebildet. Simultan zur vermehrten Degradation des Titinfilaments (siehe Abb. 7) zeigten in KCl kultivierte Kardiomyozyten ab Tag 4 signifikant erhöhte K48- und K63-polyubiquitinierte Titinlevel. An den Tagen 4 und 7 präsentierten die Versuchszellen eine um den Faktor $2,99 \pm 0,18$ und $2,75 \pm 0,23$ gestiegene K48-Titinubiquitinierung, welche sich bis Tag 9 auf den Faktor $3,47 \pm 0,23$ steigerte. Die K63-Titinubiquitinierung zeigte an den Tagen 4 und 7 mit $2,98 \pm 0,38$ - und $1,54 \pm 0,21$ -fach erhöhten K63-Leveln ähnliche Werte, welche an Tag 9 mit um den Faktor $4,00 \pm 0,43$ erhöhten Leveln ihr Maximum erreichte (Abb. 8).

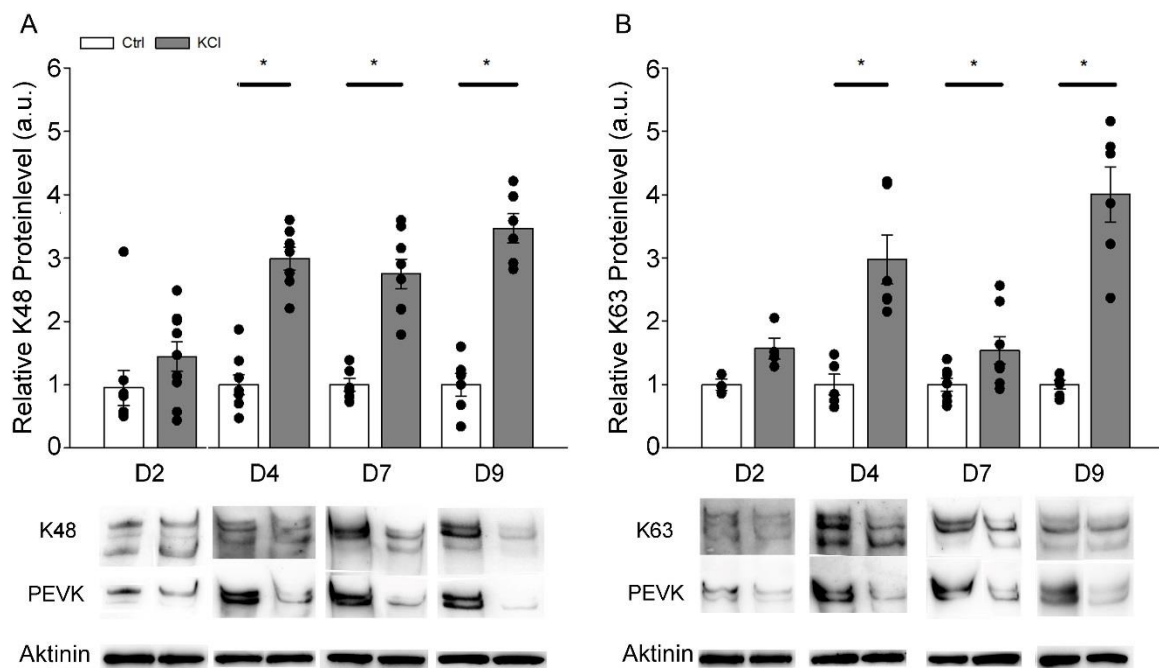


Abb. 8: Auswirkungen des hyperkaliämischen Zellarrests auf die Titin-Ubiquitinierung in embryonalen Rattenkardiomyozyten. (A) Relative K48-spezifische Titin-Ubiquitinierung im Verhältnis zum PEVK-Antikörper und zur Beladungskontrolle Aktinin (n=6 bis 9). (B) Relative K63-spezifische Titin-Ubiquitinierung in Relation zum PEVK-Antikörper und zur Beladungskontrolle Aktinin (n=3 bis 8). Die dargestellten Zellen wurden unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen kultiviert. Säulendiagramme zeigen die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Proteinlevel an den Tagen 2, 4, 7 und 9. Western Blots sind exemplarisch

dargestellt. Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

3.3 PSMA2-Proteinlevel sind in den Versuchszellen erhöht

Im Folgenden wird der Effekt mechanischer Arretierung auf die Expression proteasomaler Bestandteile in embryonalen Rattenkardiomyozyten untersucht. Die erhöhte Titindegradation mit der einhergehenden K48-Ubiquitinierung könnte auf eine vermehrte hydrolytische Degradation im 26S Proteasom hindeuten (Su and Wang, 2010). Als Marker für diesen Abbaumechanismus sollten die relativen Proteinlevel der 20S Untereinheit PSMA2 (Wu et al., 2005) untersucht werden. Die Auswirkungen des Zellarrests auf die PSMA2-Proteinlevel in embryonalen Rattenkardiomyozyten sind in Abbildung 9a dargestellt. Im Verlauf des Experiments wiesen die arretierten Versuchszellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ascendierende relative Proteinlevel an PSMA2 auf. So präsentierten die in KCl arretierten Kardiomyozyten an Tag 4 ein $1,38 \pm 0,08$ -fach erhöhtes und signifikantes Niveau der 20S Untereinheit. Auch an den Tagen 7 und 9 zeigten die Versuchszellen signifikante, um den Faktor $1,73 \pm 0,14$ und $1,77 \pm 0,16$ erhöhte relative PSMA2-Proteinlevel (Abb. 9a).

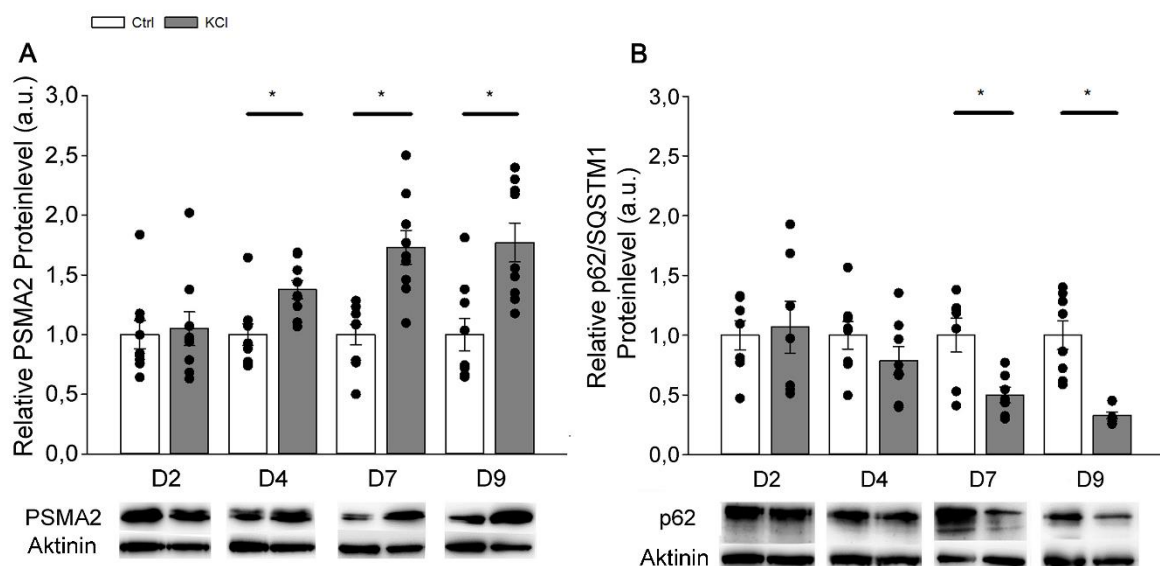


Abb. 9: Einfluss des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf die relativen PSMA2- und p62-Proteinlevel. (A) Relative PSMA2-Proteinlevel im Vergleich zur Beladungskontrolle Aktinin (n=9) (B) Relative p62-Proteinlevel in Relation zur Beladungskontrolle Aktinin (n=7 bis 8). Gegenüberstellung der Zellen unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen. Diagramme geben die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Tage 2, 4, 7 und 9 wieder. Western Blots sind exemplarisch dargestellt. Durch den *Student's*

t-test ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert <0,05 angenommen und durch Asterisken markiert.

3.4 ERC besitzen bei Inaktivierung reduzierte p62-Proteinlevel

Um den Anteil autophagosomaler Degradationsmechanismen auf den durch mechanische Inaktivierung induzierten Titinabbau zu untersuchen, wurden definierte Marker unter Kontroll- und hyperkaliämischen Versuchsbedingungen analysiert. Das multifunktionale Adapterprotein p62 vermittelt über die bivalente Bindung polyubiquitiner Substrate und des Autophagosombestandteils LC3 eine autolysosomale Degradation. Eine Hemmung der Autophagie und des Proteasoms geht mit einer Akkumulation von p62 einher (Shaid et al., 2013, Albornoz et al., 2019). Die Auswirkungen des hyperkaliämisch induzierten Zellarrests auf die relativen p62-Proteinlevel in embryonalen Rattenkardiomyozyten sind in Abbildung 9b dargestellt. Die immunhistochemische Färbung von p62 ist in Abbildung 11a zu finden. Im Laufe der Kultivierung präsentierten in KCl arretierte Kardiomyozyten in Relation zu den Kontrollzellen deszendierende p62-Proteinlevel. So wiesen die Versuchszellen an Tag 4 ein um den Faktor $0,79 \pm 0,12$ reduziertes Niveau an p62 auf. Ab Tag 7 zeigten die hyperkaliämisch arretierten ERC signifikant reduzierte Proteinlevel ($0,50 \pm 0,07$), welche bis Tag 9 auf den Faktor $0,33 \pm 0,03$ sanken (Abb. 9b).

Die Auswirkungen des hyperkaliämischen Zellarrests auf die LC3-II/I-Ratio und das Verhältnis von LC3-II zu Aktinin sind in Abbildung 10a/b dargestellt. Im Laufe der Kultivierung konnte zwischen beiden Zellkollektiven keine Diskrepanz der LC3-II/I-Ratio beobachtet werden. Das Verhältnis von LC3-II zur Beladungskontrolle α -Aktinin zeigte sich hingegen in den KCl-arretierten embryonalen Kardiomyozyten an den ersten Tagen tendenziell erhöht. So wiesen die Versuchszellen an Tag 7 eine um den Faktor $1,48 \pm 0,28$ erhöhte Ratio auf. An Tag 9 präsentierten die in KCl arretierten Kardiomyozyten aber ein $0,81 \pm 0,16$ -fach erniedrigtes Verhältnis (Abb. 10a/b).

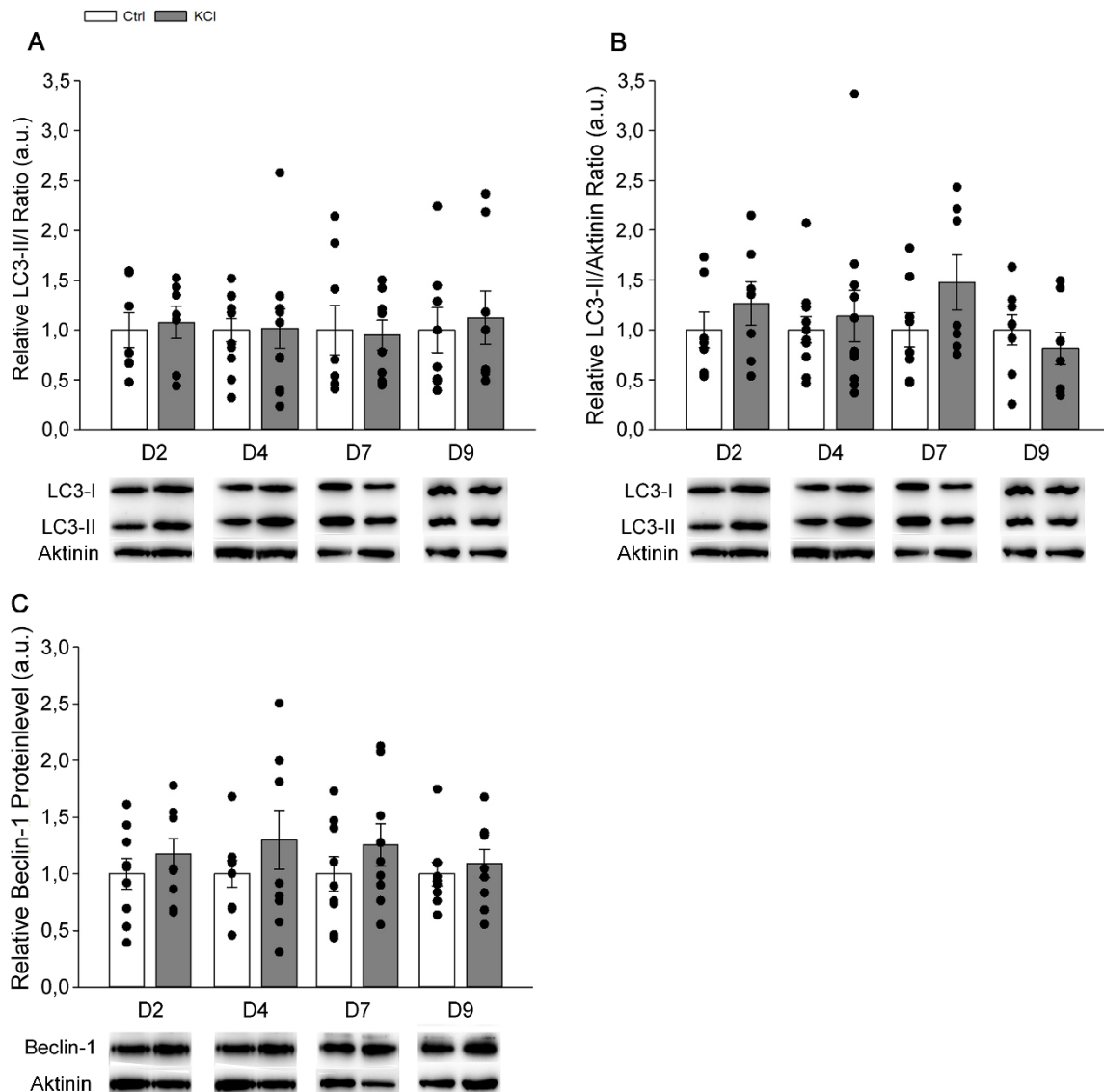


Abb. 10: Auswirkung des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf die relativen LC3- und Beclin-1-Proteinlevel. (A) Relativer Anteil von LC3-II in Relation zu LC3-I (n=7 bis 11). (B) Relative LC3-II-Proteinlevel im Vergleich zur Beladungskontrolle Aktinin (n=7 bis 11). (C) Relative Beclin-1-Proteinlevel im Relation zur Beladungskontrolle Aktinin (n=9). Gegenüberstellung der Zellen unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen. Diagramme geben die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Tage 2, 4, 7 und 9 wieder. Exemplarische Western Blots sind dargestellt. Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

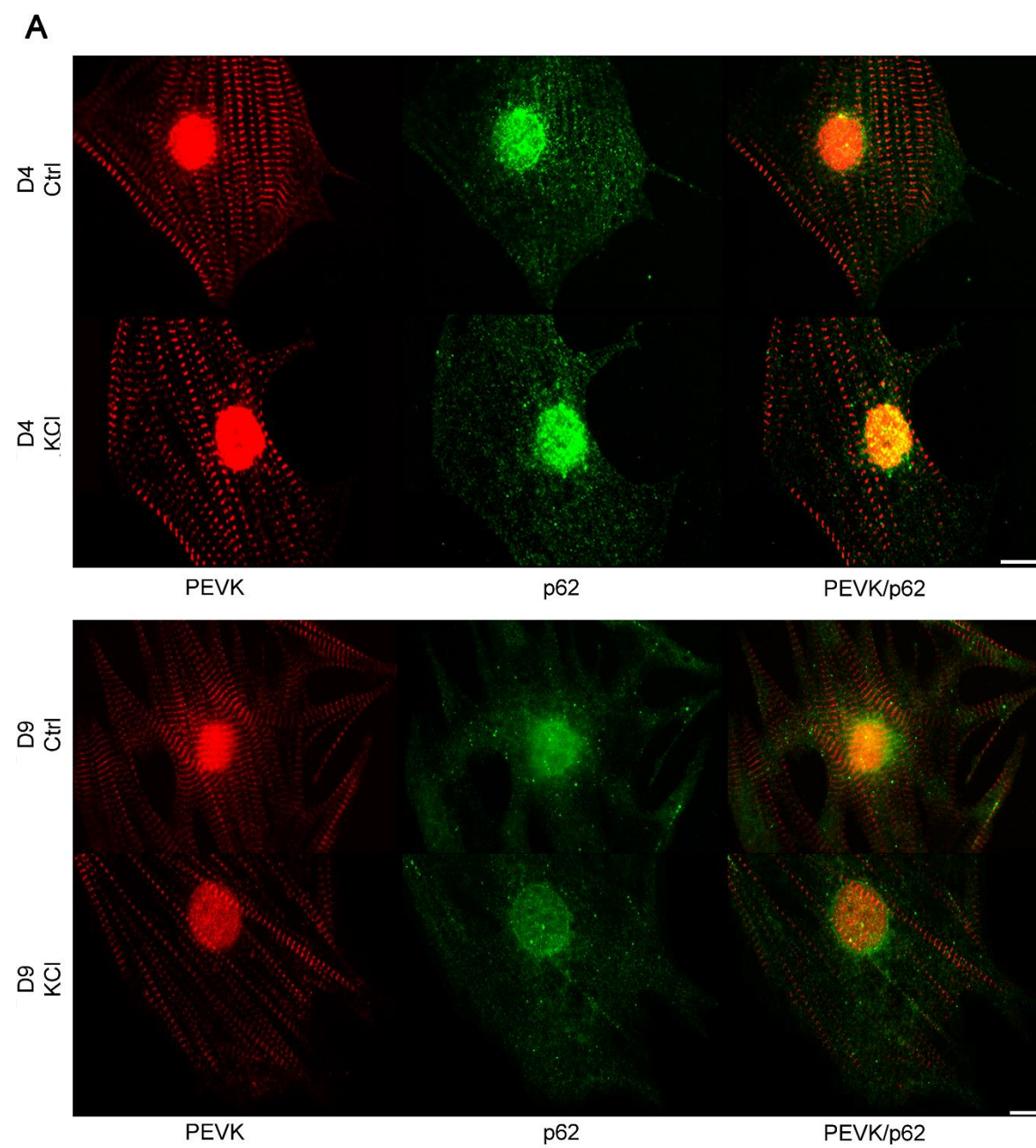
Im Prozess der Autophagie induziert Beclin-1 durch Interaktion mit der Phosphoinositid-3-Kinase die Bildung und Reifung von Autophagosomen (Maejima et al., 2016). Der Einfluss mechanischer Inaktivierung auf die Beclin-1-Proteinlevel ist in Abbildung 10c dargestellt. Die in KCl arretierten embryonalen Kardiomyozyten präsentierten während der Kultivierung eine leicht erhöhte Tendenz an Beclin-1. So zeigten die Versuchszellen an Tag 4 $1,30 \pm$

0,26-fach erhöhte Proteinlevel. Zum Abschluss des *Treatments* glichen sich die Beclin-1-Level nahezu an, die arretierten Kardiomyozyten wiesen an Tag 9 ein lediglich um den Faktor $1,09 \pm 0,12$ erhöhtes Niveau auf (Abb. 10c).

3.5 Arretierte Kardiomyozyten weisen keine veränderte Immunhistochemie auf

In Anbetracht der signifikant verminderten p62-Proteinlevel sollte die immunhistochemische Färbung Auskunft über eine etwaige veränderte Lokalisation oder Akkumulation von p62 erbringen. An Tag 4 und 9 ließen sich zwischen Kontroll- und Versuchszellen keine Unterschiede erkennen. Bisweilen schienen sich die p62-Moleküle entlang der Sarkomerstruktur und zwischen den PEVK-Banden anzuordnen. Da die Titin-spezifische PEVK-Region in dem I-Band liegt, impliziert die visualisierte Akkumulation von p62 die erwartete Bindung im M-Linien-Bereich des A-Bandes (Lange et al., 2005). Somit konnten für p62 im Western Blot zwar signifikant reduzierte Proteinlevel nachgewiesen werden, in der Immunhistochemie offenbarte sich aber kein Unterschied zwischen beiden Zellgruppen (Abb. 11a).

Zudem sollte die immunhistochemische Analyse von LC3 und LAMP1 Auskunft über ein vermehrtes oder vermindertes Vorkommen von Autophagosomen- oder Lysosomen erbringen. Im Abgleich der Färbungen beider Zellkollektive konnte aber weder bei LC3 noch bei LAMP-1 eine divergierende Akkumulation oder Lokalisation festgestellt werden (Abb. 11b/c).



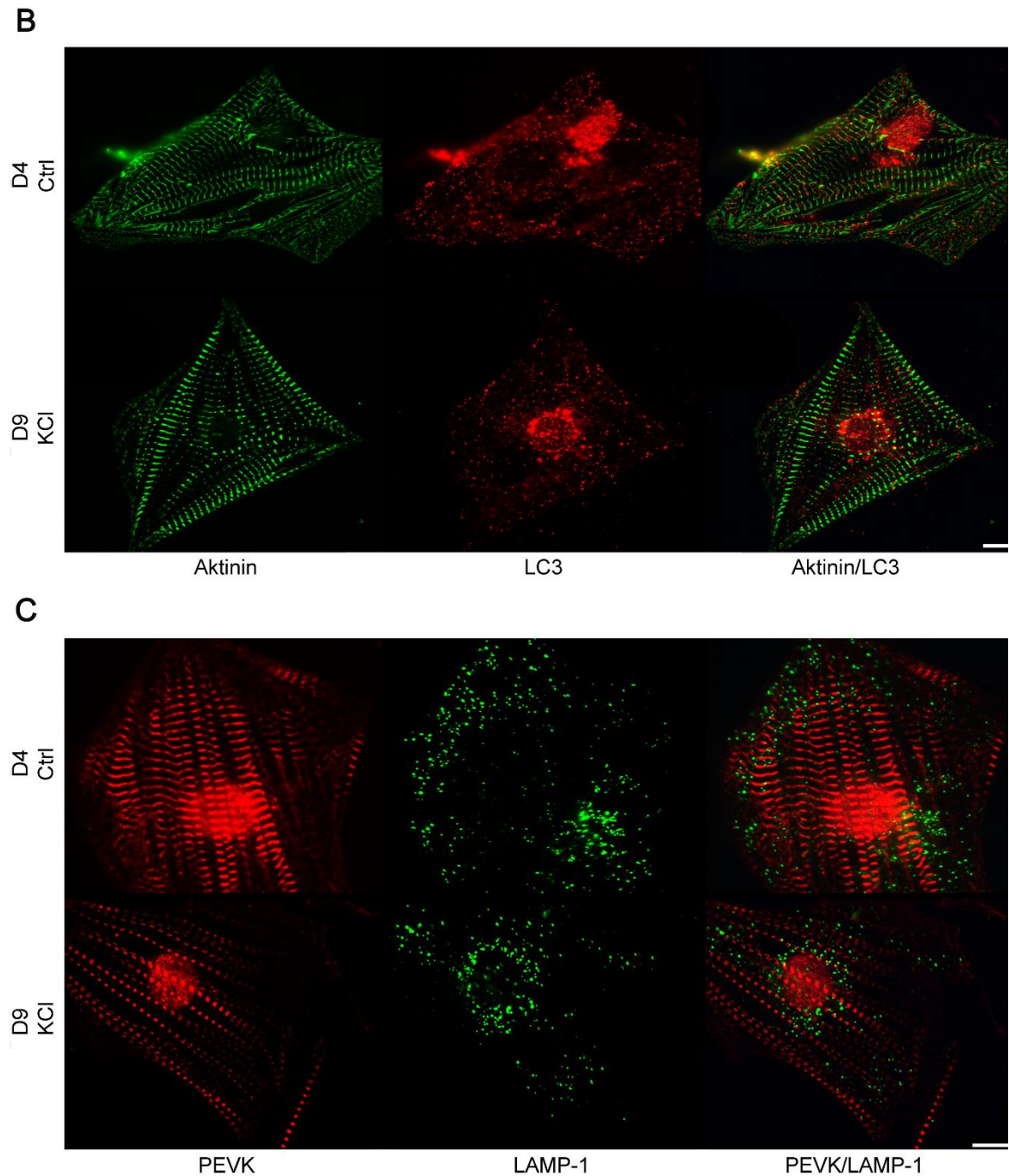


Abb. 11: Auswirkungen des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf die zelluläre Lokalisation von p62, LC3 und LAMP-1 in embryonalen Rattenkardiomyozyten. Embryonale Rattenkardiomyozyten wurden in Kontroll- und 35 mM-haltigen KCl-Medium kultiviert und fixiert. (A) Färbung von p62 und dem Titinmarker PEVK. (B) Färbung von LC3 und dem Titinmarker PEVK. (C) Färbung von LAMP-1 und dem Titinmarker PEVK. Anschließend wurden alle Zellen mit den Sekundärantikörpern Alexa 488 und 555 markiert. Jeweils exemplarische und repräsentative Bilder von Tag 4 und 9. Balkenlänge: 10 μ m.

3.6 Kultivierung in hyperkaliämischem Medium nimmt keinen Einfluss auf die Zellvitalität

Wie in den bisherigen Kapiteln dargestellt, führt die mechanische Inaktivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten zu einem verstärkten Titinabbau mit konkordant erhöhter proteasomaler und autophagosomaler Degradation. Um die Ergebnisse einer physiologischen Reaktion auf die Nicht-Nutzung der Sarkomere zuzuordnen und eine Apoptose-induzierte Degradation zu exkludieren, sollten bestimmte Parameter die Zellvitalität der arretierten Versuchszellen belegen. Die immunhistochemische Färbung sollte hierbei die intakte Zellmorphologie der Kardiomyozyten nachweisen. Die Analyse der Caspasen-Aktivität diene der Identifizierung apoptotischer Vorgänge, bei deren Ausführung die Effektorcaspasen 3 und 7 Schlüsselrollen besitzen (Flutsch et al., 2014).

Die Auswirkungen des hyperkaliämisch induzierten Zellarrests auf die Zellfläche (in Mikrometer) und die Caspase 3/7-Aktivität (in relativen Lichteinheiten) sind in Abbildung 12 dargestellt. Zur Berechnung der Fläche wurde der Zellumfang (A) anhand der PEVK-Färbungen und des Phasenkontrasts mit dem Programm ImageJ ermittelt. Infolge des kontinuierlichen Zellwachstums der embryonalen Kardiomyozyten nahm die Zellfläche beider Zellkollektive mit zunehmender Versuchsdauer beständig zu. So konnte bei den in KCl arretierten Kardiomyozyten keine Reduktion der Zellfläche beobachtet werden. An Tag 9, dem Ende der Kultivierung, wiesen die Kontrollzellen eine Zellfläche von $5408 \pm 350 \mu\text{m}^2$ auf. Die Versuchszellen zeigten mit $6090 \pm 345 \mu\text{m}^2$ ähnliche Werte (Abb. 12a).

Die Analyse der Effektorcaspasen 3 und 7 zeigte in den mechanisch inaktivierten Kardiomyozyten indessen eine leicht reduzierte Aktivität außerhalb des Signifikanzniveaus. Hierbei wurden die jeweiligen Werte eines Versuchsansatzes aufeinander normiert und repräsentieren die relative Aktivität. Tendenziell wiesen die Versuchszellen an Tag 4 eine $0,82 \pm 0,07$ -fach erniedrigte Caspase 3/7-Aktivität auf, welche sich an Tag 9 mit $0,73 \pm 0,27$ weiterhin leicht reduziert zeigte (Abb. 12b).

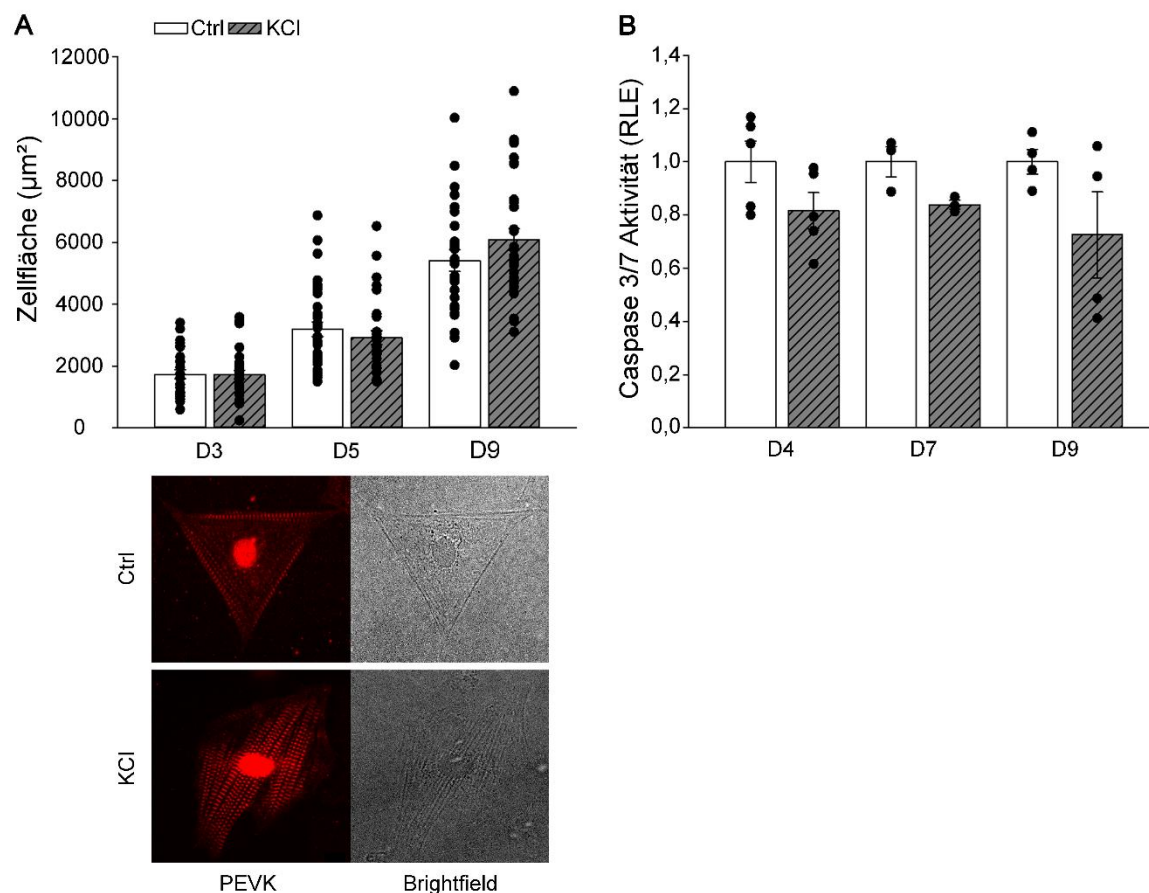


Abb. 12: Auswirkungen des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf die Zellfläche embryonaler Rattenkardiomyozyten und deren relative Caspase 3/7-Aktivität. (A) Quantifizierte Zellfläche (in µm) unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen. Säulen spiegeln die Mittelwerte ± Standardfehler an den Tagen 3, 5 und 9 wider (n=27 bis 33). Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Tag 5. Die Zellflächen wurden anhand der PEVK-Färbung und des Phasenkontrast-Bildes ermittelt. (B) Relative Caspase 3/7-Aktivität unter Kontroll- und hyperkaliämischen Bedingungen. Diagramm zeigt Mittelwerte ± Standardfehler der Relativen Lichteinheiten (RLE) an den Tagen 4, 7 und 9 (n=3 bis 4). Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert <0,05 angenommen und durch Asteriksen markiert.

3.7 Arretierung beschleunigt den Titinisoform-Switch kultivierter embryonaler Rattenkardiomyozyten

Die bisherigen Resultate sprechen für einen erhöhten Titinabbau mit Aktivierung autophagosomaler und proteasomaler Degradationsmechanismen in arretierten embryonalen Rattenkardiomyozyten. Im Folgenden soll der Einfluss des hyperkaliämischen Zellarrests und des erhöhten Titinabbaus auf den postnatalen Isoform-Switch des Titinfilaments, dargestellt in Abbildung 13, untersucht werden. Embryonale

Rattenkardiomyozyten wiesen mit zunehmender Kultivierungsdauer einen progredient steigenden N2B- und einen konkordant sinkenden N2BA-Anteil auf. In Relation zu den Kontrollzellen exprimierten die in KCl arretierten Kardiomyozyten mit zunehmender Versuchsdauer signifikant höhere N2B-Anteile. Bei einem noch ausgeglichenen Isoformverhältnis an Tag 2, zeigten die Versuchszellen an Tag 4 mit $50,43 \pm 1,82\%$ zu $45,97 \pm 1,39\%$ (Ctrl) einen gestiegenen Anteil an N2B. Während an Tag 7 die Kontrollzellen $46,38 \pm 1,11\%$ N2B aufwiesen, besaßen in KCl-kultivierte Kardiomyozyten mit $57,12 \pm 1,58\%$ signifikant mehr N2B. Zum Ende des Kultivierungszeitraums wurden an Tag 9 in den Kontrollzellen $51,04 \pm 0,63\%$ N2B gemessen, die Versuchszellen zeigten mit $64,51 \pm 1,31\%$ N2B weiterhin signifikant erhöhte Isoform-Anteile (Abb. 13). Auch hier wird der deutlich geringere Titin-Gehalt der arretierten Kardiomyozyten ersichtlich, welcher in vorherigen Experimenten bereits analysiert wurde (siehe 3.1).

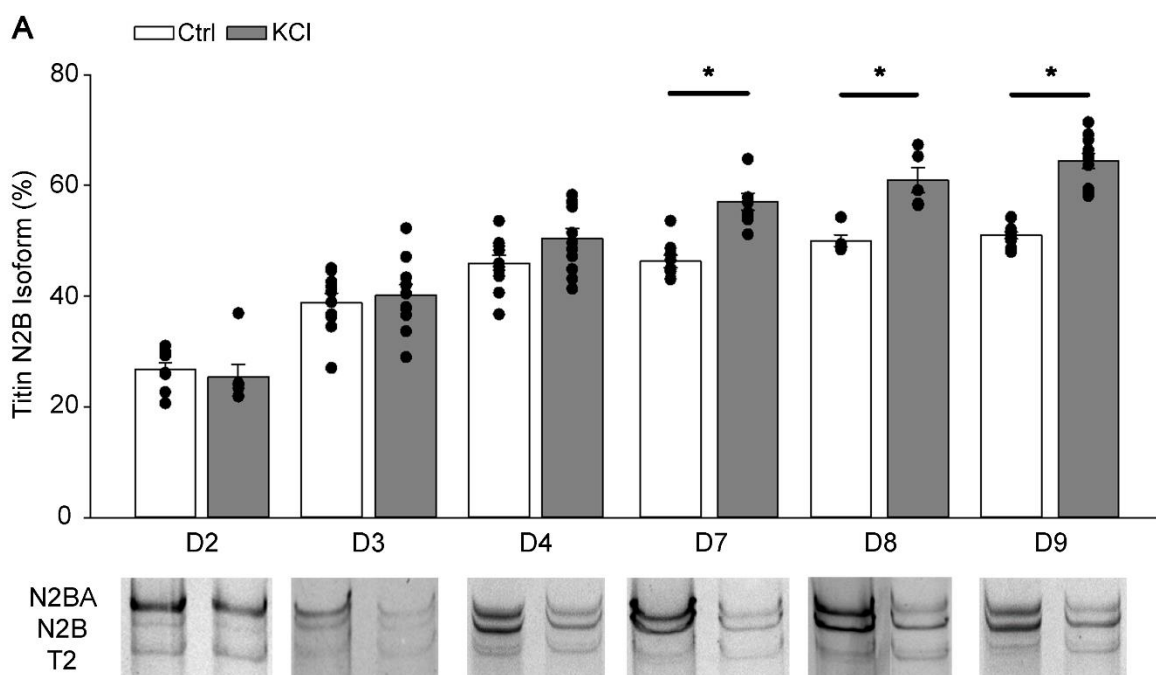


Abb. 13: Einfluss des ab Tag 1 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf den Titinisoform-Switch in embryonalen Rattenkardiomyozyten. Zusammenfassende Darstellung der Resultate unter Kontrollbedingungen und unter Kultivierung der Kardiomyozyten in 35 mM KCl-haltigen Nährmedium an den Tagen 2, 3, 4, 7, 8 und 9. Die Säulendiagramme stellen den relativen Anteil der Titin-Isoform N2B am Gesamttitin dar (Mittelwert $\pm$ Standardfehler); (n=6 bis 11). Die repräsentativen Titingele der Tage 2, 4, 7 und 9 bilden das N2BA:N2B Isoformverhältnis sowie die Titin-spezifische Abbaubande T2 ab. Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

3.8 Arretierung von ERC ab Tag 7 bewirkt am Titinfilament keine Veränderung

Die Auswirkungen des hyperkaliämischen Zellarrests auf die Titindegradation (siehe 3.1) und den Isoform-Switch (siehe 3.7) sollten in einem modifizierten Versuchsansatz getestet werden. Hierfür wurden die Versuchszellen nach Präparation identisch zu den Kontrollzellen kultiviert, erst ab Tag 7 erhielten sie das 35 mM-haltige KCl-Nährmedium. An den Tagen 9 und 10 wurden die Zellen in SDS-Probebuffer geerntet und analysiert.

Während embryonale Rattenkardiomyozyten im bisherigen Versuchsansatz nach 4 Tagen erkennbare Unterschiede in der Titinisoform-Komposition aufwiesen (D4), zeigten die alternativ behandelten Versuchszellen keine Disparität. So besaß die Kontrollgruppe an Tag 10 einen N2B-Anteil von $66,55 \pm 1,84\%$, während die KCl kultivierten Kardiomyozyten ein N2B-Gehalt von $64,51 \pm 1,30\%$ hatten (Abb. 14a). Im Vergleich zu der signifikant erhöhten Degradationsbande T2 bei ab Tag 1 arretierten Kardiomyozyten wiesen die Versuchszellen im alternierenden Ansatz an Tag 10 mit $0,17 \pm 0,01$ zu $0,13 \pm 0,02$ (Ctrl) lediglich eine tendenziell erhöhte T2/T1-Ratio außerhalb des Signifikanzniveaus auf (Abb. 14b). Zusätzlich zeigten sich an Tag 10 im Abgleich der Titin/Myosin-Verhältnisse zwischen Kontrollzellen ($0,33 \pm 0,03$) und den arretierten Kardiomyozyten ($0,38 \pm 0,02$) keine signifikanten Differenzen (Abb. 14c).

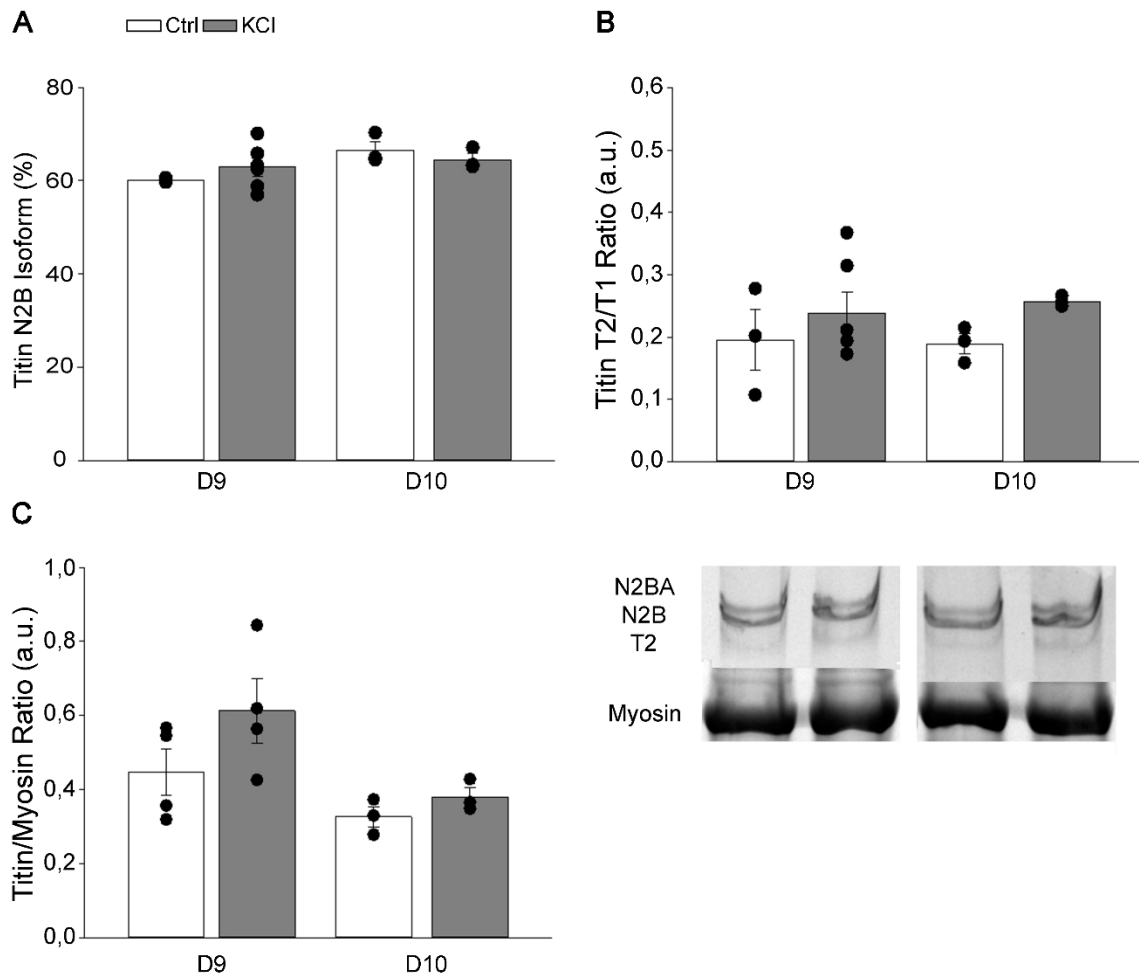


Abb. 14: Einfluss des ab Tag 7 induzierten hyperkaliämischen Zellarrests auf den Titinisoform-Switch, die Titin-Degradation und die Titin/Myosin-Ratio in embryonalen Rattenkardiomyozyten. (A) Relativer Anteil der N2B-Isoform am Gesamttitin (n=3 bis 6). (B) Relatives Verhältnis der Degradationsbande T2 zum Gesamttitin T1 (N2BA+N2B) (n=3 bis 6). (C) Relatives Verhältnis des Gesamttitins (T1 = N2BA+N2B) zu Myosin (n=3 bis 4). Diagramme zeigen die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Tage 9 und 10. Durch den *Student's t-test* ermittelte statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

4 Diskussion

4.1 Mechanische Inaktivierung induziert die Degradation des Titinfilaments und führt zu reduziertem Titin-Gehalt

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen eines hyperkaliämisch induzierten Zellarrests auf die Degradation und Entwicklung des Titinfilaments untersucht. Hierbei wurde geprüft, inwiefern die mechanische Nicht-Nutzung der Sarkomere zu einem erhöhten Abbau von Titin führt und welche Pfade der zellulären Protein Quality Control involviert sind. Zudem wurde der Einfluss fehlender Sarkomerkontraktionen auf die Isoform-Komposition des Titinfilaments analysiert. Für die Durchführung dieser Experimente bietet die Zellkultur mit embryonalen Rattenkardiomyozyten sehr gute Voraussetzungen. Im Gegensatz zu adulten Zellen bilden embryonale Kardiomyozyten aufgrund ihrer hohen Teilungsrate einen intakten Zellrasen, der als myofibrillärer Apparat synchronisiert und hochfrequent kontrahiert.

In seiner Rolle als größtes bekanntes Protein des menschlichen Körpers fungiert Titin als Bauplan und Gerüst des Sarkomers (Rudolph et al., 2019). Da mechanischer Stress zur Abnutzung muskulärer Proteine führt, vermuteten wir hierdurch eine vermehrte Degradation des Titinfilaments. Schon unter Standardbedingungen entsteht durch konstanten Turnover des Titins ein dynamisches Verhältnis aus Synthese und Abbau, wobei in ERC während der ersten Tage die Proteinbiosynthese überwiegt (Rudolph et al., 2019). Dabei sollte mechanische Arretierung unserer Hypothese nach durch Nicht-Nutzung der Sarkomere das Gleichgewicht zugunsten einer verstärkten Degradation des Titinfilaments verschieben. Tatsächlich konnte in unseren Experimenten bei den arretierten Kardiomyozyten sowohl ein verstärkter Abbau des Titinfilaments als auch eine Reduktion des Gesamttitins beobachtet werden. Die kardioplegisch arretierten ERC wiesen über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg signifikant erhöhte Level des Titin-Degradationsproduktes T2 auf. Zudem zeigten die mechanisch inaktivierten Versuchszellen ab Tag 4 signifikant reduzierte Titin/Myosin- und Titin/Aktin-Ratios. Unter kardioplegen Bedingungen spräche dies für einen koordinierten Abbau des Sarkomerproteins Titin bei muskulärer Nicht-Nutzung, der im Vergleich zu anderen Muskelproteinen vornehmlich das Titinfilament betrifft. Diese Ergebnisse lassen sich in verschiedenen Studien wiederfinden. So führte eine durch operative Denervation bedingte Arretierung im Skelettmuskel ebenfalls zur vermehrten Degradation des Titinfilaments (Chen et al., 2005, Tournel et al., 2002, Ulanova et al., 2019). Neben dem erhöhten Gehalt der Titin-Degradationsbande T2 konnte zudem eine Reduktion des Gesamttitins (T1) festgestellt werden (Ulanova et al., 2019). Auch in diesem Fall wiesen die Versuchszellen erniedrigte Titin/Myosin- und Titin/Aktin-Ratios auf;

das Aktin/Myosin-Verhältnis blieb unverändert. Somit wurde bereits hier eine, mit unseren Resultaten konsistente, schnellere und exzessivere Degradation des Titinfilaments im Vergleich zu anderen Sarkomerbestandteilen beschrieben (Chen et al., 2005, Toursel et al., 2002). Es lässt sich schlussfolgern, dass mechanische Arretierung zu einem erhöhten Turnover des Titinfilaments führt. Welche Degradationspfade am beobachteten Abbauprozess beteiligt sind, wird im Folgenden untersucht.

4.2 Die kardioplegisch arretierten Versuchszellen weisen eine erhöhte Titin-Ubiquitinierung auf

Die durch mechanische Inaktivierung hervorgerufene Degradation des Titins wirft die Frage auf, welche zellulären Abbaumechanismen in den Prozess involviert sind. Muskuläre Inaktivität führt über reduzierte Proteinbiosynthese und vermehrte Degradation zu Atrophie, welche durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und Autophagie vermittelt wird (Lang et al., 2017). Hierfür werden Substrate durch Polyubiquitinierung für den Abbau markiert, wobei Titin mit verschiedenen, an der Substratdegeneration beteiligten Proteinen interagieren kann. Im M-Band-Bereich besitzt Titin eine Kinase-Domäne, welche über Komplexbildung mit dem Zinkfingerprotein nbr1, dem Ubiquitin-assoziierten Adapterprotein p62 und der E3-Ligase MuRF-2 (*muscle RING-finger protein*) auf reduzierte mechanische Belastung reagieren kann (van der Pijl et al., 2019, Kötter et al., 2014, Lange et al., 2005). Der M-Band-Bereich des Titins ist zudem Bindungsstelle der E3-Ligase MuRF-1 (Centner et al., 2001, Kötter et al., 2014, Witt et al., 2005). Somit stellt die Ubiquitinierung Titins durch die *muscle RING-finger proteine* 1 und 2 einen möglichen Degradationspfad dar. Hierbei könnte eine K48-vermittelte Ubiquitinierung Titins den proteasomalen Abbau vermitteln (Xu et al., 2009), wohingegen die Verknüpfung über K63 zur autophagosomalen Degradation führt (Kwon and Ciechanover, 2017). Um eine solche Aktivität in den arretierten Kardiomyozyten zu detektieren, wird im Folgenden der genaue Ubiquitinierungsstatus des Titinfilaments untersucht.

De facto konnten wir in unseren Versuchen nachweisen, dass mechanische Arretierung bei ERC ab Tag 4 zu einer signifikant erhöhten K48- und K63-Ubiquitinierung des Titinfilaments führt. Die vermehrte Protein-Ubiquitinierung könnte sowohl durch einen verringerten oder inhibierten Abbau der markierten Substrate als auch durch eine stark gesteigerte E3-Ligasenaktivität und/oder Expression hervorgerufen werden. So wurden in Atrophie-Modellen bereits erhöhte Level der muskelspezifischen E3-Ligasen MuRF-1 (*muscle-ring-finger enzyme-1*) und Atrogin-1 nachgewiesen (Bodine et al., 2001, Gomes et al., 2001, Lang et al., 2017). MuRF-1 interagiert wie oben erwähnt über die im M-Band-Bereich

liegende Domäne A168-170 mit Titin (Witt et al., 2005) und kann vermutlich durch muskuläre Inaktivität aus der Bindung gelöst und aktiviert werden (van der Pijl et al., 2019). Aufgrund der Assoziation mit Muskelatrophie und der Interaktion mit Titin besteht die Möglichkeit, dass sich die bei uns beobachtete Titin-Ubiquitinierung zum Teil auf eine erhöhte MuRF-1-Aktivität zurückführen lässt. Somit sind unsere Resultate am ehesten im Rahmen einer stark erhöhten Protein-Ubiquitinierung zu deuten, welche die Degradationskapazität der Zelle übersteigt und durch Akkumulation zu erhöhten K48- und K63-Proteinleveln führt.

4.3 Die Inaktivierung der Kardiomyozyten führt zu erhöhten PSMA2- und erniedrigten p62-Leveln

Anhand proteasomaler und autophagosomaler Marker sollen Hinweise zur Aktivität beider Abbausysteme gefunden und somit die These der Degradationskapazität übersteigenden Protein-Ubiquitinierung unterstützt werden. Über eine K48- oder K63-verknüpfte Ubiquitinierung wird die zelluläre Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System und Autophagie vermittelt. Da das 26S Proteasom den Endpunkt des Ubiquitin-Proteasom-Systems darstellt, analysierten wir die Proteinlevel von PSMA2, einer α -Untereinheit vom 20S Kerns des Proteasoms (Wu et al., 2005). Diese liegt lediglich im 26S Proteasom vor und lässt sich nicht im Zytosol nachweisen. Bei unseren hyperkaliämisch arretierten ERC detektierten wir ab Tag 4 signifikant erhöhte PSMA2-Level, was für ein vermehrtes Vorkommen von Proteasomen in den mechanisch inaktivierten Kardiomyozyten spricht. Die erhöhten PSMA2-Level könnten auf eine größere Anzahl von Proteasomen hindeuten, welche möglicherweise mit einer gesteigerten proteasomalen Aktivität und erhöhten Degradation polyubiquitinerter Substrate im 26S Proteasom einhergeht. Gemeinsam mit der vermehrten K48-Ubiquitinierung könnten die erhöhten PSMA2-Proteinlevel auf eine Induktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems hinweisen. Gleichwohl reicht dessen erhöhte Aktivität für eine adäquate Degradation des Titinfilaments nicht vollständig aus. Zur Bestätigung dieser Hypothese müsste in weiteren Analysen die proteasomale Aktivität in arretierten ERC untersucht werden.

Neben dem Ubiquitin-Proteasom-System wird die zelluläre Degradation vornehmlich durch Autophagie vermittelt. Hierfür untersuchten wir die Proteinlevel und Immunhistochemie des autophagosomalen Rezeptors p62, des Phagophoren-Membranprotein LC3s und des Induktions-Proteins Beclin-1. In Bezug auf die Proteinlevel wiesen die hyperkaliämisch arretierten ERC in unserem Versuchsmodell ab Tag 7 signifikant erniedrigte p62-Proteinlevel auf. Da das Adapterprotein p62 im Rahmen der Autophagie degradiert wird,

implizieren verminderte p62-Level eine erhöhte autophagosomale Aktivität. Im Gegensatz dazu wiesen weder die LC3-Proteinlevel, das LC3-II/LC3-I-Ratio noch die Beclin-1-Level der arretierten Kardiomyozyten signifikanten Veränderungen auf. Bei der Interpretation des LC3-II/LC3-I-Ratios muss jedoch beachtet werden, dass dieses Verhältnis nicht direkt die Aktivität der zellulären Autophagie widerspiegelt. Eine erniedrigte Ratio könnte beispielsweise für eine erhöhte Formation von Autophagosomen stehen, da am Innern der Membran lokalisierten LC3-Moleküle durch autophagosomale Aktivität degradiert werden (Shibutani and Yoshimori, 2014, Tanida et al., 2008). Andererseits könnte auch eine gestörte Autophagosom-Lysosom-Fusion durch Akkumulation LC3-II-haltiger Autophagosomen zu einer erhöhten Ratio führen (Bartlett et al., 2017). Zusammengenommen sprechen die Level der autophagosomalen Proteine aber für einen erhöhten Autophagie-Fluss der Zelle. Die von uns untersuchten Marker waren ebenso Bestandteil weiterer Versuchsmodelle. Mutationen des Titinfilaments (TTNtv, *Titin-truncating variants*) führten in Kardiomyozyten über Beeinträchtigung der Autophagie zu Pathogenese dilatativer Kardiomyopathien. Da p62 durch autophagosomale Aktivität degradiert wird, müsste eine beeinträchtigte Autophagie erhöhte p62-Level nach sich ziehen (Zhou et al., 2019). Tatsächlich kam es über Induktion von TTNtvs in diesem Tiermodell zu erhöhten p62- und LC3-II-Leveln, wohingegen Beclin-1 keine Veränderung aufwies (Zhou et al., 2019). Auch in weiteren Versuchsmodellen triggerte eine gestörte autophagosomale Degradation den Anstieg von p62 und LC3-II (Nalbandian et al., 2015, Gui et al., 2017). Im Gegensatz dazu führte die hypoxämisch- bzw. Rapamycin-induzierte Aktivierung der autophagosomalen Degradation zu reduzierten p62- und gesteigerten LC3-II-Leveln (Zhou et al., 2019, Gui et al., 2017). Gemeinsam belegen diese Resultate, dass die bei uns beobachteten erniedrigen p62-Proteinlevel auf eine verstärkte Autophagie zurückgeführt werden können.

Immunhistochemisch zeigte sich in der Kontroll- sowie Versuchsgruppe eine Ansammlung von p62 im M-Band-Bereich, wobei sich zwischen beiden Zellkollektiven bezüglich der Lokalisation keine Unterschiede zeigten. Die immunhistochemisch dargestellte Ansammlung der p62-Moleküle an dem M-Band könnte der bekannten Interaktion mit dem Titinfilament entsprechen. Hier kommt es unter mechanischer Belastung im Bereich der Titin-Kinasen-Domäne zur Komplexbildung von nbr1, p62/SQSTM1 und MuRF-2 (Lange et al., 2005). Weiterhin konnte bei den arretierten Kardiomyozyten keine vermehrte LC3-, Beclin-1- oder LAMP-1-Akkumulation beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich in einem anderen Experiment bei Hypoxie-induzierter Autophagie eine verstärkte Akkumulation von LC3, was einem erhöhten Einbau des Membranproteins in Autophagosome (Gui et al., 2017) oder einer reduzierten Prozessierung entsprechen

könnte. Dies zeigt, dass bei unseren Versuchszellen die autophagosomale Degradation zu keiner veränderten Konzentration an Autophagosomen führt.

Schließlich sprechen die erhöhten PSMA2-Level für eine gesteigerte Konzentration an Proteasomen in den arretierten Kardiomyozyten. Gleichzeitig deuten die erniedrigten p62-Level auf einen verstärkten Abbau markierter Substrate im Autophagosom hin. Zudem vermittelt p62, wie Ergebnisse der AG Krüger belegen, die Degradation polyubiquitinerter Substrate im 26S Proteasom. Da es im Rahmen dessen selbst abgebaut wird, führt der Cross-Link beider Systeme möglicherweise zur weiteren Reduktion der p62-Proteinlevel. Somit könnte der erhöhte Titinabbau auf einer gesteigerten Ubiquitinierung mit konkordanter proteasomaler und autophagosomaler Degradation basieren.

4.4 Der Degradation des Titinfilaments liegt keine Aktivierung der zellulären Apoptose zugrunde

Zusätzlich sollte unser Ansatz auf eine akzidentielle Aktivierung von Apoptose in den Versuchszellen untersucht werden, wodurch die Ergebnisse über eine generelle Degradation beeinflusst werden könnten. Apoptose beschreibt einen kontrollierten Zelltod, der dysfunktionale Zellen und Organellen entfernen kann. Unter Aktivierung von Proteasen, sogenannter Caspasen, kommt es zur Zellschrumpfung, Fragmentierung und Kompartimentierung der zu beseitigenden Strukturen (D'Arcy, 2019, Maiuri et al., 2007). Unsere ab Tag 1 kardioplegisch arretierten ERC zeigten jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen eine unveränderte relative Caspase 3/7-Aktivität. Da die Caspase-Level mit der apoptotischen Aktivität korrelieren, sprechen unsere Resultate für eine unbeeinträchtigte zelluläre Apoptose. Als morphologisches Kriterium der Apoptose wird zudem die Zellschrumpfung beschrieben. Bezüglich der Zellfläche unterschieden sich die mechanisch inaktivierten Versuchszellen zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe. Gemeinsam mit der unveränderten relativen Caspase-Aktivität sprechen die Resultate gegen eine durch die Behandlung ausgelöste Apoptose. Dagegen konnte in mehreren Studien zellulärer Apoptose induziert werden. So wurde im Herzen bei Homozystein-getriggerten Schäden die vermehrte Expression der Kaskadenenzyme Caspase 3 und 9 detektiert. Zudem führte ein Dexamethason- und Strahlung-induzierter Zelltod ebenso wie die durch Jasplakinolid herbeigeführte Apoptose zu einer Reduktion der Zellgröße und Fragmentation der Nuklei (Aida et al., 2016, Bortner and Cidlowski, 2007). Somit lässt sich schlussfolgern, dass in unserem Versuchsansatz keine Apoptose induziert wurde.

4.5 Hyperkaliämie beschleunigt bei embryonalen Rattenkardiomyozyten den Titinisoform-Switch

In den bisherigen Abschnitten wurde die Degradation des Titinfilaments ausführlich untersucht. Ob es trotz des erhöhten Abbaus zu einem Isoform-Switch kommt und er sich von den Kontrollbedingungen unterscheidet, soll im Folgenden diskutiert werden. Im Laufe der perinatalen Entwicklung durchlaufen kardiale Struktur- und Funktionsproteine wie Aktin, Myosin und Titin einen Isoform-Switch zugunsten der adulten Form und modifizieren die Eigenschaften des Myokards. Während in den ersten postnatalen Tagen hauptsächlich die längere und elastischere Titin-Isoform N2BA exprimiert wird, führt die Aktivität des Spleißingfaktors RBM20 zu einem erhöhten Anteil der kürzeren und steiferen N2B-Isoform. Deren passiven Eigenschaften erhöhen im Herzen die myokardialen Steifigkeit (Krüger et al., 2008, Guo et al., 2012, Guo and Sun, 2018). Patienten mit Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit, Aortenklappenstenose und linksventrikulärer Dysfunktion weisen pathophysiologisch eine reduzierte kontraktile Funktion auf. Über Re-Expression der elastischeren N2BA-Isoform kann das Herz die Steifigkeit kompensatorisch reduzieren (Krüger et al., 2008, Neagoe et al., 2002, Krüger et al., 2010, Gotzmann et al., 2018). Aufgrund der physiologischen Modulierbarkeit Titins sollte in dem vorliegenden Projekt der Einfluss mechanischer Arretierung auf den Titinisoform-Switch embryonaler Rattenkardiomyozyten untersucht werden. Tatsächlich führte der ab Tag 1 induzierte hyperkaliämische Zellarrest in den Versuchszellen ab Tag 7 zu einem signifikant erhöhten N2B-Gehalt und hierdurch zu einem beschleunigten Titinisoform-Switch. Mechanische Inaktivität könnte somit Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Isoform-Komposition des Titinfilaments besitzen. Umgekehrt könnte spekuliert werden, dass vermehrte mechanische Reize den Isoform-Switch möglicherweise blockieren. Weitere Versuchsmodelle untersuchten bereits alternative Einflüsse auf den Titinisoform-Switch. So führte die Applikation der anabolen Stoffwechselhormone T3 und Insulin bei ERC über vermehrte Expression der adulten N2B-Form zu einem beschleunigten perinatalen Titinisoform-Switch (Krüger et al., 2008, Krüger et al., 2010). Das Isoformverhältnis adaptierte sich hierbei an das hormonell-induzierte hyperdynamische Herzwachstum (Krüger et al., 2010) und ließ sich durch externe Reize regulieren. Somit zeigte sich auch in anderen Ansätzen eine Modulierbarkeit der Isoform-Komposition des Titinfilaments. Bei T3- und Insulin-behandelten Kardiomyozyten konnte eine Aktivierung der PI3K/Akt-Signaltransduktion nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass PI3K über eine erhöhte Akt-Aktivität mTOR triggert (Krüger et al., 2010), welches die Synthese der adulten N2B-Isoform stimuliert (Krüger et al., 2010). Zudem wiesen die Versuchszellen unter T3-Behandlung erhöhte RBM20-Level auf (Zhu et al., 2015). Möglicherweise induzierte eine

durch Insulin/PI3K-getriggerte mTOR-Aktivität die vermehrte Expression von RBM20 und führt dadurch zur Synthese der kürzeren N2B-Isoform. Die Auswirkungen der mechanischen Arretierung auf die erläuterte Signaltransduktion wurden hier nicht untersucht. Einen möglichen Einfluss stellt die kardioplege Arretierung dar, welche über Inaktivierung der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle zu einer reduzierten zellulären Calcium-Freisetzung führt (Chambers, 2003). Die daraus resultierende verringerte intrazelluläre Calcium-Konzentration könnte ebenso wie die verminderten Ionentransporte über die Membran die Signaltransduktion der Zelle beeinträchtigen. Zudem erleichtert die muskuläre Inaktivität des Sarkomers durch mechanischen Stillstand möglicherweise die N2BA-Degradation und den N2B-Einbau. Fehlende Kontraktionen könnten hierbei einen ungestörten Turnover des Titins ermöglichen. Auch ein Missverhältnis zwischen Degradation und Neusynthese, beispielsweise durch einen überschießenden Abbau der embryonalen N2BA-Isoform und dem Einbau der N2B-Bande, könnte ursächlich für den beschleunigten Titinisoform-*Switch* sein (Krüger et al., 2010). So wiesen Versuchstiere in einem Botulinumtoxin-induzierten Atrophiemodell neben vermehrter Titin-Degradation auch eine erhöhte Genexpression des Titinfilaments auf. Die erhöhten mRNA-Level weisen auf eine erhöhte Translation des Titin-Gens als Antwort auf die vermehrte Degradation hin (Legerlotz et al., 2009) und beschleunigen möglicherweise durch Expression der N2B-Form den Isoform-*Switch*. Zusätzlich zur Translation könnte vermehrt N2B aus einem mobilen Titin-Pool rekrutiert werden, welcher nicht mit dem Sarkomer assoziiert ist und 10-15% der Gesamtmenge an Titin ausmacht (Rudolph et al., 2019). Auch hier trägt der verstärkte Einbau der N2B-Isoform möglicherweise zu einem akzelerierten *Switch* bei.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass der beschleunigte Titinisoform-*Switch* in den arretierten Kardiomyozyten auf mehreren Ursachen basieren könnte. Neben den Auswirkungen der Kardioplegie auf die zelluläre Signaltransduktion besteht die Möglichkeit, dass fehlende Kontraktionen den Ein- und Abbau des Titinfilaments erleichtern. Zudem könnte eine verstärkte Degradation der N2BA-Bande zu einem reaktiven N2B-Einbau führen, welcher den Titinisoform-*Switch* beschleunigt. Diese Vermutung wird durch den bei uns nachgewiesenen erhöhten Abbau des Titinfilaments unterstützt.

4.6 Die mechanische Inaktivierung der ERC ab Tag 7 hat keinen Einfluss auf den Abbau und die Isoform-Komposition Titins

Der alternative Versuchsansatz mit Arretierung der embryonalen Kardiomyozyten ab Tag 7 sollte die Auswirkungen des hyperkaliämischen Zellarrests zu einem späteren Zeitpunkt untersuchen. Der Unterschied liegt hierbei in der ungestörten Entwicklung beider Zellkollektive während der ersten sieben Tage, insbesondere auf Titinisoform-*Switch* bezogen. So exprimieren Rattenherzen 4 Tage vor Geburt (E18) ausschließlich die embryonale N2BA-Isoform, wohingegen die N2B-Gehälter am ersten postnatalen Tag ca. 60% betrug (Krüger et al., 2006, Opitz et al., 2004). Zwischen dem 5. und 12. postnatalen Tag stieg der N2B-Anteil von 80% auf 94% an, womit die Isoform-Komposition adulter Rattenherzen erreicht war (Opitz et al., 2004). Da ERC somit zu späteren Zeitpunkten geringere N2BA-Gehälter aufweisen, sollte untersucht werden, ob der Effekt des Titinisoform-*Switches* vornehmlich auf den Abbau der embryonalen und adulten N2BA-Form zurückzuführen ist. Tatsächlich kam es durch die hyperkaliämische Inaktivierung der embryonalen Kardiomyozyten ab Tag 7 zu keiner Erhöhung des N2B-Gehalts und somit zu keinem beschleunigten Titinisoform-*Switch*. Die Titin-Degradationsbande T2 zeigte zwar tendenziell erhöhte Werte, diese bewegten sich jedoch außerhalb des Signifikanzniveaus. Auch die Titin/Myosin-Ratio zeigte sich in den Versuchszellen unverändert. Gemeinsam zeigen unsere Daten, dass es beim alternativen Versuchsansatz im beobachteten Zeitraum zu keiner signifikant erhöhten Degradation des Titinfilaments und keinem beschleunigten Titinisoform-*Switch* kommt. Hierbei sollte beachtet werden, dass die mechanische Arretierung mit 4 Tagen über einen kürzeren Zeitraum als bisher erfolgte und bei längerer Kultivierungsdauer durchaus Unterschiede beobachtet werden könnten.

Der größte Anteil des Isoform-*Switches* fand auch in unserem Versuchsmodell innerhalb der ersten 4 Kultivierungstage statt. Die gesteigerte Degradation der embryonalen N2BA-Isoform und der vermehrte Einbau der N2B-Isoform könnten daher ursächlich für den im anderen Versuchsansatz beobachteten beschleunigten Titinisoform-*Switch* sein. In diesem Fall besitzt die Arretierung ab Tag 1 den vergleichsweise größeren Effekt auf die Isoform-Komposition des Titinfilaments. Es wäre denkbar, dass eine frühe mechanische Inaktivierung die ohnehin fortschreitende Degradation der N2BA-Bande und den Einbau der N2B-Isoform beschleunigt. Zu späteren Zeitpunkten, wenn der Abbau der embryonalen Isoform weiter fortgeschritten ist, verbleibt der Arretierung demnach ein geringerer Einfluss auf den Titinisoform-*Switch*. Zudem könnte der kürzere Kultivierungszeitraum der ERC in hyperkaliämischen Nährmedium die Resultate erklären. Im ersten Versuchsansatz wurden

die Zellen bis zum Erreichen signifikant erhöhter N2B-Anteile über die Dauer von 7 Tagen mechanisch inaktiviert, wohingegen die Kardiomyozyten im alternativen Modell maximal 4 Tage in hyperkaliämischen Medium kultiviert wurden. Möglicherweise lässt sich der Effekt erst zu späteren Zeitpunkten beobachten. Um schlussendlich eine Aussage über die Auswirkungen des hyperkaliämischen Zellarrests ab Tag 7 treffen zu können, muss in weiterführenden Untersuchungen die Kultivierung der ERC über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und untersucht werden.

4.7 Schlussfolgerung

Die mechanische Inaktivierung der Kardiomyozyten führte zu einem signifikant erhöhten Abbau des Titinfilaments, welches im Vergleich zu anderen Sarkomerproteinen bevorzugt degradiert wurde. Hierbei konnte eine vermehrte Titin-Ubiquitinierung nachgewiesen werden, die am ehesten im Rahmen einer überschießenden, die Degradationskapazität übersteigenden Protein-Ubiquitinierung gedeutet werden kann. Zudem sprechen erhöhte PSMA2-Level für eine gesteigerte Konzentration an Proteasomen und reduzierte Mengen an p62 für eine vermehrte autophagosomale Degradation. Ausgelöst durch die muskuläre Nicht-Nutzung der Sarkomere könnte dies im Rahmen einer komplementären Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Autophagie gedeutet werden. Die ab Tag 1 arretierten Kardiomyozyten zeigten keine erhöhten Caspase-Level und eine intakte Zellmorphologie, weshalb wir einen potenziellen Einfluss durch Apoptose ausschließen konnten. Des Weiteren zeigte sich in den arretierten embryonalen Rattenkardiomyozyten der Titinisoform-Switch beschleunigt. Dies könnte unter anderem auf die vermehrte Degradation der embryonalen N2BA-Isoform und den erhöhten Einbau der N2B-Bande zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu führte in einem alternativen Versuchsansatz die mechanische Arretierung ab Tag 7 in der Versuchsgruppe zu keinem gesteigerten Abbau Titins und der Titinisoform-Switch zeigte sich unbeeinflusst. Dies könnte im Rahmen unserer Hypothese gedeutet werden, da zu späteren Zeitpunkten keine embryonalen Isoformen mehr vorliegen und der Switch bereits zu einem großen Teil abgeschlossen ist. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Nicht-Nutzung der Sarkomere die Degradation des Titinfilaments vermutlich unter Aktivierung proteasomaler und autophagosomaler Abbaumechanismen induziert und zusätzlich zu einem beschleunigten Titinisoform-Switch führt (Abb. 15).

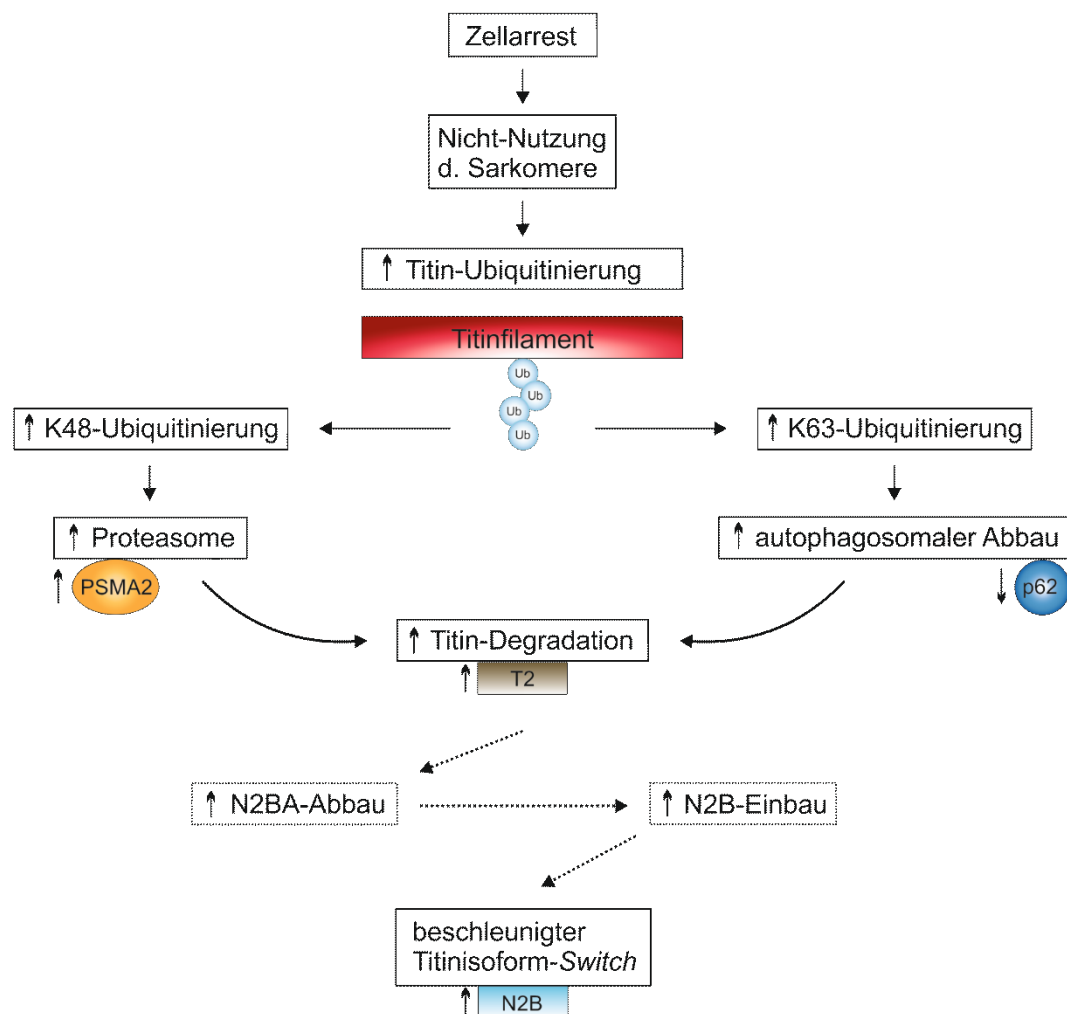


Abb. 15: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes und unserer Resultate. Die hyperkaliämisch induzierte Nicht-Nutzung der Sarkomere triggert die Ubiquitinierung des Titinfilaments. Die K48-Ubiquitinierung führt zu einer erhöhten Konzentration an Proteasomen, welche vermutlich mit einer vermehrten proteasomalen Degradation Titins einhergehen. Die K63-Ubiquitinierung induziert einen erhöhten autophagosomalen Abbau des Titinfilaments. In Summe führt die Aktivierung beider Abbausysteme zu einer erhöhten Titin-Degradation. Diese beschleunigt zudem den Titinisoform-Switch, möglicherweise durch verstärkten Abbau der embryonalen N2BA-Isoform.

Unsere Resultate liefern somit neue Informationen über die noch nicht vollständig verstandene Degradation des Titinfilaments. Da der Um- und Abbau des Titins bei Krankheitsbildern wie dem Remodeling nach Myokardinfarkt oder DCM eine Rolle spielt, könnten unsere Erkenntnisse zum Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen beitragen. So findet bei Patienten mit Myokardinfarkt im Rahmen des kardialen Remodelings ein erhöhter Turnover des Titinfilaments statt, welcher durch Aktivierung proteasomaler Degradationsmechanismen vermittelt wird (Kötter et al., 2016). Dabei erlauben unsere Resultate möglicherweise weitere Rückschlüsse auf die Vorgänge nach myokardialer Infarzierung. So könnte das Remodeling und der damit einhergehende

Turnover des Titinfilaments neben der proteasomalen auch auf einer Ubiquitin-vermittelten autophagosomalen Degradation basieren. Zudem lösen Mutationen im Titin-Gen (*TTN*) circa 20% aller familiären Formen von Dilatativer Kardiomyopathie aus (Herman et al., 2012, Roberts et al., 2015). Hierbei besitzen die Kardiomyozyten neben desorganisierten Sarkomeren erhöhte N2BA-Anteile, welche zur einer reduzierten passiven Steifigkeit führen (Makarenko et al., 2004, Tharp et al., 2019). Der zugrunde liegende Prozess dieses Titinisoform-*Switchs* lässt sich womöglich mit unserem Modell vergleichen. So könnte die proteasomale und autophagosomale Degradation der N2B-Isoform zumindest zum Teil zu erhöhten N2BA-Anteilen und einer verringerten myokardialen Steifigkeit beitragen. Folglich lässt sich festhalten, dass unsere Erkenntnisse eine bessere Interpretation pathologischer Vorgänge in Bezug auf das Titinfilament ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

- AIDA, N., USHIKUBO, T., KOBAYASHI, F., SAKO, R., SUEHARA, M., FURUSAWA, M. & MURAMATSU, T. 2016. Actin stabilization induces apoptosis in cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *Int Endod J*, 49, 663-9.
- ALBORNOZ, N., BUSTAMANTE, H., SOZA, A. & BURGOS, P. 2019. Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *Int J Mol Sci*, 20.
- BANG, M.-L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH ADAM, J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT CHRISTIAN, C., LABEIT, D., GREGORIO CAROL, 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. *Circulation Research*, 89, 1065-1072.
- BARTLETT, J. J., TRIVEDI, P. C. & PULINILKUNNIL, T. 2017. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 104, 1-8.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BODINE, S. C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V. K., NUNEZ, L., CLARKE, B. A., POUHEYMIROU, W. T., PANARO, F. J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z. Q., VALENZUELA, D. M., DECHIARA, T. M., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. & GLASS, D. J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294, 1704-8.
- BORTNER, C. D. & CIDLOWSKI, J. A. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 462, 176-88.
- CENTNER, T., YANO, J., KIMURA, E., MCELHINNY, A. S., PELIN, K., WITT, C. C., BANG, M. L., TROMBITAS, K., GRANZIER, H., GREGORIO, C. C., SORIMACHI, H. & LABEIT, S. 2001. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, 306, 717-26.
- CHAMBERS, D. J. 2003. Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest. *Ann Thorac Surg*, 75, S661-6.
- CHAMBERS, D. J. & FALLOUH, H. B. 2010. Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 127, 41-52.

- CHAUUI-BERLINCK, J. G. & MONTEIRO, L. H. A. 2017. Frank-Starling mechanism and short-term adjustment of cardiac flow. *J Exp Biol*, 220, 4391-4398.
- CHEN, S. P., SHEU, J. R., LIN, A. C., HSIAO, G. & FONG, T. H. 2005. Decline in titin content in rat skeletal muscle after denervation. *Muscle Nerve*, 32, 798-807.
- D'ARCY, M. S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43, 582-592.
- DADSON, K., HAUCK, L. & BILLIA, F. 2017. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, 131, 1375-1392.
- DEPRE, C., WANG, Q., YAN, L., HEDHLI, N., PETER, P., CHEN, L., HONG, C., HITTINGER, L., GHALEH, B., SADOSHIMA, J., VATNER, D. E., VATNER, S. F. & MADURA, K. 2006. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation*, 114, 1821-8.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- FLUTSCH, A., ACKERMANN, R., SCHROEDER, T., LUKARSKA, M., HAUSAMMANN, G. J., WEINERT, C., BRIAND, C. & GRUTTER, M. G. 2014. Combined inhibition of caspase 3 and caspase 7 by two highly selective DARPins slows down cellular demise. *Biochem J*, 461, 279-90.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- FRONTERA, W. R. & OCHALA, J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96, 183-95.
- GAUTEL, M. 2011. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch*, 462, 119-34.
- GAUTEL, M. & DJINOVIC-CARUGO, K. 2016. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol*, 219, 135-45.
- GOMES, M. D., LECKER, S. H., JAGOE, R. T., NAVON, A. & GOLDBERG, A. L. 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14440-5.
- GOTZMANN, M., GRABBE, S., SCHONE, D., VON FRIELING-SALEWSKY, M., DOS REMEDIOS, C. G., STRAUCH, J., BECHTEL, M., DIETRICH, J. W., TANNAPFEL, A., MUGGE, A. & LINKE, W. A. 2018. Alterations in Titin Properties and Myocardial Fibrosis Correlate With Clinical Phenotypes in Hemodynamic Subgroups of Severe Aortic Stenosis. *JACC Basic Transl Sci*, 3, 335-346.

- GRÄTER, F., SHEN, J., JIANG, H., GAUTEL, M. & GRUBMÜLLER, H. 2005. Mechanically Induced Titin Kinase Activation Studied by Force-Probe Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*, 88, 790-804.
- GREGORIO, C. C., PERRY, C. N. & MCELHINNY, A. S. 2005. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 389-400.
- GUI, D., CUI, Z., ZHANG, L., YU, C., YAO, D., XU, M., CHEN, M., WU, P., LI, G., WANG, L. & HUANG, X. 2017. Salidroside attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and apoptosis resistance by upregulating autophagy through the AMPK-mTOR-ULK1 pathway. *BMC Pulm Med*, 17, 191.
- 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. A., 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.
- GUO, W. & SUN, M. 2018. RBM20, a potential target for treatment of cardiomyopathy via titin isoform switching. *Biophys Rev*, 10, 15-25.
- HAYASHI, T., ARIMURA, T., ITOH-SATOH, M., UEDA, K., HOHDA, S., INAGAKI, N., TAKAHASHI, M., HORI, H., YASUNAMI, M., NISHI, H., KOGA, Y., NAKAMURA, H., MATSUZAKI, M., CHOI, B. Y., BAE, S. W., YOU, C. W., HAN, K. H., PARK, J. E., KNÖLL, R., HOSHIJIMA, M., CHIEN, K. R. & KIMURA, A. 2004. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44, 2192-201.
- HENDERSON, C. A., GOMEZ, C. G., NOVAK, S. M., MI-MI, L. & GREGORIO, C. C. 2017. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol*, 7, 891-944.
- HERMAN, D. S., LAM, L., TAYLOR, M. R., WANG, L., TEEKAKIRIKUL, P., CHRISTODOULOU, D., CONNER, L., DEPALMA, S. R., MCDONOUGH, B., SPARKS, E., TEODORESCU, D. L., CIRINO, A. L., BANNER, N. R., PENNELL, D. J., GRAW, S., MERLO, M., DI LENARDA, A., SINAGRA, G., BOS, J. M., ACKERMAN, M. J., MITCHELL, R. N., MURRY, C. E., LAKDAWALA, N. K., HO, C. Y., BARTON, P. J., COOK, S. A., MESTRONI, L., SEIDMAN, J. G. & SEIDMAN, C. E. 2012. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 366, 619-28.
- HIDALGO, C. & GRANZIER, H. 2013. Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*, 23, 165-71.

- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- HIDALGO, C. G., CHUNG, C. S., SARIPALLI, C., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRILIS, G., LABEIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 54, 90-97.
- HUDSON, B. D., HIDALGO, C. G., GOTTHARDT, M. & GRANZIER, H. L. 2010. Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 972-8.
- ICHIMURA, Y., KIRISAKO, T., TAKAO, T., SATOMI, Y., SHIMONISHI, Y., ISHIHARA, N., MIZUSHIMA, N., TANIDA, I., KOMINAMI, E., OHSUMI, M., NODA, T. & OHSUMI, Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-92.
- JI, C. H. & KWON, Y. T. 2017. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol Cells*, 40, 441-449.
- KASSIOTIS, C., BALLAL, K., WELLNITZ, K., VELA, D., GONG, M., SALAZAR, R., FRAZIER, O. H. & TAEGTMEYER, H. 2009. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation*, 120, S191-7.
- KIRKIN, V., LAMARK, T., SOU, Y. S., BJØRKØY, G., NUNN, J. L., BRUUN, J. A., SHVETS, E., MCEWAN, D. G., CLAUSEN, T. H., WILD, P., BILUSIC, I., THEURILLAT, J. P., ØVERVATN, A., ISHII, T., ELAZAR, Z., KOMATSU, M., DIKIC, I. & JOHANSEN, T. 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33, 505-16.
- KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA, F., INOUE, T., SHINTANI, S. A., OYAMA, K., TERUI, T., MINAMISAWA, S., ISHIWATA, S. & FUKUDA, N. 2014. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J Physiol Sci*, 64, 221-32.
- KÖTTER, S., ANDRESEN, C. & KRÜGER, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MÜLLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovascular Research*, 99, 648-656.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GÖDECKE, A.,

- FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRÜGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. 119, 1017-1029.
- KRÜGER, M., BABICZ, K., VON FRIELING-SALEWSKY, M. & LINKE, W. A. 2010. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 910-6.
- KRÜGER, M., KOHL, T. & LINKE, W. A. 2006. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H496-506.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRÜTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD MARGARET, M., BUTT, E., DOS REMEDIOS CRIS, G. & LINKE WOLFGANG, A. 2009. Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs. *Circulation Research*, 104, 87-94.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- KRÜGER, M., SACHSE, C., ZIMMERMANN, W. H., ESCHENHAGEN, T., KLEDE, S. & LINKE, W. A. 2008. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ Res*, 102, 439-47.
- KWON, Y. T. & CIECHANOVER, A. 2017. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*, 42, 873-886.
- LABEIT, S., LAHMERS, S., BURKART, C., FONG, C., MCNABB, M., WITT, S., WITT, C., LABEIT, D. & GRANZIER, H. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol*, 362, 664-81.
- LANG, F., ARAVAMUDHAN, S., NOLTE, H., TURK, C., HOLPER, S., MULLER, S., GUNTHER, S., BLAAUW, B., BRAUN, T. & KRUGER, M. 2017. Dynamic changes in the mouse skeletal muscle proteome during denervation-induced atrophy. *Dis Model Mech*, 10, 881-896.
- 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., EHLE, E., UDD, B. & GAUTEL, M. 2005. The

- Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover. 308, 1599-1603.
- LEGERLOTZ, K., MATTHEWS, K. G., MCMAHON, C. D. & SMITH, H. K. 2009. Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve*, 39, 472-9.
- LEWINTER, M. M. & GRANZIER, H. L. 2014. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 63, 207-12.
- LI, H., LINKE, W. A., OBERHAUSER, A. F., CARRION-VAZQUEZ, M., KERKVLIT, J. G., LU, H., MARSZALEK, P. E. & FERNANDEZ, J. M. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418, 998-1002.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A., 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. 146, 631-644.
- LOPES, L. R. & ELLIOTT, P. M. 2014. A straightforward guide to the sarcomeric basis of cardiomyopathies. *Heart*, 100, 1916-23.
- MAEJIMA, Y., ISOBE, M. & SADOSHIMA, J. 2016. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 95, 19-25.
- MAIURI, M. C., ZALCKVAR, E., KIMCHI, A. & KROEMER, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 741-52.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., MONTE, F. D., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts. 95, 708-716.
- MCELHINNY, A. S., KAKINUMA, K., SORIMACHI, H., LABEIT, S. & GREGORIO, C. C. 2002. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. 157, 125-136.
- MUKHOPADHYAY, S., PANDA, P. K., SINHA, N., DAS, D. N. & BHUTIA, S. K. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19, 555-66.
- NALBANDIAN, A., LLEWELLYN, K. J., NGUYEN, C., YAZDI, P. G. & KIMONIS, V. E. 2015. Rapamycin and chloroquine: the in vitro and in vivo effects of autophagy-

- modifying drugs show promising results in valosin containing protein multisystem proteinopathy. *PLoS One*, 10, e0122888.
- NAM, T., HAN, J. H., DEVKOTA, S. & LEE, H. W. 2017. Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Mol Cells*, 40, 897-905.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- OLIVEIRA, M. A., BRANDI, A. C., SANTOS, C. A., BOTELHO, P. H., CORTEZ, J. L. & BRAILE, D. M. 2014. Modes of induced cardiac arrest: hyperkalemia and hypocalcemia--literature review. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 29, 432-6.
- ONWUKA, E., KING, N., HEUER, E. & BREUER, C. 2018. The Heart and Great Vessels. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- OPITZ, C. A., KULKE, M., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., HINSEN, H., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2003. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12688-93.
- 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. *Circulation Research*, 94, 967-975.
- PANDEY, U. B., NIE, Z., BATLEVI, Y., MCCRAY, B. A., RITSON, G. P., NEDELSKY, N. B., SCHWARTZ, S. L., DIPROSPERO, N. A., KNIGHT, M. A., SCHULDINER, O., PADMANABHAN, R., HILD, M., BERRY, D. L., GARZA, D., HUBBERT, C. C., YAO, T. P., BAEHRECKE, E. H. & TAYLOR, J. P. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447, 859-63.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., ØVERVATN, A., BJØRKØY, G. & JOHANSEN, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PENG, J., SCHWARTZ, D., ELIAS, J. E., THOREEN, C. C., CHENG, D., MARSISCHKY, G., ROELOFS, J., FINLEY, D. & GYGI, S. P. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, 21, 921-6.
- PICKART, C. M. & FUSHMAN, D. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 8, 610-6.

- PORTBURY, A. L., WILLIS, M. S. & PATTERSON, C. 2011. Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*, 286, 9929-34.
- RAZEGHI, P., SHARMA, S., YING, J., LI, Y. P., STEPKOWSKI, S., REID, M. B. & TAEGETMEYER, H. 2003. Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation*, 108, 2536-41.
- ROBERTS, A. M., WARE, J. S., HERMAN, D. S., SCHAFER, S., BAKSI, J., BICK, A. G., BUCHAN, R. J., WALSH, R., JOHN, S., WILKINSON, S., MAZZAROTTO, F., FELKIN, L. E., GONG, S., MACARTHUR, J. A., CUNNINGHAM, F., FLANNICK, J., GABRIEL, S. B., ALTSHULER, D. M., MACDONALD, P. S., HEINIG, M., KEOGH, A. M., HAYWARD, C. S., BANNER, N. R., PENNELL, D. J., O'REGAN, D. P., SAN, T. R., DE MARVAO, A., DAWES, T. J., GULATI, A., BIRKS, E. J., YACIOUB, M. H., RADKE, M., GOTTHARDT, M., WILSON, J. G., O'DONNELL, C. J., PRASAD, S. K., BARTON, P. J., FATKIN, D., HUBNER, N., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E. & COOK, S. A. 2015. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*, 7, 270ra6.
- RUDOLPH, F., HUTTEMEISTER, J., DA SILVA LOPES, K., JUTTNER, R., YU, L., BERGMANN, N., FRIEDRICH, D., PREIBISCH, S., WAGNER, E., LEHNART, S. E., GREGORIO, C. C. & GOTTHARDT, M. 2019. Resolving titin's lifecycle and the spatial organization of protein turnover in mouse cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 25126-25136.
- SEQUEIRA, V. & VAN DER VELDEN, J. 2015. Historical perspective on heart function: the Frank-Starling Law. *Biophys Rev*, 7, 421-447.
- SHAIK, S., BRANDTS, C. H., SERVE, H. & DIKIC, I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 20, 21-30.
- SHEN, Y. F., TANG, Y., ZHANG, X. J., HUANG, K. X. & LE, W. D. 2013. Adaptive changes in autophagy after UPS impairment in Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin*, 34, 667-73.
- SHIBUTANI, S. T. & YOSHIMORI, T. 2014. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 24, 58-68.
- SOLOMON, V. & GOLDBERG, A. L. 1996. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem*, 271, 26690-7.
- STIENEN, G. J. 2015. Pathomechanisms in heart failure: the contractile connection. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 47-60.

- SU, H. & WANG, X. 2010. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovasc Res*, 85, 253-62.
- SWEENEY, H. L. & HAMMERS, D. W. 2018. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88.
- TANNOUS, P., ZHU, H., NEMCHENKO, A., BERRY, J. M., JOHNSTONE, J. L., SHELTON, J. M., MILLER, F. J., JR., ROTHERMEL, B. A. & HILL, J. A. 2008. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 117, 3070-8.
- THARP, C. A., HAYWOOD, M. E., SBAIZERO, O., TAYLOR, M. R. G. & MESTRONI, L. 2019. The Giant Protein Titin's Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease. *Front Physiol*, 10, 1436.
- 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 Commun*, 345, 355-61.
- TOTH, A., NICKSON, P., QIN, L. L. & ERHARDT, P. 2006. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 281, 3679-89.
- TOURSEL, T., STEVENS, L., GRANZIER, H. & MOUNIER, Y. 2002. Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions. *J Appl Physiol* (1985), 92, 1465-72.
- TROMBITÁS, K., GREASER, M., LABEIT, S., JIN, J.-P., KELLERMAYER, M., HELMES, M. & GRANZIER, H. 1998. Titin Extensibility In Situ: Entropic Elasticity of Permanently Folded and Permanently Unfolded Molecular Segments. 140, 853-859.
- ULANOVA, A., GRITSYNA, Y., SALMOV, N., LOMONOSOVA, Y., BELOVA, S., NEMIROVSKAYA, T., SHENKMAN, B. & VIKHLYANTSEV, I. 2019. Effect of L-Arginine on Titin Expression in Rat Soleus Muscle After Hindlimb Unloading. *Front Physiol*, 10, 1221.
- VAN DER PIJL, R. J., GRANZIER, H. L. & OTTENHEIJM, C. A. C. 2019. Diaphragm contractile weakness due to reduced mechanical loading: role of titin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 317, C167-c176.

- VAN DER VELDEN, J., HO, C. Y., TARDIFF, J. C., OLIVOTTO, I., KNOLLMANN, B. C. & CARRIER, L. 2015. Research priorities in sarcomeric cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*, 105, 449-56.
- WANG, Z. V. & HILL, J. A. 2015. Protein quality control and metabolism: bidirectional control in the heart. *Cell Metab*, 21, 215-226.
- WATERS, S., MARCHBANK, K., SOLOMON, E., WHITEHOUSE, C. & GAUTEL, M. 2009. Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett*, 583, 1846-52.
- WILLIS, M. S., ROJAS, M., LI, L., SELZMAN, C. H., TANG, R. H., STANSFIELD, W. E., RODRIGUEZ, J. E., GLASS, D. J. & PATTERSON, C. 2009. Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, H997-h1006.
- WITT, C. C., BURKART, C., LABEIT, D., MCNABB, M., WU, Y., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *Embo j*, 25, 3843-55.
- WITT, C. C., WITT, S. H., LERCHE, S., LABEIT, D., BACK, W. & LABEIT, S. 2008. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. 27, 350-360.
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 350, 713-722.
- WOLFE, R. R. 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr*, 84, 475-82.
- WU, X., ZHAO, S. H., YU, M., ZHU, Z. M., WANG, H., WANG, H. L. & LI, K. 2005. Physical mapping of four porcine 20S proteasome core complex genes (PSMA1, PSMA2, PSMA3 and PSMA6). *Cytogenet Genome Res*, 108, 363.
- XU, P., DUONG, D. M., SEYFRIED, N. T., CHENG, D., XIE, Y., ROBERT, J., RUSH, J., HOCHSTRASSER, M., FINLEY, D. & PENG, J. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 137, 133-45.
- ZHANG, J., WANG, G., ZHOU, Y., CHEN, Y., OUYANG, L. & LIU, B. 2018. Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 75, 1803-1826.
- ZHENG, Q. & WANG, X. 2010. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction. *Panminerva Med*, 52, 9-25.
-

- ZHOU, J., NG, B., KO, N. S. J., FIEDLER, L. R., KHIN, E., LIM, A., SAHIB, N. E., WU, Y., CHOTHANI, S. P., SCHAFER, S., BAY, B. H., SINHA, R. A., COOK, S. A. & YEN, P. M. 2019. Titin truncations lead to impaired cardiomyocyte autophagy and mitochondrial function in vivo. *Hum Mol Genet*, 28, 1971-1981.
- ZHU, C., CHEN, Z. & GUO, W. 2017. Pre-mRNA mis-splicing of sarcomeric genes in heart failure. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863, 2056-2063.
- ZHU, C., YIN, Z., REN, J., MCCORMICK, R. J., FORD, S. P. & GUO, W. 2015. RBM20 is an essential factor for thyroid hormone-regulated titin isoform transition. *J Mol Cell Biol*, 7, 88-90.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Martina Krüger und Dr. Sebastian Kötter bedanken. Prof. Dr. Martina Krüger hat mir die Arbeit an unserem Projekt überhaupt ermöglicht und stand mir immer mit kompetentem Rat zur Seite. Mein besonderer Dank gilt Dr. Sebastian Kötter, ohne dessen Ideen und Unterstützung mir diese Arbeit nicht so gelungen wäre. Trotz nicht enden wollender Nachfragen und Korrekturen hatte er immer ein offenes Ohr für mich und konnte stets weiterhelfen. An dieser Stelle auch vielen Dank auch an Prof. Dr. Schmitt und die Mitglieder des Prüfungskomitees der Medizinischen Fakultät für die Begutachtung meiner Arbeit. Danken möchte ich zudem der gesamten AG Krüger und ganz besonders Sabine Bongardt, die mich mit viel Geduld in die Tiefen der Laborarbeit eingeführt hat. Auch meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken, die mich bei dieser Arbeit immer unterstützt und mir sehr geholfen haben.