

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

**Effekte von Hyperglykämie auf den Titinisoformenswitch und
die Autophagie in embryonalen Rattenkardiomyozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Deborah Jessica Kalandrik

2022

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

Hyperglykämie ist das Leitsymptom des Diabetes mellitus. Physiologisch kommt es postprandial zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellage im Blut. Dauerhaft erhöhte Blutzuckerspiegel sind jedoch pathologisch und bedingen langfristig schwerwiegende Organschädigungen, insbesondere auch am Herzen. Die molekularen Ursachen für die Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass metabolische Veränderungen einen starken Einfluss auf den kontraktilen Apparat der Herzmuskelzellen haben. Neben den Proteinen Aktin und Myosin spielt Titin in der Muskelkontraktion eine zentrale Rolle. Mit einer Größe von 3-3,7 MDa ist Titin das größte bisher bekannte Protein im menschlichen Körper. In der Herzmuskulatur werden zwei Isoformen exprimiert, die längere und elastische N2BA (3,3 MDa) und die kürzere und steifere N2B Isoform (3,0 MDa). Die Steifigkeit von Myozyten kann durch das Titinisoformenverhältnis beeinflusst werden. Perinatal findet ein Isoformenswitch statt, in dem die N2BA-Isoform zunehmend durch die N2B-Isoform ersetzt wird. Dieser Wechsel beinhaltet nicht nur den Einbau neuer Filamente, sondern auch den Abbau der fetalen Isoform und der zu erneuernden adulten Isoform. Die vermutete Lebensdauer von nur 3-5 Tagen unterstreicht die Notwendigkeit zur kontinuierlichen Erneuerung der Titinfilamente. Bei Diabetespatienten wurden titinbasierte Veränderungen im Herzmuskel festgestellt und das Isoformenverhältnis war zugunsten der längeren und elastischeren Isoform N2BA verschoben. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen die Autophagie und damit ein zentrales Element der Proteindegradationsmaschinerie inhibieren. Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel des perinatalen Titinisoformenswitches den Einfluss von Hyperglykämie auf die Titinisoformenzusammensetzung zu untersuchen und die Beteiligung der Autophagie am Abbau des Titinfilaments zu prüfen. Hierzu wurden embryonale Rattenkardiomyozyten unter hyperglykämischen Bedingungen und in An- und Abwesenheit von Insulin kultiviert. Anschließend wurde das Titinisoformenverhältnis mittels SDS-Gelelektrophorese zu verschiedenen Zeitpunkten sowie Expressionsänderungen von an der Autophagie beteiligten Proteinen bestimmt. Im Gegensatz zu einem veränderten Isoformenverhältnis bei Diabetespatienten gab es im ERC-Zellkulturmodell keinen Hinweis darauf, dass zu frühen oder späteren Zeitpunkten hohe Glukosekonzentrationen eine Auswirkung auf die Komposition der Titinisoformen haben. Ebenso wurde weder eine Inhibition noch eine Induktion der Autophagie beobachtet. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass Hyperglykämie nicht ursächlich für die beobachtete veränderte Titinisoformenexpression ist. Eine Beteiligung der Autophagie an den Umbauprozessen konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Hyperglykämiewirkung unterscheidet sich vermutlich je nach Reifestadium und somit Proliferationsraten eines Gewebes. Zusammenfassend lassen die Daten den Schluss zu, dass die titinbasierten Veränderungen bei Diabetespatienten möglicherweise nicht auf hyperglykämiebedingte Effekte zurückzuführen sind.

Abstract

Hyperglycemia is the leading symptom of diabetes mellitus. Physiologically, a hyperglycemic metabolic state occurs in the blood postprandially. However, permanently elevated blood glucose levels are pathological and cause serious organ damage in the long term, especially to the heart. The molecular causes for the development of diabetic cardiomyopathy are not yet fully understood. Metabolic changes are presumed to have a strong influence on the contractile apparatus of cardiac myocytes. Next to the proteins actin and myosin, titin plays a central role in muscle contraction. With a size of 3-3.7 MDa, titin is the largest protein known to date in the human body. Two isoforms are expressed in cardiac muscle, the longer and elastic N2BA (3.3 MDa) and the shorter and stiffer N2B isoform (3.0 MDa). Myocyte stiffness may be influenced by the titin isoform ratio. Perinatally, an isoform switch occurs in which the N2BA isoform is increasingly replaced by the N2B isoform. This switch does not only involve the incorporation of new filaments but also the degradation of both the fetal isoform and the to be renewed adult isoform. The presumed lifespan of only 3-5 days underscores the need for continuous renewal of titin filaments. In diabetic patients, titin-based changes were observed in the cardiac muscle and the isoform ratio was shifted in favor of the longer and more elastic isoform N2BA. In neonatal rat cardiomyocytes, high glucose concentrations were shown to inhibit autophagy and thus a key element of the protein degradation machinery. The aim of this work was to use the perinatal titin isoform switch as an example to investigate the influence of hyperglycemia on titin isoform composition and to examine the involvement of autophagy in titin filament degradation. For this purpose, embryonic rat cardiomyocytes were cultured under hyperglycemic conditions and in the presence and absence of insulin. Subsequently, the titin isoform ratio was determined by SDS gel electrophoresis at different time points and expression changes of proteins involved in autophagy were explored. In contrast to altered isoform ratios in diabetic patients, there was no evidence in the ERC cell culture model that high glucose concentrations had an effect on titin isoform composition early or later in time. Similarly, neither inhibition nor induction of autophagy was observed. The collected data suggests that hyperglycemia is not causal for the observed alteration in the titin isoform expression. Involvement of autophagy in the remodeling processes could not be conclusively determined. The hyperglycemic effect likely differs depending on the maturation stage and thus proliferation rates of the tissue. In conclusion, the data suggests that the titin-based changes in diabetic patients may not be due to hyperglycemia-related effects.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|---|
| A | Ampère |
| A-Band | Anisotropes Band |
| Abb. | Abbildung |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym A |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Akt | Proteinkinase B; Gene: AKT1, AKT2, AKT3 |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPKα | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Atg | <i>Autophagy related protein</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> |
| °C | Grad Celsius |
| CHL | Chloroquine |
| cm² | Kubikcentimeter |
| CMA | Chaperon-vermittelte Autophagie |
| CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CTRL | Kontrolle (<i>control</i>) |
| D | Tag (<i>day</i>) |
| Da | Dalton |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DM | Diabetes mellitus |
| DMT1/2 | Diabetes mellitus Typ 1/2 |
| DTT | Dithiothreitol |
| DPP-4 | Dipeptidylpeptidase-4 |
| ERC | <i>Embryonic rat cardiomyocytes</i> |
| et al. | <i>Et alii</i> (und andere) |
| FBS | Fötales Kälberserum |
| FIP200 | <i>focal-adhesion kinase family interacting protein of 200kDa</i> |
| Glu | Glukose |

| | |
|--|---|
| G+I | Glukose+Insulin |
| h | Stunde (<i>hour</i>) |
| H₂O | Wasser |
| H₂O_{bidest} | Zweifach destilliertes Wasser |
| HbA_{1c} | glykiertes Hämoglobin |
| HCL | Salzsäure |
| I-Band | isotropes Band |
| Ig | Immunglobulin |
| Ins | Insulin |
| l | Liter |
| LC3 | <i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> |
| m | Meter |
| M | Molar/ Mol |
| MDM2 | mouse-double-minute 2 |
| min | Minute |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> |
| MuRF | <i>Muscle-specific RING Finger E3 ligase</i> |
| n | Anzahl an unabhängigen Experimenten |
| N2-Bus | <i>N2-B unique sequence</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Nbr1 | <i>Neighbor-of-BRCA1-gene-1</i> |
| p62/SQSTM1 | <i>sequestome 1</i> |
| PAGE | Natriumdodecylsulfat Polyakrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PEVK | Prolin, Glutamat, Valin, Lysin |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-Kinase Komplex |
| PI3P | Phosphatidylinositol-3-Phosphat |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> |
| PSMA2 | <i>proteasomal subunit alpha type - 2</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| p-Wert | Überschreitungswahrscheinlichkeit |

| | |
|--------------|---|
| RBM20 | <i>RNA binding motif protein 20</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleid acid</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i>) |
| SEM | Standardfehler |
| Ser | Serin |
| TBST | <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> |
| T-cap | Titin-cap/ Telethonin |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Thr | Threonin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | <i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität) |
| ULK | <i>Uncoordinated-51 Like Kinase</i> |
| UPS | Ubiquitin-Proteasom-System |
| V | Volt |
| v/v | Volumen/Volumen |
| Vps30 | <i>vacuolar protein sorting 30</i> |
| w/v | Gewicht/Volumen |
| ZSF1 | <i>Zucker fatty/ spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Hyperglykämie als Leitsymptom des Diabetes Mellitus | 1 |
| 1.2 | Das Makroprotein Titin | 2 |
| 1.2.1 | Titin als Bestandteil eines Sarkomers..... | 2 |
| 1.2.2 | Titin in seiner Struktur und Funktion | 4 |
| 1.2.3 | Die Titin-vermittelte passive Steifigkeit des Myokards in Abhängigkeit von Veränderungen im Isoformenverhältnis | 6 |
| 1.3 | Proteindegradation in der Zelle..... | 8 |
| 1.3.1 | Die Autophagie..... | 8 |
| 1.3.2 | Das Ubiquitin-Proteasom-System | 12 |
| 1.3.3 | Titin innerhalb des Protein-Qualitätskontroll-Systems | 14 |
| 1.4 | Autophagie als möglicher Mediator eines Hyperglykämie-Effektes auf die Titinisoformenkomposition | 15 |
| 2 | Zielsetzung | 17 |
| 3 | Material und Methoden | 18 |
| 3.1 | Material..... | 18 |
| 3.1.1 | Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten | 18 |
| 3.1.2 | Puffer und Lösungen | 19 |
| 3.1.3 | Chemikalien und Enzyme | 21 |
| 3.1.4 | Laborgeräte | 22 |
| 3.1.5 | Antikörper | 23 |
| 3.2 | Methoden..... | 24 |
| 3.2.1 | Zellkulturmethoden..... | 24 |
| 3.2.2 | Proteinnachweis..... | 28 |
| 3.2.3 | Analyse der Proteinbanden..... | 32 |
| 3.2.4 | Software | 32 |
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Untersuchung der Effekte von Hyperglykämie auf Titin..... | 33 |
| 4.1.1 | Glukose- oder Insulinstimulation beeinflussen nicht die Titin-Isoformen-Komposition in kultivierten ERC | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.2 | Glukose- oder Insulinstimulation beeinflussen nicht die K63-Polyubiquitinierung an Titin | 34 |
| 4.2 | Untersuchung der Effekte von Hyperglykämie auf die intrazellulären | |
| | Degradationsmechanismen..... | 36 |
| 4.2.1 | Kultivierung von ERC unter alleinigen hyperglykämischen Bedingungen | 37 |
| 4.2.2 | Kultivierung von ERC unter hyperglykämischen Bedingungen mit Insulinstimulation | 39 |
| 4.2.3 | Kultivierung von ERC unter hyperglykämischen Bedingungen in serumfreiem Medium... | 42 |
| 4.3 | Akt-Aktivierung durch Insulin-Stimulation in ERC..... | 45 |
| 4.4 | Akkumulation von LC3-II und p62 nach Chloroquine-Stimulation in ERC..... | 45 |
| 5 | Diskussion | 47 |
| 5.1 | Relevanz und Einordnung in den medizinischen Kontext..... | 47 |
| 5.2 | Die Verbindung zu Titin und der Autophagie..... | 48 |
| 5.3 | Der Titinisoformenswitch im Zellkulturmodell | 50 |
| 5.4 | Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf den Titinisoformenswitch..... | 50 |
| 5.5 | Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf den Abbau von Titin | 53 |
| 5.6 | Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf die Proteindegradationsmechanismen | 54 |
| 5.7 | Fazit und Ausblick | 58 |
| 6 | Literatur und Quellenverzeichnis..... | 60 |
| 7 | Anhang..... | 73 |
| 7.1 | Abbildungsverzeichnis | 73 |
| 7.2 | Tabellenverzeichnis | 74 |

1 Einleitung

1.1 Hyperglykämie als Leitsymptom des Diabetes Mellitus

Weltweit leiden etwa 422 Millionen Menschen an Diabetes mellitus. Der Diabetes mellitus Typ 2 ist mit 95% die weitaus häufigere Form und hat in den vergangenen Jahren erheblich zugenommen (<https://www.who.int/health-topics/diabetes>, 2020). In Deutschland liegt die Prävalenz bei etwa 10%. Aufgrund der prognostizierten demographischen Entwicklung ist davon auszugehen, dass die Prävalenz weiter ansteigen wird und bis zum Jahr 2045 mehr als 600 Millionen Menschen weltweit an der Krankheit leiden (Goffrier B, Schulz Mandy and Bätzing-Feigenbaum J, 2017; Cosentino *et al.*, 2020).

Im Blutplasma sind verschiedene Nährstoffe gelöst, die dem Gewebe Energie liefern. Eine besondere Bedeutung hat die im Blut gelöste Glukose. Der Glukosegehalt des Blutes wird durch die Hormone Insulin und Glukagon reguliert und beträgt physiologisch etwa 5 mmol/l. Abweichungen von diesem Wert werden als Hypo- bzw. Hyperglykämie bezeichnet. Die Hyperglykämie ist ein diagnostischer Parameter und kennzeichnet den Diabetes mellitus (Heinrich *et al.*, 2014).

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen, die alle den erhöhten Glukosespiegel im Blut gemeinsam haben. Die wichtigsten Vertreter der Gruppe sind Diabetes mellitus Typ 1 und 2. Bei DMT1 kommt es über einen autoimmunen Prozess zum Untergang der insulinproduzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse. Der bedeutend häufigere DMT2 hat einen genetischen Einfluss und ist stark mit der Überernährung in Wohlstandsgesellschaften assoziiert. Hierbei kommt es zu einer beeinträchtigten Insulinwirkung an der Körperzelle und in diesem Zuge zu einer zunächst kompensatorisch erhöhten und im Verlauf verminderten Insulinsekretion. Bei beiden Typen führt die fehlende Insulinwirkung zu einer Hyperglykämie im Blutkreislauf. DMT2 manifestiert sich meist schleichend und bleibt über viele Jahre hinweg unentdeckt. Allerdings kommt es schon in dieser Zeit durch die pathologische Stoffwechsellage über Mikro- und Makroangiopathien zu schwerwiegenden Organschädigungen, insbesondere

auch am Herzen (Herold, 2020). Oberstes Ziel der Behandlung ist die optimale Blutzuckereinstellung, um das Risiko für Folgeerkrankungen zu senken. Die Therapie ist vielschichtig, komplex und zudem abhängig von der vorliegenden Diabetesform (Cosentino *et al.*, 2020).

Kardiovaskuläre Ereignisse sind die häufigste Todesursache unter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 (Einarson *et al.*, 2018). Die Ergebnisse der Framingham-Studie zeigten eine 2,4-fach erhöhte Inzidenz von Herzinsuffizienz bei Männern mit DM, bei Frauen sogar 5-fach erhöht (Kannel, Hjortland und Castelli, 1974). Die diabetische Kardiomyopathie ist definiert als eine Störung der Myokardstruktur mit herabgesetzter kardialer Leistung bei Menschen mit DM ohne Risikofaktoren. Zu den Risikofaktoren gehören unter anderem die koronare Herzerkrankung, Bluthochdruck oder Herzklappenerkrankungen (Jia, Hill und Sowers, 2018).

Mehrere Faktoren sind in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie von Bedeutung. Zu den frühen, Diabetes-assoziierten Defekten, die einer klinisch manifesten Funktionseinschränkung vorausgehen können, gehören Veränderungen in der Myokardstruktur sowie eine Beeinträchtigung des Metabolismus und der Calcium-Homöostase (Boudina und Abel, 2010).

Hyperglykämie ist ein eigenständiger Risikofaktor für diabetische Kardiomyopathie (Boudina und Abel, 2007). Die Entwicklung einer diabetischen Kardiomyopathie und Herzversagen lassen sich in engen Zusammenhang bringen mit der Dauer und Schwere der Hyperglykämie (Iribarren *et al.*, 2001; Bhatia *et al.*, 2004; van Melle *et al.*, 2010).

1.2 Das Makroprotein Titin

1.2.1 Titin als Bestandteil eines Sarkomers

Die kleinste kontraktile Einheit eines quergestreiften Muskels ist das Sarkomer. Über Längenvariation befähigt es den Muskel zur Kontraktion. Das Sarkomer besteht hauptsächlich aus drei Myofilamenten: den dicken Myosinfilamenten, den dünnen Aktinfilamenten und dem elastischen Titinfilament. Die Filamente sind im Muskel überlappend angeordnet und können eine Verkürzung des

Sarkomers bewirken. Sie verleihen dem Muskel seine charakteristische Querstreifung. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau eines Sarkomers dargestellt. Es spannt sich zwischen zwei Z-Scheiben auf, die als Halteapparat den dünnen Aktinfilamenten sowie den Titinfilamenten zur Aufhängung dienen. Mittels der Z-Scheiben findet wesentlich die Verknüpfung von Zytoskelett und kontraktilen Apparaten statt (Pyle und Solaro, 2004). Ein einzelnes Titinmolekül erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und durchspannt somit ein halbes Sarkomer (Fürst *et al.*, 1988). Es ist unter anderem wichtig für die Zentrierung der Myosinfilamente zur optimalen aktiven Kraftentwicklung (Horowitz, Maruyama und Podolsky, 1989).

Das mikroskopische Lichtbrechungsverhalten zeigt die charakteristische Myofilamentanordnung innerhalb eines Sarkomers und ist namensgebend für die einzelnen Regionen. Es wird unterteilt in die Z-Scheibe, das isotrope Band (I-Band), das anisotrope Band (A-Band) und die M-Linie in der Mitte eines Sarkomers. Das I-Band stellt sich mikroskopisch einfach lichtbrechend dar und umgibt die Z-Scheiben. Je nach Dehnungs- oder Kontraktionszustand kann es unterschiedliche Längen annehmen. Das A-Band zeigt im Lichtmikroskop ein doppellichtbrechendes Verhalten und beinhaltet die Myosin-haltigen Regionen. Eine Quervernetzung der Myosinfilamente untereinander führt zu einer zentralen Verdichtung innerhalb des A-Bands und wird als M-Linie bezeichnet (Knappeis und Carlsen, 1968; Agarkova und Perriard, 2005). Bei konstanter Eigenlänge von Myosin- und Aktinfilamenten bewirkt ein Ineinandergleiten dieser eine Längenminderung des Sarkomers und verursacht so eine Verkürzung des Gesamtmuskels, eine Kontraktion (Huxley und Hanson, 1954). Dieser Ablauf wird durch eine Änderung der chemischen Konfiguration am Myosinmolekül ermöglicht und als Querbrückenzyklus bezeichnet. Die Fortsätze („Köpfchen“) des Myosins können mittels Winkelveränderung und Bindung an Aktin die Filamente gegeneinander verschieben. Für die Lösung des Myosins vom Aktin wird Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) benötigt (Maruyama, 1995). Während der Muskelkontraktion ist bei Titin eine Längenänderung zu beobachten, die hauptsächlich im elastischen I-Bandbereich stattfindet (Labeit *et al.*, 1992; Linke *et al.*, 1999).

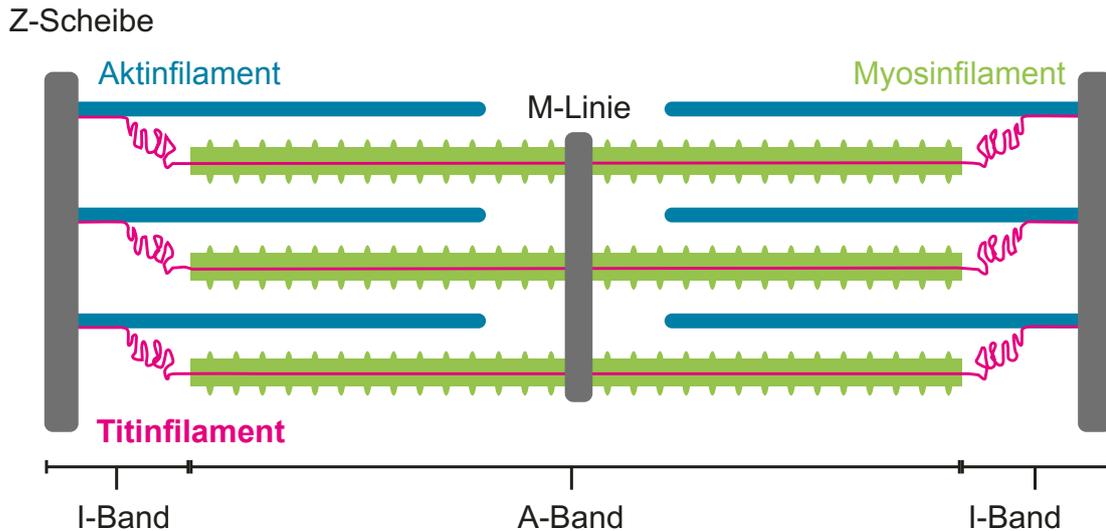


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. Eine Verkürzung des Sarkomers wird durch Ineinandergleiten von Aktin und Myosin herbeigeführt. Ein einzelnes Titinmolekül durchspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. A-Band (anisotropes Band), I-Band (isotropes Band), M-Linie (mediane Verdichtung der Myosinfilamente), Z-Scheibe (laterale Begrenzung des Sarkomers und Aufhängeapparat für Aktin- und Titinfilamente).

1.2.2 Titin in seiner Struktur und Funktion

Titin ist mit einer Größe von 3-3,7 MDa das größte bekannte Protein im menschlichen Körper. Es ist im Sarkomer verankert und durchspannt es, wie in Abbildung 1 dargestellt, von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Fürst *et al.*, 1988). Ein einziges Gen (*TTN*) bestehend aus 363 Exons kodiert die gesamte Aminosäuresequenz von Titin. In der Herzmuskulatur werden zwei Isoformen durch alternatives Spleißen koexprimiert: die lange und elastische N2BA- (ca. 3,2-3,3 MDa) und die kürzere und steifere N2B-Isoform (ca. 3,0 MDa) (Freiburg *et al.*, 2000; Bang *et al.*, 2001).

Titin weist in seiner Struktur 4 Hauptregionen auf: (1) Das N-terminale Ende, das in der Z-Scheibe des Sarkomers fixiert ist, (2) die I-Banden-Region, die ausschlaggebend für die Elastizität von Titin ist, (3) die A-Banden-Region, die wichtig für die Stabilisation von Myosin ist, und (4) das C-terminale Ende, das in der M-Linie verankert ist. Das C-terminale Ende beinhaltet eine Serin/ Threonin Kinase-Domäne und überlappt mit dem C-Terminus des nächsten Titinmoleküls (Chauveau, Rowell und Ferreira, 2014).

Titin setzt sich zusammen aus miteinander verknüpften Immunglobulin (Ig)- und Fibronectin Typ 3-ähnlichen Domänen, sowie aus den *unique sequences*, individuellen Sequenzabschnitten, und einer am M-Band gelegenen Titinkinase-Domäne (Labeit *et al.*, 1992; Labeit und Kolmerer, 1995; Bang *et al.*, 2001; Gautel, 2011). Die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Bestandteile ermöglichen Titin einen stetigen Konfigurationswandel und eine relevante Beteiligung an der myokardialen Elastizität (Makarenko *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005).

Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Titinisoformen N2BA und N2B besteht in der I-Bandenregion (800 kDa-1,5 MDa) (Freiburg *et al.*, 2000). Im Herzen setzt sich diese Region aus drei wichtigen Bestandteilen zusammen: (1) mehreren seriell angeordneten immunglobulinähnlichen Ig-Domänen, (2) der Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) reichen Region (PEVK-Region) und (3) der herzspezifischen N2B-Domäne (LeWinter und Granzier, 2014). Beide Isoformen besitzen eine proximale und distale Ig-Domäne. Die längere N2BA-Isoform jedoch enthält zusätzlich eine mittlere Ig-Domäne (Lahmers *et al.*, 2004). Darüber hinaus weisen die Isoformen eine unterschiedliche Länge ihrer PEVK-Region auf. Die PEVK-Region der N2BA-Isoform ist deutlich länger. Beide Isoformen enthalten zudem die herzspezifische N2B-Domäne. Sie besteht aus drei Ig-Domänen und der N2B-*unique sequence* (N2-Bus). Die N2BA-Isoform enthält zudem noch ein zusätzliches N2A-Element (Greaser *et al.*, 2003). Die Zusammenschau dieser Faktoren, die zusätzlichen Ig-Domänen, das längere PEVK-Segment und die Expression des N2A-Elements, bedingen die Größe und vermehrte Elastizität der N2BA-Isoform gegenüber der N2B-Isoform (Bang *et al.*, 2001).

Bei initialer Dehnung zu Beginn der Diastole extendieren zunächst die *linker sequences* in den proximalen und distalen Ig-Domänen-Regionen bis sich bei weiterer Expansion die PEVK- und die N2-Bus-Region ebenfalls ausweiten (Linke *et al.*, 1996; Granzier *et al.*, 1997). Die passive Spannung im Sarkomer nimmt dabei simultan zu und lässt so eine Rückstellkraft wie bei einer Feder entstehen (Linke *et al.*, 1999). Die I-Bandenregion ist demnach über ihre Funktion

als molekulare Feder maßgeblich an der Elastizität des Sarkomers beteiligt (Linke und Granzier, 1998).

Die myokardiale Steifigkeit wird innerhalb der physiologischen Sarkomerlänge (bis ca. 2,2 μm) maßgeblich durch die Rückstellkräfte von Titin bedingt, wohingegen bei einer Sarkomerlänge von über 2,2 μm die Kollagen-vermittelte Steifigkeit der Extrazellulärmatrix eine größere Rolle spielt (Linke, Popov und Pollack, 1994; Granzier und Irving, 1995; Prado *et al.*, 2005).

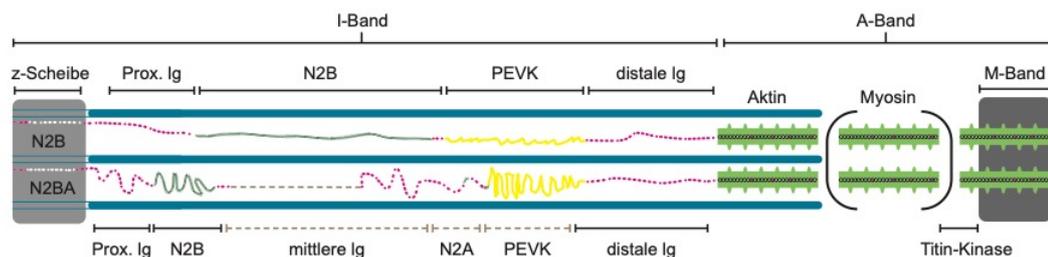


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Titinisoformen N2B und N2BA in einem kardialen Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Dargestellt ist der spezifische Aufbau der jeweiligen Isoform in einem Halbsarkomers. Beide kardiale Isoformen besitzen eine proximale und distale (im Hinblick auf die Z-Scheibe) Ig-Domäne, eine PEVK-Region und das herzspezifische N2B-Element. Das zusätzliche Ig-Segment sowie ein N2A-Segment sind charakteristisch für die N2BA-Isoform.

1.2.3 Die Titin-vermittelte passive Steifigkeit des Myokards in Abhängigkeit von Veränderungen im Isoformenverhältnis

Es wird angenommen, dass pro Myosinfilament eine konstante Anzahl von Titinmolekülen existiert (in der Regel sechs Titinmoleküle pro halbes dickes Filament). Das Isoformenverhältnis jedoch kann verändert werden. Eine Veränderung wird über eine gesteigerte oder geminderte Expression der beiden Isoformen N2BA und N2B gewährleistet. So kann ein längerfristiger Einfluss auf die Titin-vermittelte passive Steifigkeit der Myofilamente genommen werden (Cazorla *et al.*, 2000).

Neben den längerfristigen Veränderungen der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit gibt es auch kurzfristige Einflüsse. Dazu gehören posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und oxidativer Stress (Krüger und Kötter, 2016).

Eine Veränderung des Isoformenverhältnisses ist sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen zu beobachten. Bei kleineren Säugetieren mit höherer Herzfrequenz wird eine höhere N2B-Expression (N2B:N2BA Verhältnis circa 80:20 bei einer Maus) beschrieben als in einem menschlichen Herzen, wo das N2B:N2BA bei etwa 60:40 liegt (Cazorla *et al.*, 2000; Hidalgo und Granzier, 2013). Es gibt auch Unterschiede innerhalb eines Organismus. So wird die N2BA-Isoform im rechten Herzen und den Herzvorhöfen stärker exprimiert, als im linken Ventrikel (Neagoe *et al.*, 2003).

In einem Zellkulturmodell mit embryonalen Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass es in der Perinatalperiode zu einer starken Veränderung der Isoformenkomposition kommt. Pränatal exprimieren Rattenkardiomyozyten fast ausschließlich eine fötale N2BA-Isoform (bis zu 3,7 MDa) (Opitz *et al.*, 2004). Perinatal wird diese fötale Isoform sukzessiv durch die kleineren Isoformen N2BA und N2B ersetzt. Vermutlich reagiert der Fötus mit der elastischen N2BA-Isoform adaptiv auf den geringeren ventrikulären Fülldruck im Gegensatz zum adulten Herzen. Hinzu kommt, dass durch den Einbau der elastischeren Isoform mehr Flexibilität im Zusammenbau der Sarkomere während der embryonalen Entwicklung bestehen könnte (Warren *et al.*, 2004).

Auch unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Veränderung des Titinisoformenverhältnisses. Eine erhöhte Expression der N2BA-Isoform besteht bei dem Krankheitsbild der ischämischen Kardiomyopathie (Neagoe *et al.*, 2002). Ebenfalls wurde vermehrt die N2BA-Isoform in der Spätphase der Herzinsuffizienz nachgewiesen (Makarenko *et al.*, 2004). Vermutet wird ein adaptiver Vorgang, um durch die Expression der N2BA-Isoform kompensatorisch der gestiegenen Steifigkeit der Extrazellulärmatrix entgegenzuwirken (Nagueh *et al.*, 2004; LeWinter und Granzier, 2014). Ein weiterer Effekt auf das Verhältnis wurde sowohl für das Thyroidhormon Trijodthyronin (T3) als auch für Insulin nachgewiesen. Die Stimulation von embryonalen Rattenkardiomyozyten im Zellkulturmodell mit Insulin bewirkte eine Verschiebung des Isoformenverhältnisses zugunsten der N2B-Isoform. Der PI3K-Akt-Signalweg wurde als zugrundeliegender Mechanismus identifiziert (Krüger *et al.*, 2008, 2010).

Die Einflüsse, die ursächlich für eine Verschiebung im Titinisoformenverhältnis sind, sind noch unzureichend untersucht und verstanden. Es wurde eine Bedeutung des Spleißfaktors RNA-bindendes Protein 20 (RBM20) für die Expression der N2BA-Isoform nachgewiesen (Guo *et al.*, 2012).

1.3 Proteindegradation in der Zelle

1.3.1 Die Autophagie

Die zelluläre Homöostase erfordert ein Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen. In eukaryotischen Zellen existieren zwei Mechanismen für den Abbau von Proteinen: die Autophagie und das Proteasom. Lediglich die Autophagie kann ganze Zellorganellen degradieren (Klionsky, 2003). Für diesen wichtigen Prozess in der Zelle wurde eine große Bandbreite an physiologischen und pathophysiologischen Funktionen gefunden (Mizushima, 2007). Die Autophagie beteiligt sich an der Entwicklung, Differenzierung und dem *Remodeling* in verschiedenen Organismen (Levine und Klionsky, 2004). Ferner wird durch den Prozess zum einen die Energiehomöostase über das Recycling von beschädigten oder gealterten Proteinen und Zellorganellen aufrecht erhalten und es fungiert als ein Überlebensmechanismus der Zelle, um Stressoren aus der Umgebung zu begegnen (Hale *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde im Zusammenhang mit Pathologien wie Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz ebenfalls eine gesteigerte Autophagie-Aktivierung gefunden (Mizushima und Komatsu, 2011; Bonaldo und Sandri, 2013).

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (Shintani und Klionsky, 2004). Alle drei unterscheiden sich in ihrer Methode, Zellbestandteile dem Lysosom für den Abbau zuzuführen (Cuervo, 2004). In Kardiomyozyten spielt die Makroautophagie eine entscheidende Rolle (Terman und Brunk, 2005), weshalb diese im Folgenden lediglich als „Autophagie“ bezeichnet wird.

Im Zusammenhang mit dem Autophagieprozess konnten insgesamt 31 Atg-Proteine (*autophagy-related*) identifiziert werden, 18 von ihnen spielen eine Rolle in der Entstehung des Autophagosoms (Suzuki und Ohsumi, 2007). Zu Beginn

des Prozesses wird ein Teil des Zytoplasmas mit den abzubauenen Substraten sequestriert und in einer Vakuole umschlossen. Hierfür bildet sich, wie in Abbildung 3 dargestellt, eine sichelförmige Lipiddoppelmembran vom endoplasmatischen Retikulum abstammend, welche auch als Phagophore bezeichnet wird. Die Enden der Phagophore extendieren bis sie ihre Substrate umschließen. Nun hat sich ein Autophagosom gebildet (Seglen *et al.*, 1996; Noda, 2002; Cuervo, 2004; Levine und Klionsky, 2004). Das Autophagosom verschmilzt im weiteren Verlauf mit dem Lysosom und wird als Autolysosom bezeichnet. Dabei wird die innere Autophagosomenmembran durchbrochen und der Inhalt von den lysosomalen Proteasen zersetzt sowie Makromoleküle recycelt (Shintani und Klionsky, 2004; Hale *et al.*, 2013).

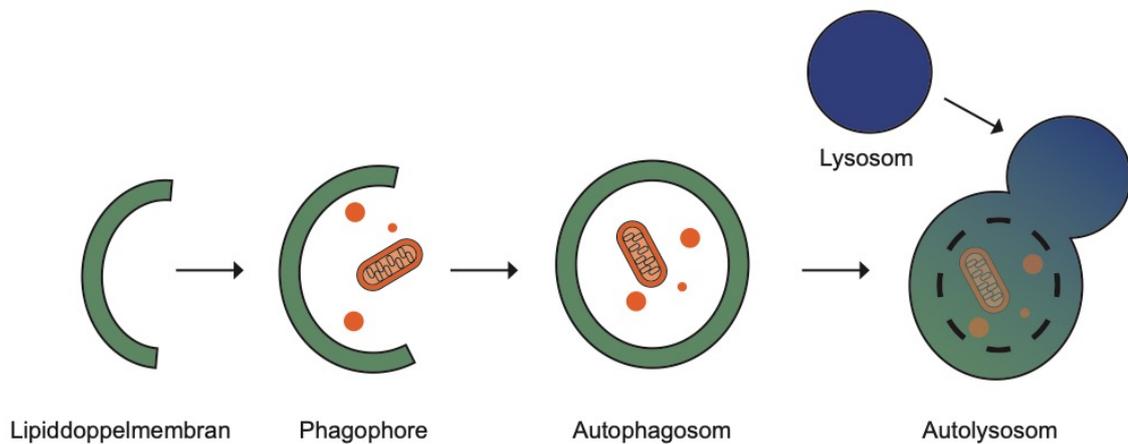


Abbildung 3: Schema der Autophagosom-Bildung. Eine sichelförmige Lipiddoppelmembran entwickelt sich zur Phagophore. Die Enden dieser Phagophore extendieren bis sie ihre abzubauenen Substrate umschließen. Durch die Verschmelzung des Autophagosoms mit dem Lysosom wird der Inhalt durch lysosomale Proteasen zersetzt.

Der Autophagieprozess ist komplex und wird von zahlreichen Einflüssen und Regulatoren gesteuert. Das Netzwerk der Proteine interagiert präzise auf zelluläre Veränderungen. Eine zentrale Rolle in den Signalwegen spielen die Kinasen *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTOR) und AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK α). Beide phosphorylieren die *unc-51-like* Kinase 1 (ULK) an verschiedenen Stellen und können so die Aktivität gegensätzlich beeinflussen. Die ULK kann mTOR und AMPK α ebenfalls über Phosphorylierung

inhibieren. Innerhalb der drei Kinasen gibt es folglich sowohl positive, als auch negative Feedbackregulationen (Alers *et al.*, 2012).

Die Serin/Threonin-Protein-Kinase mTOR detektiert das Nährstoffangebot in der Zelle, reguliert das Zellwachstum und -überleben und inhibiert direkt den Autophagieprozess. Es ist über Signalwege in den Zellmetabolismus integriert: Wenn ein reiches Nährstoffangebot vorhanden ist, dann phosphoryliert es ULK an Serin 757 und inhibiert so die Autophagie und damit Proteindegradation. Bei fehlenden Nährstoffen hingegen induziert AMPK α den Autophagieprozess durch Phosphorylierung von ULK an den Stellen Serin 317 und Serin 777 (Yu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Alers *et al.*, 2012; Hale *et al.*, 2013).

Die ULK formt einen Komplex mit drei weiteren Proteinen: ATG13, FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*) und ATG101, und leitet so die Entstehung der Autophagosomen ein (Jung *et al.*, 2009; Mizushima, 2010; Kim *et al.*, 2011). Vorausgesetzt die Autophagie wird induziert, kommt es durch die ULK zu einer Phosphorylierung von Beclin-1, welches ein Element des PI3K-Komplexes ist. Die AMP-Kinase kann die Autophagie unter Umgehung von ULK und durch direkte Phosphorylierung von Beclin-1 ebenfalls induzieren (Zhang *et al.*, 2016).

Der aktive Phosphatidylinositol 3-Kinase Komplex (PI3K) rekrutiert Lipide zur Ausdehnung der Phagophore und produziert unter anderem Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) als Bestandteil der Autophagosomenmembran. Abhängig von den einzelnen Komponenten dieses Komplexes, wie PIK3C3/CPS34 und Beclin-1, und deren Interaktion und Zusammensetzung besitzt der Komplex verschiedene Aufgaben zur Regulation des Autophagieprozesses (Liang *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2013; Shibutani und Yoshimori, 2014).

Beclin-1 setzt sich zusammen aus Atg6/Vps30 (*vacuolar protein sorting 30*) und ist Bestandteil des PI3-Kinase Komplexes. Erstmals entdeckt wurde es in Interaktion mit Beclin-2, welches eine antiapoptotische Funktion ausübt (Liang *et al.*, 1998; Mizushima, 2007). Während eines Hungerzustandes der Zelle kann

Beclin-1 von Beclin-2 dissoziieren und die Autophagie aktivieren (Maiuri *et al.*, 2007).

Die Elongation der Phagophorenenenden wird über zwei Ubiquitin-assoziierte Konjugationssysteme erreicht. Im Rahmen der dort ablaufenden Signalkaskaden über verschiedene ATG-Proteine (*autophagy related protein*) wird das im Zytosol vorkommende Protein LC3-I zu seiner aktiven Form LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) lipidiert und in die Autophagosomenmembran eingebaut. LC3-II verbleibt in der Membran bis zur Verschmelzung mit dem Lysosom. Das LC3-II, welches mit der äußeren Membran assoziiert ist, dissoziiert nach der Fusion und das LC3-II, welches in der inneren Membran lokalisiert ist, wird von den lysosomalen Proteasen mit den abzubauenen Substraten degradiert. Diese Eigenschaft von LC3-II macht das Protein zu einem beliebten Autophagiemarker (Tanida, Ueno und Kominami, 2008; Hale *et al.*, 2013).

p62/SQSTM1 (*sequestome 1*) ist ein Bestandteil des Zytoskeletts mit verschiedenen Funktionen in zahlreichen Geweben und das am besten bekannte Ziel von selektiver Autophagie (Bjørkøy *et al.*, 2005) Es fungiert als Adapterprotein und bindet die abzubauenen Substrate. Es hat eine Ubiquitin-bindende Domäne und eine Domäne, die mit LC3-II interagiert. Es wird angenommen, dass mittels p62 eine Verbindung zwischen der Autophagie und dem Ubiquitin-Proteasom-System besteht (Babu, Geetha und Wooten, 2005; Itakura und Mizushima, 2011). In seiner Funktion als Adapterprotein befindet es sich in der inneren Autophagosomenmembran und wird innerhalb des Autophagieprozesses degradiert (Bjørkøy *et al.*, 2009). Eine Beeinträchtigung der Autophagie führt zu einer Akkumulierung von p62 (Komatsu *et al.*, 2007).

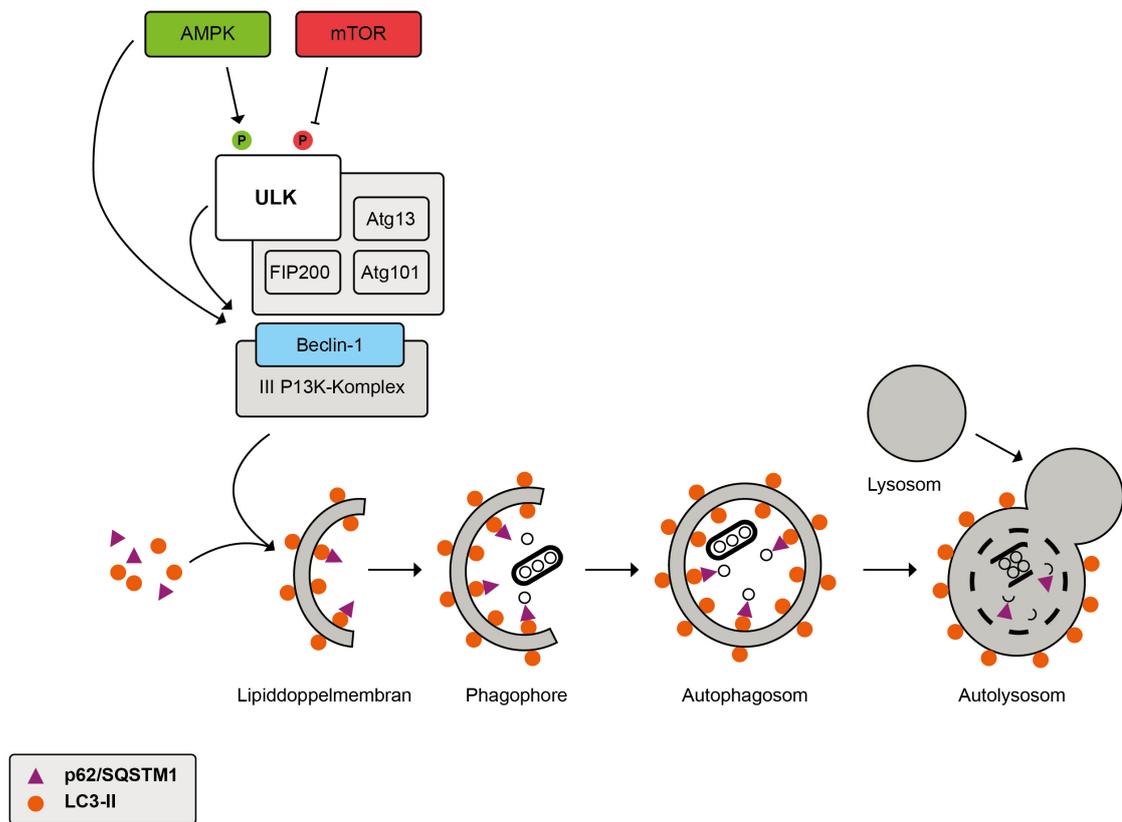


Abbildung 4: Induktion und Inhibition der Autophagosom-Bildung. Die Proteinkinasen AMPK α und mTOR phosphorylieren ULK wechselseitig an unterschiedlichen Stellen und können so die Aktivität gegensätzlich beeinflussen (Induktion und Inhibition). ULK aktiviert Beclin-1, einen Bestandteil des Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase-Komplexes. Beclin-1 wird auch durch AMPK α direkt aktiviert. Der PI3K-Komplex rekrutiert Bestandteile, die für die Bildung des Autophagosoms essentiell sind, wie p62/ SQSTM1 und LC3-II.

1.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Innerhalb des Ubiquitin-Proteasom-Systems können fehlgefaltete Proteine nicht-lysosomal degradiert werden. Das Proteasom erkennt die abzubauenen Proteine anhand ihrer Konjugation an Ubiquitin (Finley, 2009).

Das 26S-Proteasom setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: der katalytischen 20S-Untereinheit und der regulatorischen 19S-Untereinheit (Gallastegui und Groll, 2010). Die 20S-Untereinheit mit ihrer zylinderförmigen Struktur besteht aus vier siebengliedrigen Ringen, bestehend aus alpha- und beta-Untereinheiten (Groll *et al.*, 1997; Finley, 2009). In der beta-Untereinheit ist das proteolytisch aktive Zentrum lokalisiert mit *Caspase-like*, *Trypsin-like* und *Chymotrypsin-like* Enzymaktivitäten (Chondrogianni und Gonos, 2005).

Defekte Proteine werden für die Degradierung im Proteasom durch Anhängen eines oder mehrerer Ubiquitinmoleküle an einen Lysinrest markiert. Das Peptid Ubiquitin mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa besteht aus 76 Aminosäuren. Es sind verschiedene Ubiquitinligasen bekannt, die die Moleküle in einzelnen Schritten miteinander verknüpfen. Es wurden Ubiquitinligasen gefunden, die auch mit dem Titinfilament im Sarkomer interagieren (Willis *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu monoubiquitinierten Substraten werden polyubiquitinierte Proteine mit mindestens 4 Ubiquitinketten erfolgreich vom Proteasom gebunden und abgebaut (Thrower, 2000). Die Ubiquitinketten erhalten ihre Bezeichnung "K6, K11, K27, K29, K33, K48 oder K63" abhängig von den Lysinresten, über die sie jeweils verknüpft sind. K48 wurde erstmals identifiziert als Markierung von Substraten für den proteasomalen Abbau. K11 oder K63 hingegen kennzeichnen hauptsächlich für nicht-proteolytische Signalwege (Behrends und Harper, 2011). Die K63-Ubiquitinierung wurde als Signal für die Degradation über die Autophagie erfasst (Tan *et al.*, 2008).

Die Substrate binden an die 19S-Untereinheit des Proteasoms und translozieren anschließend zu der 20S-Untereinheit im Inneren des Proteasoms, wo sie hydrolysiert werden (Deveraux *et al.*, 1994). Sechs ATPasen der regulatorischen Untereinheit bilden einen ringförmigen Komplex und veranlassen sowohl die Entfaltung als auch die Translokation der Substrate (Finley, 2009).

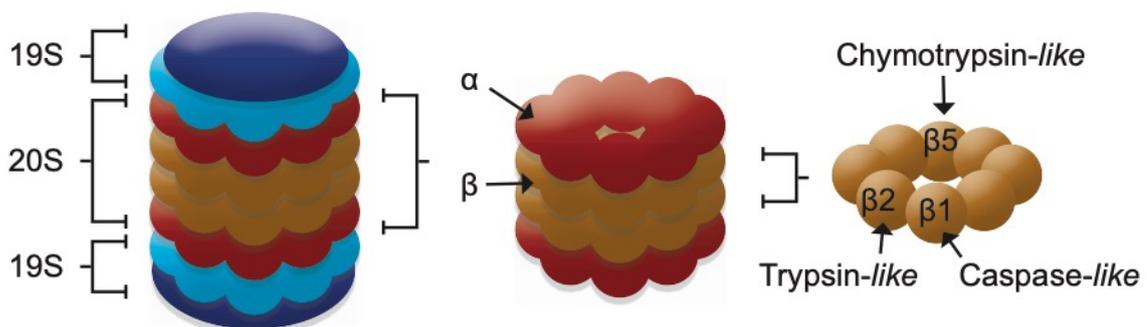


Abbildung 5: Aufbau des 26S-Proteasoms. Zwei regulatorische 19S- und eine zentrale, katalytische 20S-Untereinheit bilden das Proteasom. Vier siebengliedrige Ringe bestehend aus alpha- und beta-Untereinheiten bilden die katalytische Untereinheit mit ihren drei proteolytischen Aktivitäten lokalisiert in der beta-Einheit: Trypsin-like, Chymotrypsin-like und Caspase-like Enzymaktivität.

1.3.3 Titin innerhalb des Protein-Qualitätskontroll-Systems

Obwohl das Sarkomer oft als statische Struktur beschrieben wird, ist es tatsächlich dynamisch und unterliegt einem konstanten Umsatz, wodurch es sich an physiologische Veränderungen anpassen kann, während die Funktion erhalten bleibt (Willis *et al.*, 2008).

Unter physiologischen Bedingungen spielen die Mechanismen der Proteindegradation eine wichtige Rolle für die Herzmuskelzellen (Kötter, Andresen und Krüger, 2014). Pathologische Prozesse sind mit einer Beeinträchtigung des Protein-Qualitätskontroll-Systems assoziiert, diese können im Rahmen einer Kardiomyopathie auftreten (Carrier *et al.*, 2010; Predmore *et al.*, 2010; Schlossarek, Frey und Carrier, 2014).

Trotz seiner enormen Größe hat Titin eine vermutete Lebensdauer von nur 3-5 Tagen (Zak *et al.*, 1977; Isaacs *et al.*, 1989). Dies unterstreicht die Notwendigkeit zur kontinuierlichen Erneuerung der Titinfilamente. Es gibt mehrere Nachweise, dass Elemente des Protein-Qualitätskontroll-Systems an dem dafür notwendigen Um- und Abbau beteiligt sind (Kötter, Andresen und Krüger, 2014).

Eine Interaktion von E3-Ligasen mit verschiedenen Strukturen des Titinmoleküls suggerieren eine Anbindung zum proteasomalen Abbaumechanismus. Es wurde eine Verbindung zwischen der Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*mice-double-minute 2*) und dem Protein Telethonin an der Z-Scheibe nachgewiesen (Tian *et al.*, 2006). Des Weiteren interagiert die M-Bandendomäne von Titin mit MuRF-1 und MuRF-2, ebenfalls zwei E3-Ubiquitin-Ligasen (Witt *et al.*, 2005; Kötter, Andresen und Krüger, 2014).

Eine weitere, wichtige Verbindung besteht zwischen der Titin-Kinase-Domäne und dem Nbr1/p62/SQSTM1-Komplex. Über das Protein p62 ist eine weitere Proteindegradation über den Autophagieprozess wahrscheinlich (Lange, 2005; Kötter, Andresen und Krüger, 2014).

Es scheint offensichtlich, dass aufgrund der enormen Größe von Titin, der Um- und Abbau von Myofilamenten die Zelle vor eine große Herausforderung stellt. Anhand der bislang gewonnenen Erkenntnisse ist anzunehmen, dass das

Protein-Qualitätskontroll-System einen entscheidenden Mechanismus in der Proteindegradation von Titin darstellt (Kötter, Andresen und Krüger, 2014).

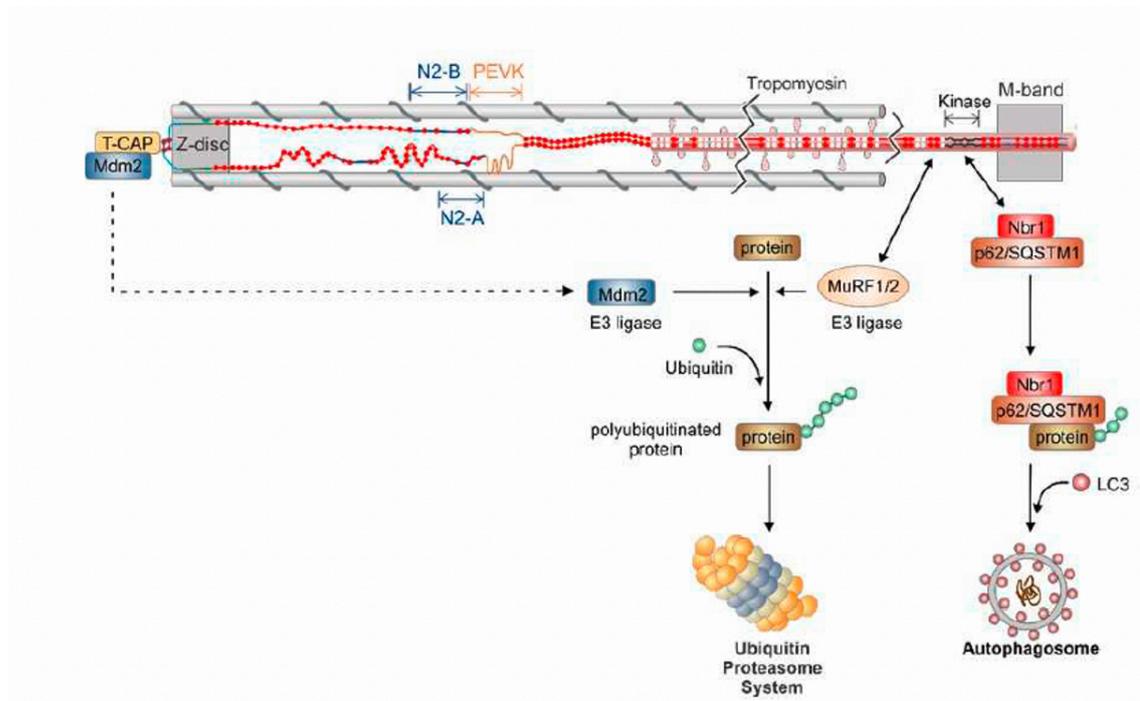


Abbildung 6: Verbindung des Protein-Qualitätskontroll-Systems mit dem Titinfilament. Durch eine Interaktion von Titin mit den E3-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 (*Muscle-specific RING Finger E3 ligase*) konnte eine Verbindung zu dem UPS gezeigt werden. Im Bereich der Titin-Kinase-Domäne ist das Titinfilament mit dem p62/SQSTM1/Nbr1-Komplex assoziiert und könnte so eine Anbindung an das Autophagie-Lysosomen-System darstellen. MDM, *mice-double-minute 2*; T-cap, Telethonin (*titin-cap*); Nbr1, *neighbor-of-BRCA1-gene-1* (verändert nach Kötter et al., 2014).

1.4 Autophagie als möglicher Mediator eines Hyperglykämie-Effektes auf die Titinisoformenkomposition

Die Entwicklung und Differenzierung einer Zelle geht häufig mit zellulärem *Remodeling* einher und benötigt einen gesteigerten Abbau. Autophagie hat in diesem Fall zwei Aufgaben: Erst werden präexistente Materialien eliminiert und anschließend unterstützt der Autophagieprozess den folgenden Aufbau von neuen Komponenten (Mizushima und Levine, 2010).

Im vorherigen Kapitel wurden die Verbindungen von Titin zu dem Protein-Qualitätskontroll-System erläutert und dargestellt.

Nahezu alle Gewebe mit defekter Autophagie weisen eine Akkumulierung von polyubiquitinierten Proteinen auf (Mizushima und Komatsu, 2011). In Zellkulturversuchen mit embryonalen Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Autophagie durch Chloroquine auch zu einer deutlichen Erhöhung der K63-Ubiquitinierung von Titin führt (Salcan, 2018). Es wurde ebenfalls erkannt, dass bei einer durch Metformin induzierten Proteindegradation in der Zelle sich auch gleichzeitig das Titinisoformenverhältnis ändert (Bärthlein, 2019).

Bei Diabetespatienten wurden titinbasierte Veränderungen im Herzmuskel festgestellt. Das Isoformenverhältnis war zugunsten der längeren und elastischeren Isoform N2BA verschoben (Hopf *et al.*, 2018). In einer Versuchsreihe mit neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen die Autophagie und damit ein zentrales Element der Proteindegradationsmaschinerie inhibieren (Kobayashi *et al.*, 2012).

Darüber hinaus gibt es Anzeichen dafür, dass bei vielen diabetischen Komplikationen auf den Autophagieprozess durch Hyperglykämie Einfluss genommen werden könnte und eine fehlerhafte Autophagie für die Glukotoxizität verantwortlich sei (Han *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2014).

Betrachtet man diese Erkenntnisse in einem Zusammenhang, so ist es plausibel, dass Hyperglykämie möglicherweise über Auswirkungen auf die Autophagie eine Veränderung in der Titinisoformenkomposition bewirkt.

2 Zielsetzung

Vor dem in der Einleitung dargestellten Hintergrund hat die vorliegende Arbeit das folgende Ziel: Es soll am Modell des perinatalen Titinisoformenswitches der Einfluss von Hyperglykämie auf die Regulation der Titinisoformenzusammensetzung untersucht und die Beteiligung der Autophagie am Abbau des Titinfilaments geprüft werden. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass Hyperglykämie die Autophagie in embryonalen Kardiomyozyten hemmt und die Titinisoformenkomposition beeinflusst. Hierzu wurden in einem Zellkulturmodell embryonale Rattenkardiomyozyten zunächst unter rein hyperglykämischen Bedingungen kultiviert. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Versuchsreihe, schlossen sich Kultivierungsansätze unter hyperglykämischen Bedingungen mit Anwesenheit von Insulin sowie der Kultivierung in serumfreiem Medium an. Es wurden verschiedene Kultivierungszeiträume gewählt, um Abhängigkeiten der hohen Glukoselevel von Entwicklungsstadium und Stimulationsdauer zu überprüfen.

In der weiteren Proteinanalyse wurde das Titinisoformenverhältnis mittels SDS-Gelelektrophorese sowie das Level von an der Autophagie beteiligten Proteinen bestimmt. Das Aktivitätslevel von Autophagie wurde anhand der Marker AMPK α , mTOR, LC3-II, p62 und Beclin mittels *Western Blot* bestimmt. Um weitere mögliche Effekte auf den proteasomalen Abbau zu ermitteln, wurde auch der Marker PSMA2 (*proteasomal subunit alpha type-2*) untersucht. Darüberhinausgehend wurde die K63-Ubiquitinierung vom Titinfilament analysiert mit der Zielsetzung, einen Einfluss durch die Stimulation auf die Autophagie direkt am Titinmolekül zu detektieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Zur Kultivierung der embryonalen Rattenkardiomyozyten wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Kulturmedien verwendet.

Tabelle 1: Kulturmedien für die embryonalen Rattenkardiomyozyten

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

3.1.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind wie in Tabelle 2 beschrieben zusammengesetzt.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

| Puffer / Lösung | Zusammensetzung |
|--|---|
| 10 x SDS-Laufpuffer | 250 mM Tris 2 M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| 10 x <i>-Tris-buffered saline</i> + Tween (TBST) (pH 7,4) | 0,2 M Tris/ HCL 1,5 M NaCl 1% Tween – 20 |
| 4 x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8) | 0,5 M Tris/ HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| 4 x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8) | 1,5M Tris/ HCL 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| Anodenpuffer (pH 8,8) | 300 mM Tris/ HCL 100 mM Tricine |
| Blockierungslösung | 2% BSA in 1 x TBST |
| Kathodenpuffer (pH 8,7) | 300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris/ HCl |
| <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) | 150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid |
| PVDF <i>destain</i> | 10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol |
| PVDF <i>stain</i> | 0,075% <i>Serva Blue</i> in Methanol |
| SDS – Probenpuffer (pH 6,8) | 8 M Urea 2 M Thiourea, 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) <i>Serva Blue</i> 10% (v/v) Glycerol, 0,05M Tris/ HCl |
| <i>Stripping</i> Puffer | 6 M Guanidinhydrochlorid |

| | |
|------------------------------------|--|
| | 20 mM Tris, 0,2% Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol |
| Titinprobenpuffer | 8 M Urea 2 M Thiourea, 3% SDS 0,035% Serva Blue 10% Glycerol 50 mM Tris |
| Verdaupuffer (pH 7,35-7,45) | 137 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,7 mM <i>Potassium chloride</i> 406 μ M Natriumdihydrogenphosphat 12 mM Natriumhydrogenphosphat 190 U/mL Kollagenase Typ II 1512USP-U/mL Trypsin, Phenolrot |

3.1.3 Chemikalien und Enzyme

Die in Tabelle 3 aufgeführten Chemikalien und Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 3: Chemikalien und Enzyme

| Chemikalie/ Enzym | Hersteller |
|---|--------------------|
| Acrylamid/ Bisacrylamid | Roth |
| Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1 | Biorad |
| Agarose LE | Biozym |
| Aminocaprinsäure | Sigma |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Appli Chem |
| <i>Bovine Serum Albumine (BSA)</i> | Capricorn |
| Chloroquine | Sigma |
| Dithiothreitol (DTT) | Appli Chem |
| ECL (<i>Western blotting detection reagent</i>) | Cyanagen |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol absolut | VWR |
| Ethanol vergällt | VWR |
| Glucose | Merck |
| Glycerol | Sigma |
| Glycin | Roth |
| Guanidinhydrochlorid | Appli Chem |
| <i>Imperial protein stain</i> | Thermo Scientific |
| Insulin, humanes rekombinantes | SAFC Biosciences |
| Isofluran | Piramal Healthcare |
| Isopropanol | Merck |
| Kaliumchlorid | Sigma |
| Kollagenase Typ 2 | Biochrom |
| Metforminhydrochlorid | Sigma |
| Methanol | Sigma |
| Mitomycin C | Sigma |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck |

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

3.1.4 Laborgeräte

In Tabelle 4 sind die Laborgeräte aufgelistet, die für die Durchführung dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4: Laborgeräte

| Gerät | Typ | Hersteller |
|-------------------------|--------------------|-------------------|
| Bildschirm | V243 | HP |
| Blottingapparatur | Trans Blot | Biorad |
| Brutschrank | Heracell VIOS 250i | Thermo Scientific |
| Chemiluminescent Imager | Fusion FX | Vilber Lourmat |
| Elektrophorese-Kammer | Mini-Twin | Biometra |
| Feinwaage | AE163 | Mettler |
| Gefrierschrank | Typ 311104 | Liebherr |
| Heizblock/ Thermomixer | Compact 5350 | eppendorf |
| Kombischüttler | SM-30 | Bühler |
| Kühlschrank | KT1730 | Liebherr |

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Magnetrührer | Professional Serie, | VWR |
| Magnetrührer | RCT basic | IKA |
| Mikroskop | AE 2000 | Motic |
| Mikrowelle | Micromat 135 | AEG |
| Mikrozentrifuge | Mini Star Silverline | VWR |
| Netzteil | Power Pack P25 | Biometra |
| PC | Elite Desk 800 G2 TWR | HP |
| pH-Meter | MP 220 | Mettler Toledo |
| Reagentschüttler (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 |
| Zentrifuge | Rotofix 32 A | Hettich Zentrifugen |

3.1.5 Antikörper

Für die *Western Blot* Analysen wurden die in Tabelle 5 genannten Antikörper verwendet.

Tabelle 5: Antikörper

| Prim. Antikörper | Verdünnung | Quelle | Hersteller | Bestellnummer |
|---------------------------------|------------|-----------|----------------|---------------|
| Akt (pan) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling | #4691 |
| AMPK α (pan) | 1:1000 | Kaninchen | Cell Signaling | #2532 |
| K63-abhängiges Polyubiquitin | 1:1000 | Kaninchen | Cell Signaling | #5621 |
| LC3B | 1:1000 | Kaninchen | Cell Signaling | #2775 |
| mTor (pan) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling | #2972 |
| PEVK | 1:50000 | Kaninchen | Eurogentec | #5621 |
| Phospho-Akt (Ser473) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling | #4060 |

| | | | | |
|---|-------------------|---------------|-------------------|----------------------|
| Phospho-AMPK α (Thr172) | 1:1000 | Kaninchen | Cell Signaling | #2531 |
| Phospho-mTor (Ser2448) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling | #2971 |
| PSMA2 (D3A4) | 1:2000 | Kaninchen | Cell Signaling | #11864 |
| SQSTM1/p62 | 1:1000 | Kaninchen | Cell Signaling | #5114 |
| Sek. Antikörper | Verdünnung | Quelle | Hersteller | Bestellnummer |
| Anti-mouse IgG, horseradish- peroxidase- linked | 1:10000 | Pferd | Cell Signaling | #7076 |
| Anti-rabbit IgG, horseradish- peroxidase- linked | 1:10000 | Ziege | Cell Signaling | #7074 |

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten

Zur Gewinnung der embryonalen Rattenkardiomyozyten für die Zellkultur wurden tragende Wistar-Ratten am 18. Gestationstag eingesetzt. Sie wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend mittels Genickbruch getötet. Über einen Bauchschnitt folgte die Entnahme der Embryonen. Nach der Eröffnung der Thoraces mit einem Scherenschnitt wurden die embryonalen Herzen mit einer Pinzette entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale zunächst auf Eis gelagert. Die Tötung der Tiere sowie die Präparation und Organentnahme wurde von fachkundigen Mitarbeitern nach den Vorgaben der örtlichen Behörden durchgeführt. Das Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben, das gemäß Versuchstiermeldeverordnung vergeben wurde, lautet O 29/11. Eine

Tierversuchsgenehmigung für die Entnahme embryonaler Gewebe wurde unter dem Az. 84-02.04.2017.A145 von der zuständigen Landesbehörde erteilt.

3.2.1.2 Zellkultivierung

Die Kardiomyozyten wurden an einer Sicherheitsbank der Klasse 2 aufbereitet. Vorweg wurden ein Verdaupuffer, Gelatine und 20% Medium in einem auf 37°C erhitzten Wasserbad bereitgestellt.

Um die Zellen aus ihrem Verband zu lösen, wurde zunächst die PBS Lösung mit einer Pipette abgesaugt und die Herzen mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Danach folgte ein Verdauvorgang zur enzymatischen Dissoziation durch einen Trypsin und Kollagenase enthaltenden Verdaupuffer. Der erwärmte Verdaupuffer wurde in ein Mikroreaktionsgefäß gefüllt und die zerkleinerten Kardiomyozyten hinzugegeben. Das Mikroreaktionsgefäß wurde in einem Inkubator für insgesamt eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 30 min erfolgte eine behutsame Resuspension der Zellen im Verdaupuffer mit einer Pipette.

Während der Lagerung der präparierten Zellen im Inkubator wurden 6-Well Platten mit im Wasserbad erhitzter Gelatine vorbereitet. Es erfolgte die Gabe von 1 ml Gelatine in jedes Well. Nach 15 min wurde die überstehende Gelatine mit einer Pipette abgesaugt und die Platten für den Trockenvorgang 10 min offen stehen gelassen.

Im Anschluss an den Verdauvorgang wurde das Zellgemisch mit 10 ml Kulturmedium (20% FBS) durch ein 70 µm Sieb filtriert. Dieser Schritt diente der Extraktion von nicht-verdauten Gewebestücken. Danach folgte die Zentrifugation bei 1000 RPM über 5 Minuten. Anschließend konnte der Überstand von den sich als Pellet abgesetzten Kardiomyozyten entfernt und die zurückgebliebenen Zellen resuspendiert werden. Nachfolgend wurde entsprechend der Größe des Pellets 20% FBS-haltiges Kulturmedium hinzugegeben auf eine Konzentration von etwa 10⁵ Zellen/ml. Auf die vorbereiteten und mit Gelatine beschichteten 6-Well Platten wurde nun 1ml der Zelllösung pro Well aufgetragen und für zunächst 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im

Inkubator kultiviert. In dieser Zeit konnte sich ein Großteil der embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) am Grund absetzen.

Nach Ablauf von den 24 Stunden erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Mitomycin C, um eine mitotische Inaktivierung der embryonalen Fibroblasten zu gewährleisten. Das Verfahren erfolgte mit 10 µl Mitomycin C pro ml 20% FBS-haltigem Kulturmedium und dauerte 30-45 Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmter PBS ausgewaschen und das 20%ige Medium durch Aktivkohle-gefiltertes und somit hormonreduziertes Kulturmedium mit 1% FBS-Anteil ersetzt.

Im Anschluss folgte die Stimulation der auf den verschiedenen Wells befindlichen Zellen. Die verschiedenen Ansätze sind dem folgenden Kapitel zu entnehmen. Sowohl die unten beschriebenen Stimulationsmedien sowie das Kulturmedium (1% FBS) wurden täglich gewechselt.

Zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten wurden die embryonalen Kardiomyozyten in SDS-Probenpuffer geerntet. Zunächst wurde das noch vorhandene Medium auf den einzelnen Wells mit einer Pipette entfernt und mit einer PBS Lösung gespült. Danach erfolgte die Gabe von 50-150 µl Titinprobenpuffer pro Well je nach gesichteter Zellmenge. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Platte gelöst und die Lösung in bereitgestellte und beschriftete Mikroreaktionsgefäße pipettiert.

3.2.1.3 Zellstimulation

Für die Fragestellung dieser Arbeit wurden insgesamt vier Versuchsansätze gewählt. Bei allen wurde die Hälfte der Zellen als Kontrollzellen in 1%igem FBS Medium kultiviert. Bei der anderen Hälfte wurden je nach Ansatz dem Nährmedium Stoffe hinzugefügt oder entzogen. Eine Zeitachse über die verschiedenen Ansätze ist in Abbildung 7 dargestellt. Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Stimulationszellen wurden die Kulturmedien täglich erneuert. An Tag 2, 4, 7 und 9 nach Präparation wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet.

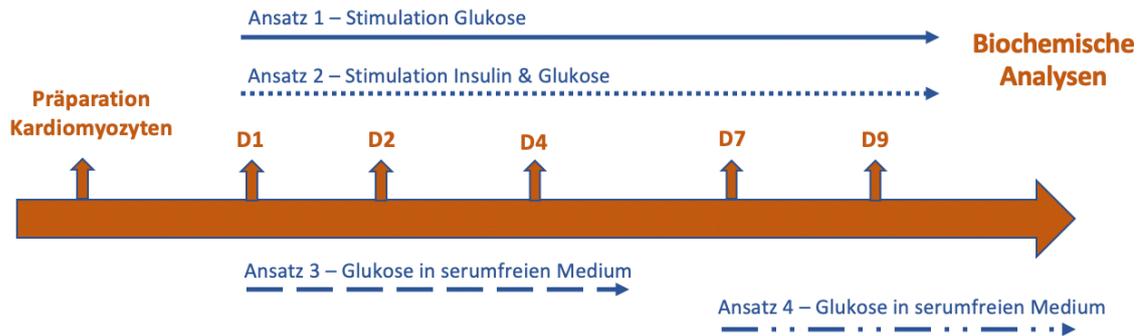


Abbildung 7: Zeitachse zur Darstellung des Versuchsaufbaus. In Ansatz 1 wurde die Glukosestimulation an Tag 1 (D1) nach Präparation begonnen und an Tag 2 (D2), Tag 4 (D4), Tag 7 (D7) und Tag 9 (D9) geerntet. In Ansatz 2 wurde ab Tag 1 (D1) nach Präparation mit Glukose und Insulin gleichzeitig stimuliert und an 3 Zeitpunkten geerntet (D4, D7, D9). Bei Ansatz 3 wurde auch ab Tag 1 (D1) mit Glukose stimuliert, sowohl die Kontroll- als auch die Stimulationszellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert und nach 48 und 72 Stunden geerntet. In Ansatz 4 startete die Stimulation nach einer Woche in Kultur (D7) mit Glukose in serumfreiem Medium, die Zellen wurden nach 72 Stunden geerntet. Anschließend wurden die geernteten Proben für biochemische Analysen verwendet.

Im ersten Ansatz wurden die Zellen mit einer Glukoselösung bestehend aus Kulturmedium (1 % FBS) und einer Glukosekonzentration von 30 mmol stimuliert. Innerhalb jedes Zyklus nach einer Präparation wurde eine Hälfte der embryonalen Kardiomyozyten mit Glukose stimuliert und die andere Hälfte als Kontrollzellen in 1 % FBS Medium kultiviert.

Der zweite Ansatz beinhaltete zusätzlich zu der Glukoselösung Insulin (172 nmol/l). Das Insulin wurde ebenfalls jeden Tag erneut auf die Zellen gegeben.

Im dritten Ansatz wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. Die mit Glukose stimulierten Zellen erhielten auf Basis des serumfreien Mediums 30 mmol Glukose täglich neu.

Für den vierten Ansatz wurden die Zellen bis Tag 7 in 1 % FBS Medium kultiviert. Ab Tag 7 erhielten sowohl die Kontrollzellen als auch die mit 30 mmol Glukose stimulierten Zellen serumfreies FBS Medium.

3.2.2 Proteinnachweis

3.2.2.1 Gelelektrophorese

Zur Proteinanalyse wurden die in dem Zelllysate befindlichen Proteine mittels SDS PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamidgelelektrophorese) nach Molekülmasse aufgetrennt.

Es wurden drei Gele verschiedener Zusammensetzung verwendet: Polyakrylamidgele 7,5% und 12% und Agarosegele. Agarosegele eignen sich zur Auftrennung von Titin (Größe 3-4 MDa). Für die Herstellung wurden die in Tabelle 6 genannten Chemikalien vermengt und im Wasserbad auf 48°C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur wurden Ammoniumperoxidsulfat und in der Mikrowelle aufgekochte Agarose hinzugegeben. Das entstandene Gemisch wurde anschließend zügig auf- und abpipettiert und mindestens zwei Stunden zwischen zwei Glasplatten stehen gelassen zur Polymerisation. Mit 7,5% und 12%igen Polyakrylamidgelen wurden Proteine, die an der Autophagie beteiligt sind, aufgetrennt und untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Trenngel gemäß Tabelle 7 angefertigt und 45 Minuten die Polymerisation unter Abschluss von Sauerstoff durch Zugabe von Isopropanol abgewartet. Anschließend wurde das Trenngel mit einem nach Tabelle hergestelltem Sammelgel übergossen.

Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingele

| Lösung | Titingel 2,1 % |
|------------------------------------|-----------------------|
| 30% Akrylamidlösung | 1,40 ml |
| H ₂ O _{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 |

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

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

Die im Probenpuffer asservierten Zellen wurden zur Auffaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen für ca. 3 min auf 98°C erhitzt. Im Anschluss wurden je nach Viskosität 12-18 µl von der Probe auf den Gelen aufgetragen. Für die Gele wurde das Gelelektrophoresesystem Mini-Twin des Herstellers Biometra eingesetzt.

Die Stromstärke zur Proteinauftrennung in 1x - Laufpuffer betrug 20 mA pro Polyakrylamidgel und 2,5 mA pro Titingel beim Einlaufen der Proben. Hiernach wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Polyakrylamidgel bzw. 5 mA pro Titingel erhöht. Die Proteinauftrennung in den Polyakrylamidgelen war nach ca. 40 min beendet, in den Titingelen nach etwa 5 Stunden.

Im Anschluss wurden die Gele mittels Proteinfärbung oder *Western Blot* weiterbehandelt.

3.2.2.2 Imperial Protein Stain

Eine Färbung der Gele erfolgte, um die einzelnen Titinbanden darzustellen und so die Isoformenkomposition zu analysieren. Hierzu wurde das Gel in *Imperial Protein Stain*, einer Coomassie-basierten Proteinfärbelösung, gegeben und für 1 Stunde auf einen Schüttler gestellt bei 70 Mot 1/min. Hiernach wurde das Gel für eine weitere Stunde in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf dem Schüttler entfärbt. Das Wasser wurde in dieser Zeit vier Mal gewechselt. Anschließend

wurden die Gele mit einem Durchlichtprogramm des Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) digitalisiert und die Pixeldichte der Banden mit der Software Image J quantitativ gemessen. In der Auswertung erfolgte eine Addition beider Isoformen in jeder Probe und die einzelne Isoform (N2BA und N2B) wurde als prozentualer Anteil des Gesamttitins angegeben. In Abbildung 8 wird exemplarisch ein Titingel gezeigt mit den beiden Titin-Isoformen N2BA und N2B und dem entsprechenden Molekulargewicht.

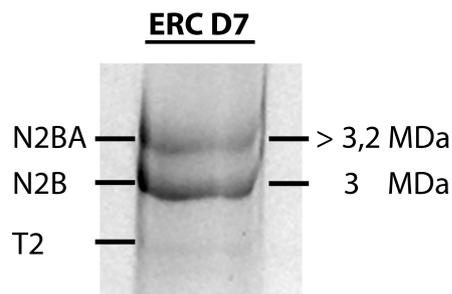


Abbildung 8: Exemplarisches Titingel aus embryonalen Rattenkardiomyozyten an Tag 7 in Kultur. Das Titingel wurde mit *Imperial Protein Stain* gefärbt. Zu sehen sind die nach Molekulargewicht aufgetrennten Titinisoformen in ERC nach 7 Tagen Kultivierung. Die größere und elastischere Isoform N2BA hat ein Molekulargewicht von 3,2-3,7 MDa. Das Molekulargewicht der kleineren und steiferen Isoform N2B beträgt etwa 3 MDa. T2 markiert ein proteolytisches Titinfragment.

3.2.2.3 Western Blot

Zur weiteren Proteinanalyse wurden mittels *Semi-Dry Western Blotting* die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. An die Proteine auf der Membran konnten spezifische Antikörper binden und deren Bindung durch ein Chemolumineszenz-Signal in einem Imager sichtbar gemacht werden.

Vier Stücke von *Whatman*-Blottingpapier wurden jeweils in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt. Die in Anodenpuffer getränkten Papiere wurden auf der Anodenplatte des Turbo Transfer Blottingsystems platziert und darauf die in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Auf die Membran wurde dann ein Polyakrylamidgel geschichtet und anschließend mit den in Kathodenpuffer getränkten *Whatman*-Papieren abgedeckt. Der Transfer erfolgte über ein

senkrecht aufgebautes elektrisches Feld bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² des Gels für 12 Minuten (SDS-Gele) bzw. 20 min (Titingele).

Zur Überprüfung der Proteinbeladung der Membran wurde diese 30 Sekunden lang in *Serva-Blue* Lösung gefärbt und im Anschluss in *Destain* Lösung wieder entfärbt. Danach erfolgte die vollständige Entfärbung der Blotting-Membranen in 1xTBST-Lösung und anschließende Blockierung mittels 2%iger Rinderserumalbuminlösung (BSA) in 1xTBST über 1 Stunde.

Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht. Diese wurden wie in Tabelle 5 angegeben in 2%iger BSA-Lösung verdünnt. Danach wurden die Blots mindestens 3 Mal 5 Minuten lang in 1xTBST-Lösung gewaschen und über 2 Stunden mit dem entsprechenden Meeretich-Peroxidase-(HRP) gekoppelten, sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Waschvorgang in 1xTBST-Lösung. Eine Tabelle über die verschiedenen Antikörper findet sich auf Seite 23.

Um die mit Antikörpern beladenen Banden zu visualisieren, wurde eine 1:1 verstärkte Chemolumineszenz (ECL)-Reagenzien-Lösung angesetzt und die *Western Blots* damit vollständig bedeckt. Mit dem Fusion FX7 Chemolumineszenz-Imager (Vilbert & Lourmat) wurden die dadurch erzeugten Chemolumineszenz-Signale dokumentiert.

Der Phosphorylierungsstatus von Proteinen wurde mit Phospho- und pan-Antikörpern bestimmt. Beide Antikörper wurden auf demselben *Western Blot* nacheinander analysiert. Der phosphorylierte Anteil des Proteins wurde zunächst von dem Phospho-Antikörper gebunden und das Chemolumineszenz-Signal erfasst. Nachfolgend wurde der Phospho-Antikörper durch mit β -Mercaptoethanol versetztem *Stripping* Puffer vom *Western Blot* getrennt. Derselbe Blot wurde hiernach erneut blockiert und diesmal mit dem pan-Antikörper inkubiert und digitalisiert. So konnte das Verhältnis von phosphoryliertem und dem gesamten Protein analysiert werden.

3.2.3 Analyse der Proteinbanden

Die Auswertung der Chemolumineszenz-Signale erfolgte mithilfe der ImageJ (*National Institutes of Health*) - Software. Hierzu wurden die mit *Imperial protein stain* gefärbten Proteinbanden und *Western Blots* densitometrisch in der oben genannten Software analysiert. Mit den gezeigten Diagrammbalken werden die erhobenen Mittelwerte und jeweiligen Standardfehler (SEM) dargestellt. Jeder Punkt stellt ein Ergebnis dar. Um eine statistische Relevanz zu gewährleisten, stammen die erhobenen Werte aus mindestens drei verschiedenen Zell-Präparationen. Für die statistische Analyse wurde der *Student's t-test* beziehungsweise *One Way ANOVA Test* in dem Programm Sigma Plot verwendet. Bei P-Werten $<0,05$ wurde die statistische Signifikanz angenommen und die Nullhypothese abgelehnt. Statistisch signifikante Werte wurden in den Graphen mit einem Sternchen * gekennzeichnet.

3.2.4 Software

Folgende Programme wurden für diese Arbeit verwendet:

Adobe Photoshop, Adobe InDesign, ImageJ, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Microsoft Word und SigmaPlot 10.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Effekte von Hyperglykämie auf Titin

4.1.1 Glukose- oder Insulinstimulation beeinflussen nicht die Titin-Isoformen-Komposition in kultivierten ERC

Es wurden zwei Versuchsansätze gewählt, um einen potentiellen Effekt von Glukose auf die Zusammensetzung der beiden Titinisoformen in den embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) zu untersuchen. Im ersten Versuchsansatz wurden ERC in einem hyperglykämischen Kultivierungsmedium mit 30 mM Glukose kultiviert. Innerhalb des zweiten Ansatzes wurden die Zellen zusätzlich zu 30 mM Glukose auch mit Insulin (172 nM/l) stimuliert. In beiden Versuchsansätzen wurde nach 4, 7 und 9 Kultivierungstagen das Verhältnis der N2B und N2BA Titinisoformen per Coomassie-gefärbten 2,1% SDS-PAGE Gelen bestimmt und die Bandenintensität densitometrisch ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 9 (A und B) zu sehen. Die jeweiligen Anteile der Titinisoformen N2BA und N2B sind als prozentualer Anteil des Gesamttitins angegeben.

Zunächst wurde die Zusammensetzung der Isoformen von den in Glukose kultivierten ERC und den Kontrollzellen verglichen. In den stimulierten Zellen wurde nach 4 Tagen in Kultur ein N2B-Anteil von $43,77 \pm 4,51$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $48,45 \pm 4,65$ % N2B-Anteil festgestellt. Auch nach 9 Kultivierungstagen in hyperglykämischen Medium wurden mit Werten von $66,06 \pm 1,65$ % N2B in den Glukose-stimulierten Zellen gegenüber $62,65 \pm 1,65$ % N2B in den unbehandelten Zellen keine signifikanten Veränderungen detektiert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Zusammensetzung der Titinisoformen in embryonalen Rattenkardiomyozyten unter hohen Glukosekonzentrationen nicht verändert wird.

Zusätzlich wurde die Titinisoformenzusammensetzung nach gleichzeitiger Gabe von Glukose und Insulin analysiert. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit denen der unbehandelten Kontrollzellen und mit den Ergebnissen nach alleiniger Insulinstimulation. Mit $59,61 \pm 3,54$ % unterschied sich der Titin N2B-Anteil

nach 9 Kulturtagen mit Glukose- und Insulingabe weder von den Kontrollzellen mit $56,6 \pm 2,82$ % noch von den mit Insulin stimulierten Zellen mit $60,09 \pm 4,35$ %. Hier lässt sich feststellen, dass Glukose auch bei gleichzeitiger Gabe von Insulin keinen Effekt auf die Titinisoformenzusammensetzung hat.

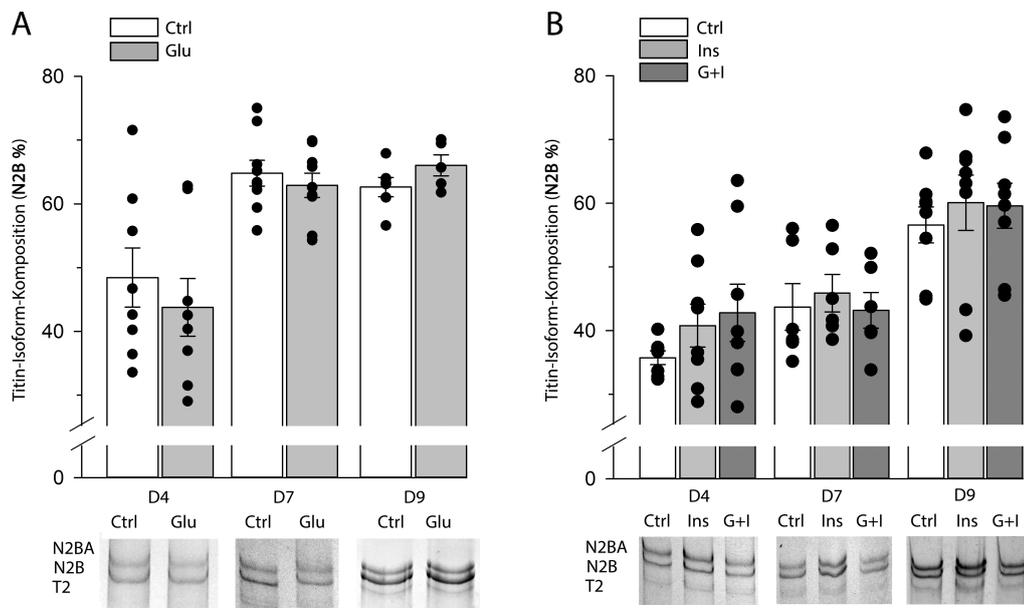


Abbildung 9: Bestimmung des Titinisoformenverhältnisses unter Glukosestimulation (A) und Anwesenheit von Insulin (B), Zusammenfassung der densitometrischen Auswertung der Coomassie-gefärbten 2,1% SDS-PAGE Gelen von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und (A) unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) sowie (B) Anwesenheit von Insulin (Ins, 172nM/l) und gleichzeitiger Glukose- und Insulinstimulation (G+I, 30mM, 172nM/l) nach 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen in Kultur. Die Säulendiagramme zeigen den relativen Anteil der N2B-Isoform am Gesamttitin (Mittelwert \pm Standardfehler); (n=5-8). Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative Titingele mit Isoform-Auftrennung (N2BA und N2B) sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. T2 zeigt ein proteolytisches Titinfragment. Statistische Signifikanzen wurden zwischen Kontroll- und Stimulationszellen für jeweils jeden Kultivierungszeitpunkt durch den *Student's t-test* und *One Way ANOVA-Test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

4.1.2 Glukose- oder Insulinstimulation beeinflussen nicht die K63-Polyubiquitinierung an Titin

Die K63-Polyubiquitinierung markiert Proteine für den Abbau über das Autophagie-System (Tan *et al.*, 2008). Mittels *Western Blot*-Verfahren wurde die K63-Ubiquitinierung von Titin unter hyperglykämischer Kultivierung mit 30 mM Glukoselösung und unter gleichzeitiger Insulinstimulation in zwei Ansätzen nach drei verschiedenen Kultivierungszeiträumen von 4, 7 und 9 Tagen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 10 (A und B) dargestellt. Das

an K63-ubiquitinierte Titin wird in Relation zum Gesamttitin angegeben. PEVK dient als Muskelmarkerprotein. Der Antikörper wird für die Messung des Gesamttitins verwendet.

Die relative K63-Ubiquitinierung des Titinfilaments lag in Glukose kultivierten ERC bei $0,82 \pm 0,05$ a.u. an Tag 4, bei $1,19 \pm 0,14$ a.u. an Tag 7 und bei $0,97 \pm 0,13$ a.u. an Tag 9 und unterschied sich an keinem der Zeitpunkte signifikant von den Kontrollzellen (Abbildung 10 A). Bei den in Glukose und Insulin kultivierten ERC zeigte sich ebenfalls nach keinem der beiden Kultivierungszeiträume ein signifikanter Unterschied zu den Kontroll- oder ausschließlich mit Insulin stimulierten Zellen (Abbildung 10 B). Es ließ sich jedoch die Tendenz erkennen, dass die gleichzeitig in Glukose und Insulin kultivierten Zellen eine vermehrte K63-Polyubiquitinierung aufwiesen. Allerdings konnte diese Beobachtung nicht mit einer statistischen Signifikanz belegt werden.

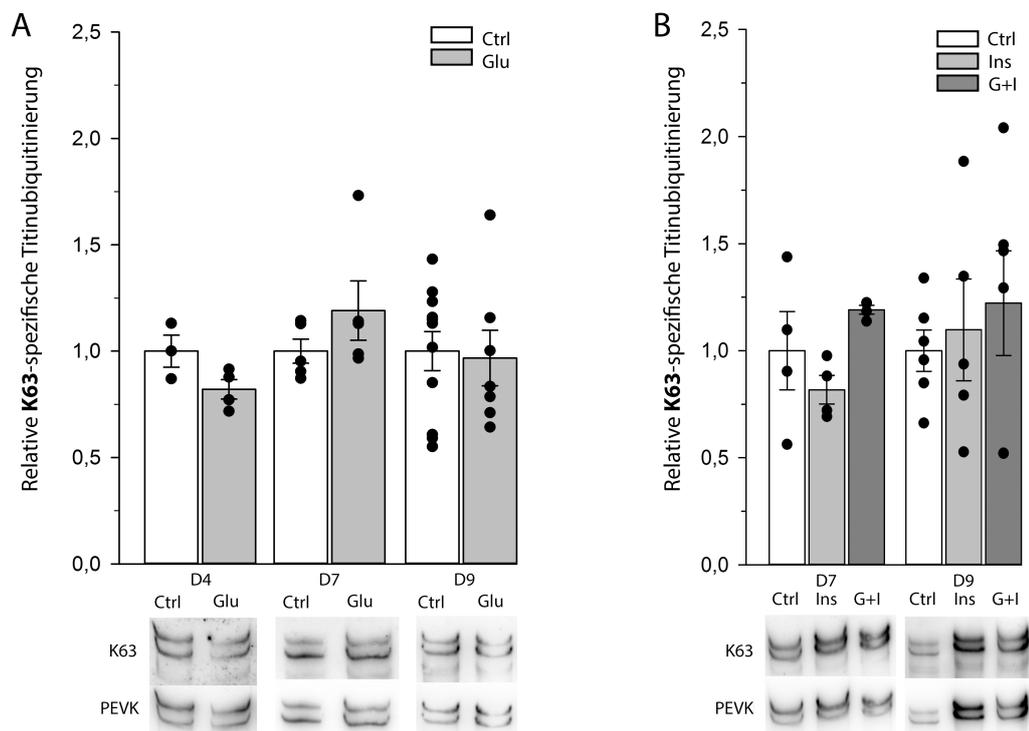


Abbildung 10: Analyse der K63-Ubiquitinierung von Titin unter Glukosestimulation (A) und Anwesenheit von Insulin (B), nach deren Nachweis im Western Blot. Zusammenfassung der Ergebnisse der K63-Ubiquitinierung von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und (A) unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) sowie (B) reiner Insulinstimulation (Ins, 175nM/l) und gleichzeitiger Glukose- und Insulinstimulation (G+I, 30mM, 172nM/l) nach 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen in Kultur. Das Säulendiagramm zeigt die relative K63-Ubiquitinierung mit einem K63-Polyubiquitin-Antikörper (K64-Ub) am Gesamttitin (PEVK) (Mittelwert ± Standardfehler);

(n=3-9). Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden zwischen Kontroll- und Stimulationszellen für jeweils jeden Kultivierungszeitpunkt durch den *Student's t-test* und *One Way ANOVA*-Test ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

4.2 Untersuchung der Effekte von Hyperglykämie auf die intrazellulären Degradationsmechanismen

Zur Ermittlung von Effekten von Hyperglykämie auf die intrazellulären Degradationsmechanismen und einer daraus resultierenden potentiellen Beteiligung am Titinabbau, wurde die autolysosomale und proteasomale Aktivität in den kultivierten Rattenkardiomyozyten untersucht. Mittels *Western Blot* Analyse wurden die Proteinlevel bekannter Autophagiemarker sowie der in die Signalwege eingeschalteten Kinasen bestimmt. Dazu gehören mTOR, AMPK α , LC3-II, p62 und Beclin-2. Darüber hinaus wurde der proteasomale Marker PSMA2 (*proteasomal subunit alpha type-2*) betrachtet.

mTOR und AMPK α beeinflussen je nach Nährstoffangebot in der Zelle die ULK1/2 Enzymaktivität wechselseitig. mTOR hemmt den Autophagieprozess, wohingegen die AMP-Kinase (AMPK α) ihn induzieren kann. Anhand des Phosphorylierungslevels kann auf die Aktivität der Kinase geschlossen werden. Eine Phosphorylierung der AMPK α bedeutet nach aktuellem Verständnis eine Aktivierung und somit Induktion der Autophagie, wohingegen einer Phosphorylierung von mTOR eine Inhibition der Autophagie folgt (Akers *et al.*, 2012). LC3-II ist die lipidierte Form von LC3 und wird häufig zur Quantifizierung der Autophagieaktivität verwendet (Mizushima und Yoshimori, 2007). p62 ist ein weiterer bekannter Marker, um Veränderungen im Autophagieprozess zu messen. Beide fungieren als Adapterproteine in den Autophagosomen (Tanida, Ueno und Kominami, 2008; Bjørkøy *et al.*, 2009). Beclin ist ein Bestandteil des PI3K-Komplexes und beteiligt sich somit an der Produktion von der Autophagosomenmembran (Shibutani und Yoshimori, 2014). Je nachdem, an welcher Stelle der Autophagieprozess unterbrochen wird, kommt es zu einer Zu- oder Abnahme dieser Marker. PSMA2 gehört zum 20S-Proteasom (Coux, Tanaka und Goldberg, 1996). Deswegen kann anhand der Höhe des Proteinlevels von PSMA2 eine Aussage über die Menge an Proteasomen in den Zellen getroffen werden.

4.2.1 Kultivierung von ERC unter alleinigen hyperglykämischen Bedingungen

Die Ergebnisse über die Analyse zu Effekten auf das Protein-Qualitäts-Kontrollsystem unter einem hohen Glukoselevel von 30 mM sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt.

Die in hyperglykämischen Medium kultivierten ERC zeigten nach den Kultivierungszeiträumen von 2, 4, 7 und 9 Tagen keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen bezüglich der Kumulation der Autophagiemarker. Auch die Phosphorylierungslevel der beiden Kinasen AMPK α und mTOR waren nach den verschiedenen Kultivierungszeiträumen nicht signifikant erhöht.

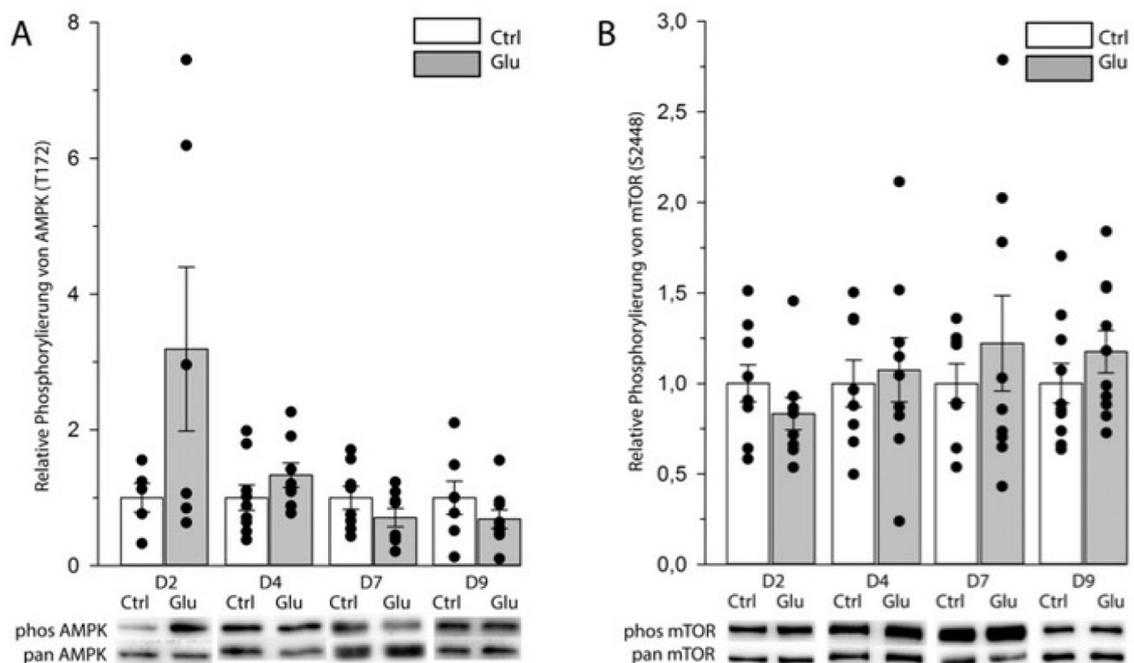


Abbildung 11: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagiemarker von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) nach 2 (D2), 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen. *Western Blot* Analyse (A) der relativen Phosphorylierung von AMPK α im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=5-9) (B) der relativen Phosphorylierung von mTOR im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=8-9). Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

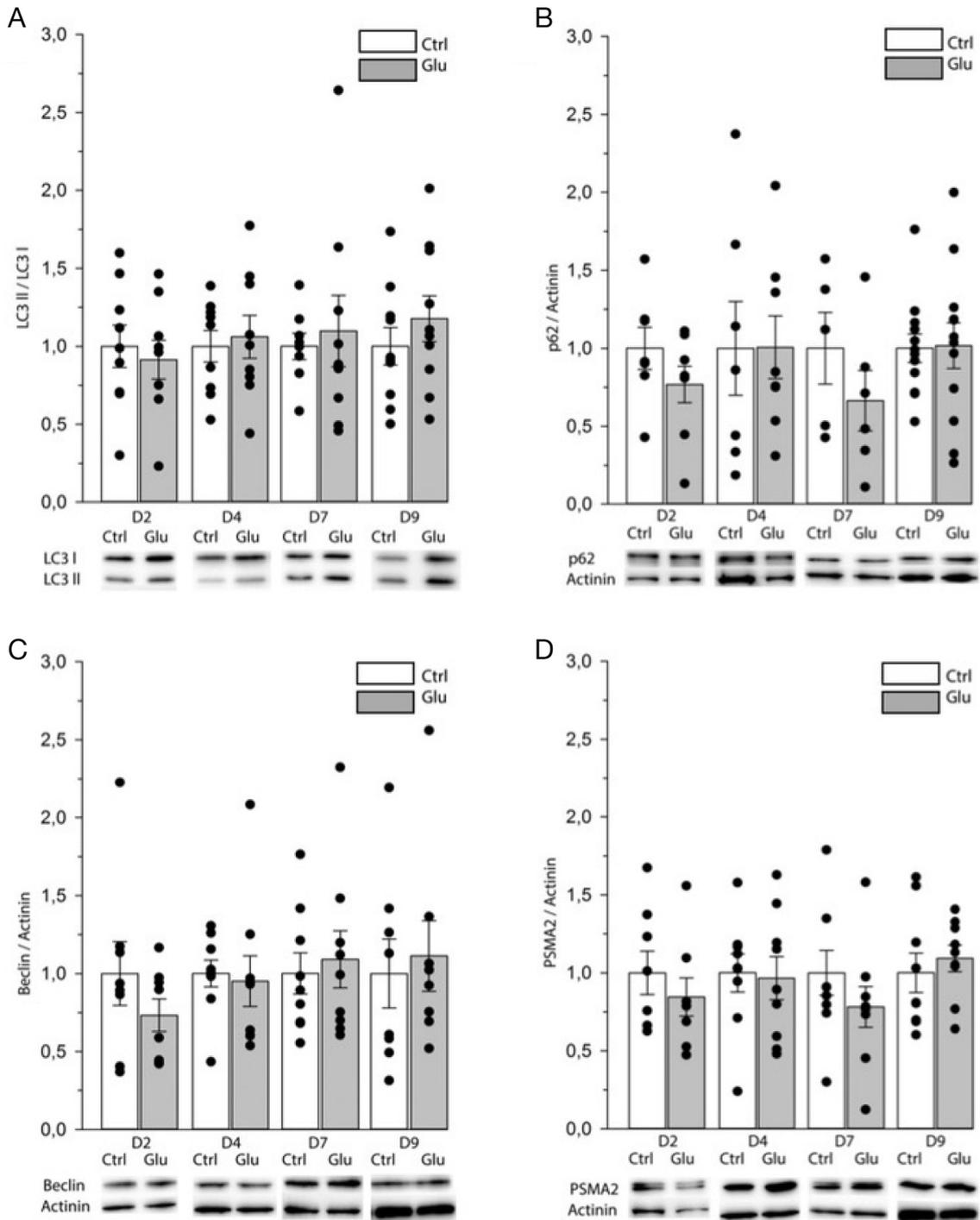


Abbildung 12: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagiemarker von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) nach 2 (D2), 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen. *Western Blot* Analyse **(A)** des relativen Anteils von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I ($n=8-10$) **(B)** dem relativen p62-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin ($n=5-11$) **(C)** dem relativen Beclin-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin ($n=7-9$) **(D)** dem relativen PSMA2-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin ($n=7-9$). Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

4.2.2 Kultivierung von ERC unter hyperglykämischen Bedingungen mit Insulinstimulation

Die Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen die Ergebnisse der Analyse des Protein-Qualitäts-Kontrollsystems unter hoher Glukosekonzentration von 30 mM bei gleichzeitiger Insulinstimulation.

Die AMP-Kinase, die eine zentrale Rolle in der Autophagie-Induktion spielt, zeigte zu den Kultivierungszeitpunkten Tag 4 und Tag 7 unter alleiniger Insulinstimulation eine signifikante Aktivitätssteigerung. Das relative Phosphorylisierungslevel der AMPK α der insulinstimulierten Zellen war um den Faktor $2,11 \pm 0,31$ (D4) beziehungsweise $2,78 \pm 0,61$ (D7) gesteigert. Diese Steigerung war durch die gleichzeitige Gabe von Glukose aufgehoben und mit einer relativen Phosphorylierung von $1,15 \pm 0,16$ (D4) beziehungsweise $1,32 \pm 0,34$ (D7) signifikant erniedrigt gegenüber den rein mit Insulin stimulierten Zellen. An Tag 9 war diese Wirkung aufgehoben und es bestanden keine Phosphorylierungsunterschiede von AMPK α innerhalb der verschiedenen Stimulationszellen.

Darüber hinaus wurde ein isolierter Effekt auf den LC3-II/ LC3-I-Quotienten festgestellt. An dem Kultivierungszeitpunkt Tag 2 zeigte sich ein signifikant reduzierter LC3-II-Anteil im Verhältnis zu LC3-I sowohl bei den rein mit Insulin stimulierten Zellen als auch bei den gleichzeitig mit Insulin und Glukose behandelten Zellen. Die reine Insulinstimulation rief eine Reduktion des LC3-II/ LC3-I-Verhältnisses auf das $0,55 \pm 0,05$ - fache und die Glukose- und Insulinstimulation auf das $0,63 \pm 0,08$ - fache hervor. Zu anderen Kultivierungszeitpunkten ließ sich diese Beobachtung nicht erneut feststellen.

Auch die ergänzenden, weiteren Autophagiemarker sowie PSMA2 als Marker für den proteasomalen Abbau zeigten nach keiner der zwei Stimulationsvarianten signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen.

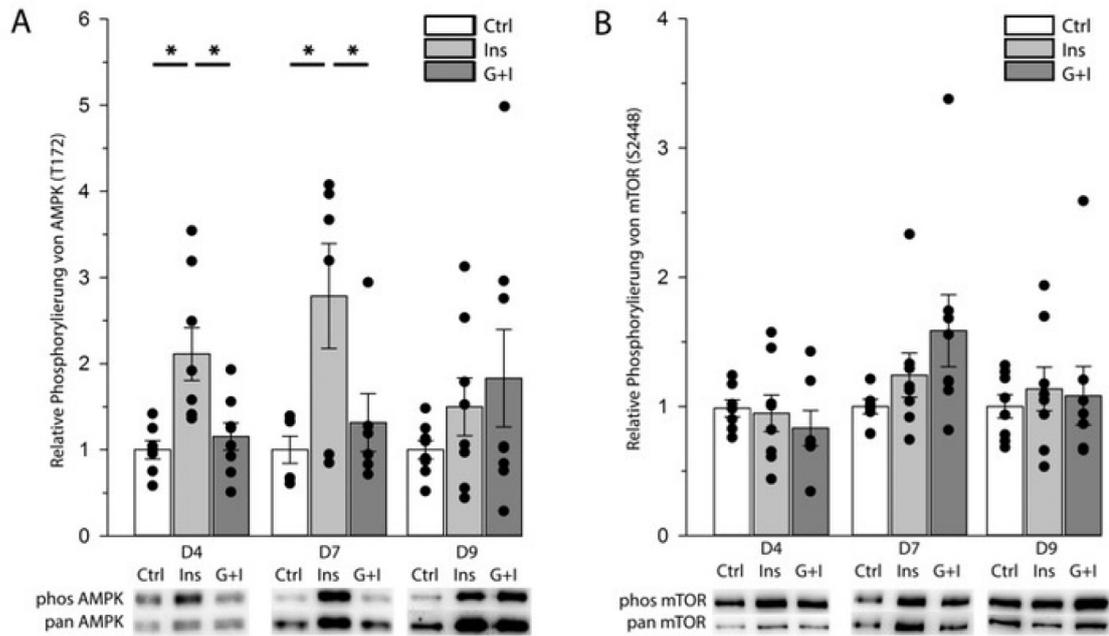


Abbildung 13: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung und Anwesenheit von Insulin von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagie-Marker von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl), unter Anwesenheit von Insulin (Ins, 175nM/l) und gleichzeitiger Glukose- und Insulinstimulation (G+I, 30mM, 172nM/l) nach 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen in Kultur. *Western Blot* Analyse **(A)** der relativen Phosphorylierung von AMPK α im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=4-8) **(B)** der relativen Phosphorylierung von mTOR im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=5-8) Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *One Way ANOVA*-Test ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und gegebenenfalls durch Asterisken gekennzeichnet.

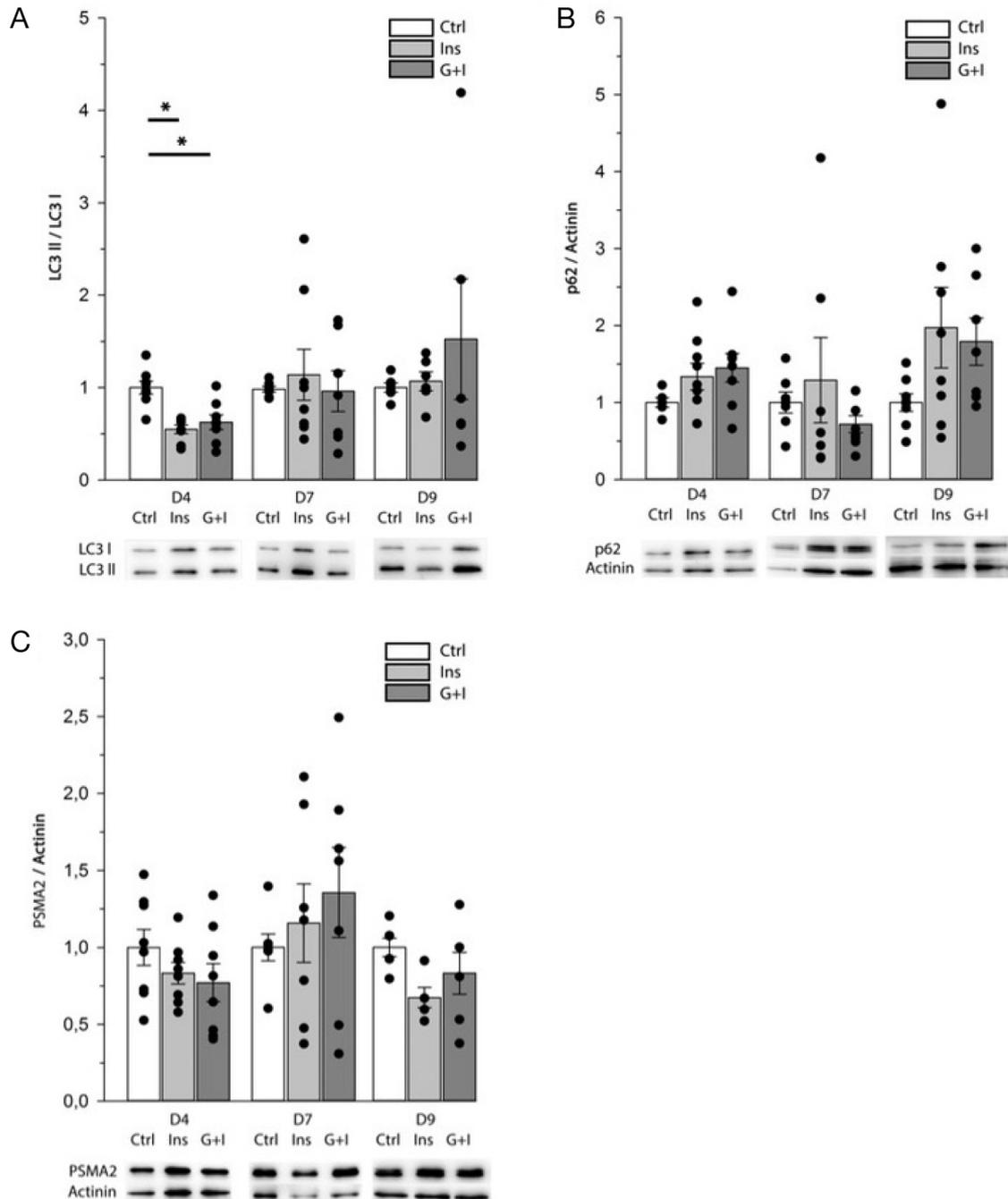


Abbildung 14: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung und Anwesenheit von Insulin von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagie-Marker von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl), unter Anwesenheit von Insulin (Ins, 175nM/l) und gleichzeitiger Glukose- und Insulinstimulation (G+I, 30mM, 172nM/l) nach 4 (D4), 7 (D7) und 9 (D9) Tagen in Kultur. *Western Blot* Analyse **(A)** des relativen Anteils von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I (n=5-8) **(B)** dem relativen p62-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=5-8) **(C)** dem relativen PSMA2-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=5-8). Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *One Way ANOVA*-Test ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und gegebenenfalls durch Asterisken gekennzeichnet.

4.2.3 Kultivierung von ERC unter hyperglykämischen Bedingungen in serumfreiem Medium

Die Ergebnisse über die Untersuchung der Proteinlevel bekannter Autophagiemarker bei Kultivierung von ERC in serumfreiem Medium und unter einer hohen Glukosekonzentration von 30 mM sind in Abbildung 15 (A-F) und Abbildung 16 (A-D) dargestellt. Abbildung 15 zeigt die Untersuchung bei Kultivierung in serumfreiem Medium ab dem Tag der Mitomycin-Behandlung, folglich 24 h nach Präparation. Sowohl die Kontroll- als auch die Stimulationszellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert. Für die Analyse, die in Abbildung 16 dargestellt ist, wurden die ERC vorerst über 6 Tage in 1% FBS Medium kultiviert, um einen höheren Reifestatus zu erlangen. Anschließend wurden erneut die Kontroll- und die Stimulationszellen in serumfreiem Medium kultiviert.

Die in hyperglykämischen, serumfreien Medium kultivierten ERC zeigten nach den Kultivierungszeiträumen von 24, 48 oder 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen bezüglich der Autophagie- oder proteasomalen Marker. Auch die relative Phosphorylierung der Kinasen AMPK α und mTOR wiesen keine statistisch signifikanten Abweichungen zu den unbehandelten Zellen auf.

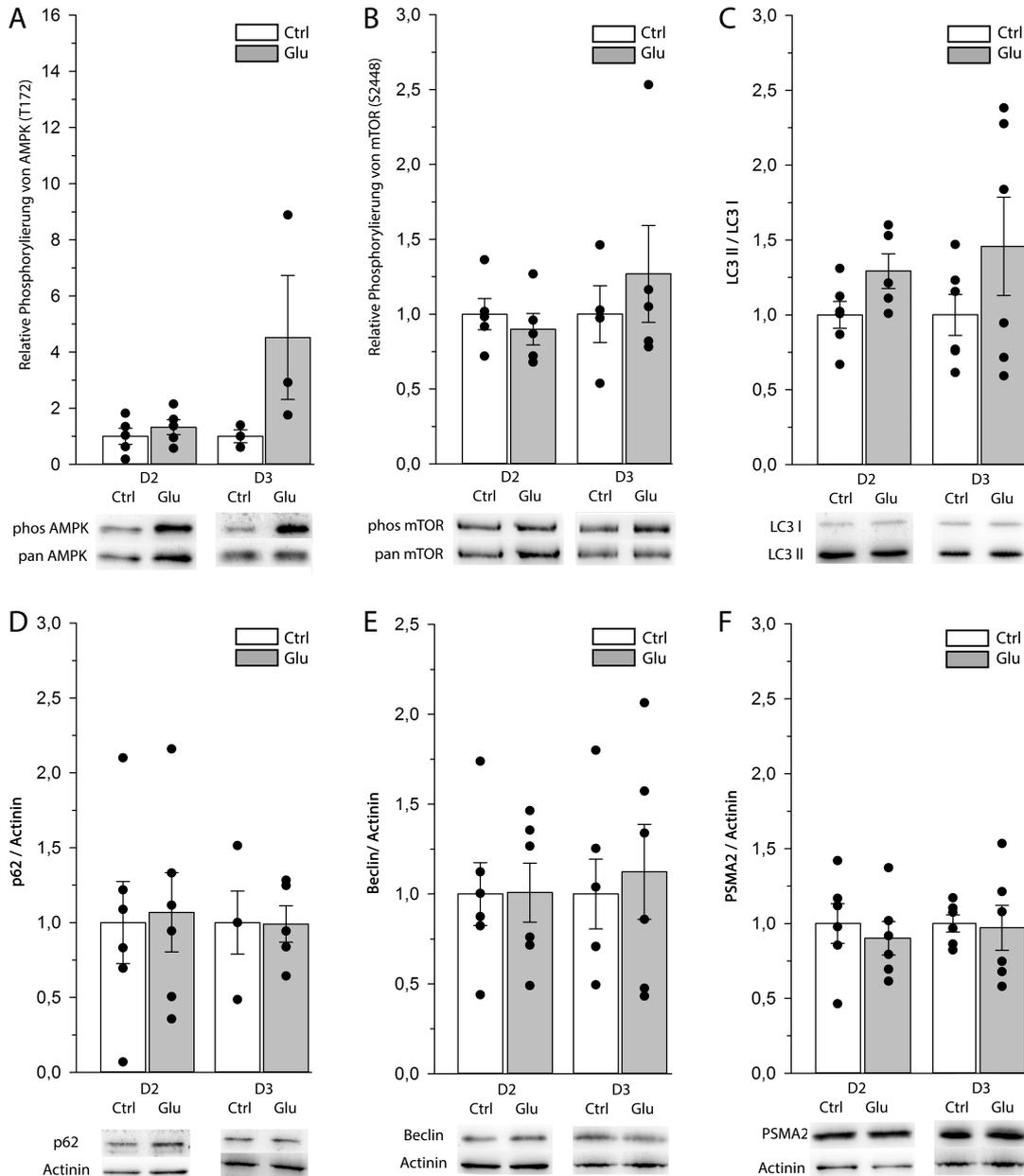


Abbildung 15: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung in serumfreiem Medium von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagie-Marker von ERC in serumfreiem Medium unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) nach 24 (D2), 48 (D3) und 72 (D4) Stunden. *Western Blot* Analyse (A) der relativen Phosphorylierung von AMPK α im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=3-5) (B) der relativen Phosphorylierung von mTOR im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=4-5) (C) des relativen Anteils von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I (n=3-6) (D) dem relativen p62-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=3-6) (E) dem relativen Beclin-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=5-6) (F) dem relativen PSMA2-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=6). Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

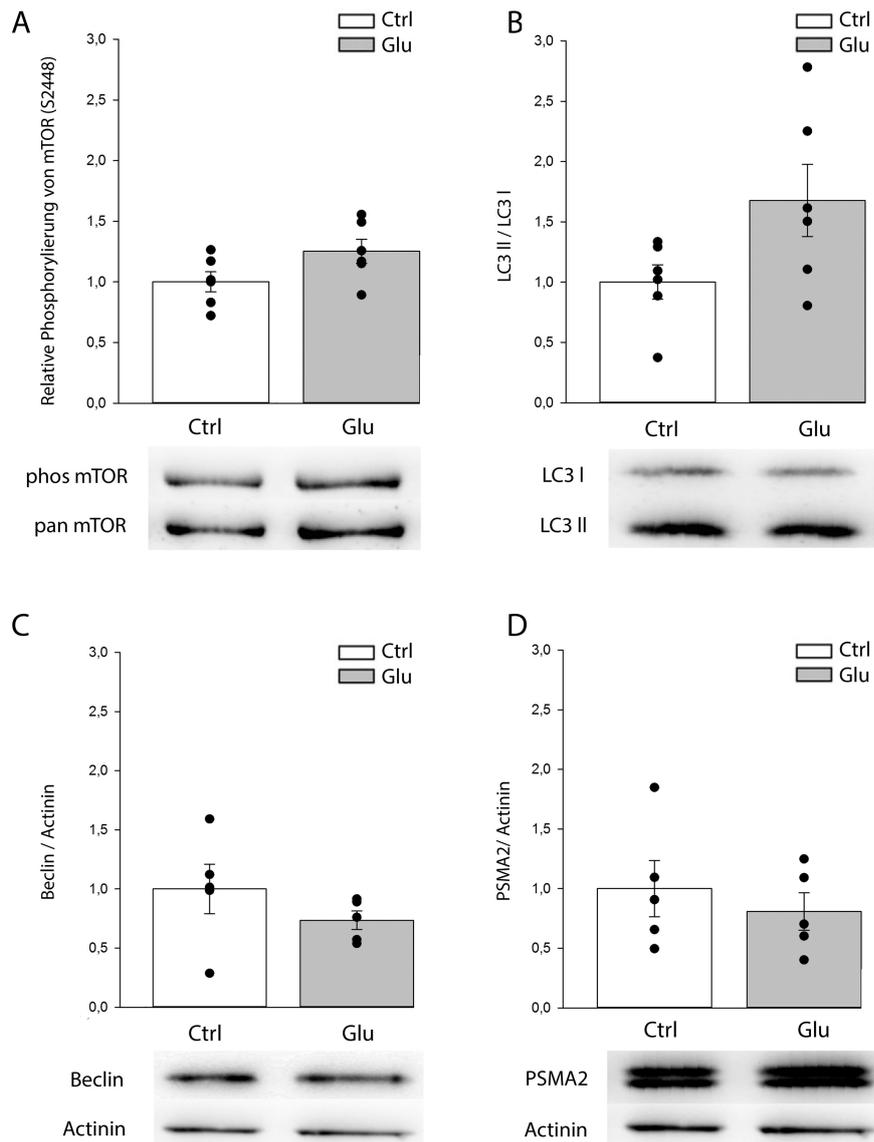


Abbildung 16: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung in serumfreiem Medium ab Tag 7 in Kultur von ERC. Zusammenfassung der Ergebnisse der Autophagie-Marker von ERC in serumfreiem Medium unter Kontrollbedingungen (Ctrl) und unter hyperglykämischer Kultivierung (Glu, 30 mM) nach 72 Stunden. *Western Blot* Analyse **(A)** der relativen Phosphorylierung von mTOR im Verhältnis zum pan-Antikörper (n=5-6) **(B)** des relativen Anteils von LC3-II im Verhältnis zu LC3-I (n=6) **(C)** dem relativen Beclin-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=5) **(D)** dem relativen PSMA2-Proteinlevel im Verhältnis zur Beladungskontrolle Actinin (n=5). Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Jeder Punkt stellt ein n dar. Repräsentative *Western Blots* sind für jeden Kultivierungszeitpunkt abgebildet. Statistische Signifikanzen wurden durch den *Student's t-test* ermittelt, bei $p < 0,05$ angenommen und traten nicht auf.

4.3 Akt-Aktivierung durch Insulin-Stimulation in ERC

Es ist bekannt, dass der PI3K-Akt-Signalweg durch Insulin induziert wird. Akt, auch Proteinkinase B genannt, wird durch die PI3K an zwei Positionen (S473 und Thr308) phosphoryliert und damit aktiviert (Abeyrathna und Su, 2015).

Zur Bestätigung der insulinabhängigen AKT-Aktivierung wurden ERC für 7 Tage mit den beiden Stimulationsansätzen kultiviert und repräsentativ für die Aktivierung von AKT die Serin473-Phosphorylierung bestimmt (Abbildung 17). Wie erwartet zeigten sich eine deutlich erhöhte relative Phosphorylierung der AKT-Kinase unter Insulinstimulation in physiologischem Kultivierungsmedium sowie in Kultivierung mit hohen Glukosekonzentrationen (30 mM).

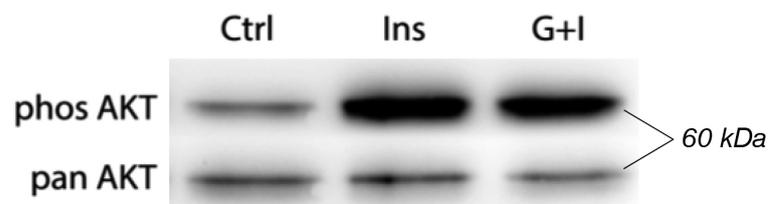


Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot einer AKT-Aktivierung durch Anwesenheit von Insulin. Darstellung der Phosphorylierung von AKT an Serin473 von ERC unter Kontrollbedingungen (Ctrl), unter Anwesenheit von Insulin (Ins, 172nM/l) und gleichzeitiger Glukose- und Insulinstimulation (G+I, 30mM, 172nM/l) nach 7 Tagen in Kultur.

4.4 Akkumulation von LC3-II und p62 nach Chloroquine-Stimulation in ERC

Chloroquine ist ein bekannter und handelsüblicher Inhibitor der Autophagie. Es inaktiviert die in den Lysosomen vorkommenden Hydrolasen und verhindert die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom (Shintani und Klionsky, 2004).

Nach Stimulation der ERC mit Chloroquine zeigte sich eine deutlich sichtbare Akkumulation von LC3-II und p62, sowohl in den Kontroll- als auch in den Stimulationszellen nach den Kultivierungszeiträumen von 4 und 9 Tagen (Abbildung 18).

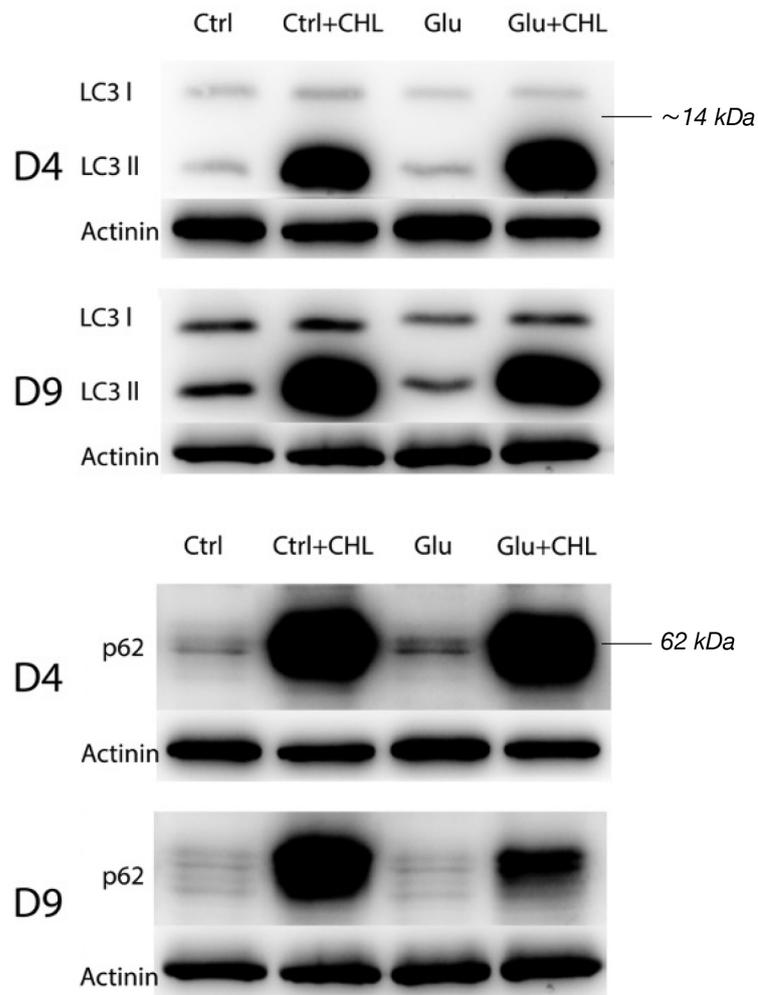


Abbildung 18: Repräsentative Western Blots einer Chloroquine-induzierten Inhibition der Autophagie in ERC. Zur Inhibition der Autophagie wurden 4 (D4) und 9 (D9) Tage nach Präparation ERC Kontrollzellen (Ctrl) und mit Glukose stimulierte Zellen (Glu, 30mM) mit Chloroquine (CHL, 5 μ M, 24h) kultiviert. Eine Western Blot Analyse wurde durchgeführt zur Bestimmung **(A)** des LC3-I- und LC3-II- Proteinlevels und **(B)** p62-Proteinlevels und der Beladungskontrolle Actinin unter Autophagie-Inhibition.

5 Diskussion

5.1 Relevanz und Einordnung in den medizinischen Kontext

Wie bereits in der Einleitung angeführt, ist der Diabetes mellitus eine global verbreitete Erkrankung und somit von einer hohen Relevanz, nicht nur medizinisch, sondern auch gesellschaftspolitisch. Der Typ-2-Diabetes, der im Erwachsenenalter deutlich überwiegt, gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit. In Deutschland wird bis zum Jahr 2040 eine zunehmende Inzidenz mit einer relativen Steigerung von bis zu 77% prognostiziert (Tönnies *et al.*, 2019). Trotz der mittlerweile vielfältigen Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten entwickeln viele der Erkrankten Langzeitschäden an verschiedenen Organsystemen. Über ein Drittel der Patienten mit Diabetes mellitus weist eine kardiovaskuläre Begleiterkrankungen auf (Koch-Institut, 2019). Eine diastolische Funktionsstörung ist eine weit verbreitete Komplikation des Diabetes mellitus und tritt schon früh im Laufe der Erkrankung auf (Yilmaz *et al.*, 2015; Brunvand *et al.*, 2016). Die Diabetische Kardiomyopathie bezeichnet eine herabgesetzte Leistung mit Umbauprozessen am Herzen bei Diabetes mellitus-Patienten. Anfangs kommt es zu einer isolierten asymptomatischen linksventrikulären diastolischen Dysfunktion ohne zeitgleich bestehenden weiteren Pathologien (Fein und Sonnenblick, 1985; Chamnan *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2009; Falcao-Pires und Leite-Moreira, 2012; Lorenzo-Almorós *et al.*, 2017).

In einer Studie von Kiencke *et al.* 2010 betraf die diabetische Kardiomyopathie 48% der eingeschlossenen Probanden mit Diabetes mellitus. (Kiencke *et al.*, 2010).

Das Risiko von Typ-2-Diabetes-Patienten für eine kardiovaskuläre Erkrankung ist zwei- bis vierfach, bei Frauen sogar bis sechsfach erhöht. Die Glykämie (Vorkommen von Glukose im Blut) ist dabei Prädiktor für die kardiovaskuläre Prognose. Diabetiker mit einer Herzerkrankung wiederum haben eine schlechtere Prognose als Nicht-Diabetiker. Annähernd drei Viertel der Herzinsuffizienz-Patienten im NYHA-Stadium 3 und 4 weisen eine gestörte Glukoseregulation mit schlechter Überlebensrate auf. Je mehr Glukose anfällt

und je höher der HbA_{1c} (glykiertes Hämoglobin, das einen Rückschluss auf das Blutzuckerniveau der letzten 8-12 Wochen zulässt) ist, desto schlechter ist die klinische Prognose bei Herzinsuffizienz und desto höher ist die Inzidenz für diese. Es wird sogar davon ausgegangen, dass Diabetiker weitaus häufiger von einer Herzinsuffizienz betroffen sind als diagnostiziert. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Herzinsuffizienz und dem Diabetes mellitus, dazu gehören ursächlich ein metabolisches Ungleichgewicht durch die hyperglykämische Stoffwechsellage und gleichzeitige Insulinresistenz. Dies führt einmal zu einer verstärkten Athero- und Thrombogenese, aber auch zu einer veränderten myokardialen Binnenstruktur (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2020).

In den letzten Jahrzehnten haben sich viele Publikationen damit befasst, ob der Diabetes mellitus direkt zu myokardialen Veränderungen führt, dennoch ist bis heute nicht sicher belegt, dass die diabetische Kardiomyopathie als separate Krankheitsentität existiert (Marx, Dörr und Tschöpe, 2019). Da die Herzinsuffizienz einen erheblichen Einfluss auf eine erhöhte Mortalität bei Diabetikern hat (Marx, Dörr und Tschöpe, 2019), ist ein besseres Verständnis über die Genese dieser Erkrankung für eine wirksame Prävention und Therapie unabdinglich. Auf Grundlage der bereits gewonnenen Erkenntnisse und Hinweise und noch bestehenden Unklarheiten, ist eine weitere Grundlagenforschung zu diesem Thema erforderlich. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis leisten.

5.2 Die Verbindung zu Titin und der Autophagie

Das Sarkomer unterliegt einem konstanten Umbau seiner Bestandteile, wodurch es sich an physiologische Veränderungen anpassen kann, während die Funktion erhalten bleibt (Willis *et al.*, 2008). Titin fungiert als Strukturprotein im Sarkomer und ist in seiner Funktion als molekulare Feder maßgeblich an der myokardialen, passiven Steifigkeit sowie systolischen und diastolischen Funktion des Herzens beteiligt (Tharp, Mestroni und Taylor, 2020). Seine Längenvariationen gelten aktuell als der vermutlich maßgebende Einfluss auf die dilatative Kardiomyopathie, allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen komplex und bis heute nicht vollständig verstanden (Tharp *et al.*, 2019). Auch für eine

frühe diastolische Dysfunktion mit einer erhöhten passiven Steifigkeit des linken Ventrikels werden Modifikationen von Titin als wesentliche Ursache angesehen (Franssen und González Miqueo, 2016).

Eine Änderung des N2BA/N2B-Verhältnisses über eine vermehrte oder verminderte Expression der beiden Isoformen ist ebenfalls ein Bestandteil der adaptiven Vorgänge bei einer Funktionsstörung des Herzens. Aus einem genaueren Verständnis über die Mechanismen dieser veränderten Expression könnte ein therapeutischer Nutzen bei Herzinsuffizienz gezogen werden (Tharp, Mestroni und Taylor, 2020).

In der Literatur sind zahlreiche Einflüsse auf die Autophagie bekannt (Alers *et al.*, 2012). Unter anderem hemmt ein reiches Nährstoffangebot über die Kinase mTOR die Proteindegradation im Autophagieprozess. Glukose stellt eine Möglichkeit der Energiegewinnung dar. In einer früheren Studie wurde herausgefunden, dass hohe Glukoselevel die Autophagie in kultivierten Kardiomyozyten von neonatalen Ratten und adulten Mäusen inhibieren (Kobayashi *et al.*, 2012).

Mögliche Auswirkungen vom Glukosestoffwechsel auf die Autophagie sind noch nicht vollständig untersucht und verstanden. Veränderungen der Autophagie-Aktivität spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Insulinresistenz bei Diabetes und vielen Stoffwechselerkrankungen. Daher lohnt es sich, den tieferen Mechanismus der Induktion von Insulinresistenz gegen Autophagie durch oxidativen Stress und die entsprechenden Komplikationen für den Körper weiter zu untersuchen (Le, 2020).

Auf Basis dieses Wissens, sowie vor dem Hintergrund der Notwendigkeit des besseren Verständnisses über die diabetische Kardiomyopathie und anhand der zahlreichen Hinweise über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Hyperglykämie und Titin wurde das vorliegende Projekt entwickelt. Es sollte der Titinisoformenswitch und die Autophagie unter hyperglykämischer Kultivierung im Zellkulturmodell mit embryonalen Rattenkardiomyozyten untersucht werden.

5.3 Der Titinisoformenswitch im Zellkulturmodell

Die Rattenkardiomyozyten weisen im embryonalen Stadium (E16) noch nahezu ausschließlich die N2BA-Isoform auf. Perinatal erfolgt der stetige Austausch der Isoform, bis überwiegend die adulte N2B-Isoform vorhanden und gleichzusetzen mit dem Verhältnis in adulten Rattenkardiomyozyten ist (Opitz et al., 2004). Kommt es im humanem Herzen zu Herzversagen, so kommt es wieder zu einer Expression von fötalen Isoformen der myokardialen Proteine (Schwartz und Mercadier, 1996). Auch bei Titin kehrt sich das Verhältnis der Isoformen bei Herzversagen um. In diesem Fall wird vermehrt die längere N2BA-Isoform gefunden (Neagoe et al., 2002; Makarenko et al., 2004; Nagueh et al., 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften, wie der kurzfristige Umbau der Isoformen um den perinatalen Zeitpunkt herum, und der Entdeckung, dass bei Störungen der Herzfunktion bei Menschen der *Switch* in die entgegengesetzte Richtung abläuft, eignet sich das gewählte Zellkulturmodell besonders gut, um im Modell den Einfluss von Hyperglykämie auf den *Switch* zu untersuchen.

Zusätzlich konnte in verschiedenen, weiteren Studien gezeigt werden, dass im Zellkulturmodell ein Einfluss auf den Titinisoformenswitch genommen werden kann. Zu den einflussnehmenden Stimuli gehören unter anderem Schilddrüsenhormone, Insulin und bislang nicht publizierte Daten der AG Krüger (Krüger et al., 2008, 2010). Auf Basis der bereits durchgeführten Untersuchungen wurde der vorliegende Versuchsaufbau entwickelt.

5.4 Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf den Titinisoformenswitch

Die vorliegenden Ergebnisse haben die aufgestellte Hypothese, dass Hyperglykämie die Autophagie in embryonalen Rattenkardiomyozyten hemmt und der Titinisoformenswitch beeinflusst wird, nicht bestätigt.

In den durchgeführten Versuchen wurden embryonale Rattenkardiomyozyten unter hyperglykämischen Bedingungen bis zu einem Zeitraum von 9 Tagen kultiviert. An drei Zeitpunkten, nach 4, 7 und 9 Tagen, wurden die Zellen geerntet und das Titinisoformenverhältnis bestimmt. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer war unter physiologischen Kultivierungsbedingungen

vermehrt die kürzere und steifere N2B-Isoform vorhanden, übereinstimmend mit den bisherigen Resultaten zu dem Isoformenswitch in embryonalen Rattenkardiomyozyten (Krüger *et al.*, 2008, 2010). Jedoch scheinen hohe Glukosekonzentrationen zumindest im Zellkulturmodell mit ERC keine Auswirkungen auf Titin haben. Bei humanen Gewebeproben von Diabetespatienten hingegen wurde ein verändertes Isoformenverhältnis im Herzmuskel festgestellt. Die längere und elastischere N2BA-Isoform war vermehrt vorhanden (Hopf *et al.*, 2018).

In Typ 1-Diabetes-Ratten wurde ebenfalls ein verschobenes Titin-Isoformen-Verhältnis hin zu der längeren und elastischeren N2BA-Isoform gefunden (Zile *et al.*, 2015).

Auch unter alleiniger Insulinstimulation oder der Kultivierung mit Insulin und Glukose gleichzeitig wurden an den Zeitpunkten von 4, 7 oder 9 Tagen keine Veränderungen in der Titinisoformenkomposition festgestellt. Dieser Ergebnisse widersprechen vorangegangenen Studien, die einen Effekt von Insulinstimulation auf das Isoformenverhältnis nachweisen konnten (Krüger *et al.*, 2010). Auch Zhu *et al.* entdeckte einen Effekt von Insulin auf die N2B-Expression über die Aktivierung der mTOR-Kinase (Zhu *et al.*, 2017). Allerdings wurden diese Ergebnisse in neonatalen Rattenkardiomyozyten erzielt. Eine fehlende Wirkung des verwendeten Insulins wurde in diesem Projekt mittels des Nachweises einer Akt-Phosphorylierung überprüft. Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigten die ERC nach 24 h Insulinstimulation ein deutlich erhöhtes AKT-Phosphorylierungslevel, welches dem bekannten Signalweg von Insulin entspricht (Abeyrathna und Su, 2015). Somit konnte die grundsätzliche Aktivierung insulinabhängiger Signalwege in den kultivierten und stimulierten ERC und damit die Wirksamkeit des in diesem Projekt verwendeten Insulins bestätigt werden.

Eine 24-stündige Inhibition bzw. Induktion der Autophagie mit Chloroquine und Metformin in ERC zeigte keine Auswirkung auf die Titinisoformenzusammensetzung (Salcan, 2018). Da jedoch eine Verknüpfung zwischen der Titindegradation und dem Protein-Qualitätskontroll-System gezeigt werden konnte, liegt der Verdacht nahe, dass ein direkter Einfluss auf

die Autophagie auch eine Auswirkung auf den Titinisoformenswitch hat (Kötter, Andresen und Krüger, 2014). Möglicherweise hätte die Inhibition der Autophagie mit Chloroquine über einen längeren Zeitraum andere Ergebnisse am Titinisoformenverhältnis erzielt. Es ist jedoch nicht klar, über welchen Zeitraum ERC in Anwesenheit von Chloroquine vital bleiben.

RBM20 (*RNA binding motif protein 20*) ist ein Spleißfaktor, der spezifisch in Muskelzellen vorkommt und maßgeblich die Titinisoformenkomposition reguliert. Ergebnisse aus einer Versuchsreihe mit adulten Ratten zeigen, dass diese bei einer *loss-of-function*-Mutation des für RBM20-codierenden Gens ein erhöhtes N2BA:N2B-Verhältnis aufweisen. Eine vermehrte Expression von RBM20 hingegen führte zu einer vermehrten Produktion der N2B-Isoform (Guo *et al.*, 2012). Für verschiedene Signalwege wurde bereits ein Einfluss auf RBM20 nachgewiesen. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde Insulin als Aktivator der Kinase mTOR identifiziert, welche wiederum über RBM20 zu einer erhöhten Expression von N2B führte (Zhu *et al.*, 2017).

Eine weitere, kürzlich erschienene Studie hat herausgefunden, dass Linagliptin, ein DPP-4 Inhibitor (Dipeptidylpeptidase-4-Hemmer), der in der Diabetes-Therapie eingesetzt wird und bei ZSF1-Ratten reduzierte Blutglukosewerte, sowie eine verminderte Hyperlipidämie und Gewichtsabnahme bewirkt hat, zu einer verminderten ventrikulären Steifigkeit und einem erhöhten N2BA/N2B-Titin-Isoformenverhältnis führt, also mehr von der flexiblen N2BA-Isoform vorhanden ist (Cuijpers *et al.*, 2021). In Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen liegt die Ursache des veränderten Titinisoformenverhältnis in diesen Untersuchungen vermutlich nicht an den reduzierten Blutglukoseleveln, sondern weiteren Effekten der Linagliptin-Therapie.

Li *et al.* untersuchten die Herzfunktion von diabetischen Ratten im Hinblick auf verschiedene Arten der körperlichen Betätigung. Es wurde Ausdauersport dem Krafttraining gegenübergestellt. Interessanterweise wirkte sich das Ausdauertraining positiver auf die Herzfunktion aus, trotzdem das Krafttraining eine vorteilhaftere Wirkung auf den Blutglukosespiegel hatte. Als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus der verbesserten Herzfunktion unter Ausdauertraining wurde eine Auswirkung auf die titinbasierte Steifigkeit

identifiziert (Li *et al.*, 2019). Übereinstimmend mit den in diesem Projekt erzielten Ergebnissen, scheint nicht der veränderte Blutglukosespiegel die Auswirkungen auf die titinbasierte Steifigkeit verursacht zu haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zu bereits identifizierten Einflüssen auf die Titinisoformenzusammensetzung in ERC und anderen Geweben (Neagoe *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005; Krüger *et al.*, 2008, 2010; Hopf *et al.*, 2018), hohe Glukoselevel keinen Einfluss auf die Isoformenkomposition in ERC haben. In dem gewählten Zellkulturmodell wurde nicht der erwartete Effekt gesehen. Krüger *et al.* postulieren jedoch, dass der Titinisoformenswitch im Modell unter hormonreduziertem Medium nicht so schnell und effektiv wie *in vivo* verläuft (Krüger *et al.*, 2008, 2010). Möglicherweise konnten so hyperglykämische Effekte kompensiert und verschleiert werden. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die titinbasierten Veränderungen bei Diabetes möglicherweise nicht auf hyperglykämiebasierten Effekten, trotz dem Hyperglykämie das Leitsymptom des Diabetes mellitus ist, sondern auf weiteren Umständen beruhen, die mit Diabetes mellitus einhergehen, wie hohe Insulin-Level, metabolische Veränderungen und oxidativer Stress (Elsayed und Abass, 2019).

5.5 Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf den Abbau von Titin

Die vorliegende Versuchsreihe über die K63-Ubiquitinierung von Titin zeigte keine Auswirkungen auf die Ubiquitinierung unter hohen Glukoseleveln, weder zu frühen Kultivierungszeitpunkten noch nach 9 Tagen in Kultur. Auch unter Zugabe von Insulin oder alleiniger Insulinstimulation wurden keine signifikanten Unterschiede zu den Zellen unter Kontrollbedingungen gesehen. Da Zhu *et al.* Insulin als Aktivator der mTOR-Kinase identifiziert hat (Zhu *et al.*, 2017) und mTOR bekanntermaßen als Inhibitor in die Signalkaskade der Autophagie eingeschaltet ist (Alers *et al.*, 2012), wurde in der aktuellen Versuchsreihe durch die Insulinstimulation im Zellkulturmodell eine Akkumulation des K63-ubiquitinierten Titins erwartet in Folge einer Inhibition der Autophagie. Damit übereinstimmend, konnte eine Tendenz erkannt werden, dass die gleichzeitig in

Glukose und Insulin kultivierten ERC eine vermehrte K63-Polyubiquitinierung aufweisen. Vorrangende Untersuchungen aus der AG Krüger bezüglich der Auswirkungen einer Induktion mittels Metformin bzw. Inhibition mit Chloroquine der Autophagie auf das Titinfilament zeigten, dass eine Induktion zu einer verminderten und eine Inhibition zu einer vermehrten K63-Ubiquitinierung führt, welches die Schlussfolgerung zulässt, dass die Autophagie an der Titindegradation beteiligt ist (Salcan, 2018). Ebenso wurde eine Beteiligung des Proteasoms am Titinabbau in ERCs gefunden über eine vermehrte K48-Ubiquitinierung bei Hemmung des Proteasoms (Kötter et al., 2016).

In den Ergebnissen des vorliegenden Projektes wurde der erwartete Effekt nicht beobachtet und die Hypothese, dass Hyperglykämie und Insulinstimulation im Zellkulturmodell zu einer Akkumulation von K63-ubiquitiniertem Titin führen, widerlegt. Möglicherweise lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse von Zhu et al. aus einer Versuchsreihe mit neonatalen Rattenkardiomyozyten nicht auf embryonale Zellen übertragen. Es ist ebenso denkbar, dass mTOR über die Insulinaktivierung nicht in der Autophagieinhibition aktiv ist, sondern in bislang nicht bekannten Interaktionen der Signalwege untereinander und, wie von den Autoren postuliert, in Zusammenhang mit der Expression von RBM20 und der N2B-Isoform steht (Zhu et al., 2017).

5.6 Effekte von Hyperglykämie und Insulin auf die Proteindegradationsmechanismen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass hohe Glukoselevel im Zellkulturmodell keine Auswirkung auf die Autophagie oder den proteasomalen Abbau in embryonalen Kardiomyozyten haben. Auch in Anwesenheit von Insulin gibt es keinen Beleg für einen Effekt auf die intrazellulären Degradationsmechanismen. Damit wurde die initiale Hypothese, dass hohe Glukoselevel die Autophagie in ERC hemmen, widerlegt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Marker wurden bereits in zahlreichen Publikationen als anerkannte Autophagiemarker verwendet und herangezogen, um eine Aussage über den Autophagiefluss in einer Zelle zu treffen (Mizushima, 2007; Alers et al., 2012). In den durchgeführten

Experimenten wurden das Phosphorylierungslevel der AMP- und mTOR-Kinase, sowie die Proteinlevel von LC3-II, p62, Beclin und PSMA2 bestimmt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Resultaten einer Versuchsreihe von Kobayashi et al. In den Experimenten dieser Arbeitsgruppe konnte die Autophagie unter hyperglykämischen Bedingungen in Kultur in neonatalen Rattenkardiomyozyten inhibiert werden. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden in DMEM unter 5,5 mM (Kontrollen) und 17 und 30 mM Glukose für 72 h kultiviert (Kobayashi *et al.*, 2012). Somit glichen sich das Kultivierungsmedium und das Glukoselevel mit dem der vorliegenden Versuchsreihe. Neben dem Kultivierungszeitraum von 72 h wurde in dieser Arbeit auch ein längerer Zeitraum von bis zu 9 Tagen betrachtet. Doch auch nach diesem Zeitraum in Kultur zeigte sich kein Effekt auf die ERC durch hohe Glukoselevel. Zur Beurteilung des Autophagieprozesses verwendeten Kobayashi et al. ebenfalls unter anderem die Marker LC3-II und p62. Die in hoher Glukoselösung kultivierten Zellen wiesen verminderte LC3-II- und erhöhte p62-Level auf. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass hohe Glukoselevel die Autophagie inhibieren. Es wurde angenommen, dass hohe Glukoselevel über eine Aktivierung von mTOR zu der Inhibition der Autophagie und Kardioprotektion führen. Es ist bekannt, dass mTOR bei Insulin und weiteren metabolischen Signalen, wie dem Vorhandensein von Nährstoffen, aktiviert wird (Kobayashi et al., 2012). Doch auch in der durchgeführten Versuchsreihe bei Kultivierung in hyperglykämischen Medium und Insulin gleichzeitig, konnte keine vermehrte Phosphorylierung von mTOR beobachtet werden. Da die hier verwendeten Zellkulturbedingungen denen von Kobayashi et al. gleichen, scheinen die dort an neonatalen Rattenkardiomyozyten gesehenen Effekte nicht auf embryonale Rattenkardiomyozyten übertragbar zu sein. Womöglich haben die Kardiomyozyten im embryonalen Stadium Kompensationsmechanismen, weswegen sie nicht auf hohe Glukoselevel reagieren. Bereits 1998 postulierten Rothen-Rutishauser et al., dass neonatale Rattenkardiomyozyten ein wesentlich anderes Verhalten als adulte Rattenkardiomyozyten aufweisen (Rothen-Rutishauser et al., 1998).

Um zu bestätigen, dass eine Inhibition der Autophagie in diesem Zellkulturmodell generell möglich ist, wurden die Kontroll-ERC und die in Hyperglykämie kultivierten ERC mit Chloroquine nach 4 und 9 Tagen in Kultur stimuliert. Chloroquine ist ein bekannter Inhibitor der Autophagie. Durch Anreicherung in den Lysosomen und Anhebung des pH-Wertes inaktiviert es die darin vorkommenden Hydrolasen. Zusätzlich blockiert es die Verschmelzung des Autophagosoms mit dem Lysosom (Shintani und Klionsky, 2004). Unter beiden Kultivierungsbedingungen war ein deutlicher Anstieg der LC3-II- und p62-Proteinlevel zu beobachten, bei gleichbleibender Beladungskontrolle. Die Akkumulation der Proteine LC3-II und p62 zeigt, dass der Autophagieprozess sowohl in den Kontroll- als auch in den Stimulationszellen erfolgreich unterbrochen werden konnte.

Ebenso widersprüchlich zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist eine kürzlich publizierte Studie. Li et al. haben herausgefunden, dass Autophagie durch hohe Glukoselevel in neuronalen Zellen des Hippocampus inhibiert wird. Zuerst wurde dies in diabetischen Ratten festgestellt. Sekundär konnte die Inhibition durch Hyperglykämie direkt in Neuronen des Hippocampus von Mäusen bestätigt werden. Als Mediator wurde hierfür ATG4B identifiziert. Die Level des Autophagie-Protein-Markers Atg5 und LC3-II waren verringert und die Level von p62 unter den hyperglykämischen Bedingungen erhöht (Li *et al.*, 2017).

Einen zusätzlichen Hinweis zu dieser Thematik geben Matsui et al. Sie besagen, dass der Entzug von Glukose Autophagie in Kardiomyozyten induziert (Matsui et al., 2007), welches als indirekter Hinweis zur Interpretation verwendet werden kann, dass hohe Glukoselevel wiederum die Autophagie induzieren.

Eine weitere Studie demonstrierte eine Inhibition der Autophagie in Herzzellen von Diabetes-Typ 1-Mäusen, welche mit einer kardialen Dysfunktion einher ging (Xie *et al.*, 2011).

Dennoch ist die Datenlage über die Inhibition bzw. Induktion der Autophagie durch Hyperglykämie nach wie vor nicht eindeutig. Die Arbeitsgruppe von Mellor et al. konnte belegen, dass Autophagie verstärkt bei Mäusen unter einer Fruktoseernährung, die dadurch eine Insulinresistenz und Hyperglykämie

entwickelt haben im Sinne eines Diabetes Typ 2, stattfindet (Mellor *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse widersprechen den vorherigen Literaturbelegen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde im Zuge der Insulinstimulation der ERC ein signifikant erhöhtes Phosphorylierungslevel der AMPK α an Tag 4 und 7 nach Präparation festgestellt, welches bei gleichzeitiger Glukosegabe wieder aufgehoben war. Außerdem wurde ein signifikant erniedrigtes LC3-II-Proteinlevel unter Insulin und gleichzeitiger Glukose- und Insulin-Stimulation festgestellt, das sich zu späteren Kultivierungszeitpunkten normalisierte. Es liegt nahe, dass das Insulin eine entscheidende Wirkung hier gezeigt hat, da dieser Effekt unter alleiniger Glukose-Stimulation nicht beobachtet wurde. In der Literatur ist bislang keine Phosphorylierung der AMP-Kinase unter Insulin Therapie an der Stelle Threonin172 beschrieben, welches nach dem aktuellen Verständnis einer Aktivierung und Induktion der Autophagie bedeuten würde (Chan, 2012). Jedoch lässt sich diese Hypothese nicht anhand der Proteinlevel bekannter Autophagiemarker bestätigen. Es wäre viel mehr eine Aktivierung und Steigerung des Phosphorylierungslevel von mTOR unter Insulinstimulation zu erwarten (Meijer und Codogno, 2006).

Dabei ist schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass die Autophagie von Insulin inhibiert und von Glukagon angeregt wird (Mortimore und Poso, 1987).

Die der Inhibition vorgeschalteten Signalwege wurden bereits identifiziert: Insulin aktiviert die Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt und mTOR, um die Glukoseaufnahme in die Zelle zu fördern, die Proteinsynthese zu stimulieren und die Autophagie zu inhibieren (Mizushima, 2005; Meijer und Codogno, 2006), vermutlich über Phosphorylierung und Inaktivierung der Atg1 (*autophagy related 1*) Proteinkinase, deren *mammalian homolog* als ULK1 bekannt ist (Akers *et al.*, 2012).

Bei ausbleibenden, erwarteten Effekten in dieser Arbeit wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt mit einem geänderten Versuchsaufbau. Die ERC wurden für 72 h in serumfreiem Medium kultiviert und die Kontrollbedingungen erneut mit hohen Glukoseleveln verglichen. Die zugrundeliegende Annahme bestand darin, dass bekanntlich der Entzug von Nährstoffen die Autophagie

induzieren kann (Lum, DeBerardinis und Thompson, 2005). Dies bestätige eine Studie, in der Mäuse, die 24 h nicht gefüttert wurden, eine verstärkte Autophagie aufzeigt haben, trotz dem sie noch genügen Lipide aufwiesen. Daraus resultierte die Schlussfolgerung, dass eine Induktion des Autophagieprozesses rasch geschieht, noch bevor die Energiereserven vollkommen erschöpft sind (Mizushima und Komatsu, 2011). Es wurde angenommen, dass eine mögliche Hemmung der Autophagie durch Hyperglykämie erst bei Induktion dieser durch Nährstoffdeprivation anhand der Autophagiemarker messbar wird. Doch auch in diesem Versuchsansatz wurden die bereits erzielten Ergebnisse bestätigt, dass Hyperglykämie die Autophagie in ERC nicht hemmt.

5.7 Fazit und Ausblick

Es gibt zahlreiche Publikationen, die Hinweise auf Veränderungen der Titinisoformenzusammensetzung und des beteiligten *Signalings* geben und somit die Schlussfolgerung zulassen, dass auch die Autophagie von Titin am Isoformenswitch beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend gibt es überwiegend Anzeichen dafür, dass Diabetes mellitus oder hohe Glukoselevel die Autophagie inhibieren und das Titinisoformenverhältnis zugunsten der N2BA-Isoform verändern (Matsui *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2012; Zile *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Hopf *et al.*, 2018; Cuijpers *et al.*, 2021). Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Möglicherweise liegen die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit diabetischen Tieren an weiteren diabetesbasierten Effekten, aber nicht dem Leitsymptom Hyperglykämie. Eine andere Erklärung ist, dass unterschiedliche Gewebe zudem noch in verschiedenen Differenzierungsstadien im Zellkulturmodell nicht vergleichbar sind und Glukose unterschiedliche Auswirkungen auf diese hat.

Möglicherweise eignen sich embryonale Kardiomyozyten nicht ausreichend, um die hier gestellte Frage zu untersuchen und die Ergebnisse auf adulte Kardiomyozyten zu interpretieren.

Ein weiterer, zu untersuchender Ansatz in Bezug auf die in dieser Arbeit gestellte Frage könnte das gewählte Modell zu einem späteren Zeitpunkt sein. Etwa 20

Tage nach Geburt haben Kardiomyozyten einen adulten Status erreicht und das Titinisoformenverhältnis stabilisiert sich (Warren *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wäre es eine interessante und ergänzende Untersuchung, die Proteinlevel der Autophagiemarker bei An- und Abwesenheit von lysosomalen Proteaseinhibitoren zu vergleichen. Mizushima und Yoshimori postulieren, dass durch diese Methode erst sicher aufgezeigt werden kann, wie viele Autophagosomen tatsächlich bereitgestellt bzw. abgebaut wurden (Mizushima und Yoshimori, 2007).

6 Literatur und Quellenverzeichnis

- Abeyrathna, P. und Su, Y. (2015) 'The critical role of Akt in cardiovascular function', *Vascular Pharmacology*, 74, pp. 38–48. doi:10.1016/j.vph.2015.05.008.
- Agarkova, I. und Perriard, J.-C. (2005) 'The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere', *Trends in Cell Biology*, 15(9), pp. 477–485. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.001.
- Alers, S. *et al.* (2012) 'Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks', *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), pp. 2–11. doi:10.1128/MCB.06159-11.
- Babu, J.R., Geetha, T. und Wooten, M.W. (2005) 'Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation', *Journal of Neurochemistry*, 94(1), pp. 192–203. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x.
- Bang, M.-L. *et al.* (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(11), pp. 1065–1072. doi:10.1161/hh2301.100981.
- Bärthlein, K. (2019) "Der Einfluss von Metformin-Stimulation auf den Titin-Isoformen-Switch in embryonalen Rattenkardiomyozyten in Abhängigkeit von der Autophagie-Aktivität und Expression des Spleißfaktors RBM20." Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Behrends, C. und Harper, J.W. (2011) 'Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains', *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), pp. 520–528. doi:10.1038/nsmb.2066.
- Bhatia, V. *et al.* (2004) 'Association of poor glycemic control with prolonged hospital stay in patients with diabetes admitted with exacerbation of congestive heart failure', *Endocrine Practice*, 10(6), pp. 467–471. doi:10.4158/EP.10.6.467.
- Bjørkøy, G. *et al.* (2005) 'p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death', *Journal of Cell Biology*, 171(4), pp. 603–614. doi:10.1083/jcb.200507002.
- Bjørkøy, G. *et al.* (2009) 'Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 181–197. doi:10.1016/S0076-

6879(08)03612-4.

Bonaldo, P. und Sandri, M. (2013) ‘Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy’, *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), pp. 25–39. doi:10.1242/dmm.010389.

Boudina, S. und Abel, E.D. (2007) ‘Diabetic Cardiomyopathy Revisited’, *Circulation*, 115(25), pp. 3213–3223. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597.

Boudina, S. und Abel, E.D. (2010) ‘Diabetic cardiomyopathy, causes and effects’, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(1), pp. 31–39. doi:10.1007/s11154-010-9131-7.

Brunvand, L. *et al.* (2016) ‘Early reduced myocardial diastolic function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus a population-based study’, *BMC Cardiovascular Disorders*, 16(1), p. 103. doi:10.1186/s12872-016-0288-1.

Carrier, L. *et al.* (2010) ‘The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy’, *Cardiovascular Research*, 85(2), pp. 330–338. doi:10.1093/cvr/cvp247.

Cazorla, O. *et al.* (2000) ‘Differential Expression of Cardiac Titin Isoforms and Modulation of Cellular Stiffness’, *Circulation Research*, 86(1), pp. 59–67. doi:10.1161/01.RES.86.1.59.

Chamnan, P. *et al.* (2009) ‘Cardiovascular risk assessment scores for people with diabetes: a systematic review’, *Diabetologia*, 52(10), pp. 2001–2014. doi:10.1007/s00125-009-1454-0.

Chan, E.Y. (2012) ‘Regulation and Function of Uncoordinated-51 Like Kinase Proteins’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(5), pp. 775–785. doi:10.1089/ars.2011.4396.

Chauveau, C., Rowell, J. and Ferreiro, A. (2014) ‘A Rising Titan: *TTN* Review and Mutation Update’, *Human Mutation*, 35(9), pp. 1046–1059. doi:10.1002/humu.22611.

Chondrogianni, N. and Gonos, E.S. (2005) ‘Proteasome dysfunction in mammalian aging: Steps and factors involved’, *Experimental Gerontology*, 40(12), pp. 931–938. doi:10.1016/j.exger.2005.09.004.

Cosentino, F. *et al.* (2020) ‘2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD’, *European Heart Journal*, 41(2), pp. 255–323. doi:10.1093/eurheartj/ehz486.

- Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A.L. (1996) 'Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes', *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), pp. 801–847. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004101.
- Cuervo, A.M. (2004) 'Autophagy: Many paths to the same end', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1/2), pp. 55–72. doi:10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57.
- Cuijpers, I. *et al.* (2021) 'Linagliptin prevents left ventricular stiffening by reducing titin cleavage and hypophosphorylation', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(2), pp. 729–741. doi:10.1111/jcmm.16122.
- Deveraux, Q. *et al.* (1994) 'A 26 S Protease Subunit That Binds Ubiquitin Conjugates', p. 3.
- Einarson, T.R. *et al.* (2018) 'Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017', *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), p. 83. doi:10.1186/s12933-018-0728-6.
- Elsayed, M. und Abass, N. (2019) 'Overview of Diabetic cardiomyopathy. Review article.', *Sohag Medical Journal*, 23(3), pp. 94–99. doi:10.21608/smj.2019.15185.1032.
- Falcao-Pires, I. und Leite-Moreira, A.F. (2012) 'Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment', *Heart Fail Rev*, p. 20.
- Fein, F.S. und Sonnenblick, E.H. (1985) 'Diabetic cardiomyopathy', *Progress in Cardiovascular Diseases*, 27(4), pp. 255–270. doi:10.1016/0033-0620(85)90009-X.
- Finley, D. (2009) 'Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome', *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp. 477–513. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.
- Franssen, C. und González Miqueo, A. (2016) 'The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction', *Netherlands Heart Journal*, 24(4), pp. 259–267. doi:10.1007/s12471-016-0812-z.
- Freiburg, A. *et al.* (2000) 'Series of Exon-Skipping Events in the Elastic Spring Region of Titin as the Structural Basis for Myofibrillar Elastic Diversity', *Circulation Research*, 86(11), pp. 1114–1121. doi:10.1161/01.RES.86.11.1114.
- Fürst, D.O. *et al.* (1988) 'The organization of titin filaments in the half-sarcomere

revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line.', *The Journal of Cell Biology*, 106(5), pp. 1563–1572. doi:10.1083/jcb.106.5.1563.

Gallastegui, N. und Groll, M. (2010) 'The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine', *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), pp. 634–642. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.005.

Gautel, M. (2011) 'Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 462(1), pp. 119–134. doi:10.1007/s00424-011-0946-1.

Goffrier B, Schulz Mandy und Bätzing-Feigenbaum J (2017) 'Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015'. doi:10.20364/VA-17.03.

Granzier, H. *et al.* (1997) 'Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction', *Biophysical Journal*, 73(4), pp. 2043–2053. doi:10.1016/S0006-3495(97)78234-1.

Granzier, H.L. und Irving, T.C. (1995) 'Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments', *Biophysical Journal*, 68(3), pp. 1027–1044. doi:10.1016/S0006-3495(95)80278-X.

Greaser, M.L. *et al.* (2003) 'Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension', in Linke, W.A., Granzier, H., and Kellermayer, M.S.Z. (eds) *Mechanics of Elastic Biomolecules*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 473–482. doi:10.1007/978-94-010-0147-2_8.

Groll, M. *et al.* (1997) 'Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution', *Nature*, 386(6624), pp. 463–471. doi:10.1038/386463a0.

Guo, W. *et al.* (2012) 'RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing', *Nature Medicine*, 18(5), pp. 766–773. doi:10.1038/nm.2693.

Hale, A.N. *et al.* (2013) 'Autophagy: Regulation and role in development', *Autophagy*, 9(7), pp. 951–972. doi:10.4161/auto.24273.

Han, D. *et al.* (2010) 'Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic β -cells from high glucose', *Biochemical Journal*,

425(3), pp. 541–551. doi:10.1042/BJ20090429.

Heinrich, P.C. *et al.* (eds) (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

Herold, G. (2020), *Innere Medizin*, Gerd Herold Verlag.

Hidalgo, C. und Granzier, H. (2013) ‘Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: Role in health and disease’, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(5), pp. 165–171. doi:10.1016/j.tcm.2012.10.005.

Hopf, A.-E. *et al.* (2018) ‘Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1’, *Circulation Research*, 123(3), pp. 342–355. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312166.

Horowitz, R., Maruyama, K. and Podolsky, R.J. (1989) ‘Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle.’, *The Journal of Cell Biology*, 109(5), pp. 2169–2176. doi:10.1083/jcb.109.5.2169.

Huxley, H. und Hanson, J. (1954) ‘Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation’, *Nature*, 173(4412), pp. 973–976. doi:10.1038/173973a0.

Iribarren, C. *et al.* (2001) ‘Glycemic Control and Heart Failure Among Adult Patients With Diabetes’, *Circulation*, 103(22), pp. 2668–2673. doi:10.1161/01.CIR.103.22.2668.

Isaacs, W.B. *et al.* (1989) ‘Biosynthesis of titin in cultured skeletal muscle cells.’, *The Journal of Cell Biology*, 109(5), pp. 2189–2195. doi:10.1083/jcb.109.5.2189.

Itakura, E. und Mizushima, N. (2011) ‘p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding’, *The Journal of Cell Biology*, 192(1), pp. 17–27. doi:10.1083/jcb.201009067.

Jia, G., Hill, M.A. and Sowers, J.R. (2018) ‘Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity’, *Circulation Research*, 122(4), pp. 624–638. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.

Jung, C.H. *et al.* (2009) ‘ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery’, *Molecular Biology of the Cell*. Edited by S.L. Schmid, 20(7), pp. 1992–2003. doi:10.1091/mbc.e08-12-1249.

- Kannel, W.B., Hjortland, M. und Castelli, W.P. (1974) 'Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study', *The American Journal of Cardiology*, 34(1), pp. 29–34. doi:10.1016/0002-9149(74)90089-7.
- Kiencke, S. *et al.* (2010) 'Pre-clinical diabetic cardiomyopathy: prevalence, screening, and outcome', *European Journal of Heart Failure*, 12(9), pp. 951–957. doi:10.1093/eurjhf/hfq110.
- Kim, J. *et al.* (2011) 'AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1', *Nature Cell Biology*, 13(2), pp. 132–141. doi:10.1038/ncb2152.
- Klionsky, D.J. (2003) *Autophagy*. Available at: <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9781498713276> (Accessed: 28 August 2020).
- Knappeis, G.G. und Carlsen, F. (1968) 'The ultrastructure of the M line in skeletal muscle', *The Journal of Cell Biology*, 38(1), pp. 202–211. doi:10.1083/jcb.38.1.202.
- Kobayashi, S. *et al.* (2012) 'Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury', *Autophagy*, 8(4), pp. 577–592. doi:10.4161/auto.18980.
- Koch-Institut, R. (2019) 'Diabetes in Deutschland – Bericht der Nationalen -Diabetes-Surveillance 2019'.
- Komatsu, M. *et al.* (2007) 'Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice', *Cell*, 131(6), pp. 1149–1163. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035.
- Kötter, S. *et al.* (2016) 'Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction', *Circulation Research*, 119(9), pp. 1017–1029. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309685.
- Kötter, S., Andresen, C. und Krüger, M. (2014) 'Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control', *Biological Chemistry*, 395(11), pp. 1341–1352. doi:10.1515/hsz-2014-0178.
- Krüger, M. *et al.* (2008) 'Thyroid Hormone Regulates Developmental Titin Isoform Transitions via the Phosphatidylinositol-3-Kinase/ AKT Pathway', *Circulation Research*, 102(4), pp. 439–447. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.162719.
- Krüger, M. *et al.* (2010) 'Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart

- development and diabetic cardiomyopathy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(5), pp. 910–916. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.012.
- Krüger, M. und Kötter, S. (2016) 'Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling', *Frontiers in Physiology*, 7. doi:10.3389/fphys.2016.00076.
- Labeit, S. *et al.* (1992) 'Towards a molecular understanding of titin.', *The EMBO Journal*, 11(5), pp. 1711–1716. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05222.x.
- Labeit, S. und Kolmerer, B. (1995) 'Titins: Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity', *Science*, 270(5234), pp. 293–296. doi:10.1126/science.270.5234.293.
- Lahmers, S. *et al.* (2004) 'Developmental Control of Titin Isoform Expression and Passive Stiffness in Fetal and Neonatal Myocardium', *Circulation Research*, 94(4), pp. 505–513. doi:10.1161/01.RES.0000115522.52554.86.
- Lange, S. (2005) 'The Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover', *Science*, 308(5728), pp. 1599–1603. doi:10.1126/science.1110463.
- Le, W. (2020) *Autophagy Clinical Science*. Singapore: Springer Singapore Pte. Limited. Available at: <http://public.eblib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=6272237> (Accessed: 15 February 2021).
- Levine, B. und Klionsky, D.J. (2004) 'Development by Self-Digestion', *Developmental Cell*, 6(4), pp. 463–477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1.
- LeWinter, M.M. and Granzier, H.L. (2014) 'Cardiac Titin and Heart Disease', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 63(3), pp. 207–212. doi:10.1097/FJC.0000000000000007.
- Li, S. *et al.* (2019) 'Changes in Titin and Collagen Modulate Effects of Aerobic and Resistance Exercise on Diabetic Cardiac Function', *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 12(5), pp. 404–414. doi:10.1007/s12265-019-09875-4.
- Li, Y. *et al.* (2017) 'Autophagy impairment mediated by S-nitrosation of ATG4B leads to neurotoxicity in response to hyperglycemia', *Autophagy*, 13(7), pp. 1145–1160. doi:10.1080/15548627.2017.1320467.
- Liang, C. *et al.* (2008) 'Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to

- coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking’, *Nature Cell Biology*, 10(7), pp. 776–787. doi:10.1038/ncb1740.
- Liang, X.H. *et al.* (1998) ‘Protection against Fatal Sindbis Virus Encephalitis by Beclin, a Novel Bcl-2-Interacting Protein’, *Journal of Virology*, 72(11), pp. 8586–8596. doi:10.1128/JVI.72.11.8586-8596.1998.
- Linke, W.A. *et al.* (1996) ‘Towards a Molecular Understanding of the Elasticity of Titin’, *Journal of Molecular Biology*, 261(1), pp. 62–71. doi:10.1006/jmbi.1996.0441.
- Linke, W.A. *et al.* (1999) ‘I-Band Titin in Cardiac Muscle Is a Three-Element Molecular Spring and Is Critical for Maintaining Thin Filament Structure’, *Journal of Cell Biology*, 146(3), pp. 631–644. doi:10.1083/jcb.146.3.631.
- Linke, W.A. und Granzier, H. (1998) ‘A Spring Tale: New Facts on Titin Elasticity’, *Biophysical Journal*, 75(6), pp. 2613–2614. doi:10.1016/S0006-3495(98)77706-9.
- Linke, W.A., Popov, V.I. and Pollack, G.H. (1994) ‘Passive and active tension in single cardiac myofibrils’, *Biophysical Journal*, 67(2), pp. 782–792. doi:10.1016/S0006-3495(94)80538-7.
- Lorenzo-Almorós, A. *et al.* (2017) ‘Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy’, *Cardiovascular Diabetology*, 16(1), p. 28. doi:10.1186/s12933-017-0506-x.
- Lum, J.J., DeBerardinis, R.J. und Thompson, C.B. (2005) ‘Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), pp. 439–448. doi:10.1038/nrm1660.
- Maiuri, M.C. *et al.* (2007) ‘Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1’, *The EMBO Journal*, 26(10), pp. 2527–2539. doi:10.1038/sj.emboj.7601689.
- Makarenko, I. *et al.* (2004) ‘Passive Stiffness Changes Caused by Upregulation of Compliant Titin Isoforms in Human Dilated Cardiomyopathy Hearts’, *Circulation Research*, 95(7), pp. 708–716. doi:10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f.
- Maruyama, K. (1995) ‘Birth of the Sliding Filament Concept in Muscle Contraction’, *The Journal of Biochemistry*, 117(1), pp. 1–6. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124692.
- Marx, N., Dörr, R. und Tschöpe, D. (2019) ‘Herzinsuffizienz und Diabetes – unterschätzt, wenig verstanden und zu selten diagnostiziert’, *Herz*, 44(3), pp. 189–191.

doi:10.1007/s00059-019-4797-4.

Matsui, Y. *et al.* (2007) 'Distinct Roles of Autophagy in the Heart During Ischemia and Reperfusion: Roles of AMP-Activated Protein Kinase and Beclin 1 in Mediating Autophagy', *Circulation Research*, 100(6), pp. 914–922. doi:10.1161/01.RES.0000261924.76669.36.

Meijer, A.J. und Codogno, P. (2006) 'Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease', *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5–6), pp. 411–425. doi:10.1016/j.mam.2006.08.002.

van Melle, J.P. *et al.* (2010) 'Diabetes, Glycemic Control, and New-Onset Heart Failure in Patients With Stable Coronary Artery Disease: Data from the Heart and Soul Study', *Diabetes Care*, 33(9), pp. 2084–2089. doi:10.2337/dc10-0286.

Mellor, K.M. *et al.* (2011) 'Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), pp. 1035–1043. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.03.002.

Mizushima, N. (2005) 'The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide', *Cell Death & Differentiation*, 12(S2), pp. 1535–1541. doi:10.1038/sj.cdd.4401728.

Mizushima, N. (2007) 'Autophagy: process and function', *Genes & Development*, 21(22), pp. 2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207.

Mizushima, N. (2010) 'The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation', *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), pp. 132–139. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.004.

Mizushima, N. und Komatsu, M. (2011) 'Autophagy: Renovation of Cells and Tissues', *Cell*, 147(4), pp. 728–741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026.

Mizushima, N. und Levine, B. (2010) 'Autophagy in mammalian development and differentiation', *Nature Cell Biology*, 12(9), pp. 823–830. doi:10.1038/ncb0910-823.

Mizushima, N. und Yoshimori, T. (2007) 'How to Interpret LC3 Immunoblotting', *Autophagy*, 3(6), pp. 542–545. doi:10.4161/auto.4600.

Mortimore, G.E. und Poso, A.R. (1987) 'Intracellular Protein Catabolism and its Control During Nutrient Deprivation and Supply', *Annual Review of Nutrition*, 7(1), pp. 539–568. doi:10.1146/annurev.nu.07.070187.002543.

- Nagueh, S.F. *et al.* (2004) 'Altered Titin Expression, Myocardial Stiffness, and Left Ventricular Function in Patients With Dilated Cardiomyopathy', *Circulation*, 110(2), pp. 155–162. doi:10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF.
- Neagoe, C. *et al.* (2002) 'Titin Isoform Switch in Ischemic Human Heart Disease', *Circulation*, 106(11), pp. 1333–1341. doi:10.1161/01.CIR.0000029803.93022.93.
- Neagoe, C. *et al.* (2003) 'Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2/3), pp. 175–189. doi:10.1023/A:1026053530766.
- Noda, T. (2002) 'Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure', *Trends in Cell Biology*, 12(5), pp. 231–235. doi:10.1016/S0962-8924(02)02278-X.
- Opitz, C.A. *et al.* (2004) 'Developmentally Regulated Switching of Titin Size Alters Myofibrillar Stiffness in the Perinatal Heart', *Circulation Research*, 94(7), pp. 967–975. doi:10.1161/01.RES.0000124301.48193.E1.
- Prado, L.G. *et al.* (2005) 'Isoform Diversity of Giant Proteins in Relation to Passive and Active Contractile Properties of Rabbit Skeletal Muscles', *Journal of General Physiology*, 126(5), pp. 461–480. doi:10.1085/jgp.200509364.
- Predmore, J.M. *et al.* (2010) 'Ubiquitin Proteasome Dysfunction in Human Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathies', *Circulation*, 121(8), pp. 997–1004. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.904557.
- Pyle, W.G. and Solaro, R.J. (2004) 'At the Crossroads of Myocardial Signaling: The Role of Z-Discs in Intracellular Signaling and Cardiac Function', *Circulation Research*, 94(3), pp. 296–305. doi:10.1161/01.RES.0000116143.74830.A9.
- Qu, L. *et al.* (2014) 'Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy', *Neural Regeneration Research*, 9(12), p. 1195. doi:10.4103/1673-5374.135328.
- Rothen-Rutishauser, B. *et al.* (1998) 'Different Behaviour of the Non-sarcomeric Cytoskeleton in Neonatal and Adult Rat Cardiomyocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(1), pp. 19–31. doi:10.1006/jmcc.1997.0596.
- Russell, R.C. *et al.* (2013) 'ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase', *Nature Cell Biology*, 15(7), pp. 741–750. doi:10.1038/ncb2757.

- Salcan, S. (2018), Veränderungen der elastischen Titineigenschaften in alternden Herzen sowie die Beteiligung von Protein-Qualitätskontrollmechanismen am Turnover des Titins. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schlossarek, S., Frey, N. und Carrier, L. (2014) ‘Ubiquitin-proteasome system and hereditary cardiomyopathies’, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 71, pp. 25–31. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.12.016.
- Schwartz, K. und Mercadier, J.-J. (1996) ‘Molecular and cellular biology of heart failure’., *Current Opinion in Cardiology*, 11(3), pp. 227–235. doi:10.1097/00001573-199605000-00002.
- Seglen, P.O. *et al.* (1996) ‘Structural Aspects of Autophagy’, in Suzuki, K. and Bond, J.S. (eds) *Intracellular Protein Catabolism*. Boston, MA: Springer US (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 103–111. doi:10.1007/978-1-4613-0335-0_12.
- Shibutani, S.T. und Yoshimori, T. (2014) ‘A current perspective of autophagosome biogenesis’, *Cell Research*, 24(1), pp. 58–68. doi:10.1038/cr.2013.159.
- Shintani, T. und Klionsky, D. (2004) ‘Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword’, *Science*, 306(5698), pp. 990–995. doi:10.1126/science.1099993.
- Suzuki, K. und Ohsumi, Y. (2007) ‘Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*’, *FEBS Letters*, 581(11), pp. 2156–2161. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.096.
- Tan, J.M.M. *et al.* (2008) ‘Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases’, *Human Molecular Genetics*, 17(3), pp. 431–439. doi:10.1093/hmg/ddm320.
- Tanida, I., Ueno, T. und Kominami, E. (2008) ‘LC3 and Autophagy’, in Deretic, V. (ed.) *Autophagosome and Phagosome*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology™), pp. 77–88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Terman, A. und Brunk, U.T. (2005) ‘Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology’, *Cardiovascular Research*, p. 11.
- Tharp, C., Mestroni, L. und Taylor, M. (2020) ‘Modifications of Titin Contribute to the Progression of Cardiomyopathy and Represent a Therapeutic Target for Treatment of Heart Failure’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), p. 2770. doi:10.3390/jcm9092770.

- Tharp, C.A. *et al.* (2019) ‘The Giant Protein Titin’s Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease’, *Frontiers in Physiology*, 10, p. 1436. doi:10.3389/fphys.2019.01436.
- Thrower, J.S. (2000) ‘Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal’, *The EMBO Journal*, 19(1), pp. 94–102. doi:10.1093/emboj/19.1.94.
- Tian, L.-F. *et al.* (2006) ‘MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(1), pp. 355–361. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.108.
- Tönnies, T. *et al.* (2019) ‘Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040’, *Diabetic Medicine*, 36(10), pp. 1217–1225. doi:10.1111/dme.13902.
- Warren, C.M. *et al.* (2004) ‘Titin isoform changes in rat myocardium during development’, *Mechanisms of Development*, 121(11), pp. 1301–1312. doi:10.1016/j.mod.2004.07.003.
- Willis, M.S. *et al.* (2008) ‘Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere’, *Cardiovascular Research*, 81(3), pp. 439–448. doi:10.1093/cvr/cvn289.
- Witt, S.H. *et al.* (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(4), pp. 713–722. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.021.
- Xie, Z. *et al.* (2011) ‘Improvement of Cardiac Functions by Chronic Metformin Treatment Is Associated With Enhanced Cardiac Autophagy in Diabetic OVE26 Mice’, *Diabetes*, 60(6), pp. 1770–1778. doi:10.2337/db10-0351.
- Yilmaz, S. *et al.* (2015) ‘Diabetic Cardiomyopathy; Summary of 41 years’, *Korean Circulation Journal*, 45(4), p. 266. doi:10.4070/kcj.2015.45.4.266.
- Young, L.H. *et al.* (2009) ‘Cardiac Outcomes After Screening for Asymptomatic Coronary Artery Disease in Patients With Type 2 Diabetes: The DIAD Study: A Randomized Controlled Trial’, *JAMA*, 301(15), p. 1547. doi:10.1001/jama.2009.476.
- Yu, L. *et al.* (2010) ‘Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR’, *Nature*, 465(7300), pp. 942–946. doi:10.1038/nature09076.
- Zak, R. *et al.* (1977) ‘Comparison of turnover of several myofibrillar proteins and critical

evaluation of double isotope method. [Tritium, ¹⁴C tracer techniques], *J. Biol. Chem.; (United States)* [Preprint]. Available at: <https://www.osti.gov/biblio/7214525>.

Zhang, D. *et al.* (2016) ‘AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388’, *Autophagy*, 12(9), pp. 1447–1459. doi:10.1080/15548627.2016.1185576.

Zhu, C. *et al.* (2017) ‘Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(9), pp. 2363–2371. doi:10.1016/j.bbadis.2017.06.023.

Zile, M.R. *et al.* (2015) ‘Myocardial Stiffness in Patients With Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: Contributions of Collagen and Titin’, *Circulation*, 131(14), pp. 1247–1259. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. | 4 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Titinisoformen N2B und N2BA in einem kardialen Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. | 6 |
| Abbildung 4: Induktion und Inhibition der Autophagosom-Bildung. | 9 |
| Abbildung 3: Schema der Autophagosom-Bildung. | 12 |
| Abbildung 5: Aufbau des 26S-Proteasoms. | 13 |
| Abbildung 6: Verbindung des Protein-Qualitätskontroll-Systems mit dem Titinfilament. | 15 |
| Abbildung 7: Zeitachse zur Darstellung des Versuchaufbaus. | 27 |
| Abbildung 8: Exemplarisches Titingel aus embryonalen Rattenkardiomyozyten an Tag 7 in Kultur. | 30 |
| Abbildung 9: Bestimmung des Titinisoformenverhältnisses unter Glukosestimulation (A) und Anwesenheit von Insulin (B). | 34 |
| Abbildung 10: Analyse der K63-Ubiquitinierung von Titin unter Glukosestimulation (A) und Anwesenheit von Insulin (B), nach deren Nachweis im <i>Western Blot</i> | 35 |
| Abbildung 11: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung von ERC. | 37 |
| Abbildung 12: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung von ERC. | 38 |
| Abbildung 13: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung und Anwesenheit von Insulin von ERC. | 40 |
| Abbildung 14: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung und Anwesenheit von Insulin von ERC. | 41 |
| Abbildung 15: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung in serumfreiem Medium von ERC. | 43 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 16: Analyse der Effekte auf intrazelluläre Degradationsmechanismen bei hyperglykämischer Kultivierung in serumfreiem Medium ab Tag 7 in Kultur von ERC. | 44 |
| Abbildung 17: Repräsentativer <i>Western Blot</i> einer AKT-Aktivierung durch Anwesenheit von Insulin. | 45 |
| Abbildung 18: Repräsentative <i>Western Blots</i> einer Chloroquine-induzierten Inhibition der Autophagie in ERC. | 46 |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Kulturmedien für die embryonalen Rattenkardiomyozyten | 18 |
| Tabelle 2: Puffer und Lösungen | 19 |
| Tabelle 3: Chemikalien und Enzyme | 21 |
| Tabelle 4: Laborgeräte | 22 |
| Tabelle 5: Antikörper | 23 |
| Tabelle 6: Pipettierschema für 2 Titingele | 28 |
| Tabelle 7: Pipettierschema für je 2 SDS - Standardgele/ Sammelgele | 29 |

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Martina Krüger, die mich als Teil ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen und mir somit die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Projekt mitzuarbeiten. Sie hatte stets ein offenes Ohr und dank ihres Optimismus und ihrer positiven Energie kam es zur Fertigstellung dieser Arbeit. Vielen Dank an Prof. Dr. Schmitt und an die Mitglieder des Prüfungskomitees der Medizinischen Fakultät für die Begutachtung meiner Arbeit. Für die Begleitung und Unterstützung in jeder Phase der Promotion bedanke ich mich zudem bei Dr. Sebastian Kötter, der mir immer mit konstruktiven Ratschlägen und Ideen zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Sabine Bongardt für die aufbauenden Gespräche und die tatkräftige Unterstützung bedanken, ohne dich hätten die experimentellen Arbeiten im Labor nicht funktioniert.

Vielen Dank der AG Gödecke und insbesondere Dr. Sandra Berger, für die Bereitstellung der Laborgeräte, Unterstützung und unterhaltsamen Pausengespräche in der Kaffeepause.

Danke für die Teilnahme am Förderprogramm des SFB 1116, welches mich sowohl weitergebildet als auch finanziell unterstützt hat. Danke an Prof. Dr. Pieter de Tombe für die Möglichkeit eines Forschungsaustausches in seine Arbeitsgruppe am Heart Science Center in London.

Für unsere tiefe Freundschaft, bedingungslose Unterstützung und zahlreichen gemeinsamen Erlebnisse möchte ich mich bei den weiteren Medizindoktorandinnen Linda, Leonie und Verena bedanken, sowie bei Merle, Anke und Anna. Wir haben uns gemeinsam durch dieses Studium getragen.

Mein letzter Dank gilt insbesondere meiner Familie. Dustin, nicht nur für die technische Unterstützung. Meinen Großeltern, die ausnahmslos zu mir halten und mich stets in meinem Werdegang unterstützen. Meinen Eltern, auf die ich mich immer verlassen kann und ohne die es nicht möglich gewesen wäre.