

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

**Interaktion von Titin mit E3-Ubiquitin-Ligasen und Titin-Umbau in  
Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Erik Müller  
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Drittgutachterin: Prof. Dr. Anke Claudia Fender

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Müller, E., Salcan, S., Bongardt, S., Barbosa, D. M., Krüger, M. & Kötter, S. (2021), E3 ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Scientific Reports*, 11, 21134.

## Zusammenfassung

Titin ist mit bis zu 3,7 MDa das größte bekannte Protein. Als drittes Filament durchzieht es ein gesamtes Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Titin ist wesentlich für die passiven mechanischen Eigenschaften der (Herz-)Muskulatur verantwortlich und an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt. Der Abbau von Titin und auch die Integration in Sarkomere stellen für Muskelzellen herausfordernde Prozesse dar, die bislang wenig erforscht sind. Wesentliche Proteinqualitätskontrollmechanismen sind das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die Autophagie und weitere Proteasen wie Calpaine. Ziel dieser Arbeit war das Identifizieren von E3-Ubiquitin-Ligasen, die mit Titin interagieren und das Protein somit für einen möglichen Abbau durch o.g. Mechanismen markieren. Hierzu wurden einzelne Titinfragmente (N2A, N2B, PEVK, A168-170, TK) und E3-Ubiquitin-Ligasen (MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32, Mdm2) rekombinant synthetisiert, gereinigt und mittels *GST-Pulldown-Assay* auf Interaktionen geprüft. Ergänzend wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen die Lokalisationen der einzelnen Proteine in adulten Rattenkardiomyozyten (ARC) untersucht. Darüber hinaus sollte der Vorgang des Abbaus und des Einbaus von Titin aus bzw. in Sarkomere genauer beleuchtet werden. Hierzu wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen zu verschiedenen Zeitpunkten einer 20-tägigen Zellkultur adulter Rattenkardiomyozyten unterschiedliche Abschnitte des Proteins (Z1Z2, PEVK, M8-M10) während ihres Auf- und Abbaus beobachtet. Im Titin I-Band-Bereich (N2A, N2B, PEVK) zeigten sich Interaktionen mit MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32 und Mdm2 übereinstimmend mit einer Lokalisation der Proteine im I-Band von ARC (abgesehen von MuRF-1). Außer CHIP interagierten alle E3-Ligasen auch mit dem A-Band-Bereich von Titin (A168-170, TK), für MuRF-1 und Fbx32 wurde außerdem eine Lokalisation in diesem Bereich nachgewiesen. Zusammengefasst wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere neue Interaktionen von Titin mit E3-Ligasen identifiziert, die den Abbau von Titin über die verschiedenen Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle (UPS, Autophagie) ermöglichen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ARC in Langzeitzellkultur eine Art De- und Redifferenzierung durchlaufen und Sarkomerstrukturen, auch Titin, in diesem Prozess ab- und wieder aufgebaut werden. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Titin als intaktes Molekül in das Sarkomer eingebaut wird, wohingegen beim Abbau zunächst der leichter zugängliche I-Band-Bereich und anschließend der schwieriger zugängliche A-Band-Bereich des Proteins abgebaut wird.

## **Abstract**

Titin is the largest known protein with up to 3.7 MDa. As a third filament, it spans an entire half-sarcomere from the Z-disc to the M-band. Titin is essentially responsible for the passive mechanical properties of (cardiac) muscle and is involved in the pathogenesis of numerous diseases. The degradation of titin and also its integration into sarcomeres represent challenging processes for muscle cells that have been poorly understood. Major protein quality control (PQC) mechanisms include the ubiquitin-proteasome system (UPS), autophagy and other proteases such as calpains. The aims of this work were to identify E3 ubiquitin ligases that interact with titin and thus to mark the protein for possible degradation by PQC. For this purpose, single titin fragments (N2A, N2B, PEVK, A168-170, TK) and E3 ubiquitin ligases (MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32, Mdm2) were recombinantly synthesized, purified and tested for interactions by GST pulldown assay. Supplemental immunofluorescence staining was used to verify the localizations of each protein in adult rat cardiomyocytes (ARC). In addition, the process of degradation and incorporation of titin from/into sarcomeres should be elucidated in more detail. For this purpose, immunofluorescence staining was used to observe different sections of the protein (Z1Z2, PEVK, M8-M10) during their assembly and disassembly at different time points of a 20 days cell culture of adult rat cardiomyocytes. In the titin I-band region (N2A, N2B, PEVK), interactions with MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32, and Mdm2 were consistent with localization of the proteins in the I-band of ARC (except for MuRF-1). Except for CHIP, all ligases also interacted with the A-band region of titin (A168-170, TK) and MuRF-1 and Fbx32 were also shown to localize in this region. In summary, numerous interactions have been identified that may enable titin degradation via multiple mechanisms of protein quality control (UPS, autophagy). Furthermore, it was shown that ARC undergo a kind of de- and redifferentiation in long-term cell culture and sarcomere structures, including titin, are degraded and rebuilt in this process. The results of this study suggest that titin is incorporated into the sarcomere as an intact molecule, whereas during degradation, the more accessible I-band region is degraded first, followed by the more difficult to access A-band region of the protein.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ARC</b>	Adulte Rattenkardiomyozyten
<b>ATG</b>	<i>Autophagy related protein</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>A-Band</b>	Anisotropes Band
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalziumchlorid
<b>CASA</b>	Chaperon-assistierte selektive Autophagie
<b>cDNA</b>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> )
<b>CHIP</b>	<i>C-terminus of Hsp70 interacting protein</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCM</b>	Dilatative Kardiomyopathie
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>et al.</b>	<i>Et alii</i> (und andere)
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>Fbx32</b>	<i>F-box protein 32</i>
<b>FN3</b>	Fibronektin-Typ-III
<b>g</b>	Gramm
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>Hsc</b>	Hitzeschock-verwandtes ( <i>heat-shock cognate</i> ) Protein
<b>Hsp</b>	Hitzeschockprotein
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></b>	Zweifach destilliertes Wasser

<b>I-Band</b>	Isotropes Band
<b>IBR</b>	<i>Inter-between-RING</i>
<b>ICM</b>	Ischämische Kardiomyopathie
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
<b>IgG</b>	Immunglobulin Klasse G
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>kbp</b>	Kilobasenpaare
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LC3</b>	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
<b>Lys</b>	Lysin
<b>m</b>	Milli
<b>M</b>	Molar/Mol
<b>MAFbx</b>	<i>Muscle atrophy F-box protein</i>
<b>MCS</b>	<i>Multiple cloning site</i>
<b>MDa</b>	Megadalton
<b>Mdm2</b>	<i>Murine double minute 2</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MMP-2</b>	Matrix-Metalloprotease 2
<b>mRNA</b>	<i>messenger Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)</i>
<b>MuRF</b>	<i>Muscle-specific RING finger</i>
<b>MyoD</b>	Myogener Regulationsfaktor D
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat

<b>Nbr1</b>	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
<b>NEB</b>	<i>New England Biolabs</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PEVK</b>	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI3P</b>	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RBR</b>	<i>RING-between-RING</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>S</b>	Svedberg
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
<b>SNARE</b>	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
<b>SQSTM1</b>	<i>Sequestosome-1</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
<b>TCap</b>	<i>Titin cap</i>
<b>TRIM</b>	<i>Tripartite motif</i>
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	<i>Unit</i>
<b>Ub</b>	Ubiquitin
<b>ULK</b>	<i>Unc-51-like autophagy-activating kinase</i>
<b>UPS</b>	Ubiquitin-Proteasom-System
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µl</b>	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Sarkomer .....	1
1.2	Das Titinfilament .....	2
1.2.1	Aufbau und Isoformen.....	2
1.2.2	Funktionen .....	4
1.2.3	Pathophysiologie in (Kardio-)Myopathien .....	5
1.3	Proteinqualitätskontrolle .....	6
1.3.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	7
1.3.1.1	Funktionsweise.....	7
1.3.1.2	E3-Ubiquitin-Ligasen.....	10
1.3.1.3	Die Rolle der E3-Ubiquitin-Ligasen in der sarkomerischen Proteinqualitätskontrolle.....	11
1.3.2	Autophagie.....	13
1.3.3	Calpaine .....	14
1.3.4	Proteinqualitätskontrolle des Titinfilaments.....	14
1.4	Zielsetzung .....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material .....	18
2.1.1	Bakterienstamm .....	18
2.1.2	Nährmedien.....	18
2.1.2.1	Nährmedien für Bakterienkulturen.....	18
2.1.2.2	Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten.....	19
2.1.3	Enzyme .....	19
2.1.3.1	Restriktionsenzyme .....	19
2.1.3.2	Weitere Enzyme .....	20
2.1.4	Antikörper.....	20
2.1.5	Prokaryotische Expressionskonstrukte .....	21
2.1.6	Primer .....	22
2.1.7	DNA-Fragmente .....	22
2.1.8	Vektor pGEX4T1.....	23
2.1.9	Chemikalien.....	24
2.1.10	Puffer und Lösungen.....	26

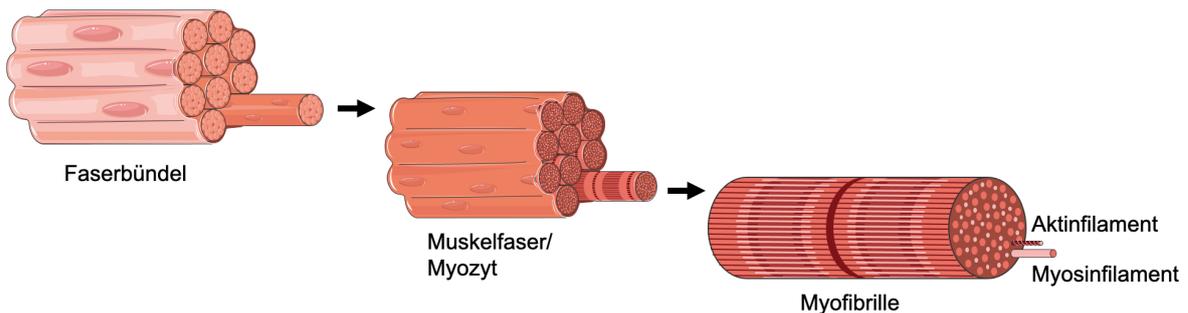
2.1.11	Laborgeräte .....	29
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.1.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	31
2.2.1.2	Isolation von mRNA aus Myokardgewebe .....	31
2.2.1.3	Synthese von cDNA aus mRNA .....	31
2.2.1.4	Generierung von PCR-Primern und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....	32
2.2.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.1.6	Agarosegelelektrophorese .....	33
2.2.1.7	Restriktion .....	34
2.2.1.8	Ligation.....	34
2.2.1.9	Transformation .....	35
2.2.1.10	Plasmidpräparation .....	35
2.2.1.11	Überprüfung der Expressionskonstrukte .....	36
2.2.2	Proteinbiochemie .....	36
2.2.2.1	Herstellung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> .....	36
2.2.2.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	37
2.2.2.3	Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus aufgeschlossenen Bakterienpellets .....	37
2.2.2.4	Ionenaustauschchromatographie .....	37
2.2.2.5	Dialyse von Proteinlösungen.....	38
2.2.2.6	<i>SDS-Page</i> Gelelektrophorese und Färben von SDS-Gelen.....	38
2.2.2.7	<i>Western-Blot</i> .....	39
2.2.2.8	Interaktionsstudien mit <i>GST-Pulldown</i> -Experimenten .....	40
2.2.3	Zellkulturmethoden.....	41
2.2.3.1	Präparation und Kultivierung adulter Rattenkardiomyozyten... 41	
2.2.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	42
2.2.4	Software und Statistik.....	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Herstellung prokaryotischer Expressionskonstrukte .....	44
3.2	Expression und Reinigung rekombinanter Titin-Fragmente und E3-Ubiquitin- Ligasen.....	46
3.3	Interaktionsstudien des Titinfilaments mit E3-Ubiquitin-Ligasen.....	49

3.3.1	MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32 und Mdm2 interagieren mit Titin I-Band-Fragmenten <i>in vitro</i> .....	49
3.3.2	MuRF-1, MuRF-2, Mdm2 und Fbx32 interagieren mit Titin A-Band-Fragmenten <i>in vitro</i> .....	50
3.4	Lokalisation verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen in adulten Rattenkardiomyozyten .....	51
3.5	Lokalisation von Proteasomen in adulten Rattenkardiomyozyten .....	53
3.6	Etablierung unterschiedlicher Titin-Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie .....	54
3.7	Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten .....	56
3.7.1	Adulte Rattenkardiomyozyten verändern ihre Sarkomerstruktur während der Langzeitkultivierung .....	56
3.7.2	Titin- <i>Turnover</i> in Langzeitzellkulturen adulter Rattenkardiomyozyten ...	58
4	Diskussion .....	60
4.1	Die Rolle verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen im Abbau des Titinfilaments ...	60
4.1.1	Interaktion von E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Titin A-Band-Bereich ...	60
4.1.2	Interaktion von E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Titin I-Band-Bereich .....	63
4.1.3	Potenzielle Abbauwege des Titinfilaments .....	65
4.1.4	Pathophysiologie der Titin-Degradation .....	68
4.2	Titin- <i>Turnover</i> im Rahmen des Sarkomerumsatzes adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur .....	71
4.2.1	Morphologische Veränderungen und Umbau der Sarkomere adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur .....	71
4.2.2	Titin-Umbau im Verlauf der Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten .....	73
4.3	Schlussfolgerungen .....	75
5	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	76
6	Anhang .....	89

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Sarkomer

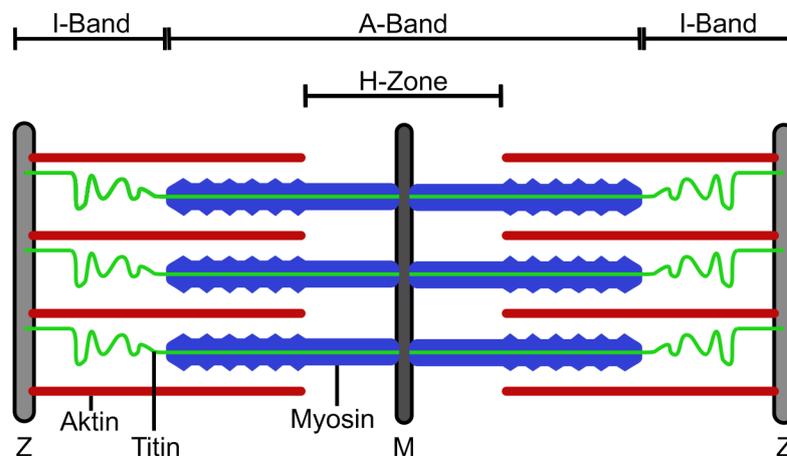
Das Sarkomer stellt die kleinste funktionelle Einheit quergestreifter Muskelzellen dar. Mehrere hundert dieser 2-2,5  $\mu\text{m}$  langen, in Serie geschalteten Strukturen bilden die 1-2  $\mu\text{m}$  dicken Myofibrillen, die parallel angeordnet das Sarkoplasma quergestreifter Muskelzellen durchziehen (Abb. 1).



**Abb. 1: Hierarchischer Aufbau von Muskelfasern.** Ein Faserbündel besteht aus zahlreichen, parallel angeordneten Muskelfasern, die wiederum von mehreren Myofibrillen durchzogen werden. Myofibrillen bestehen aus in Serie geschalteten Sarkomeren, die neben den kontraktilen Aktin- und Myosinfilamenten auch Titin enthalten. Teile der Abbildung wurden von SERVIER MEDICAL ART (<https://smart.servier.com>, abgerufen am 15.09.2020) übernommen.

Die aneinandergereihten Sarkomere werden durch Z-Scheiben, ein unter anderem durch  $\alpha$ -Aktinin gebildetes Proteingerüst, voneinander getrennt. In der Mitte eines Sarkomers befindet sich die ebenfalls durch Strukturproteine gebildete M-Linie (z.B. Proteine der Myomesin-Familie). Die Sarkomere stellen den kontraktilen Apparat der quergestreiften Muskulatur dar. Die in der Z-Scheibe verankerten dünnen Aktinfilamente und die in der M-Linie befestigten dicken Myosinfilamente ermöglichen durch den Calcium-induzierten Querbrückenzyklus die Verkürzung der einzelnen Sarkomere und somit eine Kontraktion der gesamten Muskelfaser. Laut der Gleit-Filament-Theorie bewegen sich die beiden Filamente bei diesem Vorgang ATP-abhängig ineinander. Titin durchzieht als drittes Filament ein halbes Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und ist wesentlich für die passiven mechanischen Eigenschaften von quergestreiften Muskelzellen verantwortlich (Fürst et al., 1988, Makarenko et al., 2004). Anhand des Verhaltens in polarisiertem Licht lassen sich die Sarkomere in mehrere Zonen gliedern, das doppelbrechende, anisotrope A-Band und das helle, isotrope I-Band. Ersteres bezeichnet die um die M-Linie befindliche Myosin-enhaltende Zone, letzteres die Myosin-freie Zone an der Z-Scheibe. Zusätzlich

bezeichnet man die Aktin-freie Zone an der M-Linie als H-Zone, die einen Teil des A-Bands darstellt (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Sarkomers.** Ein Sarkomer wird von zwei Z-Scheiben (Z) begrenzt und durch die M-Linie (M) in zwei Halbsarkomere geteilt. Aktin ist als dünnes Filament in der Z-Scheibe verankert, das dicke Myosinfilament wiederum in der M-Linie. Titin überspannt ein Halbsarkomer und ist in Z-Scheibe und M-Linie verankert. Das I-Band umgibt die Z-Scheibe und grenzt sich von dem zentral gelegenen A-Band ab. A-Band = anisotropes Band; I-Band = isotropes Band; Z = Z-Scheibe, M = M-Linie.

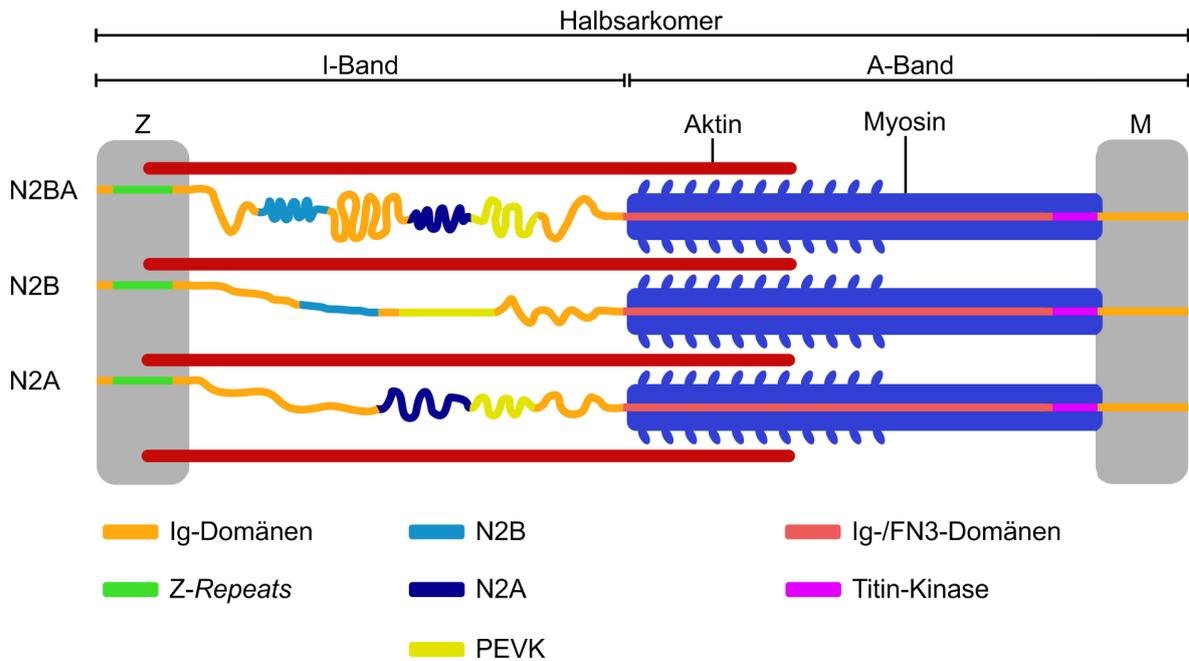
## 1.2 Das Titinfilament

Als das größte bekannte Protein erfüllt Titin innerhalb des Sarkomers zahlreiche Funktionen und spielt auch in der Pathophysiologie verschiedener Myopathien eine wesentliche Rolle. In den folgenden Abschnitten werden der Aufbau, die Funktionsweise und die Pathophysiologie des Titinfilaments genauer beleuchtet.

### 1.2.1 Aufbau und Isoformen

In den Sarkomeren quergestreifter Muskulatur ziehen die Titinfilamente von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und überspannen somit ein halbes Sarkomer. Der Aufbau des Proteins unterscheidet sich in einigen Elementen, je nachdem welche Isoform exprimiert wird. Das Titin-Gen kodiert für 364 Exons (Bang et al., 2001), die durch alternatives Spleißen zu der Expression zahlreicher Isoformen führen können (Labeit und Kolmerer, 1995, Guo et al., 2010). Relevant für Kardiomyozyten sind die langen, ca. 3200-3300 kDa großen N2BA-Isoformen und die kürzere, ca. 3000 kDa große N2B-Isoform, die im Herzmuskel co-exprimiert werden (Freiburg et al., 2000). In der Skelettmuskulatur werden je nach Muskel verschiedene N2A-Isoformen (3300-3700 kDa) exprimiert (Prado et al., 2005). Auch innerhalb der Perinatalperiode zeichnen sich deutliche Veränderungen der Titinmoleküle ab.

So findet in dieser Zeit ein *switch* von fetalen N2BA-Isoformen zu adulten N2BA- und N2B-Isoformen statt, der somit eine postnatale Erhöhung der myokardialen Steifigkeit bewirkt (Krüger et al., 2006). Der variabel aufgebaute I-Band-Anteil des Titinfilaments beginnt N-terminal mit den innerhalb der Z-Scheibe gelegenen *Z-Repeats* (Gautel et al., 1996). Daran anknüpfend befinden sich die proximalen Ig-Domänen (Labeit und Kolmerer, 1995). Je nach Isoform schließen sich einige spezifische Sequenzabschnitte an. In den beiden Herzisoformen befindet sich dort das N2B-Segment mit einer enthaltenden *unique sequence* (N2Bus) (Linke, 2008). In der längeren N2BA-Isoform folgen weitere Ig-Domänen und das ebenfalls im Skelettmuskel zu findende N2A-Segment (Krüger und Linke, 2011). Daran schließt sich die PEVK-Domäne an, eine weitere *unique sequence*, die in den unterschiedlichen Isoformen verschiedene Längen annimmt (Linke et al., 2002). Der Name kommt daher, dass dieser Bereich zu einem Großteil aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V), Lysin (K) aufgebaut ist. Den Schluss des I-Band-Anteils des Filaments bilden die distalen Ig-Domänen (Labeit und Kolmerer, 1995). Der A-Band-Anteil besteht im Wesentlichen aus strikt angeordneten Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen, die regelmäßig von einzelnen Ig-Domänen unterbrochen werden (Krüger und Linke, 2011, Labeit et al., 1992). Angrenzend an die M-Linie befindet sich die Titin-Kinase-Domäne (Labeit et al., 1992). C-Terminal liegen schlussendlich zehn weitere Ig-Domänen (M1-M10) und bilden den Abschluss des Moleküls in der M-Linie des Sarkomers (Abb. 3) (Bang et al., 2001). Einige der genannten Regionen haben sich als Hotspots für posttranslationale Proteinmodifikationen oder Proteininteraktionen herausgestellt. Insbesondere die Regionen N2Bus, PEVK und die Titin-Kinase spielen hierbei eine entscheidende Rolle, die in den folgenden Abschnitten genauer beleuchtet wird.



**Abb. 3: Titin Aufbau und Isoformen.** Dargestellt sind die drei wesentlichen Titin-Isoformen schematisch in einem Halbsarkomer. Die beiden in Kardiomyozyten exprimierten Isoformen N2BA und N2B unterscheiden sich durch die in der kürzeren N2B-Isoform fehlende N2A-Region. N2A-Isoformen werden nur im Skelettmuskel exprimiert. Ihnen fehlt die N2B-Domäne der herzspezifischen Isoformen. Z = Z-Scheibe; M = M-Linie; Ig = Immunglobulin; FN3 = Fibronectin-Typ-III.

## 1.2.2 Funktionen

Titin erfüllt in Muskelzellen zahlreiche Funktionen. Mittlerweile weitreichend bekannt ist die Funktion von Titin als molekulare Feder (Anderson und Granzier, 2012). Bei Dehnung der Sarkomere durch Dehnung des Muskels ist Titin neben Kollagenfasern wesentlich für die Entwicklung der passiven Kraft der Muskulatur verantwortlich (Linke et al., 1996). Es beeinflusst außerdem die passive Steifigkeit der Muskulatur sowie die Wandspannung der Herzwände und steht somit in direktem Zusammenhang zur Herzarbeit, insbesondere der diastolischen Ventrikelfunktion (Linke und Hamdani, 2014). Der molekulare Federmechanismus beruht im Wesentlichen auf der Entfaltung/Dehnung des I-Band-Anteils, zusammengesetzt aus Ig-Domänen, der N2B *unique sequence* und der PEVK-Region (Horowitz et al., 1989, Linke et al., 1999). Falten sich diese Anteile zurück, werden elastische Kräfte wirksam, die außerdem die aktive Kontraktion der Muskulatur unterstützen (Rivas-Pardo et al., 2016, Eckels et al., 2018). Des Weiteren spielt das Titinfilament vermutlich eine wesentliche Rolle im Frank-Starling-Mechanismus und wirkt folglich abhängig von der passiven Dehnung der Ventrikel und Calcium-Sensitivierung auch hierüber auf die aktive Muskelkraft ein (Lee et al., 2010, Linke, 2018). Die Wirkung auf die

diastolische Füllung der Herzkammern beeinflusst somit indirekt auch die systolische Auswurfleistung. Die passiven Eigenschaften des Titinfilaments lassen sich außerdem über mehrere Wege modulieren und ermöglichen dem Myokard eine Anpassung der passiven Steifigkeit. So lässt sich unter anderem durch Spleißfaktoren Einfluss auf das Isoformenverhältnis nehmen (Li et al., 2013). Wird vermehrt die steifere N2B-Isoform exprimiert und vermindert die weniger steife N2BA-Isoform, so nimmt die Gesamtsteifigkeit des Myokards zu (Kötter et al., 2014, Labeit und Kolmerer, 1995). Dem vergleichsweise langsamen Anpassungsmechanismus über die Einflussnahme auf die Prozessierung der prä-mRNA stehen verschiedene posttranslationale Modifikationen gegenüber, die die passiven Eigenschaften des Filaments deutlich dynamischer verändern können (Koser et al., 2019). Im Vordergrund stehen hier Phosphorylierung und Oxidation unterschiedlicher Domänen des Moleküls (Yamasaki et al., 2002, Hidalgo et al., 2009, Beckendorf und Linke, 2015). Verschiedenste Proteinkinasen, die in komplexe Signalwege der Muskelzellen integriert sind, können durch Phosphorylierung die passiven Eigenschaften des Titinmoleküls verändern (Linke und Hamdani, 2014). Außerdem fungiert Titin als Gerüstprotein in den Sarkomeren quergestreifter Muskelzellen und dient der Sarkomer-Integrität (Tskhovrebova und Trinick, 2010). Weiterhin scheint Titin eine Art molekulare Vorlage für die Assemblierung der unterschiedlichen Sarkomerproteine zu sein und dient besonders der strikten Anordnung der dicken Myosinfilamente (Labeit et al., 1992). Schlussendlich ist Titin ein zentrales Protein vieler Signalwege. Unter Anderem wird eine Rolle als Mechanosensor diskutiert, worüber Titin wesentliche Auswirkungen auf Hypertrophie-Signalwege hat (van der Pijl et al., 2018). Neuere Studien zeigen, dass auch die N2A-Region ein wichtiger Knotenpunkt innerhalb dieses Signalwegs zu sein scheint (Nishikawa et al., 2020).

### **1.2.3 Pathophysiologie in (Kardio-)Myopathien**

Titin zeigt in zahlreichen Kardiomyopathien und auch Skelettmuskelerkrankungen Veränderungen. Das genaue Verständnis der Pathophysiologie und die Rolle des Titinfilaments in Myopathien ist Inhalt einer Vielzahl aktueller Forschungsbestrebungen. Bereits umfassender untersucht sind Anpassungen von Titin in höhergradigen Herzinsuffizienzen unterschiedlicher Genese, häufig in Form von Veränderungen der Isoformenzusammensetzung (*isoform switch*) (Hein et al., 1994, Hein und Schaper, 1996). Insbesondere bei Herzinsuffizienzen mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) zeigt sich

häufig eine Erhöhung des N2BA:N2B Isoformenverhältnisses und folglich eine Verringerung der myokardialen, passiven Steifigkeit (Linke und Hamdani, 2014). Beschrieben sind derartige Anpassungsmechanismen auch für Myokardgewebe aus Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM), Aortenklappenstenose und Herzinsuffizienz mit persistierender Ejektionsfraktion (HFpEF) (Makarenko et al., 2004, Nagueh et al., 2004, Neagoe et al., 2002, Loescher et al., 2021). Es wird vermutet, dass dort die Senkung der Titin-abhängigen myokardialen Steifigkeit der verringerten Compliance der extrazellulären Matrix durch vermehrte Kollagensynthese entgegenwirkt (Makarenko et al., 2004, Neagoe et al., 2002). Auch das sog. *Remote-Myokard*, das nicht-betroffene Gewebe nach einem Myokardinfarkt, zeigt Veränderungen in der Titin-Homöostase, die ebenfalls als Kompensationsmechanismus diskutiert werden (Kötter et al., 2016). Weiterhin zeigen einige bekannte Mutationen im Titin-Gen ein vermehrtes Auftreten unterschiedlicher Myopathien (Krüger und Linke, 2009). Die Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie ist insgesamt sehr variabel und bis heute nicht detailliert geklärt. Abbruchmutationen des Titin-Gens lassen sich in 25 % der genetisch bedingten und in 18 % der sporadisch auftretenden dilatativen Kardiomyopathien nachweisen, sodass Titin ein ätiologisch hoch relevanter Faktor zu sein scheint, der in Zukunft ein potenzielles *Target* für zielgerichtete Therapien darstellen könnte (Herman et al., 2012, McAfee et al., 2021). Letztendlich scheint das Titinfilament auch in der Pathogenese vieler Skelettmuskelerkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen. So zeigen sich Veränderungen insbesondere bei Muskeldystrophien (Misaka et al., 2019). Exemplarisch hervorgehoben sei hier die Duchenne-Muskeldystrophie, die mit vermehrter Titin-Degradation einhergeht und bei der Titin als möglicher urindiagnostischer Biomarker diskutiert wird (Awano et al., 2018, Matsumura et al., 1989). Zusammengefasst scheint Titin in zahlreiche pathologische Vorgänge des Herz- und Skelettmuskels involviert zu sein und sollte als mögliches diagnostisches und therapeutisches Ziel in Betracht gezogen werden.

### **1.3 Proteinqualitätskontrolle**

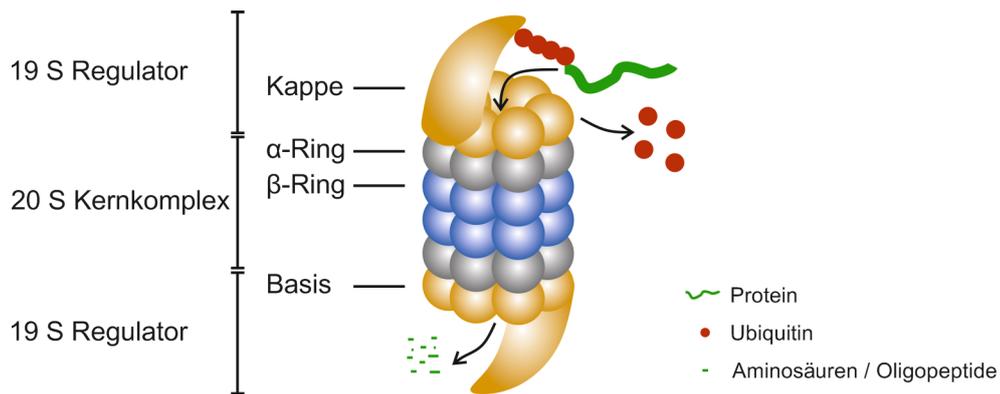
Zelluläre Proteine unterliegen einem stetigen Gleichgewicht aus Synthese und Degradation, das für die Energiehomöostase und Anpassungsfähigkeit der Zellen unerlässlich ist. Der fortlaufende Proteinumsatz (*Turnover*) dient der kontinuierlichen Erneuerung veralteter oder fehlgefalteter Proteine und ist somit wesentlich für die Erhaltung der physiologischen Funktionen einer Zelle. Die intrazelluläre Proteindegradation wird hauptsächlich von zwei

Systemen bewerkstelligt: dem Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie, die beide im Folgenden genauer erläutert werden (Pohl und Dikic, 2019). In beiden Systemen zerkleinern Proteasen die großen Polypeptide zu kleineren Oligopeptiden oder Aminosäuren, die daraufhin dem Energiestoffwechsel der Zelle oder der Neusynthese von Proteinen zur Verfügung stehen. Beide Systeme sind jedoch keinesfalls getrennt zu betrachten, sie stehen untereinander in Verbindung. Exemplarisch für diesen *crossstalk* steht die Substratmarkierung durch Ubiquitinierung von Proteinen, die von beiden Systemen erkannt werden kann (Pohl und Dikic, 2019). So dient p62/SQSTM1 als Ubiquitin-Rezeptor und kann markierte Proteine sowohl zum Proteasom transportieren als auch den Abbau über Autophagie einleiten (Rogov et al., 2014, Wang und Wang, 2015). Als drittes Degradationssystem seien außerdem die Calpaine erwähnt (Portbury et al., 2011).

### **1.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System**

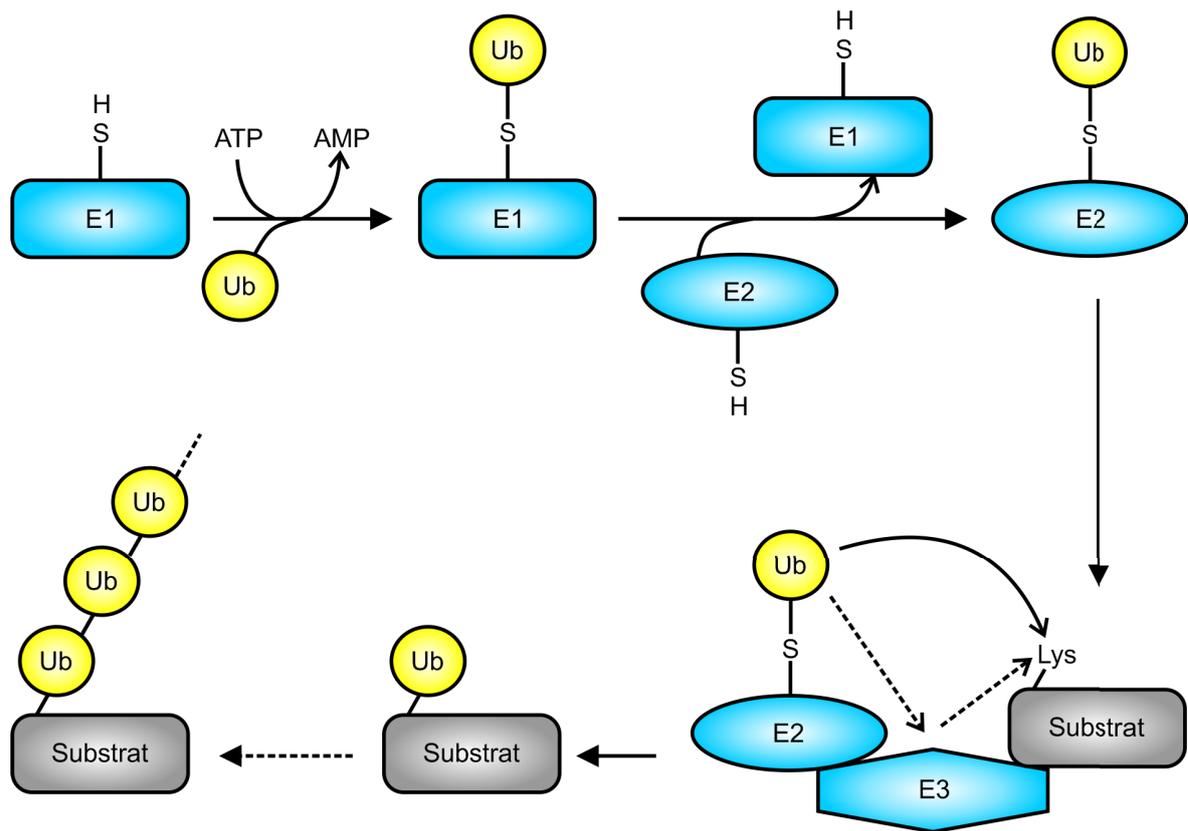
#### **1.3.1.1 Funktionsweise**

Das 26 S Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der dem Abbau veralteter oder fehlgefalteter zellulärer Proteine dient. Vier heptamere Ringe bilden den proteolytisch aktiven 20 S Kern des Komplexes, der von einer oder zwei 19 S regulatorischen Einheiten flankiert wird (Abb. 4) (Bard et al., 2018). Das Zentrum des Proteasoms wird von den zwei  $\beta$ -Ringen des Kernkomplexes gebildet, die je drei unterschiedlich proteolytisch aktive Untereinheiten besitzen. Die  $\beta$ 1-Untereinheit vollbringt Chymotrypsin-ähnliche, die  $\beta$ 2-Untereinheit Trypsin-ähnliche und die  $\beta$ 5-Untereinheit Peptidyl-Glutamyl, Peptid-hydrolysierende oder auch Caspase-ähnliche proteolytische Aktivität (Orlowski und Wilk, 2000). Umgeben werden jene  $\beta$ -Ringe von je einem  $\alpha$ -Ring, die auf beiden Seiten die Eingangspore zum Zentrum bilden. Die regulatorischen 19 S Einheiten erkennen zunächst die durch Ubiquitin zum Abbau markierten Proteine, entfalten diese und leiten sie zur Proteolyse an den zylindrisch geformten Kern weiter.



**Abb. 4: Aufbau eines 26 S Proteasoms.** Der zylindrische 20 S Kernkomplex besteht aus zwei außenliegenden, heptameren  $\alpha$ -Ringen und zwei zentralen  $\beta$ -Ringen. Umgeben wird dieser von zwei regulatorischen 19 S Einheiten, die jeweils aus einer Basis und einer Kappenstruktur bestehen. Die Kappenstruktur erkennt polyubiquitinierte Proteine und leitet diese über die Basis zu dem katalytischen Kern weiter. Hier wird das Protein degradiert und in einzelne Aminosäuren oder Oligopeptide zerlegt. Ubiquitin wird recycelt und steht der Zelle erneut zur Verfügung. S = Svedberg.

Die Deckelstruktur der regulatorischen Untereinheiten erkennt Proteine, die zuvor durch Polyubiquitinierung zum Abbau markiert wurden. Die Ubiquitinierung von Proteinen erfolgt durch eine hierarchisch angeordnete Enzymkaskade (Pohl und Dikic, 2019). Zunächst aktiviert eine E1-Ubiquitin-Ligase ATP-abhängig ein Ubiquitin-Molekül, welches daraufhin auf eine E2-Ubiquitin-Ligase übertragen wird (Nandi et al., 2006). Schlussendlich katalysiert eine E3-Ubiquitin-Ligase die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein und ist für die Substratspezifität verantwortlich (Abb. 5) (Oh et al., 2018).



**Abb. 5: Ubiquitinierung von Proteinen.** Dargestellt ist die Kaskade zur Ubiquitinierung von Proteinen. Unter ATP-Verbrauch bindet eine E1-Ligase (E1) Ubiquitin (Ub), welches auf eine E2-Ligase (E2) übertragen wird. Unter Vermittlung einer E3-Ligase (E3) wird Ubiquitin direkt oder indirekt über die E3-Ligase auf das Substrat übertragen. Mehrfache Wiederholung dieses Prozesses ermöglicht die Formierung von langen Polyubiquitinketten. Lys = Lysin; ATP = Adenosintri-phosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; S = Schwefel; H = Wasserstoff.

Wiederholt sich dieser Prozess entsteht eine Polyubiquitinkette, bei der die einzelnen Moleküle über verschiedene Lysin-Seitenketten linear oder verzweigt miteinander verknüpft sein können. Die unterschiedlichen Verknüpfungen entscheiden über den weiteren Abbauweg des Proteins. So stellt eine lineare Verknüpfung über das Lysin an der 48. Stelle des Ubiquitin-Moleküls (Lys<sup>48</sup>, K48) ein starkes Signal für den proteasomalen Abbau des Proteins dar, das von der 19 S Einheit des Proteasoms erkannt werden kann (Grice und Nathan, 2016). Polyubiquitinierung kann außerdem weitere Faktoren akquirieren, die ebenfalls proteasomale Degradation initiieren können. Weiterhin können auch monoubiquitinierte Proteine proteasomal abgebaut werden (Braten et al., 2016). Letztendlich entstehen Oligopeptide und einzelne Aminosäuren, die von den Zellen erneut für die Proteinbiosynthese oder zur Energiegewinnung genutzt werden können.

### 1.3.1.2 E3-Ubiquitin-Ligasen

E3-Ubiquitin-Ligasen binden mit Ubiquitin beladene E2-Ligasen und das zu ubiquitinierende Substrat und katalysieren die Übertragung des Ubiquitinmoleküls auf das Zielprotein. Hierbei wird zunächst die Thioesterverbindung zwischen Ubiquitin und dem Cystein des aktiven Zentrums der E2-Ligase gelöst. Anschließend wird eine neue Esterverbindung zwischen einem Lysinrest oder dem N-Terminus des Substrates über das C-terminale Ende des Ubiquitinmoleküls geknüpft (Deshaies und Joazeiro, 2009). Proteine können hierdurch monoubiquitiniert werden oder es entstehen Polyubiquitinverbindungen in verschiedenen Verknüpfungsformen (Berndsen und Wolberger, 2014). E3-Ubiquitin-Ligasen sind damit hauptverantwortlich für die Substratspezifität. Es sind über 600 verschiedene humane E3-Ligasen bekannt, die sich in drei Klassen unterteilen lassen, die RING-, HECT- oder RBR-E3-Ligasen (Berndsen und Wolberger, 2014, Li et al., 2008). RING-*finger* E3-Ligasen besitzen eine konservierte RING-*finger* Domäne, in der zwei Zinkionen koordiniert vorliegen. Diese Domäne rekrutiert zum einen die beladene E2-Ligase und katalysiert zum anderen die direkte Ubiquitinübertragung auf das Substrat (Lorick et al., 1999, Budhidarmo et al., 2012). RING-*finger* E3-Ligasen kommen als Monomer, Dimer und auch als Multiproteinkomplexe vor (Berndsen und Wolberger, 2014). Weitere Domänen sind für die Rekrutierung des Substrats verantwortlich (Deshaies und Joazeiro, 2009). Eine Sondergruppe der RING-*finger* E3-Ligasen, die sogenannten Cullin-E3-Ligasen, bestehen aus mehreren Untereinheiten, u.a. dem Cullin-Protein. Dieses enthält neben einer RING-*finger* ähnlichen Domäne ein separates Brückenprotein namens F-box, das der Substraterkennung dient (Lydeard et al., 2013, Skaar et al., 2013). HECT-E3-Ligasen katalysieren im Gegensatz zu RING-*finger* E3-Ligasen die Ubiquitinübertragung indirekt in zwei Schritten. Der sog. N-*lobe* der HECT-Domäne bindet die beladene E2-Ligase, woraufhin Ubiquitin zunächst auf einen Cysteinrest des aktiven Zentrums der E3-Ligase im sog. C-*lobe* übertragen wird (Wenzel et al., 2011). Der C-Terminus der HECT-Ligase ist wesentlich für die Substratspezifität und die Katalyse des zweiten Schritts, der Übertragung von Ubiquitin auf das Zielprotein, verantwortlich (Kamadurai et al., 2013, Maspero et al., 2013). Auch die dritte Klasse der E3-Ubiquitin-Ligasen, die RING-*between*-RING (RBR-) E3-Ligasen, übertragen Ubiquitin in zwei Schritten. Sie bestehen aus zwei separaten RING-Domänen, RING-1 und RING-2, die durch eine *inter-between*-RING (IBR-) Domäne voneinander getrennt werden (Berndsen und Wolberger, 2014). Die RING-1-Domäne bindet

die E2-Ligase und die RING-2-Domäne besitzt, ähnlich wie der *C-lobe* der HECT-Ligasen, das katalytische Cystein (Duda et al., 2013).

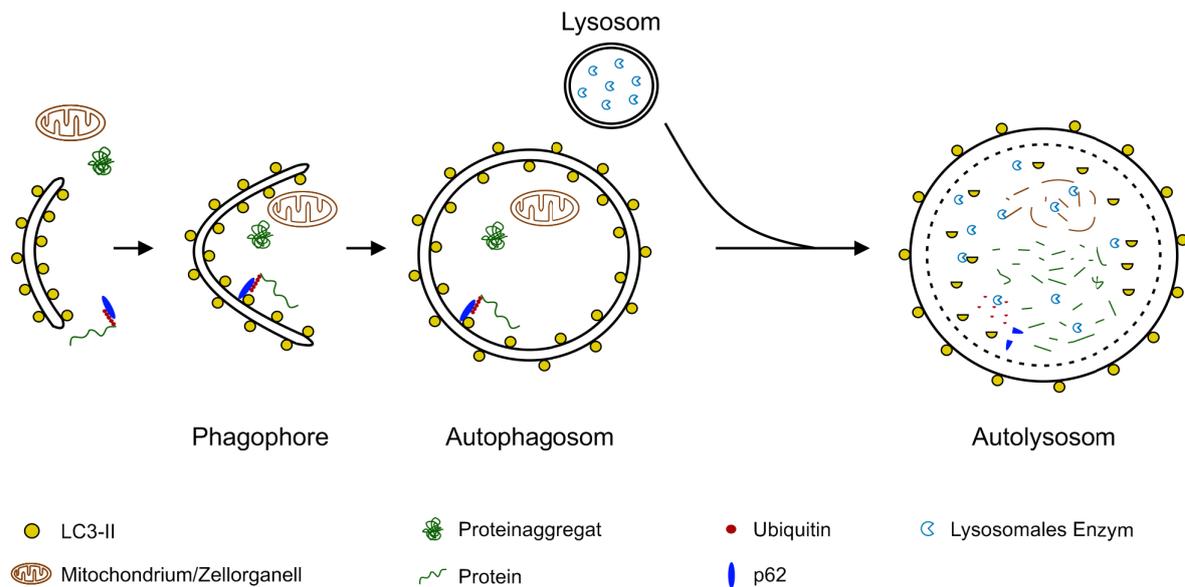
### 1.3.1.3 Die Rolle der E3-Ubiquitin-Ligasen in der sarkomerischen Proteinqualitätskontrolle

Zahlreiche E3-Ubiquitin-Ligasen sind am Protein-*Turnover* von Muskelzellen beteiligt und die genauen Mechanismen sind weiterhin Gegenstand vieler Forschungsbestrebungen. Im Folgenden wird eine Auswahl von sechs muskelspezifischen E3-Ligasen genauer beleuchtet, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden. Eine entscheidende Gruppe stellen die drei *muscle ring finger* (MuRF-)E3-Ligasen MuRF-1 (TRIM63), MuRF-2 (TRIM55) und MuRF-3 (TRIM54) dar, die zu den RING-E3-Ligasen und zur Superfamilie der *TRIPartite Motif* (TRIM-)Ligasen gehören. Sie ähneln sich in ihrem Aufbau. N-terminal befindet sich die RING-*finger* Domäne, gefolgt von einer MuRF konservierten Region, einer Zink-Finger B-Box und Leucin-reichen gewundenen Domänen, wobei letztere der Homo- oder Heterodimerisierung dienen (Foletta et al., 2011, Centner et al., 2001). Die wesentliche Funktion von MuRF-3 wird in der Muskeldifferenzierung und der Regulation und Stabilität von Mikrotubuli vermutet (Spencer et al., 2000). Wenn auch für MuRF-3 bislang keine expliziten Interaktionen mit Sarkomerproteinen bekannt sind, so scheint es trotzdem wesentlicher Bestandteil der Proteinhomeostase quergestreifter Muskulatur zu sein. MuRF-3 und MuRF-2 *knock-out* Experimente zeigen im Mausmodell die Entstehung von Skelettmuskelerkrankungen und eine reduzierte kardiale Funktion (Lodka et al., 2016). MuRF-2 scheint an der Muskeldifferenzierung und Mikrotubulistabilisation ebenfalls beteiligt zu sein, jedoch deutlich prominenter in der Embryonalentwicklung (Perera et al., 2012, McElhinny et al., 2004). Weiterhin wird vermutet, dass MuRF-2 an der Instandhaltung der M-Linien-Region des Sarkomers beteiligt ist (McElhinny et al., 2004). Mit Titin, verschiedenen Troponinen und Teilen des Myosinfilaments wurden für MuRF-2 auch bereits *in vitro* einige potentielle Bindungspartner gefunden (Witt et al., 2005). Auch MuRF-1 bindet zahlreiche Proteine in der M-Linie des Sarkomers und scheint u.a. für die proteasomale Degradation von Troponin I und der Myosin-schweren-Kette verantwortlich zu sein (Clarke et al., 2007, Kedar et al., 2004, Witt et al., 2005). Weiterhin ist MuRF-1 zusammen mit der *Cullin*-E3-Ligase *muscle atrophy* F-box (MAFbx, bzw. Fbx32 oder Atrogin-1) wesentlich an der Balance zwischen Anabolismus und Katabolismus von Muskelzellen beteiligt. Eine Hochregulation beider Proteine führt zu Muskelatrophie (Rom und Reznick, 2016). Mehrere Signalwege ermöglichen die Steuerung dieses Gleichgewichts.

So kann über ein anaboles Signal durch den *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) die Expression von MuRF-1 und Fbx32 herunterreguliert werden, während katabole Stoffwechselfsignale die Expression steigern (Stitt et al., 2004). Fbx32 besitzt im Gegensatz zu MuRF-1 eine F-box-Domäne, die für die Substratspezifität verantwortlich ist (Bodine et al., 2001). Während MuRF-1 vorwiegend kontraktile Proteine und Strukturproteine bindet, scheint Fbx32 überwiegend mit regulatorischen Proteinen der Muskelproteinsynthese, wie dem Transkriptionsfaktor MyoD und dem Translationsfaktor eIF-3-f zu interagieren (Foletta et al., 2011, Stefanetti et al., 2015, Tintignac et al., 2005, Lagirand-Cantaloube et al., 2008). Jedoch werden auch Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin als Interaktionspartner von Fbx32 diskutiert (Lokireddy et al., 2012). Eine weitere RING-E3-Ligase namens *Murine double minute 2* (Mdm2) ist hauptsächlich durch ihren Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation durch Interaktion mit dem Regulator p53 bekannt (Willis und Patterson, 2006). Mdm2 inhibiert p53, sorgt für dessen Kernexport und Ubiquitinierung und leitet damit den Abbau durch das Proteasom ein (Momand et al., 1992, Haupt et al., 1997). Auch Interaktionen mit einigen weiteren Proteinen sind bekannt, u.a. mit dem Z-Scheiben Protein Telethonin/*Titin cap* (TCap) (Tian et al., 2006). In Kardiomyozyten wirkt Mdm2 Hypertrophie und Apoptose entgegen (Toth et al., 2006). Stub-1 bzw. CHIP (*C-terminus of Hsp70 interacting protein*) besitzt keine RING-Domäne sondern eine U-Box, eine Sonderform der RING-Domäne ohne koordinierte Zinkionen. CHIP bindet beschädigte Proteine in Assoziation mit Chaperonen und sorgt für deren Neufaltung oder Degradation über das Proteasom durch seine E3-Ligase-Aktivität (McClellan und Frydman, 2001, Murata et al., 2001). Ähnlich wie Mdm2 ist auch CHIP an der Degradation von p53 beteiligt (Esser et al., 2005). Im Herzmuskel ist CHIP als Protektionsfaktor bei kardialer Ischämie beschrieben (Willis und Patterson, 2006, Zhang et al., 2005). Darüber hinaus bildet CHIP zusammen mit BAG-3 (*BAG family molecular chaperone regulator 3*), dem Hitzeschockprotein Hsc70 und dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8 einen Komplex, der Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) ermöglicht (Arndt et al., 2010). Über diesen sog. CASA-Komplex ist CHIP an der Degradation diverser Sarkomerproteine, insbesondere im Bereich der Z-Scheibe, beteiligt. Darunter finden sich das Strukturprotein  $\alpha$ -Aktinin, das Aktin-bindende Protein Filamin C (Arndt et al., 2010, Martin et al., 2021).

### 1.3.2 Autophagie

Die Autophagie ist ein kataboler Prozess zur Degradation von Proteinen, Proteinkomplexen oder -aggregaten und Zellorganellen und dient neben der zellulären Energiehomöostase auch der Proteinqualitätskontrolle (Mizushima et al., 2008, Wang und Klionsky, 2011). Sie ist essenziell für die Anpassungsfähigkeit und das Überleben von Zellen sowohl unter Ruhe-, als auch unter Stressbedingungen (Mizushima et al., 2008). Man unterscheidet zwischen Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelter Autophagie. Im Folgenden wird nur die Makroautophagie als Prozess zur Degradation zellulärer Strukturproteine genauer betrachtet und nur noch als Autophagie bezeichnet. Durch Formierung einer Doppellipidmembran wird das abzubauenende Substrat eingehüllt. Die anschließende Fusion dieses sogenannten Autophagosoms mit einem Lysosom ermöglicht den Abbau des Substrats durch lysosomale Enzyme (Abb. 6).



**Abb. 6: Prozess der Autophagie.** Eine sich formierende Phagophore umschließt abzubauenende Zellorganellen, Proteinaggregate oder Proteine mit einer Doppellipidmembran. Dies kann sowohl ungezielt als auch gerichtet durch Erkennung von Polyubiquitinketten geschehen. p62 vermittelt das polyubiquitinierte Substrat zu der Phagophore. Der Verschluss der Membran führt zur Formierung eines Autophagosoms, das mit einem Lysosom verschmilzt. Die lysosomalen Enzyme bauen den gesamten Inhalt des Autolysosoms ab.

Die einzelnen Bestandteile des Substrats können anschließend wiederverwertet werden oder der Energiegewinnung dienen. An der Bildung der Isolationsmembran, auch Phagophore genannt, sind eine Reihe von Proteinen und Proteinkomplexen beteiligt. Es sind über 35 Autophagie-assoziierte (ATG) Proteine bekannt, die die Initiation und Bildung der Membran verantworten (Sciaretta et al., 2018). Der sogenannte Ulk-Komplex (enthält *unc-51-like*

*autophagy-activating kinase* = ULK) aktiviert zunächst einen weiteren Proteinkomplex, der durch Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) und die damit einhergehende Rekrutierung weiterer ATG-Proteine für das Wachstum der Membran sorgt (Russell et al., 2013, Sciaretta et al., 2018). Weiterhin wird das im Zytoplasma vorhandene *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) in die Membran eingebaut und mit Phosphatidylethanolamin konjugiert, sodass das lipidierte LC3-II entsteht (Sciaretta et al., 2018). LC3-II ist unter anderem an der Substratrekrutierung beteiligt. So können verschiedene Adapterproteine, wie p62 und Nbr1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) gleichzeitig LC3-II und polyubiquitinierte Substrate binden, die damit durch Autophagie abgebaut werden (Johansen und Lamark, 2011). Letztendlich sorgt eine Kaskade weiterer Proteine für den Verschluss des Autophagosoms. Über unterschiedliche *SNARE*-Proteine erfolgt die Fusion mit einem Lysosom und der darauffolgende Abbau der Substrate (Nair et al., 2011). Autophagie ermöglicht so die Degradation ganzer Organellen, den Abbau von Proteinaggregaten oder den gezielten Abbau polyubiquitinerter Proteine (Johansen und Lamark, 2011, Lamark und Johansen, 2012). In letzterem Fall stellt eine lineare Verknüpfung der Polyubiquitinkette über den 63. Lysinrest (Lys<sup>63</sup>, K63) ein Signal für den proteasomalen Abbau des markierten Proteins dar (Tan et al., 2008).

### **1.3.3 Calpaine**

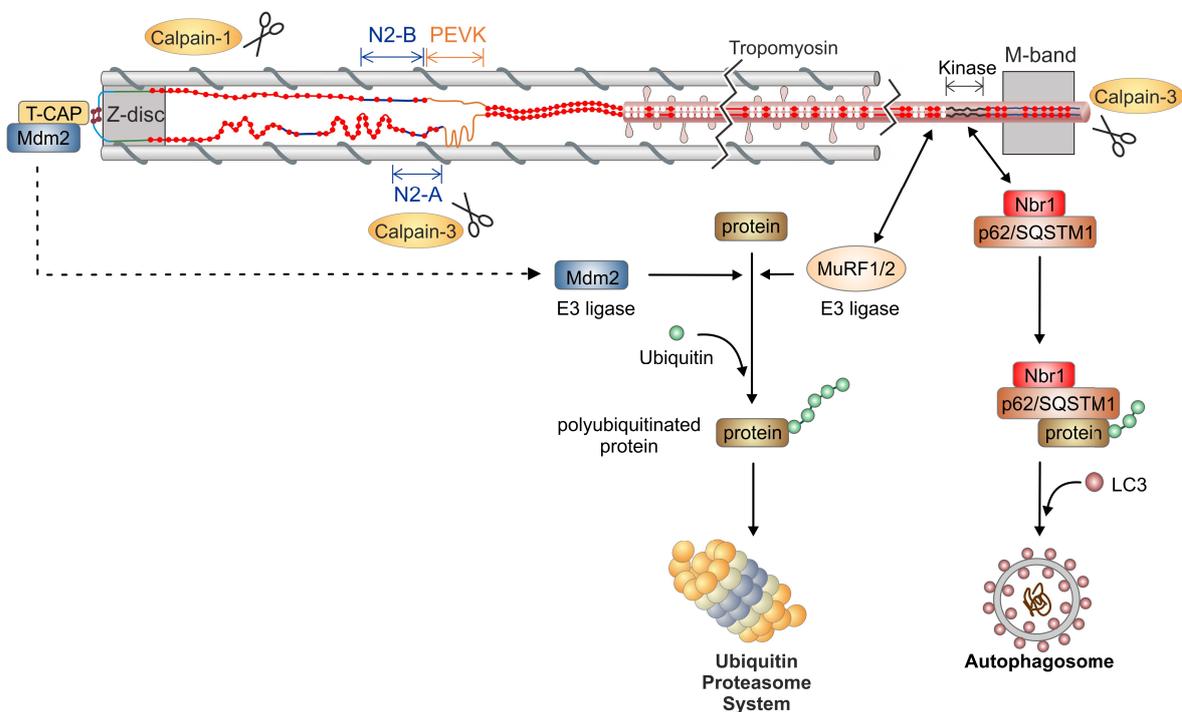
Die Calpaine sind eine Familie aus verschiedenen Cysteinproteasen, die als weiteres System für Calcium-abhängige Proteolyse im Muskel verantwortlich sind (Costelli et al., 2005). Für die Calpaine 1 und 2 wurde bereits eine Degradation unterschiedlicher Myofilamente nachgewiesen (Whipple und Koochmaraie, 1991). Die Calpaine werden als potentieller Initiator der Proteindegradation in Muskelzellen diskutiert (Costelli et al., 2005). So scheinen sie eine Art Vorverdau der Sarkomerkomplexe durchzuführen, um eine anschließende Proteindegradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System oder Autophagie zu ermöglichen (Portbury et al., 2011). Calpain 3 ist eine im Wesentlichen Skelettmuskel-spezifische Protease. Neben der proteolytischen Funktion spielt Calpain 3 auch für den Calcium-Haushalt und das Muskel-*Remodeling* eine wichtige Rolle (Chen et al., 2021).

### **1.3.4 Proteinqualitätskontrolle des Titinfilaments**

Die Proteinqualitätskontrolle des Titinfilaments stellt auf Grund seiner beachtlichen Größe eine Herausforderung für Muskelzellen dar. Wie genau Titin in das Sarkomer integriert oder

aus dem Sarkomer entfernt und degradiert wird, ist weiterhin größtenteils unbekannt. Aufgrund vieler bekannter Proteininteraktionen wird Titin allerdings als ein Knotenpunkt der sarkomerischen Proteinqualitätskontrolle vermutet (Kötter et al., 2014). Der Austausch eines Titinfilaments nimmt ca. 14 h in Anspruch und die Halbwertszeit liegt bei 3-5 Tagen (da Silva Lopes et al., 2011, Isaacs et al., 1989). Die Translation der Titin-mRNA scheint gehäuft an der Z-Scheibe bzw. im I-Band des Sarkomers stattzufinden (Rudolph et al., 2019). Die Hypothese, dass das Titinfilament schrittweise zunächst in die Z-Scheibe und dann in die M-Linie integriert wird, wird durch die aktuellen Daten von Rudolph et al. in Frage gestellt, bei denen Fluoreszenzprotein-gekoppeltes Titin in *knock-in* Mäusen beobachtet wurde (Rhee et al., 1994, Du et al., 2008, Rudolph et al., 2019). Titin wird hiernach als intaktes Filament in das Sarkomer integriert und vermutlich auch nicht stückweise aus dem Sarkomer entfernt (Rudolph et al., 2019). Zur Verfügung steht hierfür ein Pool von löslichem Titin im Zytoplasma, das ca. 15 % des Gesamt-Titins ausmacht (Rudolph et al., 2019). Wie exakt Titin jedoch degradiert wird, bleibt weiterhin unklar. Eine Vielzahl von Interaktionsstudien lässt eine Verbindung von Titin zu den wesentlichen Proteindegradationsmechanismen vermuten. Die E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 binden *in vitro* an die Titin-Region A168-170 im A-Band des Sarkomers (Witt et al., 2005). Mdm2 bindet als weitere E3-Ligase das Protein Telethonin/*Titin cap* (TCap), welches wiederum mit der Z-Scheiben-Region von Titin interagiert (Tian et al., 2006, Gregorio et al., 1998). Außerdem lässt sich Titin-Ubiquitinierung nachweisen und es werden verschiedene Ubiquitinierungsstellen im A-Band und im I-Band vermutet (Witt et al., 2005). Hierüber lässt sich eine Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System annehmen (Kötter et al., 2014). Weiterhin zeigt die Titin-Kinase eine Affinität zu dem Adapterprotein Nbr1, welches mit p62 und MuRF-2 wahrscheinlich einen Signalkomplex in dieser Region bildet (Lange et al., 2005). Über p62 ist sowohl eine proteasomale Degradation von polyubiquitiniertem Titin als auch der Abbau durch Autophagie über eine Interaktion mit LC3 denkbar (Kötter et al., 2014, Seibenhener et al., 2007, Pankiv et al., 2007, Waters et al., 2009). Neuere Studien zeigen außerdem, dass MuRF-1 Titin im Bereich der Kinase-Region ubiquitiniert und hier ebenfalls einen Signalkomplex aus Nbr1 und p62 rekrutiert (Bogomolovas et al., 2021). Letzteres lässt gleichermaßen eine Degradation durch Autophagie vermuten. Das Calpain-System scheint in der Degradation des Titinfilaments auch eine Rolle zu spielen. Die Calcium-abhängige Protease Calpain-1 zeigt Affinität zu den proximalen Ig-Domänen des Filaments, wohingegen Calpain-3 sowohl an der N2A-Region,

als auch in der M-Linie bindet (Raynaud et al., 2005, Hayashi et al., 2008). Calpain 3 ist in der Lage, Titin an verschiedenen Stellen zu binden und zu schneiden. So werden beispielsweise mehrere Schnittstellen im C-terminalen Bereich des Moleküls beschrieben (Charton et al., 2015). Möglicherweise dienen diese Proteasen einer Art Vorverdau des großen Proteins, welcher einen anschließenden Abbau durch die weiteren Proteindegradationsmechanismen ermöglicht (Kötter et al., 2014). Schlussendlich kann auch die Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2) Titin im Falle eines Schadens durch Ischämie und Reperfusion an der Z-Scheibe schneiden (Ali et al., 2010). Abbildung 7 stellt die einzelnen Interaktionen schematisch dar.



**Abb. 7: Verbindung von Titin zu den Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle.** Titin interagiert in der Region A168-170 N-terminal der Titin-Kinase mit den E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 *in vitro* (Witt et al., 2005). Mdm2 interagiert indirekt über Telethonin (T-CAP) mit der Z-Scheiben-Region von Titin (Gregorio et al., 1998, Tian et al., 2006). Polyubiquitinierung durch diese Ligasen stellt eine potentielle Verbindung zu proteasomaler Degradation dar. Calpaine interagieren ebenfalls mit unterschiedlichen Titinregionen. Die Affinität von Nbr1 zu der Titin-Kinase stellt über p62 einen möglichen *Link* zu Autophagosomen dar. (Verändert nach (Kötter et al., 2014)).

## 1.4 Zielsetzung

Wenn auch bereits einige Hypothesen existieren, ist der exakte Ablauf des Titin-Turnover nach wie vor unbekannt. Es lässt sich vermuten, dass Titin über verschiedene Systeme der Proteinqualitätskontrolle degradiert wird, über das Ubiquitin-Proteasom-System, durch Autophagie und Proteasen wie Calpaine und die MMP-2. Titin wird vermutlich an mehreren Stellen von E3-Ubiquitin-Ligasen ubiquitiniert und somit für den Abbau markiert. Die Vielzahl der bekannten E3-Ubiquitin-Ligasen und die Größe des Filaments legen nahe, dass mehrere E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Molekül interagieren. Um herauszufinden, welche E3-Ubiquitin-Ligasen potenziell für die Titin-Ubiquitinierung und damit indirekt für die Degradation des Filaments verantwortlich sind, wurden verschiedene Titin-Fragmente und sechs E3-Ubiquitin-Ligasen rekombinant synthetisiert und durch GST-Pulldown-Experimente auf Proteininteraktionen überprüft. Im Fokus standen hierbei die E3-Ligasen der MuRF-Familie, MuRF-1, -2 und -3, sowie Fbx32, Mdm2 und CHIP, die auf Interaktionen mit der N2A-, N2B-, PEVK- und Titin-Kinase-Region, sowie den Domänen A168-170 getestet werden sollten. Die bereits bekannten Affinitäten von MuRF-1 und MuRF-2 zu den Titin-Domänen A168-170 sollten durch diesen Versuchsansatz verifiziert und neue Interaktionspartner identifiziert werden (Witt et al., 2005). Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, stellten alle untersuchten E3-Ubiquitin-Ligasen sehr vielversprechende Interaktionspartner dar. Zusätzlich zu den *in vitro* Interaktionstests sollten Immunfluoreszenzfärbungen der E3-Ubiquitin-Ligasen an kultivierten adulten Rattenkardiomyozyten Aufschluss über deren Lokalisation geben und die Interaktionsstudien untermauern. Ein weiterer Versuchsansatz diente der genaueren Aufschlüsselung der Desintegration und Integration des Titinfilaments aus bzw. in Sarkomere(n). Es ist bekannt, dass sich adulte Kardiomyozyten in Langzeitzellkultur umfassend morphologisch verändern und auch Sarkomerstrukturen abgebaut und wiederaufgebaut werden (Volz et al., 1991, Horackova und Byczko, 1997). Zunächst sollten durch Immunfluoreszenzfärbungen von  $\alpha$ -Aktinin und Ubiquitin während dieses Prozesses der Proteinumsatz, insbesondere von Sarkomerstrukturen, beobachtet werden. Schlussendlich sollte die detaillierte Beobachtung des Titinfilaments durch Immunfluoreszenzfärbung unterschiedlicher Titin-Epitope Aufschluss darüber geben, ob Titin als Ganzes oder sequentiell aus dem Sarkomer entfernt wird und wie genau die Integration des Moleküls vonstattengeht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstamm

Tabelle 1: Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> NEB Express	<i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet<sup>S</sup>) endA1 D(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs

#### 2.1.2 Nährmedien

##### 2.1.2.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

Tabelle 2: Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium (gelöst in 1 l Wasser):	LB-Medium Agar (gelöst in 1 l Wasser):
25 g LB-Medium (Luria/Miller, Roth <sup>®</sup> )	25 g LB-Medium (Luria/Miller, Roth <sup>®</sup> ) 15 g Agar (Bacto <sup>™</sup> Agar, Becton Dickinson)

## 2.1.2.2 Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

Tabelle 3: Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

Kulturmedium I (Vollmedium)	Kulturmedium II (Hungermedium)
89 % (v/v) Medium 199 Earle's (Merck)	98 % (v/v) Medium 199 Earle's (Merck)
10 % (v/v) FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) superior (Merck)	1 % (v/v) FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) superior (Merck)
1 % (v/v) Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) (Merck)	1 % (v/v) Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml) (Merck)
5 mM Kreatin	5 mM Kreatin
2 mM Carnitin	2 mM Carnitin
5 mM Taurin	5 mM Taurin
10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
5 mg/ml Blebbistatin	

## 2.1.3 Enzyme

### 2.1.3.1 Restriktionsenzyme

Tabelle 4: Restriktionsenzyme

Enzymname	Schnittstelle	Hersteller
EcoRI	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'	New England Biolabs
XhoI	5'-C TCGAG-3' 3'-GAGCT C-5'	New England Biolabs
Sall	5'-G TCGAC-3' 3'-CAGCT G-5'	New England Biolabs
NotI	5'-GC GGCCGC-3' 3'-CGCCGG CG-5'	New England Biolabs

### 2.1.3.2 Weitere Enzyme

Tabelle 5: Weitere Enzyme

Bezeichnung	Enzymklasse	Hersteller
Kollagenase Typ II	Protease	Merck
Lysozym	Glykosidase	Sigma
Protease aus <i>Streptomyces griseus</i>	Protease	Sigma
Thrombin	(Serin-)Protease	Sigma
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs
VentR®-DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	New England Biolabs

### 2.1.4 Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti $\alpha$ -Aktinin	1:1.000 (IF)	Sigma
Anti Atrogin-1 (Fbx32)	1:50 (IF)	ECM Biosciences
Anti Mdm2	1:50 (IF)	Abcam
Anti MuRF-1 (TRIM63)	1:200 (IF)	Millipore
Anti MuRF-2 (TRIM55)	1:50 (IF)	Abcam
Anti MuRF-3 (TRIM54)	1:50 (IF)	Acris
Anti Proteasom 19S Rpt2/S4	1:100 (IF)	Enzo Life Sciences
Anti STUB-1 (CHIP)	1:200 (IF)	Abcam
Anti Titin A168-170	1:5000 (WB)	Myomedix
Anti Titin-Kinase	1:500 (IF) 1:2000 (WB)	Myomedix
Anti Titin M8-M10	1:500 (IF)	Myomedix
Anti Titin N2A	1:200 (IF) 1:5000 (WB)	Myomedix

Anti Titin N2B	1:5.000 (WB)	Eurogentec
Anti Titin PEVK	1:500 (IF) 1:20.000 (WB)	Eurogentec
Anti Titin Z1Z2	1:200 (IF)	Myomedix
Anti-Ubiquitin	1:500 (IF)	Cell Signaling

IF = Immunfluoreszenz; WB = *Western Blot*.

**Tabelle 7: Sekundärantikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-goat IgG Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	1:500	Cell Signaling
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 555	1:500	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	1:500	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555	1:500	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG (HRP-gekoppelt)	1:5000	Cell Signaling

## 2.1.5 Prokaryotische Expressionskonstrukte

**Tabelle 8: Prokaryotische Expressionskonstrukte**

<b>Insert</b>	<b>Vektor</b>
MuRF-1	pGEX4T1
CHIP (Stub-1)	pGEX4T1
Titin PEVK	pGEX4T1
Titin N2A	pGEX4T1
Titin N2B (Exon 49)	pGEX4T1

Hergestellt von Herrn Dr. Sebastian Kötter und Frau Dr. Senem Salcan.

## 2.1.6 Primer

Tabelle 9: Primer

Bezeichnung	Sequenz
5' Fbx32	AAAAGAATTCATGCCATTCCTCGGGC
3' Fbx32	TTTTCTCGAGTCAGAACTTGAACAAGTTGATAAAG
5' Mdm2	AAAAGAATTCATGTGCAATACCAACATG
3' Mdm2	TTTTCTCGAGCTAGGGGAAATAAGTTAGC
5' p62	AAAAGAATTCATGGCGTCGCTCACCGTGAAGGCCTAC
3' p62	TTTTCTCGAGTCACAACGGCGGGGGATGCTTTGAATACTG
5' Rpn10S5A	AAAAGAATTCATGGTGTGGAAAGCACTATGGTGTGTGTG
3' Rpn10S5A	TTTTCTCGAGTCACTTCTTGTCTTCCTCCTTCTTGTCTTC
5' Rpn13	AAAAGAATTCATGACGACCTCAGGCGCGCTCTTTC
3' Rpn13	TTTTCTCGAGTCAGTCCAGGCTCATGTCCTCCTCTTCG
5' Titin A168-170	AAAAGAATTC <del>CC</del> CACACTTTAAA
3' Titin A168-170	TTTTCTCGAGTCAATCTTCTTTGGT
5' Titin-Kinase	AAAAGAATTC <del>T</del> TATATGATTGCTGAAGATCTTGGGCG
3' Titin-Kinase	TTTTCTCGAGTCACAACCATGGGTGCTGGAGA

Unterstrichen sind die jeweiligen Restriktionsschnittstellen.

## 2.1.7 DNA-Fragmente

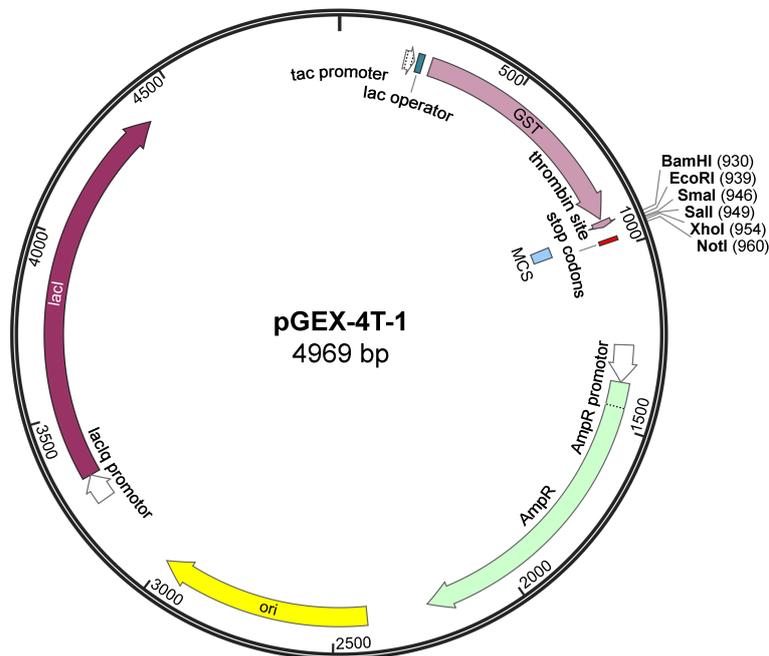
Zur Herstellung von Plasmidkonstrukten, deren Insert nicht mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion gewonnen werden konnte, wurden entsprechende DNA-Fragmente von der Firma Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) synthetisiert. Hierbei wurden zusätzlich an den Enden der DNA-Doppelstränge Restriktionsschnittstellen zur späteren Klonierung eingefügt.

Tabelle 10: DNA-Fragmente

Fragment	Restriktionsschnittstellen	Referenzsequenz
MuRF-2	SallI, NotI	NM_184085.2 (NCBI)
MuRF-3	EcoRI, XhoI	NM_187841.3 (NCBI)

### 2.1.8 Vektor pGEX4T1

Die neu hergestellten prokaryotischen Expressionskonstrukte wurden auf der Basis des pGEX4T1-Vektors (Amersham Bioscience) synthetisiert. Dieser Vektor enthält neben einer Ampicillin-Resistenzkassette einen Lac-Operator. Mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) lässt sich die Transkription aktivieren. Der Promotorregion folgt das Gen für die 27 kDa große Glutathion-S-Transferase, der sich die multiple Klonierungsstelle (MCS = *multiple cloning site*) anschließt. Dazwischen befinden sich der Code für eine Thrombinschnittstelle und anschließend mehrere Stoppcodons.



**Abb. 8: Vektorkarte pGEX-4T-1.** Hervorgehoben sind die sechs Restriktionsschnittstellen der MCS. GST = Glutathion-S-Transferase; MCS = *multiple cloning site*; AmpR = Ampicillinresistenzkassette; ori = Replikationsursprung; lacI = lac-Repressorgen.

## 2.1.9 Chemikalien

Tabelle 11: Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid / Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Agar	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Roth
Blebbistatin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific
Capronsäure	Sigma
Carnitin	Sigma
Chloroform	Merck
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Otto Fischer GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Glukose	Merck
Glycin	Roth
Glycerol	Sigma
Harnstoff	AppliChem
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumacetat	Thermo Fisher Scientific
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Kreatin	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS = <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Polysorbat 20 (Tween <sup>®</sup> 20)	Sigma
Pyruvat	Sigma
Rubidiumchlorid (RbCl)	Merck
Salzsäure 32 %	Roth
<i>Serva-Blue</i> (Coomassie-Brilliantblau)	Serva
Taurin	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem
Thioharnstoff	AppliChem
Tricin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton <sup>™</sup> X-100	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma

## 2.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer für <i>Semi-Dry</i> Blot	300 mM Tris/HCl, pH 8,8 100 mM Tricin
Blockierlösung für Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen	2 % (w/v) BSA in TBST
<i>CUT</i> -Lösung	12,5 ml Perfusionspuffer 100 µM CaCl <sub>2</sub> 0,25 mg Protease (~ 3 U) 2.500 U Kollagenase 125 mg BSA
<i>Digest-Collagenase-Protease</i> (DCP)-Lösung	50 ml Perfusionspuffer 50 µM CaCl <sub>2</sub> 1-2 mg Protease (~ 6 U) 10.000 U Kollagenase
Entfärbelösung PVDF-Membranen	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung für PVDF-Membranen	0,075 % (v/v) <i>Serva-Blue</i> in Methanol
Harnstoffpuffer 1	100 mM Tris/HCl, pH 7,4 6 M Harnstoff 1 mM DTT
Harnstoffpuffer 2	100 mM Tris/HCl, pH 7,4 1 mM DTT
Hoch-Kalzium-Lösung	25 ml Perfusionspuffer 400 µM CaCl <sub>2</sub> 250 mg BSA
Hochsalzpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5-8,0 300 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>

	2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM DTT
Ionenaustauschchromatographiepuffer 1	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
Ionenaustauschchromatographiepuffer 2	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM KCl
Kathodenpuffer für <i>Semi-Dry</i> Blot	30 mM Tris/HCl, pH 8,7 300 mM Capronsäure
Lysispuffer	50 mM Tris/HCl, pH7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 mM DTT
Niedrig-Kalzium-Lösung	25 ml Perfusionspuffer 200 µM CaCl <sub>2</sub> 250 mg BSA
10x-Natriumdodecylsulfat (SDS-) Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS
Perfusionspuffer	130 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,25 mM MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O 0,33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM HEPES 20 mM Glukose 3 mM Pyruvat 5 mM Kreatin 2 mM Carnitin 5 mM Taurin
<i>Phosphate-Buffered-Saline</i> (PBS)	150 mM NaCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 6,8

	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3 % (w/v) SDS 0,035 % (w/v) <i>Serva-Blue</i> 10 % (v/v) Glycerol
4x SDS-Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4x SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
10x Tris gepufferte Saline + Tween (TBST)	200 mM Tris/HCl 1,5 M NaCl 1 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
50x TRIS-Acetat-EDTA (TAE-)Puffer	50 mM EDTA 2 M Tris/HCl, pH 8,0 1 M Essigsäure
Transformationspuffer 1	10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerol 30 mM Kaliumacetat, pH 5,8 100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub>
Transformationspuffer 2	10 mM 3- <i>Morpholino propane sulfonic acid</i> (MOPS), pH 7,0 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerol
Thrombinpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5-8,0 150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM DTT

Falls nicht anders angegeben, wurde vollentmineralisiertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

## 2.1.11 Laborgeräte

Tabelle 13: Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav VX-100	Systec
Brutschrank Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific
Chemilumineszenz Imager Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophoresekammer Mikro-Rapid-Kammer Elphor	Bender & Hobein
Falkonzentrifuge Rotofix 32 A	Hettich
Feinwaage AE163	Mettler
Homogenisator Tissue Ruptor	Qiagen
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors HT
Inverses Mikroskopsystem Nikon ECLIPSE Ti	Nikon
Kombischüttler SM-30	Bühler
Magnetrührer RCT Classic	IKA
Mikroskop ID03	Zeiss
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Thermo Scientific Heraeus
Mikrozentrifuge Centrifuge 5430 R	Eppendorf
Orbitalschüttler Shaker DOS 10 L	neoLab
pH-Meter MP220	Mettler Toledo
Photometer Ultrospec 5300pro	GE Healthcare
Reagenzglas-Vortex-Schüttler (444-1372)	VWR
Rollenmischer	CAT
Rotationsrad SB2	IKA
Schlauchpumpe Miniplus 3	Gilson
SDS-Gelelektrophorese System Minigel-Twin	Biometra
Spektralphotometer NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	Peqlab

Thermomixer Compact 5350	Eppendorf
Thermozykler Mastercycler® nexus gradient	Eppendorf
Tischzentrifuge Mini Star	VWR
Ultraschall-Zellaufschluss Sonifier 250	Branson Ultrasonics
Ultrazentrifuge Sorvall MX 120+ Rotor: S110-AT 2189	Thermo Scientific
UV-Lichtplatte Mighty Bright	Hoefer
Waage Kern 572	Kern
Wasserbad EcoLine 003 E100	Lauda
Wasserbad 20B	Julabo
Western Blot Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden *E. coli* des NEB<sup>®</sup>-Express-Stammes (New England Biolabs) mit Rubidiumchlorid behandelt. 200 ml LB-Medium wurden mit 200 µl einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37° C bis zu einer optischen Dichte ( $\lambda = 600$  nm) von 0,6 für ca. 2-4 h kultiviert. Anschließend wurde die Kultur 5-10 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (3000 x g, 4° C, 15 min). Das resultierende Pellet wurde darauffolgend in 150 ml Transformationspuffer I resuspendiert, für 15 min auf Eis abgekühlt und erneut für 15 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 25 ml Transformationspuffer II resuspendiert und in 200 µl Aliquots bei -80° C gelagert oder sofort verwendet.

#### **2.2.1.2 Isolation von mRNA aus Myokardgewebe**

Zur Isolation von mRNA aus Herzmuskelgewebe wurden ca. 10 mg einer Gewebeprobe in 1 ml gekühltes Trizol<sup>®</sup>-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform, mehrfacher Invertierung des Reaktionsgefäßes und erneuter Inkubation bei RT für 2-3 min wurde die Lösung zentrifugiert (12.000 x g, 4° C, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 4° C, 10 min), worauf der Überstand verworfen und das Pellet in 75% Ethanol resuspendiert wurde. Im Anschluss wurde nach einer weiteren Zentrifugation (7500 x g, 4° C, 5 min) der Überstand erneut verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl autoklaviertem Wasser wiederaufgenommen und für 10 min bei 55° C inkubiert. Anschließend wurde sie entweder direkt zur cDNA-Synthese weiterverwendet oder zur längeren Lagerung bei -80° C eingefroren.

#### **2.2.1.3 Synthese von cDNA aus mRNA**

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit der Firma QIAGEN durchgeführt. Hierzu wurde der enthaltene Primer-Mix verwendet und nach Anleitung vorgegangen. Die pro Ansatz erhaltenen 30 µl cDNA-Lösung wurden auf 50 µl mit Wasser verdünnt und anschließend entweder für eine PCR verwendet oder bei -20° C zur längeren Verwahrung eingefroren.

#### 2.2.1.4 Generierung von PCR-Primern und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Abschnitts aus der gewonnenen cDNA wurden zunächst mit Hilfe von humanen Gendatenbanken (s. Referenznummer des jeweiligen Konstrukts) und der Software *DS-Gene* 10-35 bp lange 5'- und 3'-Primer generiert. Diesen wurden zur späteren Verarbeitung Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Die Primer wurden durch die Firma Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert. Um die Konzentration von Nukleinsäurelösungen zu bestimmen, wurde das Spektralphotometer NanoDrop® ND-1000 (Peqlab) verwendet. 1 µl der jeweiligen Probe wurde auf das Messinstrument aufgetragen und die Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Neben der Konzentration wurde außerdem der Reinheitsgrad detektiert.

**Tabelle 14: Referenzsequenzen**

<b>Gen</b>	<b>Referenzsequenz</b>
Fbx32 (Atrogin-1)	NM_058229.3 (NCBI)
Mdm2	XM_005268872.5
p62	NM_003900_4 (NCBI)
Rpn10S5A	NM_002810_2 (NCBI)
Rpn13	NM_007002.3 (NCBI)
Titin	NM_001256850.1 (NCBI)

Es handelt sich bei allen Genen um humane Sequenzen.

#### 2.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der synthetisierten Primer (s. 2.2.1.4) wurde aus der gewonnenen cDNA das gewünschte Gen bzw. der gewünschte Genabschnitt mittels PCR vervielfältigt. Hierzu wurden fünf bis zehn 20 µl Ansätze mit folgenden Endkonzentrationen pipettiert:

**Tabelle 15: Ansätze der Polymerase-Kettenreaktion**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Primer	0,3 pmol/ $\mu$ l
Desoxynucleotide Solution Mix (New England Biolabs)	250 pmol/ $\mu$ l
cDNA	6 nmol/ $\mu$ l
VentR <sup>®</sup> -DNA-Polymerase (New England Biolabs)	0,04 U/ $\mu$ l
10x ThermoPol <sup>®</sup> Reaction Buffer (New England Biolabs)	1x

Die Ansätze durchliefen in einem *Thermocycler* die unten aufgelisteten Phasen. In der *Annealing*-Phase wurde ein Temperaturgradient eingestellt mit einer Spanne von 5-10° C, um mit höherer Wahrscheinlichkeit die optimale *Annealing*-Temperatur der jeweiligen Primer zu erreichen. Die ungefähr erwartete Temperatur wurde dabei vorher durch das Programm *DS-Gene* bestimmt.

**Tabelle 16: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Wiederholungen</b>
Initiale Denaturierung	95° C	2 min	-
Denaturierung	95° C	30 s	40 - 45
<i>Annealing</i>	40-70° C (variabel, Gradient)	1 min	
Elongation	72° C	1 min	
Finale Elongation	72° C	2 min	-

### 2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden 0,8% Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Um die DNA-Fragmente durch UV-Licht sichtbar machen zu können, wurde dem Gel die Nukleinsäurefärbelösung Red-Safe<sup>®</sup> (HiSS Diagnostics) in einer Verdünnung von 5 $\mu$ l/100ml hinzugefügt. Die Proben wurden mit dem 6x *Orange DNA Loading Dye* (Fermentas) versetzt und daraufhin in die Taschen pipettiert. Zur späteren

Größenbestimmung der jeweiligen Fragmente wurde der Größenmarker *O'GeneRuler 1kb* (Thermo Scientific) parallel dazu laufengelassen. Sollte ein DNA-Fragment z.B. zur Klonierung weiterverwendet werden, wurde es aus dem Agarosegel extrahiert. Hierzu wurde das *QIAquick®Gel Extraction Kit* von QIAGEN nach Herstellerangabe verwendet. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht aus dem jeweiligen Agarosegel ausgeschnitten. Für eine höhere Konzentration wurde die extrahierte DNA jedoch anschließend in 30 µl Wasser statt in den vorgegebenen 100 µl Extraktions-Puffer gelöst.

### 2.2.1.7 Restriktion

Um das PCR-Produkt in einen Vektor ligieren zu können, mussten zunächst beide Komponenten mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die jeweiligen Ansätze waren wie folgt aufgebaut:

**Tabelle 17: Restriktion**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Menge</b>
Restriktionsendonukleasen	5-10 U
<i>Template</i>	0,5-5 µg
<i>NEBuffer</i> 3.1 (New England Biolabs)	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind Tabelle 4 zu entnehmen. Das restringierte PCR-Produkt wurde durch erneute Agarosegelelektrophorese und anschließende Gelextraktion aufgereinigt.

### 2.2.1.8 Ligation

Durch den Restriktionsverdau besaßen sowohl das PCR-Produkt als auch der jeweilige Vektor zueinander komplementäre *sticky ends*. Um das PCR-Produkt in den restringierten Vektor einzufügen, wurden 20 µl Ligationsansätze nach dem unten aufgeführten Schema pipettiert und anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Das einzufügende PCR-Produkt (*Insert*) wurde im dreifachen Überschuss zum Vektor eingesetzt.

**Tabelle 18: Ligation**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Volumen</b>
T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)	1 µl
10x <i>Buffer</i> for T4 DNA-Ligase	2 µl
<i>Insert</i>	6 µl
Vektor	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	9 µl

### **2.2.1.9 Transformation**

Ein 20 µl Ligationsansatz wurde zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot kompetenter *E. coli* hinzugegeben und für 10-30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock für 90 s bei 42° C im Wasserbad wurden die Plasmide von den Bakterien aufgenommen, woraufhin sie erneut 2-3 min auf Eis gegeben wurden. Zur Erholung wurden die Bakterien mit 1 ml Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und auf einen Schüttler gegeben (120 rpm, 37° C, 1-2 h). Zur Selektion der Bakterien, die das Plasmid (inkl. Ampicillin-Resistenzgen) aufgenommen haben, wurde der Ansatz zu 20 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium hinzugefügt und über Nacht kultiviert. Aus Übernachtskulturen der genetisch veränderten Prokaryoten wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden 750 µl der Bakterienkultur mit 750 µl 40 % Glycerin in LB-Medium vermischt und bei -80° C gelagert.

### **2.2.1.10 Plasmidpräparation**

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) verwendet und nach entsprechendem Protokoll vorgegangen. Das jeweilige Bakterienpellet wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Durch Fällung und anschließendem Abzentrifugieren von chromosomaler DNA, Proteinen und Lipidbestandteilen wurde hierbei die Plasmid-DNA in Lösung separiert. Nach Fällung der Plasmid-DNA mittels Isopropanol, Waschen mit Ethanol und anschließendem Wiederaufnehmen in Wasser lag die Plasmid-DNA schlussendlich in hoher Konzentration gelöst vor.

### **2.2.1.11 Überprüfung der Expressionskonstrukte**

Die neu ligierten Plasmidkonstrukte wurden zunächst durch erneute Restriktion und Gelelektrophorese überprüft. Die Größe des herausgeschnittenen *Inserts* sollte mit der des vorher gewonnenen PCR-Produkts übereinstimmen. Um detailliertere Fehler (z.B. Punktmutationen) ausschließen zu können, wurden Proben der Plasmid-Konstrukte sequenziert. Sanger-Sequenzierungen wurden vom BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Ein anschließendes Vergleichen mit der jeweiligen Referenzsequenz ermöglichte die Darstellung einzelner Mutationen und die Analyse ihrer Konsequenzen auf die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins.

## **2.2.2 Proteinbiochemie**

### **2.2.2.1 Herstellung rekombinanter Proteine aus *E. coli***

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden entsprechend transformierte *E. coli* zunächst einer erneuten Selektion mittels Ampicillin unterzogen. Diese wurden hierzu über Nacht in 20 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag zum Animpfen einer 200-600 ml Hauptkultur verwendet. Die Kultivierung erfolgte hierbei, bis sich eine optische Dichte von 0,6 ( $\lambda=600\text{nm}$ ) einstellte, bevor 0,2 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) für die Induktion der Fusionsproteinsynthese hinzugefügt wurde. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei RT wurden die Kulturen pelletiert (4000 x g, RT, 30-60 min) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer pro 1 g Trockengewicht resuspendiert, welcher zusätzlich Lysozym in einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml und einen Proteaseinhibitoren-Mix aus Leupeptin (Endkonzentration: 120 µg/ml), Aprotinin (Endkonzentration: 5 µg/ml) und Pefablock (Endkonzentration: 100 µg/ml) enthielt. Die Lösungen wurden anschließend jeweils zwei- bis dreimal 1-2 min mit Ultraschall beschallt und dabei auf Eis gelagert, um die Temperatur der Suspension niedrig zu halten. Die Suspension wurde zunächst in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (13.000 x g, 4° C, 30-60 min) und der Überstand anschließend in einer SORVALL MX 120+ Mikro-Ultrazentrifuge (Rotor S110-AT) ultrazentrifugiert (100.000 x g, 4° C, 30-60 min), sodass unlösliche Bestandteile entfernt wurden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet verworfen.

### **2.2.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

1 ml der Glutathion HiCap Matrix (*Beads*) der Firma QIAGEN wurden zunächst in Lysis-Puffer äquilibriert und darauffolgend mit dem aus 2.2.2.1 erhaltenen Überstand für 90 min auf einem Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Das GST Fusionsprotein wurde hierbei durch die Affinität der Glutathion-S-Transferase an die *Beads* gekoppelt, sodass diese anschließend über eine Säule (10 µm Porengröße) gefiltert werden konnten. Nicht an die Matrix gebundene Proteine wurden durch drei bis viermaliges Waschen mit Hochsalzpuffer von den *Beads* entfernt, welche anschließend in Thrombinpuffer äquilibriert wurden. Den nun in 1 ml Thrombinpuffer gelösten Sepharose-*Beads* wurden 20 U Thrombin hinzugegeben, um durch Inkubation auf dem Rotationsrad bei 4° C über Nacht die Fusionsproteine an der Schnittstelle zwischen GST-*Tag* und dem eigentlichen Protein zu durchtrennen. Hierzu wurde am folgenden Tag die Lösung erneut auf eine Säule gegeben und dabei der Durchfluss gesammelt, der dann das reine Protein enthielt. Die Zugabe von para-Aminobenzamidin-Agarose-Beads der Firma Sigma ermöglichte das Entfernen des Thrombins.

### **2.2.2.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus aufgeschlossenen Bakterienpellets**

Sollte ein GST-Fusionsprotein nach dem wie in 2.2.2.1 beschriebenen Zellaufschluss und der darauffolgenden Zentrifugation vollständig in das Pellet abzentrifugiert worden sein, wurde zunächst der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Harnstoffpuffer (6M Harnstoff, 100 mM TRIS/HCL, 1 mM DTT, pH 7,4) pro 200 mg Trockengewicht resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die Suspension zentrifugiert (40.000 x g, RT, 10 min) und der Überstand gesammelt. Das Fusionsprotein befand sich in denaturierter Form im Überstand frei von unlöslichen Bestandteilen wie Lipiden. Um das Protein wieder in die native Form zurückzuführen und eine erneute Faltung zu ermöglichen, wurde der Überstand schrittweise in harnstofffreien Puffer (100 mM TRIS, 1 mM DTT, pH 7,4) zurückdialysiert. Die Harnstoffkonzentrationen wurden hierbei in zwei Stunden Schritten in jedem Schritt verringert (3M, 1,5 M, 0,75 M, 0,375M, 0M). Im Anschluss wurde das Protein wie in 2.2.2.2 beschrieben an die Glutathion-Matrix gekoppelt und ggf. durch Thrombin geschnitten.

### **2.2.2.4 Ionenaustauschchromatographie**

Gereinigte Proteine, die nach o.g. Vorgehen trotzdem noch mit anderen Proteinen kontaminiert waren, wurden durch Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Hierzu wurde die Proteinlösung auf Säulen mit 10 µm Porengröße über

Anionen- (Q Sepharose<sup>TM</sup> High Performance) oder Kationenmatrix (SP Sepharose<sup>TM</sup> High Performance) der Firma GE Healthcare gespült und der Durchfluss gesammelt. Je nach Eigenladung der Proteine blieben diese entweder an der Matrix hängen oder flossen hindurch. Die Matrix wurde darauffolgend mit Puffern aufsteigender Kaliumchloridkonzentrationen gespült, beginnend mit 50 mM KCl und in 50 mM Schritten aufsteigend bis 500 mM KCl (zusammengesetzt aus den Ionenaustauschchromatographie-Puffern I und II). Der jeweilige Durchfluss wurde aufgefangen und anschließend mittels SDS-Page Gelelektrophorese analysiert. Die Durchflüsse der KCl-Konzentrationen, bei denen sich das gewünschte Protein möglichst rein gelöst hat, wurden anschließend vereinigt und die Kontaminierten verworfen.

#### **2.2.2.5 Dialyse von Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von D-Tube<sup>TM</sup> Dialyzer der Firma Merck in andere Puffer überführt. Hierbei wurden die Proteinlösungen in Dialysierer entsprechender Größe gegeben und in mindestens 1000-facher Menge des gewünschten Puffers unter ständiger Durchmischung bei 4° C dialysiert. Die gereinigten Proteine wurden so z.B. für Interaktionstests in gleiche Puffer äquilibriert.

#### **2.2.2.6 SDS-Page Gelelektrophorese und Färben von SDS-Gelen**

Durch eine *SDS-Page* Gelelektrophorese wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, um anschließend weiter analysiert zu werden. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele waren aufgeteilt in ein Sammelgel mit den Probenaschen und dem sich anschließenden Trenngel, das der eigentlichen Auftrennung der Proteine diente. Sammelgel und Trenngel waren wie folgt zusammengesetzt:

**Tabelle 19: Zusammensetzung SDS-Page Gele**

<b>Lösung</b>	<b>10 % (TG)</b>	<b>12,5 % (TG)</b>	<b>15 % (TG)</b>	<b>4 % (SG)</b>
30 % Acrylamidlösung	2,5 ml	3,125 ml	3,75 ml	0,333 ml
H <sub>2</sub> O	3,125 ml	2,5 ml	1,875 ml	1,512 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	-
4x SDS-Sammelgelpuffer	-	-	-	0,625 ml
TEMED	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl	7,5 µl
APS (100 mg in 1 ml H <sub>2</sub> O)	37,5 µl	37,5 µl	37,5 µl	25 µl

TG = Trenngel; SG = Sammelgel. Alle Angaben beziehen sich auf ein Gel.

Die Gele wurden 1 mm breit in Glasplatten der Firma Biometra gegossen und polymerisierten dort aus. Anschließend wurden sie in Gelkammern der Firma Biometra beladen und mit Laufpuffer versetzt. Die Proben wurden vorher mit Probenpuffer vermischt und für 2-3 min bei 95° C aufgekocht. Das enthaltene *SDS (sodium dodecyl sulfate)* bindet an Proteine und sorgt für eine negative Ladung der gebildeten Komplexe in einem konstanten Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. Durch das Anlegen einer Spannung liefen die Proteine im Gel parallel zu dem *PageRuler Plus Prestained* (Thermo Fisher Scientific) Größenmarker, sodass am Ende die Größe der Proteine bestimmt werden konnte. Die fertig gelaufenen *SDS-Gele* wurden aus den Glasplatten gelöst, gefärbt oder in *Western-Blots* weiterverwendet. Zum Färben wurden sie in Coomassie-enthaltende *Imperial<sup>TM</sup> Protein Stain* Lösung der Firma Thermo Fisher Scientific gegeben. Darin wurde das Gel auf einem Schüttler für 30-60 min inkubiert und anschließend für einige Stunden mit Wasser gewaschen, sodass nicht gebundener Farbstoff entfernt wurde und die Proteinbanden klar abgrenzbar waren. Mit dem Chemilumineszenz Imager Fusion FX wurden anschließend Bilder aufgenommen.

### **2.2.2.7 Western-Blot**

Mittels *Western-Blot* wurden Proteine von SDS-Gelen zur weiteren Analyse durch Immundetektion auf PVDF-Membranen übertragen. Durchgeführt wurde dieser mit dem *Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>TM</sup> Transfer System* der Firma Bio-Rad. Hierzu wurden zunächst fünf in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere auf dem Boden der Kammer positioniert, darauf die in Ethanol aktivierte PVDF-Membran, darüber das Gel und oben aufliegend fünf in

Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Entfernen der Luftblasen wurde die Kammer geschlossen und für 12 min Strom (20 V, 1,5 A) angelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran zur Kontrolle der Übertragung mit Färbelösung für PVDF-Membranen für 10 s gefärbt und mit Entfärbelösung der Hintergrund entfernt. Bei gelungenem Proteintransfer wurde die Membran nun drei- bis viermal mit TBST-Lösung gewaschen. Alle freien Bindungsstellen auf der zu analysierenden PVDF-Membran wurden daraufhin blockiert, indem die Membran für mindestens 1 h in Blockierlösung inkubiert wurde. Nach Entfernen der Blockierlösung konnte die Membran nun mit einem primären Antikörper versetzt werden, der das gewünschte Protein auf der Membran binden sollte. Dieser wurde in 0,5 % BSA in TBST entsprechend Tabelle 6 verdünnt. Nach Inkubation auf einem Rollmischer über Nacht bei RT wurde der nicht gebundene Primärantikörper durch drei Waschschriffe mit TBST entfernt. Für 1,5-2 h wurde die Membran daraufhin mit einem Sekundärantikörper auf dem Rollmischer inkubiert, gefolgt von weiteren drei Waschschriffen. Der verwendete Sekundärantikörper band den Primärantikörper und war außerdem mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Die Membran wurde anschließend mit WESTAR ETA C Ultra 2.0, einem Chemilumineszenzsubstrat der Firma BioScience, versetzt. Die Meerrettichperoxidase katalysierte hier die Chemilumineszenzreaktion, die mit Hilfe des Fusion FX *Imager* der Firma Vilber detektiert werden konnte.

#### **2.2.2.8 Interaktionsstudien mit GST-Pulldown-Experimenten**

Um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, wurden GST-Pulldown-Interaktionstests durchgeführt. Hierzu wurden rekombinante Proteine nach o.g. Methoden aufgereinigt, wobei einer der beiden potentiellen Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein an den Sepharose-Beads gebunden blieb und der jeweils andere nach Thrombinverdau als möglichst reines Protein in Thrombinpuffer vorlag. Das gelöste Protein wurde zudem an den Beads gebundenen Protein hinzugegeben und für 1 h auf einem Rotationsrad bei 4° C inkubiert. Die Beads wurden daraufhin abzentrifugiert (1000 x g, 4° C, 1 min) und der Überstand verworfen, nachdem daraus eine Probe genommen wurde. Die Beads wurden anschließend viermal mit Thrombinpuffer gewaschen, wobei jedes Mal Proben des Überstands genommen wurden. Sollte zwischen den Proteinen eine Interaktion bestehen, sollte das in Thrombinpuffer gelöste Protein nun immer noch an seinem Interaktionspartner an den Sepharose-Beads assoziiert vorliegen, jedoch nicht mehr im Überstand vorhanden sein. Um dies zu überprüfen, wurde der anfängliche Überstand, die Proben der einzelnen

Waschschritte und die *Beads* mittels Gelelektrophorese, Western-Blot und Immundetektion weiter analysiert. Unter Verwendung der jeweiligen Antikörper wurde untersucht, ob das in Lösung vorhandene Protein mit dem Fusionsprotein interagiert hat.

## **2.2.3 Zellkulturmethoden**

### **2.2.3.1 Präparation und Kultivierung adulter Rattenkardiomyozyten**

Männliche Wistar-Ratten wurden mit 1,5-2 ml Isofluran (Piramal Healthcare) volatil anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung des kranialen Abdomens und Durchtrennung des Diaphragmas wurden der Thorax und das Perikard freigelegt. Die Tötung und Organentnahme erfolgten durch fachkundige, geschulte Mitarbeiter gemäß der „Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz- Versuchstierverordnung - TierSchVersV)“. Das Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf lautet O29/11. Heparininjektionen (Heparin-Natrium, Braun) in beide Ventrikel verhinderten die Koagulation des Blutes. Das Herz wurde inklusive Aorta ascendens entnommen und kurz in Perfusionspuffer gespült. Das Herz wurde über die Aorta an einer Langendorfanlage aufgehängt und mit heparinisierendem, oxygeniertem Perfusionspuffer für ca. 5 min bei 27-30 ml/min gespült, bis der Durchfluss klar wurde. Im Anschluss wurde das System 1 min lang in oxygeniertem DCP-Puffer äquilibriert, der darauffolgend bis zu 30 min (je nach Herzgewicht) im System rotierte. Protease und Kollagenase dienten dem Verdau der extrazellulären Matrix. Das Herz nahm hierbei eine weiche Konsistenz und hellrosa Farbe an und wurde von der Anlage abgenommen. Der mechanischen Zerkleinerung durch Pinzetten folgte eine 15-minütige Inkubation des Gewebes in *CUT*-Lösung. Währenddessen wurde das Gewebe alle 5 min durch Auf- und Abpipettieren mit Pasteurpipetten verschiedener Größen weiter zerkleinert und die Zellen vereinzelt. Die Lösung wurde anschließend durch ein Zellsieb (200 µm Porengröße) gefiltert, um unverdaute Gewebestücke zu entfernen und anschließend zentrifugiert (500g, 2 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zunächst in Niedrig-Kalzium-Lösung resuspendiert. Anschließend an eine erneute Zentrifugation wurden die Zellen in Hoch-Kalzium-Lösung resuspendiert und letztendlich in Kulturmedium I im Brutschrank bei 37° C kultiviert. Letzteres wurde vorher steril filtriert und enthielt Blebbistatin, einen Myosin-Inhibitor zur Unterbindung der Kontraktion. Die Suspension wurde in 24-Well-

Zellkulturschalen gegeben, die vorher mit Deckgläschen bestückt wurden. Die Deckgläschen wurden mit jeweils 50 µl Laminin-Lösung (100 µl Laminin in 5 ml Medium 199) beschichtet, für 2 h bei 37° C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Von der aus der Präparation erhaltenen Lösung mit adulten Rattenkardiomyozyten wurden 500 µl in jedes *Well* verteilt, sodass sich die überlebenden Kardiomyozyten auf den Deckgläschen absetzen konnten. Die Zellen erholten sich zunächst 24 h im o.g. Medium. Daraufhin wurden sie für bis zu 20 Tage in Kulturmedium II weiter kultiviert. Hierbei diente regelmäßiges Spülen mit dem Kulturmedium zum einen dem Entfernen abgestorbener Zellen und zum anderen der kontinuierlichen Versorgung mit Nährstoffen. In den ersten drei bis vier Tagen wurde täglich das Medium erneuert, anschließend jeden zweiten bis dritten Tag.

### **2.2.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie adulter Rattenkardiomyozyten mussten diese zunächst auf Deckgläschen fixiert werden. Hierzu wurden die Deckgläschen 30 min mit 2 %iger Paraformaldehyd (PFA-)Lösung versetzt. Die fixierten Zellen wurden anschließend direkt gefärbt oder bei 4° C gelagert. Zur Darstellung verschiedener Proteine/Proteinabschnitte in den adulten Rattenkardiomyozyten wurden die fixierten Zellen mit Fluoreszenzantikörpern gefärbt. Spezifische Primärantikörper gegen ein gewisses Zielprotein wurden hierbei mit Alexa Fluor 488 oder 555 Sekundärantikörpern gekoppelt, welche mit Licht entsprechender Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt wurden. Hierzu wurden die Zellen vorab mit 3 % Triton in PBS für 5 min bei RT permeabilisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Permeabilisierte Zellen wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Waschung mit PBS wurden entsprechende Sekundärantikörper zu den Zellen hinzugegeben und inkubiert (2 h, RT). Der anschließenden zweistündigen Inkubation im Dunkeln bei RT folgten erneut mehrere Waschstufen mit PBS. Anschließend wurden die Deckgläschen mittels des Einbettmediums *ProLong<sup>TM</sup> Gold antifade reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) auf Objektträger eingedeckelt. Mikroskopiert wurden die Präparate mit dem Nikon ECLIPSE Ti-Mikroskop mit bis zu 1000-facher Vergrößerung.

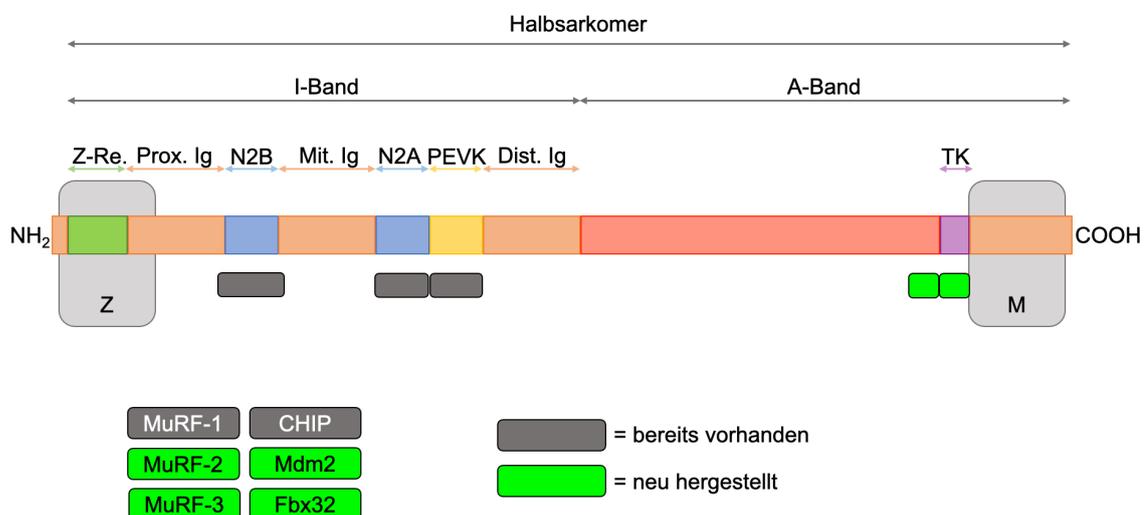
## 2.2.4 Software und Statistik

Zur Planung von Klonierungsexperimenten wurde das Programm DS-Gene<sup>®</sup> verwendet. Hier wurden Primer *designt* und schließlich das sequenzierte Konstrukt mit der Referenzsequenz abgeglichen. Vektorkarten der Plasmide wurden mit SnapGene<sup>®</sup> angefertigt. Abbildungen mit Polyacrylamid-Gelen, *Western-Blots* oder Immunfluoreszenzbildern wurden mit Adobe Photoshop<sup>®</sup> CS6 erstellt und bearbeitet. Hiermit wurden außerdem Sarkomerlängen bestimmt, die in Microsoft Excel<sup>®</sup> 2019 aufgelistet und gemittelt wurden. Statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism<sup>®</sup> durchgeführt und graphisch dargestellt. Verwendete statistische Tests sind in der jeweiligen Figurenlegende angegeben. Schemaabbildungen wurden eigenständig mit Microsoft PowerPoint<sup>®</sup> 2019 oder CorelDRAW<sup>®</sup> entworfen. Dies betrifft alle nicht explizit zitierten und lizenzierten Abbildungen. Die durchgeführten Proteinreinigungen wurden mindestens dreimalig aus verschiedenen Bakterienkulturen wiederholt und mittels Gelelektrophorese überprüft. Auch die darauffolgenden Interaktionsstudien wurden mindestens dreimal wiederholt und verifiziert. Die aufgeführten Ergebnisse zeigten sich, wenn nicht anders angegeben, fehlerfrei replizierbar. Die Zellkulturexperimente wurden mit fünf verschiedenen Herzen unabhängig voneinander durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung prokaryotischer Expressionskonstrukte

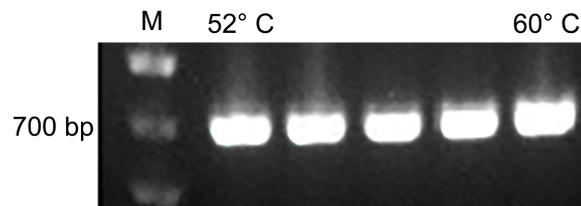
Um verschiedene Anteile des Titinfilaments mit unterschiedlichen, muskelspezifischen E3-Ubiquitin-Ligasen auf Proteininteraktionen zu überprüfen, wurden zunächst zusätzlich zu einigen bereits vorhandenen Plasmid-Konstrukten weitere prokaryotische Expressionskonstrukte hergestellt. Abbildung 9 zeigt anhand des Schemas eines Titinmoleküls die bereits vorhandenen (grau) und neu hergestellten (grün) Konstrukte. Der Fokus lag hierbei auf Titin-Regionen, die bereits mehrfach als *Hotspot*-Regionen (z.B. für Phosphorylierungen und Interaktionen) beschrieben wurden.



**Abb. 9: Übersicht prokaryotischer Expressionskonstrukte.** Dargestellt sind die bereits vorhandenen (grau) und neu hergestellten (grün) Plasmid-Konstrukte. Anhand der schematischen Abbildung des Titinfilaments in einem Halbsarkomer wird erkennbar, welche Regionen rekombinant synthetisiert wurden. Aus dem I-Band-Bereich des Filaments waren bereits Konstrukte für die N2A-Region, das PEVK-Segment und die N2-Bus mit ihren flankierenden Ig-Domänen vorhanden. Ergänzt wurden diese durch zwei Regionen im A-Band, der Domäne A168-A170 und der Titin-Kinase. Unten aufgelistet sind die Konstrukte der verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen, die als potentielle Bindungspartner ausgewählt wurden. Z-Re. = *Z-Repeats*; Prox. Ig = proximale Ig-Domänen; Mit. Ig = mittlere Ig-Domänen; Dist. Ig = Distale Ig-Domänen; Ig = Immunglobulin; TK = Titin-Kinase; Z = Z-Scheibe; M = M-Linie; A-Band = anisotropes Band; I-Band = isotropes Band; NH<sub>2</sub> = Aminogruppe; COOH = Carboxylgruppe.

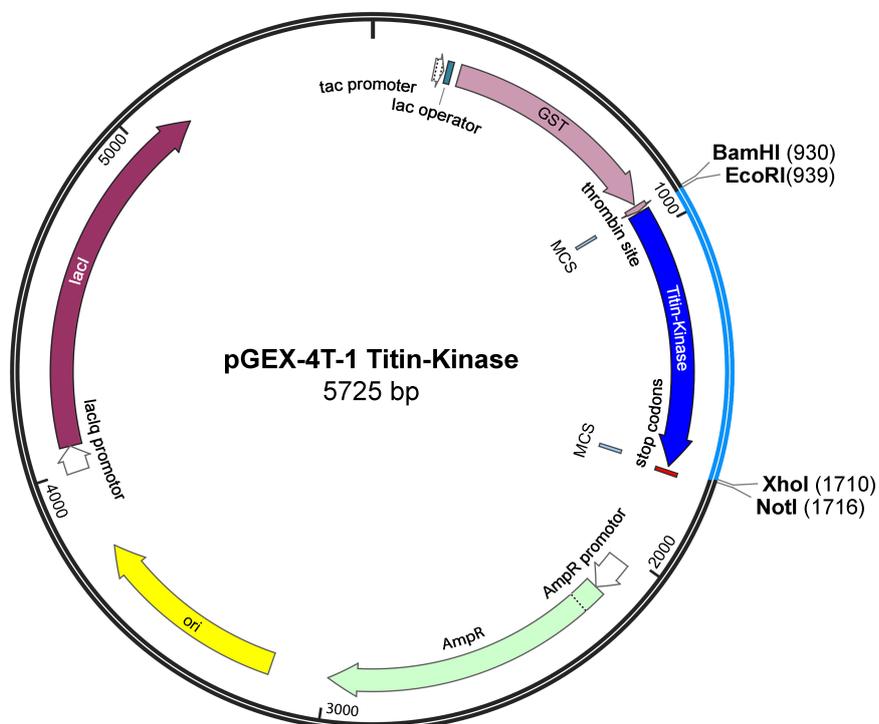
Nach Extraktion von mRNA aus humanem Myokardgewebe und Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde zunächst der gewünschte Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. Abbildung 10 zeigt das daraufhin erhaltene PCR-Produkt am Beispiel des Genabschnitts der Titin-Kinase-Region. Das hochspezifische Signal liegt oberhalb der 700

bp Markerbande entspricht den aus der Referenzsequenz erwarteten 775 bp für diesen Genabschnitt.



**Abb. 10: PCR der Titin-Kinase-Region.** 0,8%iges Agarosegel, in den Spuren liegt ein gleichmäßig aufsteigender Temperaturgradient der *Annealing*-Temperatur von 52° C bis 60° C vor. Spezifisch synthetisierte Primer ermöglichten die Amplifizierung des Genabschnitts aus humaner cDNA. Das spezifische PCR-Produkt liegt bei 700-800 bp. M = Marker.

Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Produkte restringiert und in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pGEX4T1-Vektors ligiert. Das erhaltene Konstrukt kodierte somit hinter dem regulierbaren Lac-Operator für ein Fusionsprotein aus der 27 kDa großen Glutathion-S-Transferase und dem eingefügten *Insert*. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Vektorkarte des hergestellten Titin-Kinase-Konstrukts. Weitere Vektorkarten befinden sich im Anhang.



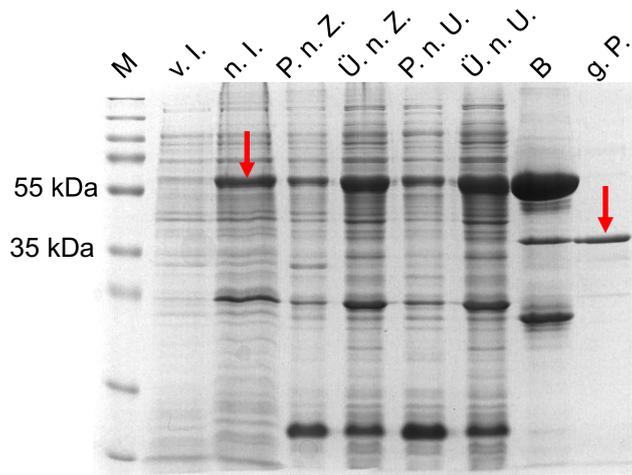
**Abb. 11: Titin-Kinase-Konstrukt.** Der 775 bp lange Genabschnitt der Titin-Kinase-Region (blau) wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI in die MCS des pGEX-4T-1 Vektors kloniert. Das Ergebnis ist ein Plasmid, das sich in Prokaryoten transfizieren lässt und dort die Expression eines Titin-Kinase-GST-

Fusionsproteins ermöglicht, das daraufhin für Interaktionsstudien verwendet werden konnte. GST = Glutathion-S-Transferase; MCS = multiple cloning site; AmpR = Ampicillinresistenzkassette; ori = Replikationsursprung; lacI = lac-Repressorgen.

Die erhaltenen Klone wurden zuletzt durch Sanger-Sequenzierung und Sequenzvergleiche auf Mutationen überprüft. Auf diese Weise wurden Konstrukte für die Titin-Kinase-Region und die Titin A-Band-Region A168-170 erfolgreich hergestellt. Weiterhin wurden Plasmidkonstrukte für die E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-2, MuRF-3, Mdm2 und Fbx32 kloniert, um die bereits vorhandenen Konstrukte (MuRF-1 und CHIP) zu ergänzen. Plasmide für das Autophagie-assoziierte Protein p62 und die proteasomalen Proteine Rpn10S5A und Rpn13 wurden ebenfalls erfolgreich kloniert und stehen ggf. für auf diese Arbeit aufbauende Experimente zur Verfügung. Zusammengefasst stehen nun prokaryotische Expressionskonstrukte für fünf verschiedene Titin-Regionen und sechs verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen zur Verfügung, die im Folgenden zur Synthese rekombinanter Proteine in *E. coli* Kulturen zum Einsatz kamen.

### **3.2 Expression und Reinigung rekombinanter Titin-Fragmente und E3-Ubiquitin-Ligasen**

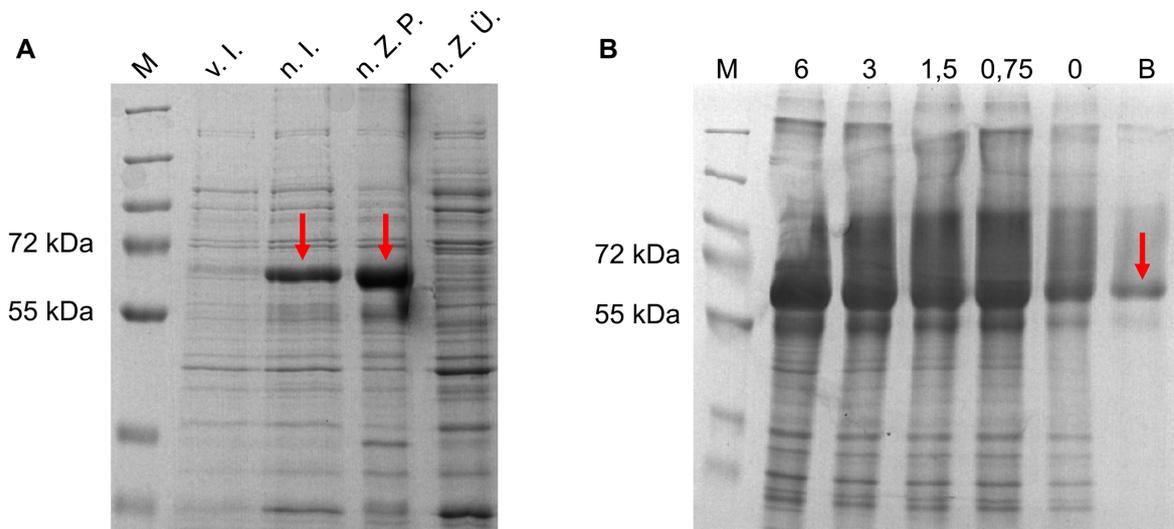
Die bereits vorhandenen oder selbst hergestellten prokaryotischen Expressionskonstrukte wurden in *E. coli* Kulturen als GST-Fusionsproteine exprimiert und anschließend gereinigt. Hierzu wurde das jeweilige Plasmid in *E. coli* transfiziert, die Expression des Proteins mit IPTG induziert und die Bakterienzellen aufgeschlossen. Durch anschließende Glutathion-Affinitätschromatographie ließen sich die Fusionsproteine separieren. Durch Thrombinverdau wurde anschließend das reine Protein von der Glutathion-S-Transferase an der dafür vorgesehenen Schnittstelle getrennt. Abbildung 12 zeigt exemplarisch den Verlauf der Reinigung der Titin-Region A168-170.



**Abb. 12: Reinigung des Titin-Fragments A168-170.** Das dargestellte, Coomassie-gefärbte 10 %ige Polyacrylamid-Gel zeigt die schrittweise Reinigung des Titin-Fragments A168-170. In den ersten Spuren neben dem Größenmarker (M) sind die *E. coli* Kulturen vor (v. I.) und nach (n. I.) Induktion der Synthese des Fusionsproteins aufgetragen. Eine erfolgreiche Expression des Proteins (ca. 65 kDa) ist deutlich zu erkennen. Es folgen Pellet (P. n. Z.) und Überstand (Ü. n. Z.) nach Zentrifugation, sowie Pellet (P. n. U.) und Überstand (Ü. n. U.) nach Ultrazentrifugation. Schließlich sind die Glutathion-*Beads* mit Fusionsprotein (B) und das gereinigte Protein (g. P.) nach Thrombinverdau dargestellt. Das gereinigte Protein ist als Bande bei ca. 35 kDa sichtbar.

Die deutliche Bande bei ca. 65 kDa nach Induktion der Proteinbiosynthese entsprach der erwarteten Größe des Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) und der o.g. Titin-Region, sodass die Proteinexpression erfolgreich funktionierte. Nach mehreren Zentrifugationsschritten ließ sich weiterhin Fusionsprotein im Überstand nachweisen, welches sich hier auch in ausreichender Menge an die Glutathion-Matrix koppeln ließ. In der letzten Spur zeigte sich letztendlich das gereinigte Protein, die Titin-Region A168-170, gelöst von der Glutathion-S-Transferase bei ca. 35 kDa. Auf diese Weise wurden weiterhin die Titin-Fragmente N2A, N2B und PEVK erfolgreich aufgereinigt. Diese wurden daraufhin für Interaktionsstudien weiterverwendet. Neben den Titin-Fragmenten wurden die E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1, MuRF-2, MuRF-3, CHIP und Mdm2 ergiebig exprimiert. Während MuRF-2, CHIP und Fbx32 problemlos gereinigt werden konnten, befanden sich die Proteine MuRF-1, MuRF-3 und die Titin-Kinase nach Aufschluss der Zellen nicht wie erwartet in Lösung, sondern zusammen mit anderen unlöslichen Bestandteilen abzentrifugiert im Pellet. Durch Denaturierung dieser Proteine mit 6 M Harnstoffpuffer ließen sich auch diese in Lösung bringen und schrittweise in Puffer ohne Harnstoff zurückdialysieren. Währenddessen war es ebenfalls möglich, die Proteine durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen (z.B. Lipiden) zu trennen, die Fusionsproteine anschließend an die Glutathionmatrix zu koppeln und letztendlich durch

Thrombinverdau zu separieren. Die untenstehende Abbildung zeigt den Reinigungsverlauf der E3-Ubiquitin-Ligase MuRF-1.



**Abb. 13: Reinigung der E3-Ubiquitin-Ligase MuRF-1.** (A) Auf 10 %ige, Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele aufgetragene Proben von *E. coli* Kulturen vor (v. I.) und nach (n. I.) Induktion der Proteinsynthese mit IPTG zeigen wie erwartet die Synthese des ca. 65 kDa großen MuRF-1-GST-Fusionsproteins. Nach Zentrifugation befindet sich dieses jedoch vollständig im Pellet (n. Z. P.) und nicht wie gewünscht im Überstand (n. Z. Ü.). (B) Dialyse des in 6 M Harnstoffpuffer gelöstem Fusionsproteins. Die Harnstoffkonzentrationen (in mol/l) wurden schrittweise halbiert. Das Protein wurde letztendlich erfolgreich an die Glutathion-Beads (B) gekoppelt. M = Marker.

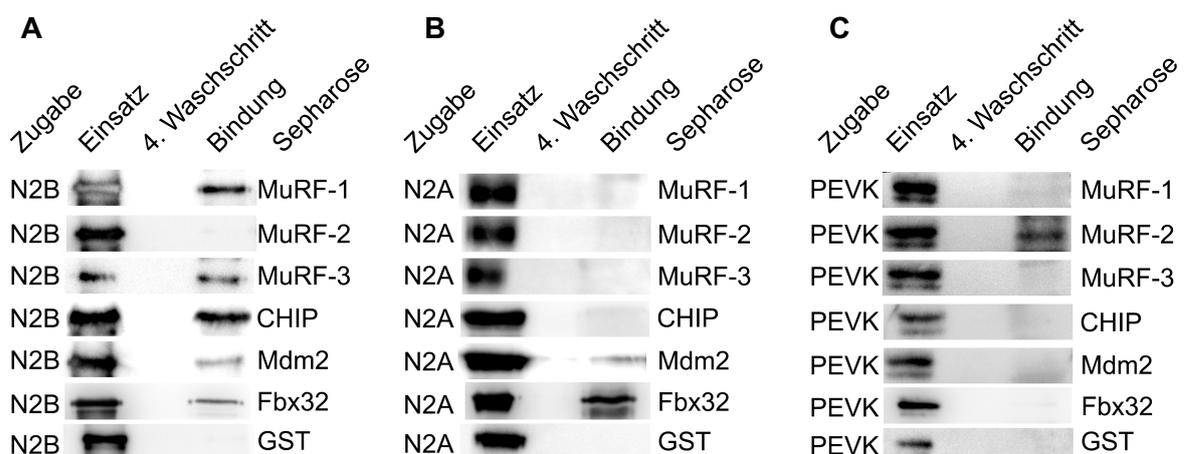
Das ca. 65 kDa große Fusionsprotein befand sich nach dem ersten Zentrifugationsschritt vollständig im Pellet, zeigte sich jedoch in 6 M Harnstoff-Puffer in Lösung und ließ sich nach Rückdialyse erfolgreich an die Glutathion-Matrix koppeln. Auch ein Thrombinverdau war, falls erwünscht, möglich. Letzteres ließ sich auf MuRF-3 und die Titin-Kinase übertragen. Schlussendlich ließen sich fünf verschiedene Titin-Fragmente und sechs E3-Ubiquitin-Ligasen erfolgreich aufreinigen und konnten im Folgenden auf Proteininteraktionen geprüft werden.

### 3.3 Interaktionsstudien des Titinfilaments mit E3-Ubiquitin-Ligasen

Die rekombinanten E3-Ubiquitin-Ligasen wurden durch *GST-Pulldown-Assays* auf Interaktion mit den fünf aufgereinigten Titin-Fragmenten getestet. Hierbei sollten bereits bekannte Interaktionen bestätigt und neue identifiziert werden.

#### 3.3.1 MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32 und Mdm2 interagieren mit Titin I-Band-Fragmenten *in vitro*

Drei Fragmente aus dem Titin I-Band (N2B, N2A, PEVK) wurden auf Interaktion mit den sechs gereinigten E3-Ubiquitin-Ligasen geprüft. MuRF-1 und CHIP zeigten eine deutliche *in vitro* Affinität zur N2B-Region des Titinfilaments. MuRF-3, Mdm2 und Fbx32 wiesen ebenfalls eine Affinität zu dieser Region auf, das Signal war jedoch deutlich geringer (Müller et al., 2021). MuRF-2 interagiert nicht mit dem N2B-Segment. Ebenfalls bestand keine Affinität zur Glutathion-S-Transferase, sodass falsch positive Ergebnisse aufgrund einer Interaktion mit dem *GST-Tag* ausgeschlossen waren. Die N2A-Region zeigte leichte Affinität zu Mdm2 und eine deutliche Affinität zu Fbx32, jedoch keine Interaktionen mit MuRF-1, MuRF-2, MuRF-3 und CHIP. MuRF-2 stellte sich unter den getesteten E3-Ubiquitin-Ligasen außerdem als einziger Bindungspartner der PEVK-Region heraus (Müller et al., 2021). Da es sich hierbei um reine *in vitro* Affinitäten handelte, wurden außerdem die Lokalisationen der einzelnen E3-Ubiquitin-Ligasen in adulten Rattenkardiomyozyten überprüft, um diese Interaktionen detaillierter interpretieren zu können (siehe 3.4).

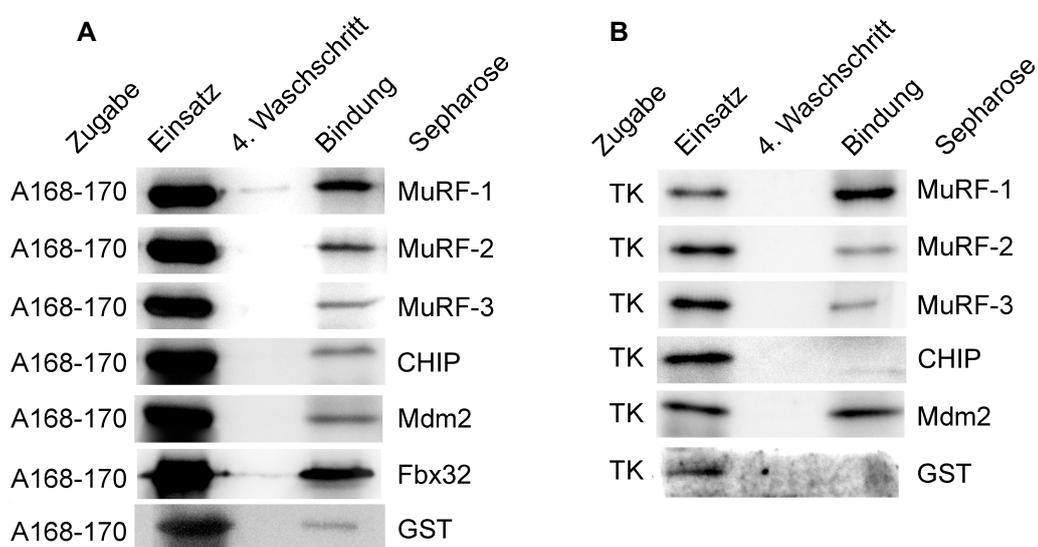


**Abb. 14: Interaktion von Titin I-Band-Fragmenten mit E3-Ubiquitin-Ligasen.** Dargestellt sind repräsentative *Western-Blots* von *GST-Pulldown-Assays* sechs verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen mit (A) dem N2B-Segment, (B) dem N2A-Segment und (C) der PEVK-Region des Titinfilaments. Die E3-Ubiquitin-

Ligasen waren als GST-Fusionsproteine an Sepharose-*Beads* gebunden, die Titin-Fragmente wurden in Lösung hinzugegeben und über spezifische Antikörper nachgewiesen. Die *Western-Blot* Ergebnisse mit Fbx32 wurden ergänzend zur Verfügung gestellt von Dr. Sebastian Kötter. Teile dieser Abbildung sind veröffentlicht in Müller et al., 2021.

### 3.3.2 MuRF-1, MuRF-2, Mdm2 und Fbx32 interagieren mit Titin A-Band-Fragmenten *in vitro*

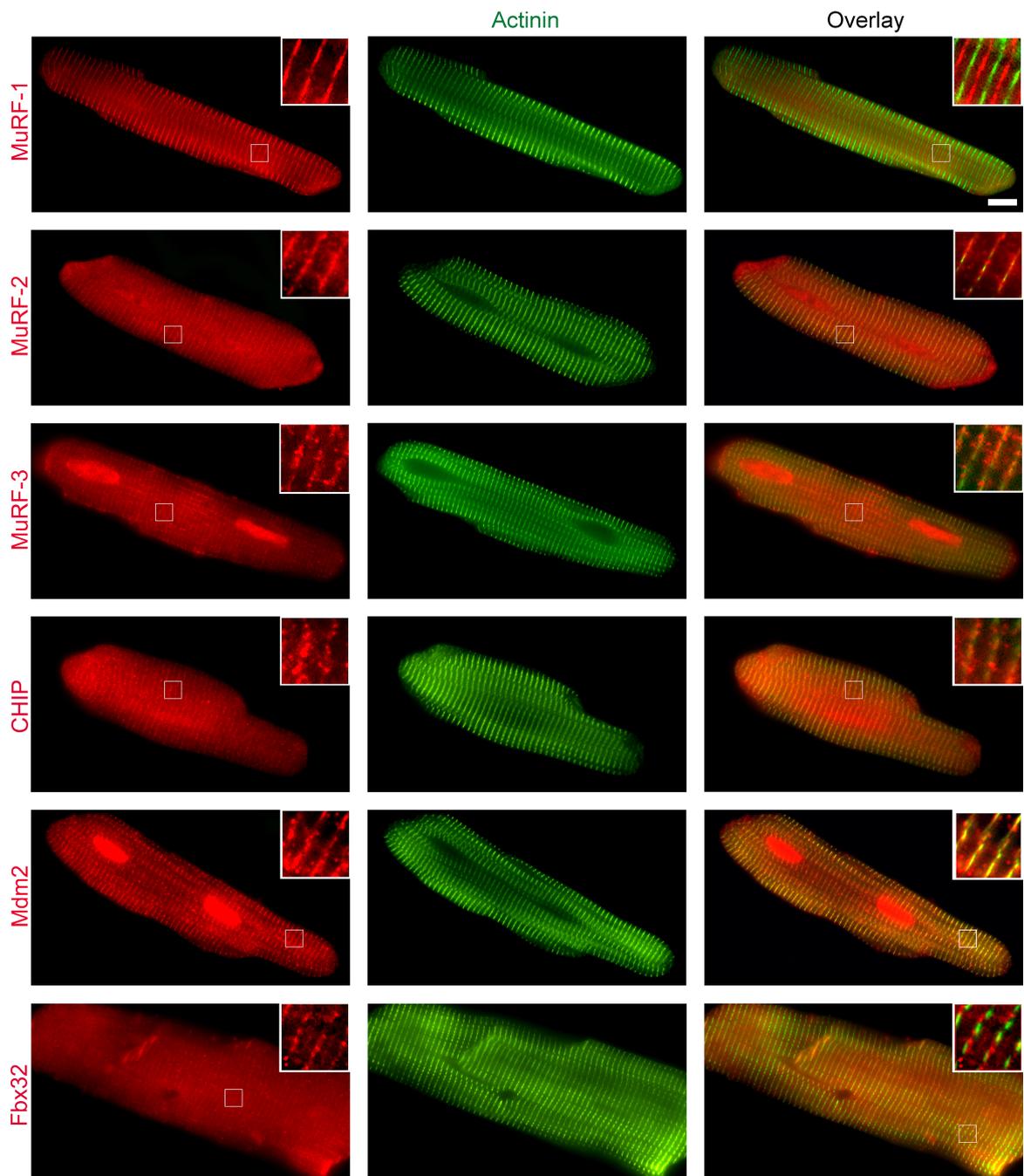
Weiterhin wurden zwei Titin-Fragmente aus dem A-Band auf Interaktion mit den sechs gereinigten E3-Ligasen getestet. Im Fokus standen die Titin-Kinase und die davon N-terminal gelegenen Ig- bzw. FN3-Domänen A168-170. Es zeigte sich neben einem deutlichen Interaktionssignal zwischen MuRF-1 und Fbx32 mit A168-170 auch ein etwas schwächeres Signal bei MuRF-2 und der genannten Titin-Region. Des Weiteren zeigten auch die anderen E3-Ubiquitin-Ligasen Affinität zu diesem Fragment, jedoch wies auch die GST-Kontrolle ein positives Signal auf (Müller et al., 2021). MuRF-1 hatte außerdem auch zu der angrenzenden Titin-Kinase eine hohe Affinität. Hier war auch bei Mdm2 ein deutlich positives Signal zu sehen. MuRF-2 und -3 zeigten auch geringfügige *in vitro* Affinität, bei CHIP und der GST-Negativkontrolle war keine Interaktion nachweisbar.



**Abb. 15: Interaktion von Titin A-Band-Fragmenten mit E3-Ubiquitin-Ligasen.** Dargestellt sind repräsentative *Western-Blots* von GST-Pulldown-Assays sechs verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen mit (A) der Region A168-170 und (B) der Titin-Kinase. Die E3-Ubiquitin-Ligasen waren als GST-Fusionsproteine an Sepharose-*Beads* gebunden, die Titin-Fragmente wurden in Lösung hinzugegeben und über spezifische Antikörper nachgewiesen. Die *Western-Blot* Ergebnisse mit Fbx32 wurden ergänzend zur Verfügung gestellt von Dr. Sebastian Kötter. Teile dieser Abbildung sind veröffentlicht in Müller et al., 2021.

### 3.4 Lokalisation verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen in adulten Rattenkardiomyozyten

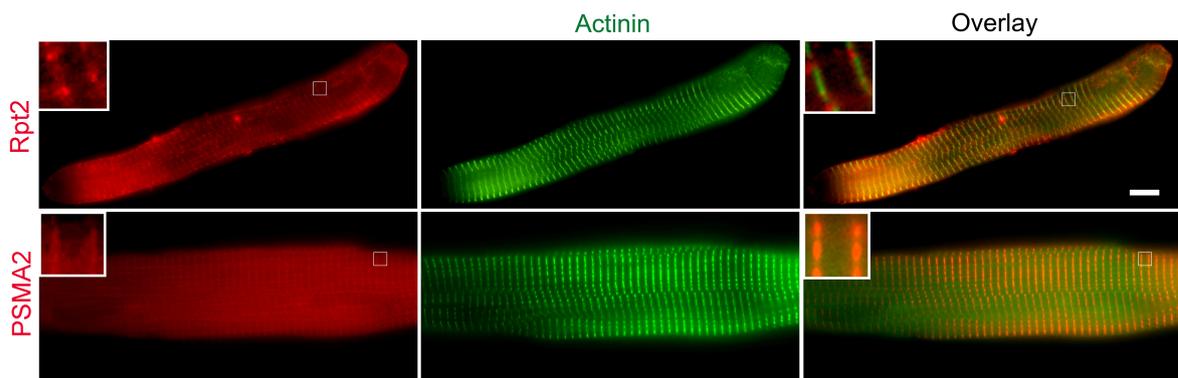
Die Lokalisation verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen wurde in 24 h kultivierten, adulten Rattenkardiomyozyten durch Immunfluoreszenzfärbung analysiert, um ggf. sarkomerische Lokalisation nachzuweisen. Die Färbungen sollten die in den vorangegangenen *Pull-down*-Experimenten gefundenen Interaktionen verifizieren. Betrachtet wurden hierbei die E3-Ligasen der MuRF-Familie, CHIP, Mdm2 und Fbx32. Für MuRF-1 zeigte sich eine deutliche, scharf abgrenzbare Querstreifung, die dem A-Band der Sarkomere zuzuordnen ist, erkennbar an der alternierenden Färbung mit  $\alpha$ -Aktinin.  $\alpha$ -Aktinin diente in den Abbildungen als Marker für die Z-Scheiben der Sarkomere. Die anderen E3-Ubiquitin-Ligasen der MuRF-Familie, MuRF-2 und MuRF-3, zeigten ebenfalls eine sarkomerische Lokalisation, jedoch auch deutlich mehr zytosolische Signale. Die im Sarkomer lokalisierten Farbsignale ließen sich bei beiden Ligasen der Z-Scheibe zuordnen (Müller et al., 2021). Hier zeigte sich in den *Overlay*-Bildern eine Co-Lokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin. MuRF-3 wies außerdem ein prominentes Farbsignal innerhalb der Zellkerne auf. Neben MuRF-2 und MuRF-3 zeigten auch die CHIP- und Fbx32-Färbungen zytosolische Lokalisation. CHIP, Mdm2 und Fbx32 waren außerdem in den Sarkomeren lokalisiert und dort ebenfalls der Z-Scheibe zuzuordnen. Weiterhin wurde bei genauer Betrachtung deutlich, dass auch im A-Band der Fbx32-Färbung eine sehr schmale Linie zu erkennen war. Schließlich zeigte auch die Färbung von Mdm2 ein sehr prominentes Signal in den Zellkernen. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass bei allen betrachteten E3-Ubiquitin-Ligasen eine sarkomerische Lokalisation zu beobachten war. Beachtet werden muss jedoch, dass eine Lokalisation im Sarkomer nicht zwangsläufig eine Interaktion mit Titin beweist, da auch andere Sarkomerproteine als potentielle Bindungspartner in Frage kommen.



**Abb. 16: Lokalisation verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen in adulten Rattenkardiomyozyten.** Die Kardiomyozyten wurden für 24 h kultiviert und anschließend nach verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen (rot, Sekundärantikörper: Alexa Fluor 555) sowie  $\alpha$ -Aktinin (grün, Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488) gefärbt. Zusätzliches Herausvergrößern macht die jeweilige Lokalisation in Bezug zu  $\alpha$ -Aktinin deutlich. Balken = 10  $\mu$ m. Teile dieser Abbildung sind veröffentlicht in Müller et al., 2021.

### 3.5 Lokalisation von Proteasomen in adulten Rattenkardiomyozyten

Weitere Immunfluoreszenzfärbungen an 24 h kultivierten, adulten Rattenkardiomyozyten sollten Aufschluss über die Lokalisation und potentielle Sarkomerassoziation von Proteasomen geben. Abbildung 17 zeigt Färbungen mit Antikörpern gegen Rpt2, einer Untereinheit der 19 S Regulatoreinheit von 26 S Proteasomen und  $\alpha$ -Aktinin als Z-Scheiben Marker. Weiterhin wurde PSMA2 als Teil des proteasomalen Kernkomplexes gefärbt.

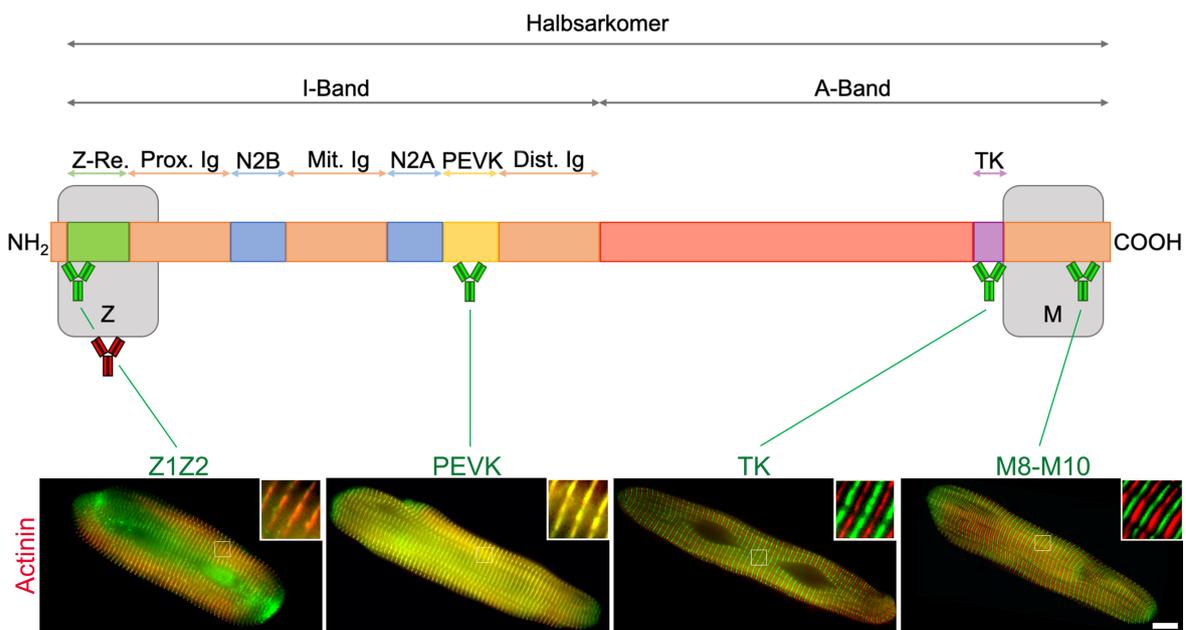


**Abb. 17: Lokalisation von Rpt2 und PSMA2 in adulten Rattenkardiomyozyten.** 24 h kultivierte Kardiomyozyten wurden mit Antikörpern gegen die proteasomalen Untereinheiten Rpt2, PSMA2 (rot, Sekundärantikörper: Alexa Fluor 555) und  $\alpha$ -Aktinin (grün, Sekundärantikörper: Alexa Fluor 488) gefärbt. Zusätzliches Vergrößern macht die jeweilige Lokalisation in Bezug zu  $\alpha$ -Aktinin deutlich. Balken = 10  $\mu$ m.

Für Rpt2 und PSMA2 zeigte sich eine regelmäßige Querstreifung der Kardiomyozyten, die jedoch im Vergleich zu  $\alpha$ -Aktinin deutlich diffuser abzugrenzen war. Im *Overlay* wurde deutlich, dass die Rpt2- und PSMA2-Farbsignale der Z-Scheibe des Sarkomers zuzuordnen waren. Bei detaillierter Betrachtung ließ sich sogar vermuten, dass Rpt2 die Z-Scheibe umgibt und somit auch in der nahen Peripherie der Z-Scheibe, dem I-Band, vorkommt. Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops erlaubte diese Differenzierung aber nur bedingt. Letztendlich deutete die diffuse Rotfärbung an, dass Proteasomen in adulten Rattenkardiomyozyten nicht nur in der Z-Scheibe bzw. dem I-Band des Sarkomers, sondern auch im Zytoplasma vorkommen.

### 3.6 Etablierung unterschiedlicher Titin-Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Ein weiterer Projektteil befasste sich zunächst mit der Etablierung mehrerer Titin-Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Hierzu wurden 24 h kultivierte, adulte Rattenkardiomyozyten mit einem Antikörper gegen ein bestimmtes Titin-Epitop und gegen den Z-Scheiben Marker  $\alpha$ -Aktinin mit jeweils unterschiedlichen Sekundärantikörpern gefärbt. Etabliert wurde ein Antikörper gegen die Titin M-Linien-Region M8-M10, gegen die Titin-Kinase und gegen die Titin Z-Scheiben-Region Z1Z2. Auch der in der Arbeitsgruppe bereits etablierte PEVK-Antikörper ist in der untenstehenden Abbildung dargestellt, da er in den darauffolgenden Experimenten als Marker für die I-Band-Region des Titinfilaments diente. Das Schema in Abbildung 17 zeigt die erwartete Bindung der Antikörper am Titinfilament.



**Abb. 18: Übersicht der Titin-Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie.** Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen mit vier verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Titin-Regionen parallel gefärbt mit einem  $\alpha$ -Aktinin-Antikörper. Unterschiedliche Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555) ermöglichten die Grünfärbung der Titin-Regionen und die Rotfärbung von  $\alpha$ -Aktinin (Z-Scheibe). Die jeweils zu erwartende Bindungsstelle ist schematisch an einem Titinfilament im Halbsarkomer gezeigt. Z-Re. = Z-Repeats; Prox. Ig = proximale Ig-Domänen; Mit. Ig = mittlere Ig-Domänen; Dist. Ig = Distale Ig-Domänen; TK = Titin-Kinase; Z = Z-Scheibe; M = M-Linie; Balken = 10  $\mu$ m.

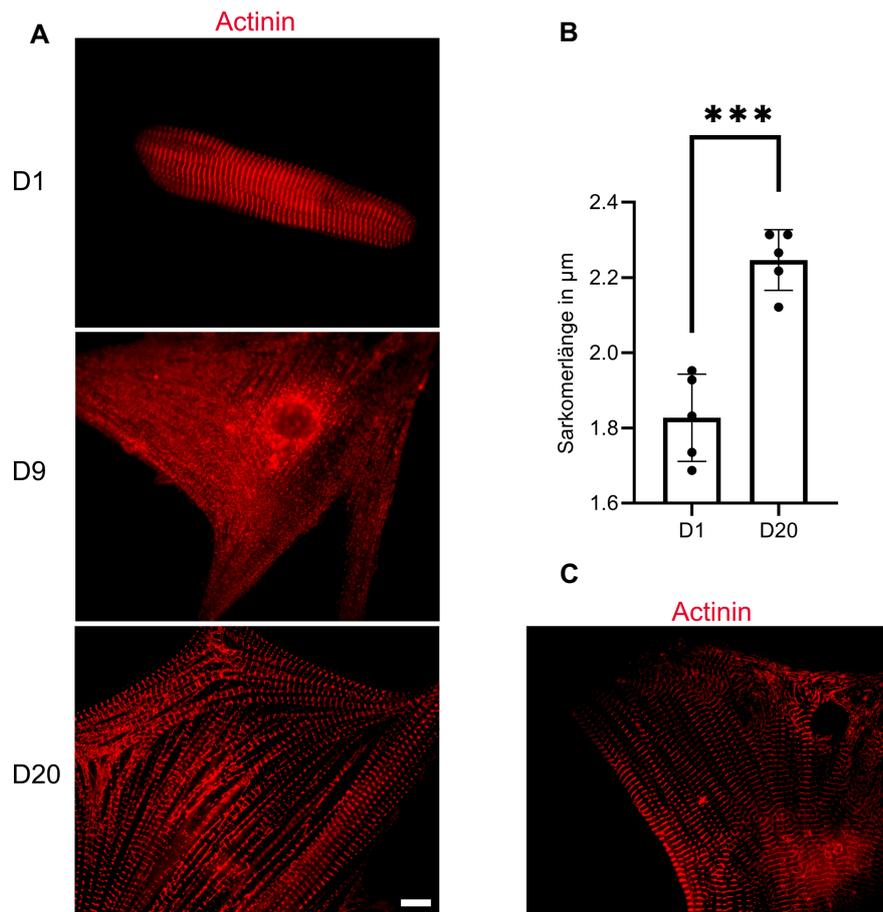
Zunächst lässt sich der Abbildung entnehmen, dass alle vier Titin-Antikörper das Bild einer Querstreifung erzeugen und somit wie erwartet im Sarkomer, in diesem Fall an Titin, binden.

Die Gegenfärbung mit  $\alpha$ -Aktinin erlaubt, die Bindung des jeweiligen Antikörpers im Sarkomer genauer zu lokalisieren. Legt man die Bilder beider Färbungen übereinander, so zeigt sich für den M8-M10-Antikörper und den Titin-Kinase-Antikörper (TK) eine alternierende rot-grün-Streifung und folglich eine Bindung in der M-Linie bzw. im A-Band des Sarkomers. Im Gegensatz dazu projiziert sich die Färbung des Z1Z2-Antikörpers wie erwartet auf die Z-Scheibe des Sarkomers und zeigt in orangener Färbung die Co-Lokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin. Der Antikörper zeigt ebenfalls eine Färbung der Zellkerne. Auch der Antikörper gegen die PEVK-Region deutet eine Co-Lokalisation mit  $\alpha$ -Aktinin an, da die PEVK-Region bei niedrigen Sarkomerlängen für das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops zu nah an der Z-Scheibe des Sarkomers liegt. Zusammengefasst haben alle vier Titin-Antikörper das erwartete Bindungsverhalten gezeigt. In den folgenden Versuchen wurde jedoch nur noch mit dem Z1Z2-, dem PEVK- und dem M8-M10-Antikörper gearbeitet, da keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Titin-Kinase und der Titin M-Linien-Region aufgrund der räumlichen Nähe zu erwarten waren.

## **3.7 Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten**

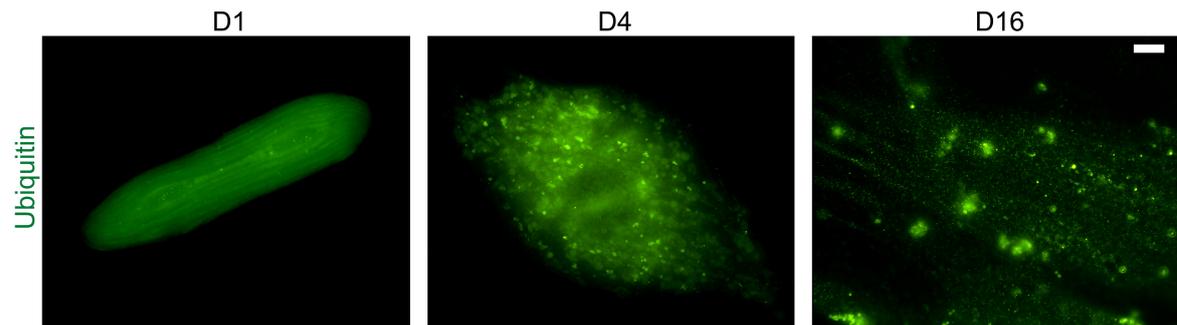
### **3.7.1 Adulte Rattenkardiomyozyten verändern ihre Sarkomerstruktur während der Langzeitkultivierung**

Es ist bereits mehrfach vorbeschrieben, dass sich adulte Rattenkardiomyozyten innerhalb mehrerer Tage in Zellkultur umfassend verändern. Im Folgenden wurden diese Veränderungen genutzt, um ein besonderes Augenmerk auf Änderungen sarkomerischer Proteine, insbesondere Titin, zu legen. Adulte Rattenkardiomyozyten wurden bis zu 20 Tage in Kultur gehalten, an verschiedenen Tagen fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Gefärbt wurden zunächst  $\alpha$ -Aktinin exemplarisch als Sarkomerstruktur und Ubiquitin als Marker für Proteindegradation. Abbildung 18 zeigt eine Übersicht der wichtigsten morphologischen Veränderungen der Zellen in 20 Tagen Zellkultur. Die anfänglich stabförmigen Kardiomyozyten weisen bereits nach 24 h einen deutlich abgerundeten Zellpol auf. Im Verlauf entwickeln sich Ausläufer an den Zellpolregionen, die Zelle wird annähernd spindelförmig. Nach und nach verzweigen sich die Zellen immer weiter, breiten sich aus und ähneln nach 20 Tagen Zellkultur eher dem Bild embryonaler (Abb. 19 C) oder neonataler Rattenkardiomyozyten. Die Zellen nehmen hierbei auch an Größe zu. Deutlich zu sehen ist hier ein Verlust der Querstreifung von Tag 1 (D1) bis Tag 9 (D9) in Kultur und ein Wiederaufbau dieser ab Tag 10 (D10) bis Tag 20 (D20), wenn auch dies nur auf einen Großteil der Zellen zutraf.



**Abb. 19: Veränderungen adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur.** (A)  $\alpha$ -Aktinin-Färbungen an Tag 1 (D1), Tag 9 (D9) und Tag 20 (D20) in Kultur. Alexa Fluor 555 wurde als Sekundärantikörper verwendet. Balken = 10  $\mu$ m. (B) Sarkomerlängenvergleich. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Sarkomerlänge an Tag 1 und Tag 20 in Kultur. Ausgemessen wurde die Sarkomerlänge an jeweils fünf Zellen. Pro Zelle wurden wiederum fünf Sarkomere gemessen und die Länge auf ein Sarkomer heruntergerechnet. Im t-Test zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,0002$ ) Zunahme der durchschnittlichen Sarkomerlänge an Tag 20 im Vergleich zu Tag 1. (C)  $\alpha$ -Aktinin-Färbung einer embryonalen Rattenkardiomyozyte, die von Dr. Sebastian Kötter (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Zellen besitzen schlussendlich an Tag 20 ausgeprägte Sarkomerstrukturen, jedoch sind diese deutlich weniger parallel angeordnet als in den ursprünglichen Kardiomyozyten. Neben der Größe der Zellen nimmt auch die Sarkomerlänge im Vergleich zu Tag 1 deutlich zu. Betrachtet man die Ubiquitin-Färbung im Zeitverlauf, so zeigt sich an Tag 1 zunächst ein homogenes, zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal. In den ersten vier Kultivierungstagen wird neben der zellmorphologischen Veränderung auch eine Zunahme des Ubiquitin-Fluoreszenzsignals deutlich. Im Zytoplasma werden bereits ab Tag 4 (D4) multiple Aggregate sichtbar. Zu späten Kultivierungszeitpunkten (hier dargestellt ist Tag 16) nimmt das Signal deutlich ab, es zeigen sich jedoch weiterhin einzelne Aggregate.

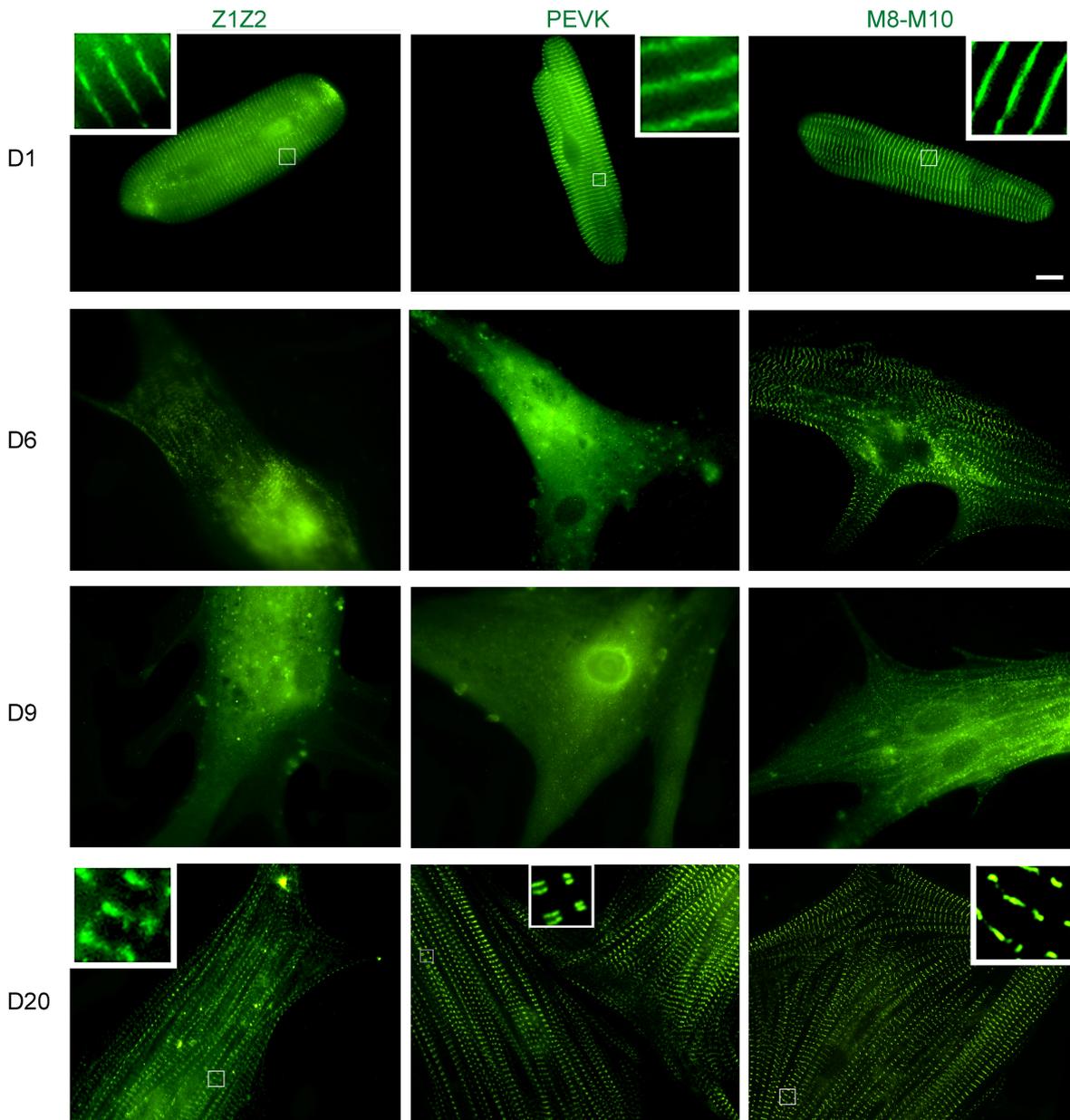


**Abb. 20: Ubiquitinfärbung in Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten.** Dargestellt sind Färbungen von Tag 1 (D1), Tag 4 (D4) und Tag 16 (D16) in Kultur. Alexa Fluor 488 wurde als Sekundärantikörper verwendet. Balken = 10  $\mu$ m.

### 3.7.2 Titin-Turnover in Langzeitzellkulturen adulter Rattenkardiomyozyten

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Prozesse während der Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten sollten im Folgenden genutzt werden um die Abbau- und Wiederaufbauprozesse des Titinfilaments detailliert zu beobachten und ggf. Unterschiede zwischen einzelnen Titin-Regionen auszumachen. Hierzu wurden ebenfalls kultivierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Gefärbt wurden hierbei die Titin-Abschnitte Z1Z2 aus der Z-Scheiben-Region, PEVK aus dem I-Band und M8-M10 aus der M-Linien-/A-Band-Region, um möglichst verschiedene Abschnitte des Filaments darzustellen. Wieder deutlich zu erkennen ist die starke morphologische Wandlung der Zellen während der Kultivierungszeit. Es zeigt sich außerdem ein schrittweiser Verlust der Querstreifung für alle drei Titin-Bereiche. Besonders rasch ist dies für die PEVK-Region im I-Band zu beobachten. Hier ist bereits an Tag 6 in vielen Zellen keine Sarkomeranordnung mehr erkennbar. Die Z-Scheiben-Region des Titinfilaments stellt sich an Tag 9 ebenfalls in vielen Zellen nicht mehr dar. Lediglich der Antikörper gegen den Titin M-Linien-Bereich zeigt in der Tendenz an Tag 9 noch häufiger eine Querstreifung. An Tag 6 zeigt sich noch eine deutliche Querstreifung und selbst an Tag 9 sind vereinzelte Sarkomere erkennbar. Innerhalb der darauffolgenden vier bis elf Kultivierungstage stabilisiert sich die Kultur der Zellen und es zeigt sich nahezu durchgehend eine gut abgrenzbare Querstreifung für alle drei Titin-Antikörper. Die Sarkomere sind jedoch nicht mehr strikt parallel angeordnet wie zu Beginn und die Zellen nehmen an Größe und Sarkomerlänge zu. Der PEVK-Antikörper zeigt an Tag 20 aufgrund der höheren Sarkomerlänge das typische Doppelbandenmuster, da er auf beiden Seiten der Z-Scheibe im I-Band bindet. Zwischen den einzelnen Regionen zeichnete sich in der

Entwicklung ab Tag 9 kein wesentlicher Unterschied ab, jedoch war es aufgrund der geringen Zellausbeute zu späten Kultivierungszeitpunkten nicht möglich, engmaschige Färbungen durchzuführen. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der I-Band-Bereich des Titinfilaments in Langzeitzellkultur adulter Rattenkardiomyozyten schneller abgebaut wird als der A-Band-Bereich des Moleküls.



**Abb. 21: Titin im Verlauf der Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten.** Drei verschiedene Titin-Regionen wurden in 20-tägiger Kultur von Kardiomyozyten mit Immunfluoreszenzfärbungen beobachtet. Hierbei diente der Antikörper gegen die Region Z1Z2 als Abbild der Z-Scheiben-Region des Moleküls, der PEVK-Antikörper als I-Band Marker und der Antikörper gegen M8-M10 als Repräsentant des A-Band-/M-Linien-Bereichs. Vergrößerungen verdeutlichen die Querstreifung. Alexa Fluor 488 wurde als Sekundärantikörper verwendet. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Rolle verschiedener E3-Ubiquitin-Ligasen im Abbau des Titinfilaments**

Die Herzinsuffizienz unterschiedlichster Genese stellt eine der größten medizinischen Herausforderungen der heutigen Zeit dar. Die langlebige Leistungsfähigkeit der Herzmuskulatur aber auch der Skelettmuskulatur beruht wesentlich auf dem präzisen Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Proteine innerhalb der einzelnen Sarkomere. Das fehlerfreie Funktionieren und die ständige Erneuerung dieser Komplexe ermöglichen der Muskulatur stetige Adaptation an äußere Einflüsse. Die Proteinqualitätskontrollmechanismen sind entscheidend für den Erhalt der Proteinhomöostase und damit fehlerfreien Funktion einzelner Muskelzellen. Besonders der herausfordernde Abbau des Titinfilaments muss hierbei präzise gesteuert werden, um die Integrität der Sarkomere langfristig zu erhalten und sich ständig ändernden äußeren Bedingungen anzupassen. Das exakte Verstehen dieser physiologischen Prozesse ermöglicht ein weitreichenderes Verständnis der Pathogenese unterschiedlichster kardialer und skelettaler Myopathien und deckt mögliche neue therapeutische Ziele auf. In den vorliegenden Untersuchungen konnten diverse E3-Ubiquitin-Ligasen als potenzielle Titin-Interaktionspartner identifiziert oder bestätigt werden. Zusammen mit über diese Arbeit hinausführenden Untersuchungen wird das komplexe Bild des Titin-Abbauweges deutlich klarer und in den folgenden Abschnitten erläutert.

#### **4.1.1 Interaktion von E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Titin A-Band-Bereich**

In dieser Arbeit wurden zahlreiche Interaktionen des Titin A-Band-Bereichs mit E3-Ubiquitin-Ligasen identifiziert. Neben den bereits bekannten Interaktionen mit MuRF-1 und MuRF-2 (Witt et al., 2005) wurden MuRF-3, Mdm2, CHIP und Fbx32 als neue Interaktionspartner identifiziert. Innerhalb des Filaments zeigen sich außerdem mehrere Interaktionsstellen sowohl im I-Band als auch im A-Band.

Eine Interaktion der muskelspezifischen E3-Ubiquitin-Ligase MuRF-1 mit den Titin-Regionen A168-170 im A-Band des Sarkomers war bereits vorher bekannt (Witt et al., 2005). Die vorliegenden Ergebnisse konnten diese Interaktion *in vitro* bestätigen und zeigten darüber hinaus eine Affinität von MuRF-1 zu der angrenzenden Titin-Kinase. Auch letztere

Interaktion steht im Einklang mit aktuellen Publikationen (Bogomolovas et al., 2021). Weiterhin zeigen die vorliegenden Immunfluoreszenzfärbungen eine Lokalisation von MuRF-1 im A-Band des Sarkomers und stützen hiermit ebenso die Bindung an die dort liegenden Bereiche des Titinmoleküls. Wenn auch in den Ergebnissen der *GST-Pulldown*-Experimente eine Affinität des Titinfragments A168-170 zu dem verwendeten *GST-Tag* zu sehen ist, zeigt sich jedoch ein deutlich stärkeres Bindungssignal mit MuRF-1 als in der *GST*-Negativkontrolle, sodass von einer tatsächlichen Interaktion ausgegangen werden kann. Aktuelle Literatur und die gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass nicht allein die Regionen A-168-170, sondern viel mehr auch die Titin-Kinase für die Rekrutierung von MuRF-1 verantwortlich sind (Bogomolovas et al., 2014, Bogomolovas et al., 2021). MuRF-1 scheint somit eine Schlüsselrolle im A-Band-Bereich von Titin zu spielen. Als E3-Ubiquitin-Ligase ist es in der Lage, das Titinmolekül in diesem Bereich zu ubiquitinieren und damit für den Abbau zu markieren. Ubiquitinierung der Titin-Kinase durch MuRF-1 scheint die Assoziation der Autophagie-assoziierten Proteine p62 und Nbr1 zu fördern (Bogomolovas et al., 2021).

Auch MuRF-2 und MuRF-3 zeigen eine Affinität zu den Regionen A168-170 und der Titin-Kinase. MuRF-2 wurde bereits vorher als Interaktionspartner in diesem Bereich beschrieben (Witt et al., 2005). Die Immunfluoreszenzfärbungen an adulten Rattenkardiomyozyten legen jedoch eher eine Lokalisation der beiden Proteine im Bereich der Z-Scheibe bzw. des I-Bands nahe. Auch wenn die dargestellten Lokalisationen in diesem Fall nicht mit den gezeigten Interaktionen übereinstimmen, ist eine *in vivo* Interaktion in humanen Zellen trotzdem denkbar. In vorangegangenen Studien lokalisierte MuRF-2 in anderen Zellkulturmodellen ebenfalls im Bereich des A-Bands (Pizon et al., 2002, McElhinny et al., 2004). Differierende Lokalisationen in unterschiedlichen Zellkulturmodellen lassen sich möglicherweise mit der variierenden Expression der MuRF-Proteine in verschiedenen Entwicklungsstadien erklären. MuRF-2 wird in der Pränatalphase am stärksten exprimiert und wird postnatal deutlich herunterreguliert, während MuRF-1 und MuRF-3 postnatal vermehrt exprimiert werden (Perera et al., 2011). Weiterhin bilden die Proteine der MuRF-Familie Homo- und Heterodimere und können sich in ihrer Funktion zum Teil gegenseitig ersetzen (Witt et al., 2005). MuRF-2 interagiert ebenfalls mit dem Signalkomplex aus Nbr1 und p62 im Bereich der Titin-Kinase (Lange et al., 2005). Auch hierüber könnte eine Verbindung zu Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle bestehen. Eine Interaktion von

MuRF-3 mit der Titin A-Band-Region wird in den vorliegenden Experimenten erstmals beschrieben. Auch die Lokalisation von MuRF-3 scheint nicht ganz eindeutig festzulegen zu sein. Während die gezeigten Färbungen MuRF-3 eher der Z-Scheibe bzw. dem I-Band des Sarkomers zuordnen, haben andere Arbeitsgruppen MuRF-3 auch im A-Band verortet (Gregorio et al., 2005). Wiederum andere Untersuchungen bestätigen eher die Lage im Bereich der Z-Scheibe (Spencer et al., 2000, Centner et al., 2001). MuRF-3 wurde als einziger Interaktionspartner der PEVK-Domäne von Titin im Bereich des I-Bands identifiziert (Details hierzu in Abschnitt 4.1.2). Die *in vitro* Interaktion mit dem Titin A-Band Bereich legt eine potenzielle Aktivität als E3-Ubiquitin-Ligase in diesem Bereich nahe. Zusammen mit MuRF-1 und -2 könnte auch MuRF-3 an der Ubiquitinierung von Titin beteiligt sein. Ähnlich wie MuRF-2 dient auch MuRF-3 als Stabilisator des Mikrotubuli-Systems (Spencer et al., 2000). Die Mikrotubulistabilität ist entscheidend für die muskuläre Differenzierung und Entwicklung (Gundersen et al., 1989, Chang et al., 2002). Gregorio et al. vermuteten bereits 2005, dass MuRF-3 einen potenziellen *Link* zwischen dem Mikrotubulisystem und Sarkomerstrukturen darstellt. Die hier bewiesenen Interaktionen von MuRF-3 mit dem Titinfilament untermauern diese Hypothese.

Neben den Proteinen der MuRF-Familie zeigen auch CHIP, Mdm2 und Fbx32 ein Interaktionssignal mit dem A-Band-Bereich des Titinfilaments. CHIP zeigt insgesamt nur eine leichte Affinität zu der Region A168-170 und keine Interaktion mit der angrenzenden Titin-Kinase. Die Affinität könnte jedoch artifiziell auf der Interaktion des Titinfragments A168-170 mit dem GST-Tag von CHIP beruhen. Die Lokalisationsstudie zeigt eine Assoziation mit der Z-Scheibe des Sarkomers. Auch in embryonalen Rattenkardiomyozyten lokalisiert CHIP im Z-Scheiben- bzw. I-Band-Bereich (Müller et al., 2021). Eine *in vivo* Interaktion mit dem A-Band-Bereich des Titinfilaments ist somit insgesamt unwahrscheinlich. Fbx32 hingegen zeigt ähnlich wie MuRF-1 ein deutliches Interaktionssignal mit A168-170. Dies steht im Einklang mit der Lokalisation in adulten Rattenkardiomyozyten, in denen Fbx32 prominent in der Z-Scheibe, aber auch im A-Band nachweisbar war. Weiterhin lässt sich Fbx32 auch in embryonalen Zellen im A-Band darstellen (Müller et al., 2021). Fbx32 und MuRF-1 sind durch ihre Aktivität als E3-Ubiquitin-Ligasen wesentliche Spieler der Muskelatrophie auch unter verschiedenen pathologischen Bedingungen und sorgen somit auch für den Abbau von Sarkomerstrukturen (Rom und Reznick, 2016). Für Fbx32 sind jedoch weiterhin wenige Ziele bekannt, die diesen

Verlust an Muskelmasse hinreichend erklären. So interagiert Fbx32 u.a. mit MyoD, einem myogenen Regulationsfaktor, und markiert diesen durch Polyubiquitinierung für den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Tintignac et al., 2005). Titin wurde mit den vorliegenden Untersuchungen als weiterer Interaktionspartner identifiziert. Dies erklärt möglicherweise einen weiteren Teil der Rolle von Fbx32 in der Muskelatrophie. Es ist vorstellbar, dass Fbx32 Titin durch Ubiquitinierung für den Abbau markiert. Mdm2 ist bekannt durch seine Rolle in der Pathophysiologie maligner Tumore und der damit einhergehenden Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 (Lam und Roudier, 2019). Diese Interaktion erklärt unter anderem auch die hier dargestellte Lokalisation in den Nuklei adulter Rattenkardiomyozyten. Die gezeigte Affinität zwischen Mdm2, der Region A168-170 und der Titin-Kinase steht nicht im Einklang mit der Assoziation zu den Z-Scheiben der Sarkomere in den Immunfluoreszenzfärbungen. Dies macht eine *in vivo* Interaktion mit dem A-Band-Bereich von Titin unwahrscheinlicher, schließt sie jedoch in humanen Geweben nicht aus. Neben seiner Rolle in der Onkogenese steht außer Frage, dass Mdm2 auch einen entscheidenden Faktor im kardiovaskulären System darstellt (Lam und Roudier, 2019). Mdm2 wirkt in Kardiomyozyten nicht nur antiapoptotisch, sondern auch anti-hypertrophisch, wenn auch letztere Funktion bislang unzureichend verstanden ist (Toth et al., 2006). Eine Interaktion mit Titin, die potentielle Ubiquitinierung und damit die Einleitung der Degradation stellt einen weiteren hypothetischen Ansatz dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit MuRF-1, -2, -3, Fbx32 und Mdm2 (und ggf. weiteren, hier nicht untersuchten Proteinen) eine Vielzahl von E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem A-Band-Bereich des Titinmoleküls interagieren und damit potentiell in der Lage sind Titin in diesem Bereich zu ubiquitinieren und für den Abbau durch Autophagie oder das Ubiquitin-Proteasom-System zu markieren (Müller et al., 2021).

#### **4.1.2 Interaktion von E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Titin I-Band-Bereich**

Im I-Band-Bereich des Titinmoleküls konnten zahlreiche neue Interaktionen mit E3-Ubiquitin-Ligasen identifiziert werden. In den Regionen N2A, N2B und PEVK zeigte sich neben dem im Abschnitt zuvor beschriebenen A-Band ein weiteres Interaktionscluster. Affinitäten konnten für alle untersuchten Ligasen (MuRF-1/-2/-3, Mdm2, CHIP und Fbx32) nachgewiesen werden.

MuRF-1 und MuRF-3 interagieren mit der N2B Region von Titin, wohingegen MuRF-2 als einzige der getesteten E3-Ubiquitin-Ligasen mit der PEVK-Domäne interagiert. Für MuRF-2 und MuRF-3 konnte hiermit übereinstimmend eine Lokalisation im Bereich der Z-Scheiben der kultivierten Kardiomyozyten gezeigt werden. Eine Differenzierung zwischen Z-Scheibe und den nahegelegenen I-Band-Regionen von Titin ist bei der vorliegenden Sarkomerlänge der kultivierten Kardiomyozyten lichtmikroskopisch nicht exakt möglich. Die Lokalisation von MuRF-1 im A-Band lässt sich mit den Interaktionsergebnissen nicht in Einklang bringen. Andere Untersuchungen haben jedoch durchaus MuRF-1 in der nahen Z-Scheiben-Peripherie darstellen können (Centner et al., 2001). Die MuRF-Proteine scheinen also auch im I-Band-Bereich von Titin eine wichtige Rolle zu spielen. Nicht zu vergessen sei erneut, dass sie untereinander auch als Heterodimere agieren und sich bei einem Ausfall teilweise ersetzen können (Witt et al., 2005). Eine Ubiquitinierung von Titin im I-Band durch die Proteine der MuRF-Familie ist somit denkbar und stellt eine mögliche Verbindung zur Proteinqualitätskontrolle dar.

Mdm2 und Fbx32 zeigen eine Affinität zu den Titin-Regionen N2B und N2A im I-Band. Die gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen zeigen darüber hinaus die Lokalisation beider Proteine in der Z-Scheibe / im I-Band und untermauern damit eine mögliche Interaktion in diesem Bereich. Es ist bekannt, dass Mdm2 Proteine durch Polyubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markieren kann. So interagiert es beispielsweise auch mit dem an Titin assoziierten Protein *TCap* (Tian et al., 2006). Eine Ubiquitinierung des Titinfilaments im I-Band durch Mdm2 ist ebenso denkbar wie durch Fbx32. Dies würde die wichtige Rolle von Mdm2 für die kardiale Entwicklung und Funktion untermauern (Stanley-Hasnain et al., 2017). Da Fbx32 neben MuRF-1 bekanntermaßen entscheidend an der Entstehung von Muskelatrophie beteiligt ist, könnte die Interaktion mit Titin und ein damit einhergehender Abbau der Titinfilamente einen weiteren Erklärungsansatz hierfür liefern (Rom und Reznick, 2016).

Die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP interagiert mit der N2B-Region des Titinfilaments *in vitro*. Immunfluoreszenzfärbungen von CHIP verorten das Protein dazu passend im Bereich der Z-Scheibe bzw. des I-Bands sowohl in adulten, als auch in embryonalen Rattenkardiomyozyten (Müller et al., 2021). Aktivität von CHIP im Bereich der Z-Scheibe des Sarkomers wurde schon früher beschrieben. Im Rahmen von Chaperon-assistierter selektiver Autophagie (CASA) wirkt CHIP im Komplex mit den Proteinen BAG3, Hsc70

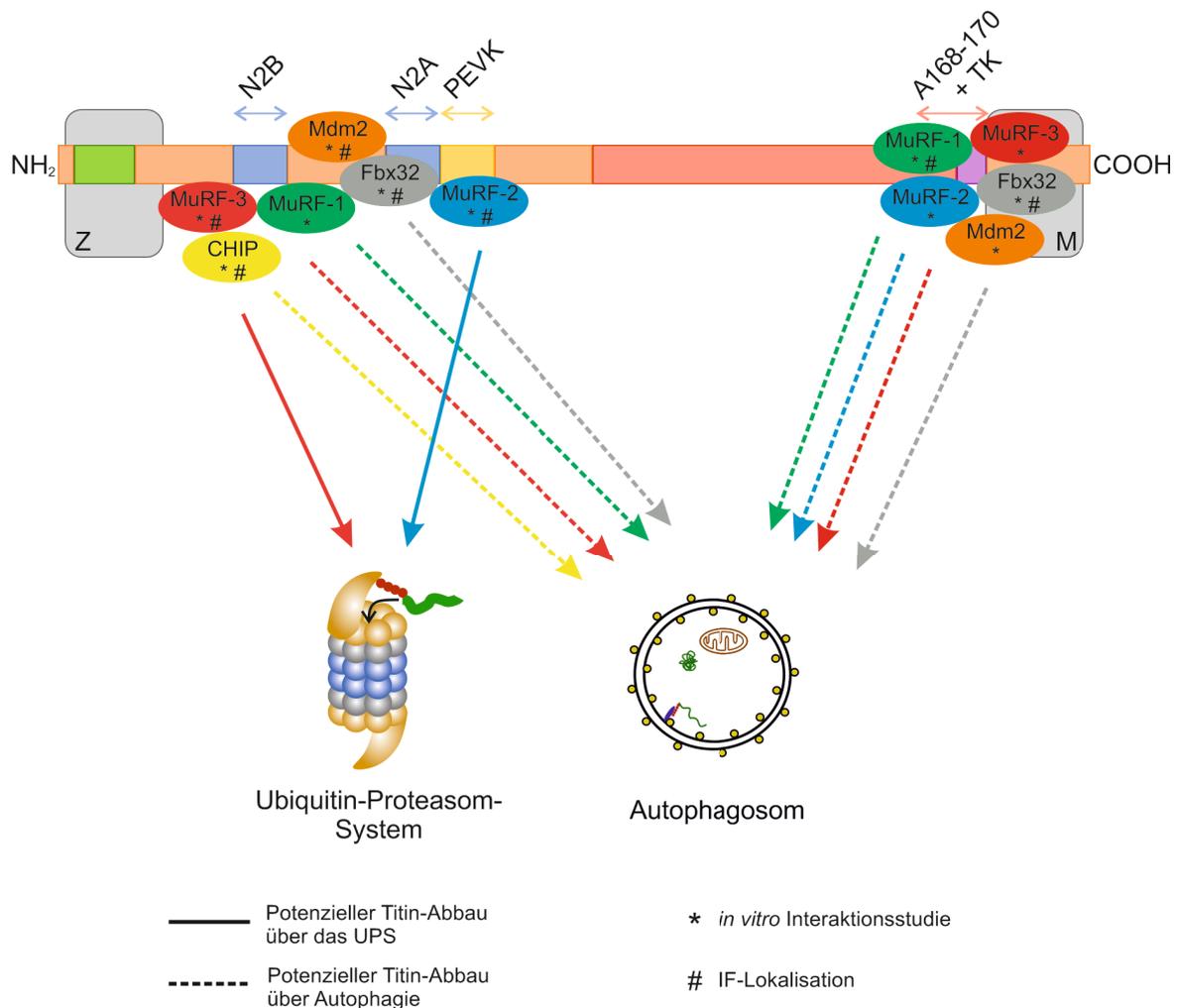
und HspB8 an der Degradation von (fehlerhaften) Proteinen mit (Arndt et al., 2010). In Kooperation mit p62 wird so die Autophagie von Z-Scheiben-Proteinen eingeleitet, z.B. ist das Aktin-bindende Protein Filamin C als Substrat beschrieben (Arndt et al., 2010). Möglicherweise ermöglicht die Interaktion von Titin mit CHIP ebenfalls einen Abbau von Titin in diesem Bereich über Autophagie. Der sogenannte CASA-Komplex spielt eine große Rolle in der Sarkomerhomöostase und ist wichtig für den Erhalt einer guten kardialen Pumpfunktion (Martin et al., 2021). Weiterhin ist CHIP ein wichtiger Schutzfaktor vor myokardialem Zelltod durch Ischämie und Reperfusion (Zhang et al., 2005). Somit ist davon auszugehen, dass neben den bekannten Zielen weitere Interaktionspartner von CHIP existieren. Mit Titin wurde hier ein weiteres mögliches Ziel herausgearbeitet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit MuRF-1, -2, -3, Mdm2, Fbx32 und CHIP eine Vielzahl von E3-Ubiquitin-Ligasen mögliche Abbauwege des Titinfilaments über Proteasomen oder Autophagie einleiten können. Zusätzlich sei erwähnt, dass E3-Ubiquitin-Ligasen Titin auch im Rahmen von Signalkaskaden monoubiquitinieren könnten. Hiermit muss nicht zwangsläufig ein Abbau des Proteins einhergehen. Potenzielle Monoubiquitinierung von Titin und ihre Auswirkungen bedürfen weiterer Untersuchungen.

#### **4.1.3 Potenzielle Abbauwege des Titinfilaments**

Insgesamt konnten die vorliegenden Untersuchungen zwei Interaktionscluster innerhalb des Titinfilaments mit E3-Ubiquitin-Ligasen aufzufindig machen. Im I-Band interagieren MuRF-1, -2, -3, Mdm2, CHIP und Fbx32 mit Titin. Im distalen A-Band interagieren MuRF-1, -2, -3, Fbx32 und ggf. Mdm2 mit Titin. Bezogen auf die enorme Größe von Titin sind multiple Interaktionen durchaus plausibel. Abbildung 22 zeigt schematisch zusammengefasst die Ergebnisse dieser Studie. Hieraus ergibt sich die Fragestellung, ob diese Interaktionen auch eine Ubiquitinierung von Titin bedeuten und wenn ja, über welche Wege der Proteinqualitätskontrolle Titin daraufhin abgebaut wird. Weiterführende Ergebnisse des Projekts zeigen starke Hinweise, dass sowohl das Ubiquitin-Proteasom-System, als auch die Autophagie an der Degradation beteiligt sind (Müller et al., 2021). Das kombinierte Herunterregulieren von MuRF-1, -2 und -3 mittels siRNA und die anschließende Inhibition der Autophagie oder der proteasomalen Aktivität in Zellkulturen embryonaler Rattenkardiomyozyten zeigen eine deutliche Reduktion der Titin-Ubiquitinierung im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Somit konnte eine Beteiligung dieser Proteine an der Ubiquitinierung gezeigt werden (Müller et al., 2021). Selektive *knock-down*

Experimente zeigen, dass MuRF-3 sowohl an Proteasom- als auch an Autophagie-assoziiierter Ubiquitinierung von Titin beteiligt ist, während MuRF-1 nur nach Autophagie- und MuRF-2 nur nach proteasomaler Inhibition Effekte zeigen (Müller et al., 2021). Werden MuRF-2 und -3 einzeln ausgeschaltet, so zeigt sich lediglich nach Inhibition der proteasomalen Aktivität eine Reduktion der Titin-Ubiquitinierung (Müller et al., 2021). Der selektive *knock-down* von MuRF-1 oder MuRF-3 führt hingegen nur nach Inhibition der Autophagie zur Reduktion der Ubiquitinierung (Müller et al., 2021). Das Ausschalten einzelner MuRF-Proteine hat jedoch keinen Effekt auf die Gesamtabbau von Titin unter basalen Bedingungen, was die Hypothese stützt, dass sich die Proteine der MuRF-Familie zumindest teilweise untereinander ersetzen können (Müller et al., 2021). Die Kombination der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit den weiterführenden siRNA-Experimenten lässt vermuten, dass MuRF-2 und MuRF-3 Titin u.a. im I-Band-Bereich ubiquitinieren und somit für den proteasomalen Abbau markieren (Müller et al., 2021). Entsprechend der in Abschnitt 3.5 gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen proteasomaler Untereinheiten der Deckel- bzw. der Kernregion lokalisieren diese im Bereich der Z-Scheibe bzw. des I-Bands der Sarkomere. Die Lokalisation von Proteasomen wurde bereits vorher in diesem Bereich beschrieben (Rudolph et al., 2019). Dies stützt die Hypothese, dass der leichter zugängliche I-Band-Bereich von Titin durch Proteasomen degradiert wird. Aufgrund der Größe des Proteins lässt sich jedoch auch hier vermuten, dass für diesen Prozess eine Art Vorverdau notwendig ist (z.B. durch Calpaine). Der zwischen Myosinfilamenten dicht gepackte und schwer zugängliche A-Band-Bereich wird vermutlich eher durch Autophagie degradiert (Müller et al., 2021). Letzteres wird auch durch die aktuellen Erkenntnisse untermauert, dass sowohl MuRF-1, als auch MuRF-2 in der Lage sind, die Autophagie-assoziierten Proteine p62 und Nbr1 im Bereich der Titin-Kinase zu rekrutieren (Bogomolovas et al., 2021). Auch für ein kombiniertes Ausschalten von CHIP und Fbx32 zeigt sich eine signifikant verminderte Titin-Ubiquitinierung nach Autophagie-Inhibition, woraus sich eine Beteiligung jener an der Markierung von Titin für den Abbau durch Autophagie ableiten lässt (Müller et al., 2021). Abbildung 22 zeigt die möglichen Verbindungen von Titin zur Proteinqualitätskontrolle über die neu identifizierten Interaktionen. Ein Vorverdau des Titinmoleküls durch Proteasen wie Calpaine oder MMP-2 könnte den E3-Ubiquitin-Ligasen z.B. einen besseren Zugang zu dem schwer zugänglichen A-Band-Bereich ermöglichen und somit synergistisch wirken, wohingegen ein Vorverdau für die Titin-Ubiquitinierung nicht nötig zu sein scheint (Müller et al., 2021).



**Abb. 22: Schematische Darstellung der Interaktion des Titinfilaments mit E3-Ubiquitin-Ligasen.** Abgebildet sind die zwei wesentlichen Interaktionscluster im A-Band und im I-Band und deren potenzielle Verbindung zum Ubiquitin-Proteasom-System oder der Autophagie. Geschlussfolgert sind diese möglichen Beziehungen aus den Ergebnissen dieser Arbeit und aus darüber hinausführenden siRNA-Experimenten, die im vorherigen Text ausführlich erläutert sind (Müller et al., 2021). Differenziert wurde zwischen Interaktionen, die mittels Immunfluoreszenz (IF, \*) oder *in vitro* Interaktionsstudie (#) detektiert wurden. Weiterhin sind mit durchgezogenen Linien potentielle Verbindungen zur Degradation durch das UPS und mit gestrichelten Linien potentielle Verbindungen zur Degradation durch Autophagie dargestellt. NH<sub>2</sub> = Aminogruppe / N-Terminus; COOH = Carboxylgruppe / C-Terminus; Z = Z-Scheibe; M = M-Linie; UPS = Ubiquitin-Proteasom-System. Verändert nach Müller et al., 2021.

Limitierend sei an dieser Stelle erwähnt, dass bei den gezeigten Ergebnissen unspezifische Bindungen nicht gänzlich auszuschließen sind. Zu untersuchen bleibt, inwieweit auch Mdm2 an der Ubiquitinierung von Titin beteiligt ist und welchen möglichen Abbauweg des Filaments dies initiiert. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass weitere E3-Ubiquitin-Ligasen mit Titin interagieren, die durch weitere Interaktionsstudien identifiziert werden müssen. Potentielle Kandidaten hierfür sind z.B. die kardialen E3-Ubiquitin-Ligasen c-CB1 (*Casitas b-lineage lymphoma*), die Ubiquitin-Protein-Ligase E3A (UBE3A), cIAP (*cellular inhibitor of apoptosis*) oder Fbx122 (*F-box and leucine-rich repeat protein 22*) (Willis et al.,

2014). Des Weiteren gilt es zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit untersuchten Ligasen nicht auch an anderen Stellen von Titin binden und das Filament ubiquitinieren. Hier wären zum Beispiel die *Z-Repeats* innerhalb der Z-Scheibe ein mögliches Ziel. Darüber hinaus benötigt es in Zukunft weitreichender Forschung bezüglich der pathophysiologischen Einbindung des Titin-*Turnover* in (Kardio-)Myopathien. Der bisherige Wissensstand und mögliche Überlegungen vor dem Hintergrund der neuen Erkenntnisse bezüglich dessen finden sich im folgenden Abschnitt.

Zusammengefasst stellt die Degradation von Titin einen hoch komplexen Prozess dar, an dem multiple E3-Ubiquitin-Ligasen und damit einhergehend mit Proteasomen, Autophagie und Calpainen verschiedenste Ebenen der Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind.

#### **4.1.4 Pathophysiologie der Titin-Degradation**

Titin ist an der Pathogenese einer Reihe von kardialen und Skelettmuskelerkrankungen beteiligt. Wenn auch die Rolle von Titin in der Pathogenese diverser Erkrankungen wenig umstritten ist, so ist nach wie vor wenig über die detaillierten Mechanismen der Einbindung des Titinfilaments bekannt. Besonders die Möglichkeit eines gestörten Titin-*Turnover* als mögliche Erkrankungsursache und therapeutisches Ziel findet aktuell noch unzureichend Anwendung. Auch für die untersuchten E3-Ubiquitin-Ligasen sind zahlreiche pathophysiologische Überlegungen bekannt. Im folgenden Abschnitt werden die neuen Erkenntnisse mit einer möglichen pathophysiologischen Einbindung von Titin bei (Herz-) Muskelerkrankungen in Verbindung gesetzt.

Ein einwandfreies Funktionieren der Proteinqualitätskontrollmechanismen ist unabdingbar für die Funktion des Herzmuskels und der Skelettmuskulatur. Die E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und Fbx32 interagieren mit Titin und sind vermutlich an dessen Abbau beteiligt. Möglicherweise lässt sich u.a. darüber ihre wichtige Rolle in der Entstehung von Muskelatrophie unterschiedlicher Genese (Tumorleiden, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, COPD) erklären (Rom und Reznick, 2016). Weiterhin wird MuRF-1 sogar als mögliches therapeutisches Ziel bei der Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) diskutiert (Adams et al., 2022). Ein Fehlen von MuRF-2 und -3 zeigt in Tierexperimenten eine verschlechterte systolische und diastolische Herzfunktion (Lodka et al., 2016). Auch hierbei wird die Interaktion mit Titin eine Rolle spielen, da Titin einen wesentlichen Einflussfaktor für die diastolische Funktion darstellt (Linke und

Hamdani, 2014). CHIP stellt einen Protektionsfaktor für einen Schaden durch Ischämie und Reperfusion im Herzmuskel dar (Zhang et al., 2005). Darüber hinaus ist CHIP Teil eines Komplexes für Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA), dessen Funktion ebenfalls entscheidend für den Erhalt kardialer Leistungsfähigkeit ist (Martin et al., 2021). Schlussendlich wirkt auch Mdm2 kardialer Hypertrophie entgegen (Hauck et al., 2017). Hierbei könnte auch die Interaktion mit Titin von Bedeutung sein. Potenziell wirkt Mdm2 unter anderem über einen Abbau von Titin antihypertrophisch.

Ein sehr aktuelles Thema ist die Beteiligung von Titin-Mutationen an der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Mutationen im Titin-Gen (TTN) führen zu Abbruchvarianten des Titinmoleküls (TTN<sub>trvs</sub> = *truncation variants*), die eine wesentliche genetische Ursache der DCM darstellen (Herman et al., 2012, McAfee et al., 2021). Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings bislang nur unzureichend verstanden. Eine mögliche Haploinsuffizienz bei heterozygoten TTN<sub>trvs</sub> wird ebenso diskutiert wie ein Einbau pathologisch verkürzter Titinmoleküle in Sarkomere (Herman et al., 2012). Viele dieser gefundenen Mutationen liegen im A-Band-Bereich von Titin und ermöglichen somit ggf. eine normale Integration in die Z-Scheibe, jedoch nicht in die M-Linie (Herman et al., 2012). Die wichtige Funktion des C-terminalen A-Band-Anteils von Titin als Mechanosensor und Signalkomplex mit zahlreichen Interaktionen würde in diesem Fall fehlen (Herman et al., 2012). Somit würden auch die weitreichenden Interaktionen von Titin mit Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle, wie die gezeigten Interaktionen und der Signalkomplex aus MuRF-Proteinen mit Nbr1 und p62, fehlen (Bogomolovas et al., 2021). Die Proteinqualitätskontrolle im distalen A-Band des Sarkomers könnte hierdurch negativ beeinflusst werden und ihren Teil zur Pathogenese der DCM beitragen.

Um ein Beispiel aus dem Bereich der Skelettmuskelerkrankungen zu nennen, wird hier die Duchenne-Muskeldystrophie erwähnt. Bereits 1989 wurde für diese Erkrankung eine deutliche Erhöhung der Titin-Degradation beschrieben (Matsumura et al., 1989). Aktuelle Forschungsbestrebungen diskutieren ein N-terminales Titin-Fragment im Urin als einen möglichen Biomarker für diese Erkrankung (Awano et al., 2018). Eine Beteiligung fehlerhafter Proteinqualitätskontrolle ist bislang jedoch unzureichend untersucht. Für die seltene Gruppe der Gliedergürtel-Muskeldystrophien (LGMD = *limb-girdle muscular dystrophy*) sind C-terminale Mutationen im Titin-Gen beschrieben, die möglicherweise in Verbindung mit einer fehlenden Calpain-3-Bindungsstelle stehen (Charton et al., 2015).

Beteiligungen weiterer fehlerhafter Proteinqualitätskontrollmechanismen bedürfen auch hier weiterer Forschung.

Das exakte Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge unterschiedlicher Herz-Kreislauf- und Skelettmuskelerkrankungen ist entscheidend für die Entwicklung zielgerichteter Therapien. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen tragen einen Teil zum Gesamtverständnis der komplexen Einbindung von Titin in die Proteinqualitätskontrolle bei und erfordern weitere Forschung an pathologischen Modellen, um mögliche pathophysiologische Auswirkungen zu identifizieren.

## **4.2 Titin-Turnover im Rahmen des Sarkomerumsatzes adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur**

### **4.2.1 Morphologische Veränderungen und Umbau der Sarkomere adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur**

Zellkulturexperimente an adulten Rattenkardiomyozyten sind weitreichend etablierte Verfahren, die die Erforschung physiologischer Prozesse und auch des Verhaltens der Zellen unter verschiedenen äußeren Bedingungen ermöglichen. Schon lange sind Modelle bekannt, die auch das langzeitige Kultivieren adulter Rattenkardiomyozyten ermöglichen (Nag et al., 1983, Volz et al., 1991). Dieses Modell wurde auch als geeignet beschrieben, um den Aufbau und Abbau von Sarkomeren zu beobachten (Person et al., 2000). In der gezeigten Studie wurden zunächst diese morphologischen Veränderungen näher untersucht, um anschließend einen detaillierteren Blick auf die Veränderungen (*Turnover*) des Titinfilaments zu bekommen.

Die Beobachtung adulter Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur zeigt deutliche morphologische Veränderungen. Bereits 24 h kultivierte Zellen zeigen einen deutlich abgerundeten Zellpol, der sonst stufig/kantig endenden, frisch isolierten Kardiomyozyten. In den darauffolgenden Tagen verbreitern sich die Zellen massiv und bilden Zellausläufer (Pseudopodien), bis sie schlussendlich deutlich größer und polygonal erscheinen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die auch meist innerhalb der ersten 72 h eine Abrundung der Zellpole sehen und darauffolgend unterschiedliche Muster zellulärer Ausbreitung (Nag et al., 1983, Mitcheson et al., 1998, Person et al., 2000). Insgesamt zeigt sich insbesondere an den Kultivierungstagen 6 bis 13 jedoch ein sehr heterogenes Muster aus leicht veränderten und massiv ausgebreiteten, formveränderten Zellen. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Person et al. überein, die dieses heterogene Muster quantitativ analysiert haben und nach Tag 12 ein Überwiegen der deutlich veränderten Zellen sehen (Person et al., 2000). Insgesamt scheinen diese Veränderungen in der vorliegenden Arbeit jedoch ca. drei Tage früher einzutreten, da sich bereits an Tag 6 viele und an Tag 9 überwiegend Zellen mit deutlichen Pseudopodien zeigen. Mitcheson et al. beschreiben jedoch, dass die Vorgänge stark von der Isolierungsqualität und den Zusätzen während der Kultivierung abhängen (Mitcheson et al., 1998). Außerdem fehlt zum definitiven Vergleich in dieser Arbeit die quantitative Auswertung, sodass sich kleinere Unterschiede erklären lassen. Beschrieben ist im Rahmen dieser Prozesse eine deutliche

Größenzunahme der Zellen (Person et al., 2000). In der vorliegenden Studie werden diese Beobachtungen um eine signifikante Zunahme der Sarkomerlänge erweitert.

In der Literatur werden die umfassenden Veränderungen adulter Kardiomyozyten in Langezeitzellkultur als ein De- und Redifferenzierungsprozess beschrieben, bei dem Myofibrillen und Sarkomerstrukturen abgebaut und anschließend neu aufgebaut und organisiert werden (Nag et al., 1983, Mitcheson et al., 1998, Person et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Färbungen des Z-Scheiben-Proteins  $\alpha$ -Aktinin legen einen Verlust der ursprünglichen Sarkomerstruktur bis zum Kultivierungstag 9 und einen anschließenden Wiederaufbau mit Neuordnung nahe. Die anfänglich stäbchenförmigen Zellen mit strikter Querstreifung entwickeln sich zu polygonal ausgebreiteten Zellen mit etwas unregelmäßiger angeordneten Myofibrillen und ähneln damit optisch embryonalen bzw. neonatalen Kardiomyozyten. Auch Person et al. beschreiben einen Verlust der Sarkomere im Zuge der Zellverbreiterung und eine Neubildung dieser Strukturen im Rahmen eines komplexen De- und Redifferenzierungsprozesses (Person et al., 2000). Die Autoren beschreiben jedoch schon an Tag 12 anhand verschiedener Sarkomerproteine eine Neuordnung der Sarkomere (Person et al., 2000). Auch in den vorliegenden Studien zeigten sich bereits an Tag 13 viele neu angelegte Myofibrillen. An Tag 20 zeigte sich, dass nahezu alle Zellen vollständig neu organisierte Myofibrillen besitzen. Dass auch die Sarkomerumstrukturierung insgesamt sehr polymorph abläuft, machte eine tageweise Vergleichbarkeit schwierig (Nag et al., 1983). Auch Mitcheson et al. beschreiben einen deutlichen Rückgang der Sarkomerstrukturen nach einer Woche in Kultur, was mit den gezeigten Ergebnissen in Einklang zu bringen ist (Mitcheson et al., 1998). Hinzu kommt, dass die vorliegenden Ubiquitin-Färbungen im Verlauf der Langzeitkultivierung die Hypothese des starken Sarkomerumsatzes stützen. Ein verstärktes Ubiquitin-Signal an Tag 4 legt einen deutlich erhöhten Proteinumsatz zu diesem Zeitpunkt nahe. Ebenso passt die deutlich verminderte Färbung an Tag 16 zu den neu angeordneten Myofibrillen. Hier wären darauf aufbauende biochemische Analysen notwendig, um Proteinubiquitinierung in diesem Verlauf exakt zu quantifizieren.

Insgesamt bestätigen die Beobachtungen die bisherigen Erkenntnisse zur Langzeitzellkultur adulter Rattenkardiomyozyten und stellen ein interessantes Modell zur Beobachtung des Titinfilaments während des Auf- und Abbaus von Sarkomerstrukturen dar.

## 4.2.2 Titin-Umbau im Verlauf der Langzeitkultivierung adulter Rattenkardiomyozyten

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigen adulte Rattenkardiomyozyten in Langzeitzellkultur einen komplexen De- und Redifferenzierungsprozess, bei dem Sarkomerstrukturen ab- und wieder aufgebaut werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen des Titin Z-Scheiben-Bereiches, des Titin M-Linien-Bereiches und der PEVK-Domäne im I-Band unterschiedliche Abschnitte des Filaments während dieses Prozesses beobachtet. Es existieren verschiedene Hypothesen über die Integration und den Abbau von Titin in das bzw. aus dem Sarkomer.

Betrachtet man zunächst den Abbau des Proteins, lässt sich aus den Ergebnissen in 3.7.2 vermuten, dass die M-Linien-Region von Titin später abgebaut wird als der Rest des Moleküls. Die Heterogenität der einzelnen Zellen an den unterschiedlichen Färbungszeitpunkten erlaubt hier jedoch keine detaillierte Aussage. Ein sukzessiver Abbau von Titin lässt sich nach wie vor nur vermuten. Möglicherweise wird der zwischen Myosinfilamenten dicht gepackte A-Band-Anteil später degradiert als die leichter zugängliche I-Band-Region des Moleküls. Um diese Hypothesen genauer zu untersuchen sind weitere Experimente aufbauend auf dem in dieser Arbeit dargestellten Modell nötig. So könnten quantitative Auswertungen der Färbungen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten möglicherweise einen genaueren Vergleich der unterschiedlichen Titin-Regionen ermöglichen. Ggf. ließe sich eine Aussage darüber treffen, ob der I-Band-Anteil des Moleküls wirklich zuerst aus dem Sarkomer abgebaut wird. Weiterhin könnten biochemische Untersuchungen der Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten Aufschluss über die Aktivität der Proteinqualitätskontrolle am Titinfilament geben. In Verbindung mit den neu entdeckten Interaktionen von Titin mit E3-Ubiquitin-Ligasen wäre eine Untersuchung deren Aktivität im Verlauf der Langzeitzellkultur adulter Rattenkardiomyozyten sicherlich aufschlussreich.

Auch der exakte Vorgang der Integration von Titin in das Sarkomer bleibt ungeklärt. Ein Modell beinhaltet die schrittweise Integration des Filaments zunächst im Bereich der Z-Scheibe und anschließend in die M-Linie, wobei Titin eine tragende Rolle in der Entstehung geordneter Sarkomere zugesprochen wird (Rhee et al., 1994, Du et al., 2008). Im Prozess des Wiederaufbaus der Sarkomere im gezeigten Zellkulturmodell zeigen sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Titin-Regionen. Dies würde jene Hypothese eher

revidieren. Dass Titin in Sarkomere parallel in die Z-Scheibe und die M-Linie integriert wird, passt jedoch zu der These von Rudolph et al., die genau diese Form des Einbaus postuliert (Rudolph et al., 2019). Der Einbau neuer Titinfilamente findet hiernach aus einem löslichen Pool an Titinmolekülen, der in Kardiomyozyten ca. 10-15% des Gesamt-Titins ausmacht, statt (Rudolph et al., 2019). Person et al. zeigten darüber hinaus in ihrem Zellkulturmodell, dass im Zuge des Neuaufbaus der Sarkomere nach  $\alpha$ -Aktinin zunächst Titin und anschließend Myosin in das Sarkomer integriert werden (Person et al., 2000). Die Ergebnisse schließen nicht aus, dass Titin als eine Art Vorlage für den Aufbau funktionstüchtiger Sarkomere dient (Labeit et al., 1997). Die in den vorliegenden Studien durchgeführten Färbungen mit dem Antikörper gegen den M-Linien-Bereich von Titin könnten neben dem vollständigen Titinfilament auch die neu entdeckte, verkürzte Chronos-Isoform von Titin anfärben (Zaubrecher et al., 2019). Diese scheint eine wichtige Rolle in der Bildung funktionstüchtiger Sarkomere zu spielen, insbesondere auch in früheren Entwicklungsstadien von Kardiomyozyten (Zaubrecher et al., 2019). Es handelt sich hierbei um eine verkürzte Isoform, die lediglich den distalen I-Band-Bereich, den A-Band-Anteil und den M-Linien-Bereich von Titin enthält (Zaubrecher et al., 2019). Die Rolle dieser Isoform im dargestellten Zellkulturmodell sollte daher mittels spezifischer Antikörper genauer untersucht werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Integration und Degradation von Titin komplexe Prozesse sind, die für das Detailverständnis weiterer Forschung bedürfen. Titin wird vermutlich als Ganzes parallel in das Sarkomer integriert und spielt eine wichtige Rolle im Aufbau funktionstüchtiger Sarkomere. Die komplexe Degradation geschieht möglicherweise Domänen-spezifisch, wobei der leicht zugängliche I-Band-Anteil ggf. schneller degradiert wird als der schwerer zugängliche A-Band-Anteil.

## 4.3 Schlussfolgerungen

Die Degradation von Titin stellt einen komplex regulierten Prozess dar, dessen Verständnis für die physiologische Funktion von Muskelzellen und die Pathophysiologie unterschiedlichster (Herz-)Muskelkrankungen unabdingbar ist. Diese Arbeit hat gezeigt, dass mit MuRF-1, -2, -3, CHIP, Fbx32 und Mdm2 unterschiedliche E3-Ligasen am Abbau von Titin beteiligt sind und eine Verbindung zu den wichtigen Proteinqualitätskontrollmechanismen (Ubiquitin-Proteasom-System und Autophagie) schaffen. Hierbei zeigten sich zwei wesentliche Interaktionscluster innerhalb des Titinmoleküls sowohl im I-Band-Bereich, rund um die Regionen N2A, N2B und PEVK, als auch im distalen A-Band-Bereich an der Titin-Kinase und den proximal gelegenen Abschnitten A168-170. MuRF-2 und -3 ubiquitinieren Titin vermutlich im I-Band-Bereich und stellen eine Verbindung zum Ubiquitin-Proteasom-System her (Müller et al., 2021). Der schwieriger zugängliche A-Band-Anteil des Filaments wird vermutlich durch Autophagie degradiert (Müller et al., 2021). Die neu entdeckten Verbindungen zwischen der Proteinqualitätskontrolle und dem Titinfilament benötigen weiterführende Untersuchungen bezüglich ihrer Rolle in der Pathogenese von (Herz-)Muskelkrankungen. Weiterhin konnte reproduziert werden, dass adulte Rattenkardiomyozyten eine umfassende Formwandlung und Neuorganisation ihrer Sarkomere im Rahmen von Langzeitzellkulturexperimenten durchlaufen. Hierbei werden auch Titinfilamente ab- und wieder aufgebaut. Es besteht die Tendenz dazu, dass der Abbau des schwer zugänglichen Titin A-Band-Bereichs erst zu einem späteren Zeitpunkt geschieht als der Abbau des I-Band-Anteils. Zu Bestätigung dieser Hypothese benötigt es allerdings quantitative Studien und Ergänzungen durch biochemische Untersuchungen. Schlussendlich scheint, in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur, Titin als Ganzes parallel in die Z-Scheibe und die M-Linie des Sarkomers integriert zu werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adams, V., Schauer, A., Augstein, A., Kirchhoff, V., Draskowski, R., Jannasch, A., Goto, K., Lyall, G., Mannel, A., Barthel, P., Mangner, N., Winzer, E. B., Linke, A. & Labeit, S. 2022. Targeting MuRF1 by small molecules in a HFpEF rat model improves myocardial diastolic function and skeletal muscle contractility. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*.
- Ali, M. A., Cho, W. J., Hudson, B., Kassiri, Z., Granzier, H. & Schulz, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- Anderson, B. R. & Granzier, H. L. 2012. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Prog Biophys Mol Biol*, 110, 204-17.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Furst, D. O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B. K., Hoch, M. & Hohfeld, J. 2010. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*, 20, 143-8.
- Awano, H., Matsumoto, M., Nagai, M., Shirakawa, T., Maruyama, N., Iijima, K., Nabeshima, Y. I. & Matsuo, M. 2018. Diagnostic and clinical significance of the titin fragment in urine of Duchenne muscular dystrophy patients. *Clin Chim Acta*, 476, 111-116.
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- Bard, J. a. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C. & Martin, A. 2018. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*, 87, 697-724.
- Beckendorf, L. & Linke, W. A. 2015. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 25-36.
- Berndsen, C. E. & Wolberger, C. 2014. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 301-7.
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., Dechiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D. & Glass, D. J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294, 1704-8.

- Bogomolovas, J., Fleming, J. R., Franke, B., Manso, B., Simon, B., Gasch, A., Markovic, M., Brunner, T., Knoll, R., Chen, J., Labeit, S., Scheffner, M., Peter, C. & Mayans, O. 2021. Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep*, 22, e48018.
- Bogomolovas, J., Gasch, A., Simkovic, F., Rigden, D. J., Labeit, S. & Mayans, O. 2014. Titin kinase is an inactive pseudokinase scaffold that supports MuRF1 recruitment to the sarcomeric M-line. *Open Biol*, 4, 140041.
- Braten, O., Livneh, I., Ziv, T., Admon, A., Kehat, I., Caspi, L. H., Gonen, H., Bercovich, B., Godzik, A., Jahandideh, S., Jaroszewski, L., Sommer, T., Kwon, Y. T., Guharoy, M., Tompa, P. & Ciechanover, A. 2016. Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4639-47.
- Budhidarmo, R., Nakatani, Y. & Day, C. L. 2012. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem Sci*, 37, 58-65.
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., Mcelhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H. & Labeit, S. 2001. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, 306, 717-26.
- Chang, W., Webster, D. R., Salam, A. A., Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J. P. & Bulinski, J. C. 2002. Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J Biol Chem*, 277, 30690-8.
- Charton, K., Sarparanta, J., Vihola, A., Milic, A., Jonson, P. H., Suel, L., Luque, H., Boumela, I., Richard, I. & Udd, B. 2015. CAPN3-mediated processing of C-terminal titin replaced by pathological cleavage in titinopathy. *Hum Mol Genet*, 24, 3718-31.
- Chen, L., Tang, F., Gao, H., Zhang, X., Li, X. & Xiao, D. 2021. CAPN3: A musclespecific calpain with an important role in the pathogenesis of diseases (Review). *Int J Mol Med*, 48.
- Clarke, B. A., Drujan, D., Willis, M. S., Murphy, L. O., Corpina, R. A., Burova, E., Rakhilin, S. V., Stitt, T. N., Patterson, C., Latres, E. & Glass, D. J. 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, 6, 376-85.
- Costelli, P., Reffo, P., Penna, F., Autelli, R., Bonelli, G. & Baccino, F. M. 2005. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2134-46.

- Da Silva Lopes, K., Pietas, A., Radke, M. H. & Gotthardt, M. 2011. Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres. *J Cell Biol*, 193, 785-98.
- Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 78, 399-434.
- Du, A., Sanger, J. M. & Sanger, J. W. 2008. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Dev Biol*, 318, 236-46.
- Duda, D. M., Olszewski, J. L., Schuermann, J. P., Kurinov, I., Miller, D. J., Nourse, A., Alpi, A. F. & Schulman, B. A. 2013. Structure of HHARI, a RING-IBR-RING ubiquitin ligase: autoinhibition of an Ariadne-family E3 and insights into ligation mechanism. *Structure*, 21, 1030-41.
- Eckels, E. C., Tapia-Rojo, R., Rivas-Pardo, J. A. & Fernandez, J. M. 2018. The Work of Titin Protein Folding as a Major Driver in Muscle Contraction. *Annu Rev Physiol*, 80, 327-351.
- Esser, C., Scheffner, M. & Hohfeld, J. 2005. The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 280, 27443-8.
- Foletta, V. C., White, L. J., Larsen, A. E., Leger, B. & Russell, A. P. 2011. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch*, 461, 325-35.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougerousse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J. S., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circulation Research*, 86, 1114-1121.
- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R. & Weber, K. 1988. The Organization of Titin Filaments in the Half-Sarcomere Revealed by Monoclonal-Antibodies in Immunoelectron Microscopy - a Map of 10 Nonrepetitive Epitopes Starting at the Z-Line Extends Close to the M-Line. *Journal of Cell Biology*, 106, 1563-1572.
- Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K. & Furst, D. O. 1996. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 11), 2747-54.
- Gregorio, C. C., Perry, C. N. & Mcelhinny, A. S. 2005. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 389-400.

- Gregorio, C. C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H. & Labeit, S. 1998. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol*, 143, 1013-27.
- Grice, G. L. & Nathan, J. A. 2016. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*, 73, 3497-506.
- Gundersen, G. G., Khawaja, S. & Bulinski, J. C. 1989. Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol*, 109, 2275-88.
- Guo, W., Bharmal, S. J., Esbona, K. & Greaser, M. L. 2010. Titin diversity--alternative splicing gone wild. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 753675.
- Hauck, L., Stanley-Hasnain, S., Fung, A., Grothe, D., Rao, V., Mak, T. W. & Billia, F. 2017. Cardiac-specific ablation of the E3 ubiquitin ligase Mdm2 leads to oxidative stress, broad mitochondrial deficiency and early death. *PLoS One*, 12, e0189861.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-9.
- Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S. & Sorimachi, H. 2008. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283, 14801-14.
- Hein, S. & Schaper, J. 1996. Pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology. *Curr Opin Cardiol*, 11, 293-301.
- Hein, S., Scholz, D., Fujitani, N., Rennollet, H., Brand, T., Friedl, A. & Schaper, J. 1994. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 26, 1291-306.
- Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., Depalma, S. R., McDonough, B., Sparks, E., Teodorescu, D. L., Cirino, A. L., Banner, N. R., Pennell, D. J., Graw, S., Merlo, M., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Bos, J. M., Ackerman, M. J., Mitchell, R. N., Murry, C. E., Lakdawala, N. K., Ho, C. Y., Barton, P. J., Cook, S. A., Mestroni, L., Seidman, J. G. & Seidman, C. E. 2012. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 366, 619-28.
- Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., Labeit, S. & Granzier, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and

- conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- Horackova, M. & Byczko, Z. 1997. Differences in the structural characteristics of adult guinea pig and rat cardiomyocytes during their adaptation and maintenance in long-term cultures: confocal microscopy study. *Exp Cell Res*, 237, 158-75.
- Horowitz, R., Maruyama, K. & Podolsky, R. J. 1989. Elastic Behavior of Connectin Filaments during Thick Filament Movement in Activated Skeletal-Muscle. *Journal of Cell Biology*, 109, 2169-2176.
- Isaacs, W. B., Kim, I. S., Struve, A. & Fulton, A. B. 1989. Biosynthesis of titin in cultured skeletal muscle cells. *J Cell Biol*, 109, 2189-95.
- Johansen, T. & Lamark, T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7, 279-96.
- Kamadurai, H. B., Qiu, Y., Deng, A., Harrison, J. S., Macdonald, C., Actis, M., Rodrigues, P., Miller, D. J., Souphron, J., Lewis, S. M., Kurinov, I., Fujii, N., Hammel, M., Piper, R., Kuhlman, B. & Schulman, B. A. 2013. Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *Elife*, 2, e00828.
- Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H. H., Rockman, H. A. & Patterson, C. 2004. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 18135-40.
- Koser, F., Loescher, C. & Linke, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*, 286, 2240-2260.
- Kötter, S., Andresen, C. & Krüger, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- Kötter, S., Kazmierowska, M., Andresen, C., Bottermann, K., Grandoch, M., Gorressen, S., Heinen, A., Moll, J. M., Scheller, J., Gödecke, A., Fischer, J. W., Schmitt, J. P. & Krüger, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- Krüger, M., Kohl, T. & Linke, W. A. 2006. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H496-506.
- Krüger, M. & Linke, W. A. 2009. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 490-8.

- Krüger, M. & Linke, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A. & Trinick, J. 1992. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J*, 11, 1711-6.
- Labeit, S. & Kolmerer, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- Labeit, S., Kolmerer, B. & Linke, W. A. 1997. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res*, 80, 290-4.
- Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., Segura, C. T. & Leibovitch, S. A. 2008. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J*, 27, 1266-76.
- Lam, B. & Roudier, E. 2019. Considering the Role of Murine Double Minute 2 in the Cardiovascular System? *Front Cell Dev Biol*, 7, 320.
- Lamark, T. & Johansen, T. 2012. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol*, 2012, 736905.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B. & Gautel, M. 2005. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308, 1599-603.
- Lee, E. J., Peng, J., Radke, M., Gotthardt, M. & Granzier, H. L. 2010. Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 449-58.
- Li, S., Guo, W., Dewey, C. N. & Greaser, M. L. 2013. Rbm20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor. *Nucleic Acids Research*, 41, 2659-2672.
- Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S. & Joazeiro, C. A. 2008. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One*, 3, e1487.
- Linke, W. A. 2008. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77, 637-48.

- Linke, W. A. 2018. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*, 80, 389-411.
- Linke, W. A. & Hamdani, N. 2014. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Ruegg, J. C. & Labeit, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- Linke, W. A., Kulke, M., Li, H., Fujita-Becker, S., Neagoe, C., Manstein, D. J., Gautel, M. & Fernandez, J. M. 2002. PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties. *J Struct Biol*, 137, 194-205.
- Linke, W. A., Rudy, D. E., Centner, T., Gautel, M., Witt, C., Labeit, S. & Gregorio, C. C. 1999. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *Journal of Cell Biology*, 146, 631-644.
- Lodka, D., Pahuja, A., Geers-Knorr, C., Scheibe, R. J., Nowak, M., Hamati, J., Kohncke, C., Purfurst, B., Kanashova, T., Schmidt, S., Glass, D. J., Morano, I., Heuser, A., Kraft, T., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., Dittmar, G., Sommer, T. & Fielitz, J. 2016. Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 7, 165-80.
- Loescher, C. M., Hobbach, A. J. & Linke, W. A. 2021. Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics and medical significance. *Cardiovasc Res*.
- Lokireddy, S., Wijesoma, I. W., Sze, S. K., Mcfarlane, C., Kambadur, R. & Sharma, M. 2012. Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303, C512-29.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. & Weissman, A. M. 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11364-9.
- Lydeard, J. R., Schulman, B. A. & Harper, J. W. 2013. Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep*, 14, 1050-61.
- Makarenko, I., Opitz, C. A., Leake, M. C., Neagoe, C., Kulke, M., Gwathmey, J. K., Del Monte, F., Hajjar, R. J. & Linke, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- Martin, T. G., Myers, V. D., Dubey, P., Dubey, S., Perez, E., Moravec, C. S., Willis, M. S., Feldman, A. M. & Kirk, J. A. 2021. Cardiomyocyte contractile impairment in heart

- failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nat Commun*, 12, 2942.
- Maspero, E., Valentini, E., Mari, S., Cecatiello, V., Soffientini, P., Pasqualato, S. & Polo, S. 2013. Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 696-701.
- Matsumura, K., Shimizu, T., Nonaka, I. & Mannen, T. 1989. Immunochemical study of connectin (titin) in neuromuscular diseases using a monoclonal antibody: connectin is degraded extensively in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci*, 93, 147-56.
- Mcafee, Q., Chen, C. Y., Yang, Y., Caporizzo, M. A., Morley, M., Babu, A., Jeong, S., Brandimarto, J., Bedi, K. C., Jr., Flam, E., Cesare, J., Cappola, T. P., Margulies, K., Prosser, B. & Arany, Z. 2021. Truncated titin proteins in dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, 13, eabd7287.
- Mcclellan, A. J. & Frydman, J. 2001. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat Cell Biol*, 3, E51-3.
- Mcelhinny, A. S., Perry, C. N., Witt, C. C., Labeit, S. & Gregorio, C. C. 2004. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci*, 117, 3175-88.
- Misaka, T., Yoshihisa, A. & Takeishi, Y. 2019. Titin in muscular dystrophy and cardiomyopathy: Urinary titin as a novel marker. *Clin Chim Acta*, 495, 123-128.
- Mitcheson, J. S., Hancox, J. C. & Levi, A. J. 1998. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res*, 39, 280-300.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-75.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69, 1237-45.
- Müller, E., Salcan, S., Bongardt, S., Barbosa, D. M., Krüger, M. & Kötter, S. 2021. E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Sci Rep*, 11, 21134.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. & Tanaka, K. 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *Embo Reports*, 2, 1133-1138.

- Nag, A. C., Cheng, M., Fischman, D. A. & Zak, R. 1983. Long-term cell culture of adult mammalian cardiac myocytes: electron microscopic and immunofluorescent analyses of myofibrillar structure. *J Mol Cell Cardiol*, 15, 301-17.
- Nagueh, S. F., Shah, G., Wu, Y., Torre-Amione, G., King, N. M., Lahmers, S., Witt, C. C., Becker, K., Labeit, S. & Granzier, H. L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 155-62.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W. L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., Baba, M., Mcnew, J. A., Jiang, X., Reggiori, F., Melia, T. J. & Klionsky, D. J. 2011. SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell*, 146, 290-302.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. & Chandu, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 31, 137-55.
- Neagoe, C., Kulke, M., Del Monte, F., Gwathmey, J. K., De Tombe, P. P., Hajjar, R. J. & Linke, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- Nishikawa, K., Lindstedt, S. L., Hessel, A. & Mishra, D. 2020. N2A Titin: Signaling Hub and Mechanical Switch in Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*, 21.
- Oh, E., Akopian, D. & Rape, M. 2018. Principles of Ubiquitin-Dependent Signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 34, 34, 137-162.
- Orlowski, M. & Wilk, S. 2000. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*, 383, 1-16.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. & Johansen, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- Perera, S., Holt, M. R., Mankoo, B. S. & Gautel, M. 2011. Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Dev Biol*, 351, 46-61.
- Perera, S., Mankoo, B. & Gautel, M. 2012. Developmental regulation of MURF E3 ubiquitin ligases in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 33, 107-22.

- Person, V., Kostin, S., Suzuki, K., Labeit, S. & Schaper, J. 2000. Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3851-9.
- Pizon, V., Iakovenko, A., Van Der Ven, P. F., Kelly, R., Fatu, C., Furst, D. O., Karsenti, E. & Gautel, M. 2002. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci*, 115, 4469-82.
- Pohl, C. & Dikic, I. 2019. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 366, 818-822.
- Portbury, A. L., Willis, M. S. & Patterson, C. 2011. Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*, 286, 9929-34.
- Prado, L. G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C. A. & Linke, W. A. 2005. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, 126, 461-80.
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y. & Ouali, A. 2005. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J*, 272, 2578-90.
- Rhee, D., Sanger, J. M. & Sanger, J. W. 1994. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 28, 1-24.
- Rivas-Pardo, J. A., Eckels, E. C., Popa, I., Kosuri, P., Linke, W. A. & Fernandez, J. M. 2016. Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction. *Cell Rep*, 14, 1339-1347.
- Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. 2014. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 53, 167-78.
- Rom, O. & Reznick, A. Z. 2016. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radic Biol Med*, 98, 218-230.
- Rudolph, F., Huttmeister, J., Da Silva Lopes, K., Juttner, R., Yu, L., Bergmann, N., Friedrich, D., Preibisch, S., Wagner, E., Lehnart, S. E., Gregorio, C. C. & Gotthardt, M. 2019. Resolving titin's lifecycle and the spatial organization of protein turnover in mouse cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 25126-25136.

- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A. & Guan, K. L. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15, 741-50.
- Sciaretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D. & Sadoshima, J. 2018. The Role of Autophagy in the Heart. *Annual Review of Physiology*, 80, 1-26.
- Seibenhener, M. L., Geetha, T. & Wooten, M. W. 2007. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett*, 581, 175-9.
- Skaar, J. R., Pagan, J. K. & Pagano, M. 2013. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 369-81.
- Spencer, J. A., Eliazar, S., Ilaria, R. L., Jr., Richardson, J. A. & Olson, E. N. 2000. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol*, 150, 771-84.
- Stanley-Hasnain, S., Hauck, L., Grothe, D., Aschar-Sobbi, R., Beca, S., Butany, J., Backx, P. H., Mak, T. W. & Billia, F. 2017. p53 and Mdm2 act synergistically to maintain cardiac homeostasis and mediate cardiomyocyte cell cycle arrest through a network of microRNAs. *Cell Cycle*, 16, 1585-1600.
- Stefanetti, R. J., Lamon, S., Wallace, M., Vendelbo, M. H., Russell, A. P. & Vissing, K. 2015. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflugers Arch*, 467, 1523-1537.
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D. & Glass, D. J. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14, 395-403.
- Tan, J. M., Wong, E. S., Kirkpatrick, D. S., Pletnikova, O., Ko, H. S., Tay, S. P., Ho, M. W., Troncoso, J., Gygi, S. P., Lee, M. K., Dawson, V. L., Dawson, T. M. & Lim, K. L. 2008. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 17, 431-9.
- Tian, L. F., Li, H. Y., Jin, B. F., Pan, X., Man, J. H., Zhang, P. J., Li, W. H., Liang, B., Liu, H., Zhao, J., Gong, W. L., Zhou, T. & Zhang, X. M. 2006. MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 355-61.

- Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P. & Leibovitch, S. A. 2005. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 280, 2847-56.
- Toth, A., Nickson, P., Qin, L. L. & Erhardt, P. 2006. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 281, 3679-89.
- Tskhovrebova, L. & Trinick, J. 2010. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 612482.
- Van Der Pijl, R., Strom, J., Conijn, S., Lindqvist, J., Labeit, S., Granzier, H. & Ottenheijm, C. 2018. Titin-based mechanosensing modulates muscle hypertrophy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9, 947-961.
- Volz, A., Piper, H. M., Siegmund, B. & Schwartz, P. 1991. Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol*, 23, 161-73.
- Wang, C. & Wang, X. 2015. The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1852, 188-94.
- Wang, K. & Klionsky, D. J. 2011. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*, 7, 297-300.
- Waters, S., Marchbank, K., Solomon, E., Whitehouse, C. & Gautel, M. 2009. Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett*, 583, 1846-52.
- Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S. & Klevit, R. E. 2011. UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*, 474, 105-8.
- Whipple, G. & Koohmaraie, M. 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *J Anim Sci*, 69, 4449-60.
- Willis, M. S., Bevilacqua, A., Pulinilkunnil, T., Kienesberger, P., Tannu, M. & Patterson, C. 2014. The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*, 71, 43-53.
- Willis, M. S. & Patterson, C. 2006. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system. *J Mol Cell Cardiol*, 41, 567-79.
- Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C. & Labeit, S. 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 350, 713-22.

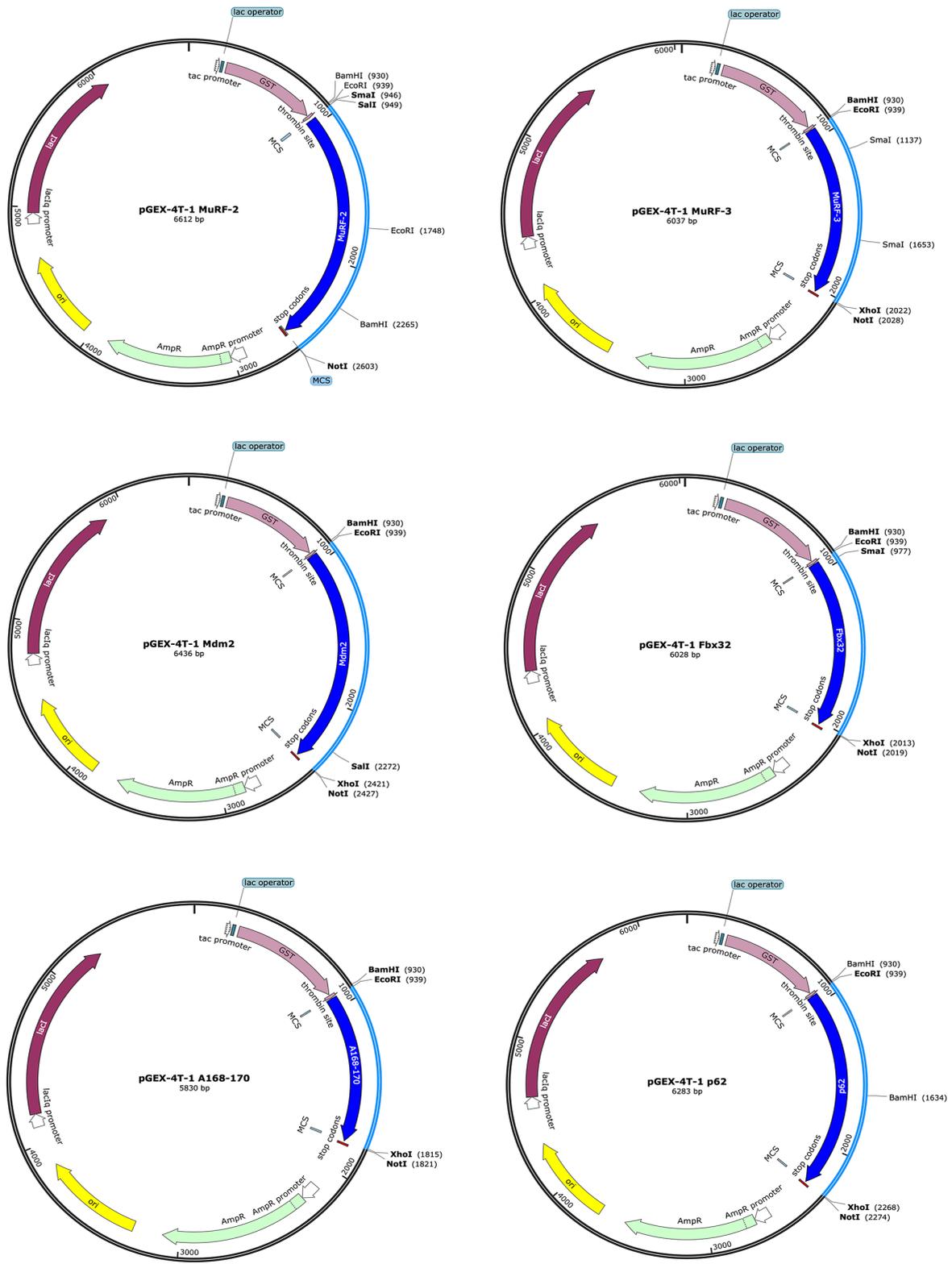
- Yamasaki, R., Wu, Y., McNabb, M., Greaser, M., Labeit, S. & Granzier, H. 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 90, 1181-8.
- Zaubrecher, R. J., Abel, A. N., Beussman, K., Leonard, A., Von Frieling-Salewsky, M., Fields, P. A., Pabon, L., Reinecke, H., Yang, X., Macadangdang, J., Kim, D. H., Linke, W. A., Sniadecki, N. J., Regnier, M. & Murry, C. E. 2019. Cronos Titin Is Expressed in Human Cardiomyocytes and Necessary for Normal Sarcomere Function. *Circulation*, 140, 1647-1660.
- Zhang, C., Xu, Z., He, X. R., Michael, L. H. & Patterson, C. 2005. CHIP, a cochaperone/ubiquitin ligase that regulates protein quality control, is required for maximal cardioprotection after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H2836-42.

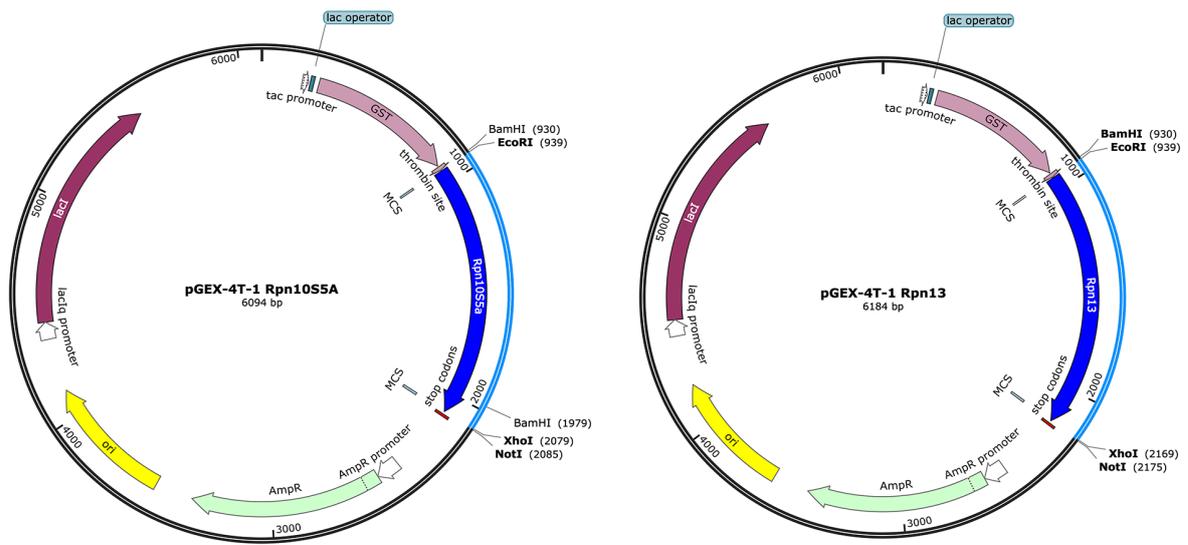
## **Internetquellen**

URL: [https://smart.servier.com/smart\\_image/muscle-16/](https://smart.servier.com/smart_image/muscle-16/); abgerufen am 15.09.2020

# 6 Anhang

Anhang 1: Übersicht der hergestellten Konstrukte. GST = Glutathion-S-Transferase; MCS = *multiple cloning site*; AmpR = Ampicillinresistenzkassette; ori = Replikationsursprung; lacI = lac-Repressorgen.





## Anhang 2: Lizenzen zu den Abbildungen 14, 15 und 16

Quelle: Müller, E., Salcan, S., Bongardt, S., Barbosa, D. M., Krüger, M. & Kötter, S. (2021), E3 ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Scientific Reports*, 11, 21134.

*Scientific Reports* ist ein *Open Access Journal*. Alle Inhalte inkl. Bildmaterial unterliegen der *Creative Commons Attribution 4.0 International Lizenz*, die freies Vervielfältigen und verändern jeglicher Abbildungen genehmigt. Die Lizenz ist abzurufen unter <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## Anhang 3: Lizenz zu Abbildung 7

Quelle: Kötter, S., Andresen, C. & Krüger, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Martina Krüger für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Zuteilung zu diesem spannenden Projekt, die außergewöhnliche Zusammenarbeit und die Begutachtung meiner Arbeit. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sebastian Kötter für die tagtägliche Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für die ausführliche Einarbeitung, die Teilhabe an diesem aufregenden Projekt, die Veröffentlichung dieser Arbeit, die regelmäßige Korrektur meiner Dissertationsschrift und das ständig offene Ohr für meine Fragen. Auch Herrn Prof. Dr. Joachim Schmitt möchte ich für die Begutachtung meiner Arbeit danken. Ein großes Dankeschön geht an die gesamte AG Krüger, insbesondere an Sabine Bongardt für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen schönen Stunden außerhalb des Instituts (z.B. im Rahmen der Weihnachtsfeiern), die wir alle zusammen verbracht haben. Julian Karpf möchte ich insbesondere für das gemeinsame Freisemester danken, in welchem wir uns gegenseitig bei unserer Arbeit unterstützt und auch frustrierende Momente zusammen durchgestanden haben. Bedanken möchte ich mich auch für die Ermöglichung der Teilnahme an der Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2019 in Ulm bei Frau Prof. Krüger und Herrn Dr. Kötter. Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke für die angenehme Zusammenarbeit. Dem Institut für Neurophysiologie möchte ich für die regelmäßige Nutzung des Sonifier 250 danken. Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für den Rückhalt und die tatkräftige Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit, die so manche schwierige Phase abgefangen und kompensiert haben. Gleiches gilt für meinen gesamten Freundeskreis, von dem ich seit Beginn an große Unterstützung erfahren durfte und mit dem ich unglaubliche Erlebnisse in dieser Zeit teile. Vielen Dank hier auch an Bastian Benner für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Allen voran gilt meiner Freundin Leona Salewski ein ganz besonderer Dank für die unglaubliche Unterstützung seit dem ersten Semester bis hin zu den letzten Schreibaarbeiten dieser Arbeit. Ohne diesen Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen.