

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

**Arretierung embryonaler Rattenkardiomyozyten induziert
den Titin-Turnover unter Beteiligung intrazellulärer Systeme
der Protein-Qualitätskontrolle**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sina Charlotte Weber

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachter: PD. Dr. Doreen Floß

Zusammenfassung

Das Muskelprotein Titin ist mit einer Größe von 3-3,7 MDa das größte bekannte Protein. Lokalisiert ist es innerhalb der kleinsten kontraktilen Einheit der quergestreiften Herz- und Skelettmuskulatur, dem Sarkomer. Die zwei im Herzen vorkommenden Isoformen sind die längere und elastischere Isoform N2BA und die kürzere und steifere Isoform N2B. Während der embryonalen Entwicklung wird zunächst eine embryonale N2BA-Isoform exprimiert, welche postnatal durch adulte N2BA- und N2B-Isoformen ersetzt wird. Der Abbau von Titin stellt aufgrund seiner festen Verankerung im Sarkomer und der Größe des Proteins eine komplexe Aufgabe für die Zelle dar. Die an diesem Prozess beteiligten molekularen Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden und waren daher Gegenstand dieser Arbeit. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass den intrazellulären Abbausystemen, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie, hierbei eine entscheidende Rolle zukommt, weshalb wir deren Beteiligung am Abbau Titins untersuchten. Indem wir spontan kontrahierende embryonale Rattenkardiomyozyten durch Kultivierung Ansätzen mit KCL,- und Blebbistatin-versetztem Nährmedien mechanisch arretierten, sollte ein durch Nicht-Nutzung beschleunigter Abbau des kontraktilen Apparats erreicht werden. So konnten wir zeigen, dass das Titin-Degradationsprodukt in arretierten Zellen vermehrt anfällt und das Titin bevorzugt gegenüber anderen Sarkomerproteinen abgebaut wird. Wir fertigten biochemische Analysen verschiedener Autophagie- und Proteasomenmarker-, sowie Marker beteiligter Signaltransduktionswege an und analysierten den Ubiquitinierungsstatus Titins über eine Kultivierungsdauer von 15 Tagen. Die Arretierung der Zellen ging mit vermehrter Ubiquitinierung Titins und mit einem beschleunigten Isoformen-*switch* einher. Es konnte eine Verringerung der Aktivität proteasomaler Enzyme gemessen werden, während es zu einem Anstieg eines proteasomalen Markerproteins kam. Da wir einen sequenziellen Abbau der verschiedenen Titindomänen vermuteten, analysierten wir die Strukturveränderung der Zellen, indem wir Immunfluoreszenzfärbungen anfertigten. Hier zeigte sich kein klares Bild einer sequenziellen Degradation. Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass durch die Arretierung der kontraktilen Zellen der Titinturnover induziert werden kann und es zu einem beschleunigten Isoformen-*switch* kommt. Hierdurch erlangen die Zellen vorzeitig ihre adulte Isoformenkomposition. Es kommt weiter zu einem Anstieg

ubiquitinierten Titins, was auf eine Beteiligung der intrazellulären Abbausystemen hinweist.

Abstract

With its size of 3-3,7 MDa, the muscle protein Titin is the largest known protein in humans. It is localised within the smallest contractile unit of the striated heart- and skeletal muscle, the sarcomere in heart muscle tissue. Titin is expressed as two major isoforms- the longer and more compliant isoform N2BA and the shorter and stiffer isoform N2B. During embryonic development a embryonic N2BA isoform is expressed, which is replaced in the perinatal period by adult N2BA- and N2B-isoforms. Due to its massive size and its tight incorporation within the sarcomere Titin degradation is a complex task for the cell and the molecular mechanisms involved in titin turnover are not fully understood. In this work we aimed to investigate the Titin degradation especially regarding the impact of systems of protein quality control. Previous research could already show that the two important systems of protein quality control, the Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) and the Autophagy, play central roles in this process. By cultivation of spontaneously contracting embryonic rat cardiomyocytes in KCL- and Blebbistatin-containing media, we achieved the mechanical arrest of the cells. Cardiomyocyte arrest accelerated the degradation of the contractile machinery of the muscle cells, due to the resulting non-usage of the contractile machinery. That way we could show a higher production of the Titin degradation product T2 in arrested cells and a preferred degradation of Titin over other sarcomere proteins. We also investigated different marker proteins for the protein quality control systems autophagy and UPS, along with proteins important for signal transduction. Furthermore, we analysed the ubiquitination levels of Titin, using Western blot analysis. We performed our analysis over a cultivation duration of 15 days and found higher ubiquitination levels of Titin and an accelerated embryonic isoform-*switch*. Furthermore, we aimed to measure the activity of the proteasome to find out more about the role of the UPS within the degradation process of Titin. For the observed period, we could observe decreased proteasomal enzyme activity in arrested cells, while we could show elevated levels of a proteasomal marker protein. Assuming a sequential degradation of the different Titin domains, we analysed structural alterations in arrested cells, using immunofluorescent staining and microscopy. Here we could not show such a sequential degradation. Summarizing our results, we could show that mechanical arrest, either caused by treating the cells with KCL or Blebbistatin, induces Titin

turnover and the Titin isoform-*switch*. An increase of ubiquitinated titin indicates the involvement of autophagy and the UPS.

Abkürzungsverzeichnis

A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B, Gene: AKT1,2 und 3
AMPK	AMP activated protein kinase
ATG	Autophagy-related-gene
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclic adenosine monophosphat
cGMP	Cyclic guanosine monophosphat
CTRL	Kontrolle (<i>control</i>)
D	Tag (<i>day</i>)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ERC	Embryonic rat cardiomyocytes
et al.	Et alii (und andere)
FIP200	focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HFpEF	Heart failure with preserved ejection fraction
I-Band	Isotropes Band
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
LAMP2a	lysosomal associated membrane protein 2a

LC3	microtubule associated protein light chain3
MDa	Megadalton
mdm2	Mouse-double-minute 2
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF	Muscle RING-finger protein
mV	Millivolt
N2-Bus	N2-B unique sequence
NaCl	Natriumchlorid
nbr1	Neighbor of BRCA1 gene 1
Page	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCQ	Protein quality control
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA/PKC/PKD	Proteinkinase A/C/D
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RBM20	<i>RNA binding motif protein 20</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Rpn	regulatory particle non ATPase
SDS	Nadriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i>)
SQSTM1	Sequestosome-1

TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTN	Titin-Gen
T3	Trijodthyronin
UBD	Ubiquitin-bindende Domäne
ULK1	unc-51-like autophagy activating kinase 1
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
Vps34	class III phosphoinositide 3-kinase
Vps15	serine-threonine kinase Vps15/ird1

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Sarkomer	1
1.2 Das Titinfilament.....	2
1.2.1 Struktur und Isoformen Titins.....	2
1.2.2 Funktionen von Titin	5
1.3 Zelluläre Proteinqualitätskontrollsysteme/ zelluläre Abbausysteme	6
1.3.1 Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS)	6
1.3.2 Die Autophagie.....	8
1.3.3 Die Calpaine und Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2)	11
1.4. Interaktionen der PQC mit Titin	11
1.5. Muskelkontraktion	14
1.6. Kardioplegie	15
1.7. Blebbistatin.....	16
1.8. Ziele der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten.....	20
2.1.4 Laborgeräte	20
2.1.5 Antikörper	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten	22
2.2.2 Proteinbiochemie.....	23
2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung	26
2.2.4 Trypsin/Chymotrypsin Assay	27
2.2.5 Software	28
2.2.6. Datenanalytische Statistik.....	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Arretierung der Kontraktilität induziert die Degradation des Titinfilaments ..	29
3.2 Der Titin-Isoformenswitch wird durch Kardioplegie beschleunigt	31
3.4 Mechanische Arretierung triggert die Polyubiquitinierung des Titinfilaments	33

3.5 Einfluss mechanischer Inaktivierung auf die proteasomale Aktivität	34
3.6 Einfluss der Inaktivierung der ERC auf p62 und LC3 Proteinlevel.....	36
3.7 Reduzierte AMPK-Phosphorylierung in mechanisch arretierten Zellen	37
3.8 Ein sequenzieller Abbau Titins ist in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht eindeutig festzustellen.....	39
4 Diskussion	41
4.1 Mechanische Arretierung induziert die Titin-Degradation.....	41
4.2 Der Isoformenswitch in embryonalen Rattenkardiomyozyten wird durch die Kontraktionsinhibition beschleunigt	43
4.3 Die Titin-Ubiquitinierung ist in chemisch arretierten Versuchszellen erhöht	44
4.4 Zellulären Degradationssysteme sind an der Titindegradation beteiligt	46
4.4.1 Die autophagosomale Aktivität wird von der mechanischen Inaktivierung signifikant beeinflusst.....	46
4.4.2 Die proteasomale Aktivität wird von der mechanischen Inaktivierung signifikant beeinflusst.....	48
4.5 Ein sequenzieller Abbau der Domänen Titins konnte in Immunfluoreszenz gefärbten Zellen nicht gezeigt werden.....	48
4.6 Schlussfolgerung.....	49
Literaturverzeichnis.....	52

1 Einleitung

1.1 Das Sarkomer

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit der Muskelzellen höherer Organismen. Gebildet wird es aus drei Filamentsystemen; den dicken, bipolaren Myosin-Filamenten, den dünnen Aktin-Filamenten und den Titinfilamenten, die parallel angeordnet mit den lateral liegenden Z-Scheiben verbunden sind [1-3] (Abb. 1). Die Z-Scheibe wird von antiparallel verlaufenden dünnen Filamenten aneinander angrenzender Sarkomere gebildet. Die Verknüpfung dieser Filamente wird durch alpha-Aktinin vermittelt, wodurch ein Netzwerk mit weiteren Proteinen wie Titin, Myotilin und Nebulin (in Skelettmuskulatur) entsteht [4, 5]. Eng mit den Aktin-Filamenten assoziiert kommen weiterhin die regulatorischen Proteine Troponin und Tropomyosin im Sarkomer vor [3]. Die Z-Scheibe liegt inmitten der sogenannten I (isotropen)-Bande des Sarkomers. Daran wiederum schließt sich das A (anisotrope)-Band an, das sich über die Länge der dicken Filamente erstreckt und in welchem sowohl Strukturen der dicken- und der dünnen Filamente liegen [1, 2, 4]. Innerhalb des A-Bandes findet sich ein Bereich, in dem dünne Filamente nicht vorkommen: die H-Zone. Hier liegt auch die M-Linie, in welcher die *Tail*-Regionen des Myosins liegen und die das Zentrum des Sarkomers bildet [1]. So reicht ein halbes Sarkomer von einer lateral liegenden Z-Scheibe bis hin zu einer zentral liegenden M-Linie. Das dritte strukturelle Filament Titin ist verbunden mit den beiden Komponenten aus dicken-, und dünnen Filamenten und wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben. Die Kraft der Muskelkontraktion wird durch den Querbrückenzyklus aufgebaut, wodurch ein Ineinandergleiten der Filamente resultiert, -welches dann zu einer Sarkomerverkürzung und Kraftentwicklung führt [2, 3]. Dieser Mechanismus wird im Abschnitt 1.5 näher beschrieben. Untereinander sind Sarkomere über ihre Z-Scheiben seriell miteinander verbunden. Es besteht außerdem eine enge Verknüpfung mit dem Zytoskelett, sowie mit der Zellmembran der Muskelzelle, sodass die generierte Kraft vom Sarkomer auf den Rest der Zelle übertragen wird und so die Kontraktion des Muskels erzeugt [3]. Vermittelt wird diese Verknüpfung über Proteine wie Filamin C [6]. Neben seiner kraft-generierenden Hauptaufgabe, vermittelt das Sarkomer auch spezifische Signalfunktionen. Diese scheinen bei der Assemblierung des Zytoskeletts, dem Remodelling und der Mechanotransduktion eine wichtige Rolle zu spielen und

vornehmlich in der Z-Scheibe, der M-Linie, der N2-B-Domäne der I-Bande und assoziierten Proteinen zu liegen. Dem Sarkomer wird zugeschrieben, damit zusätzlich ein zentraler Bestandteil in der Regulation der täglichen metabolischen Aktivität der Muskelzelle zu sein [3].

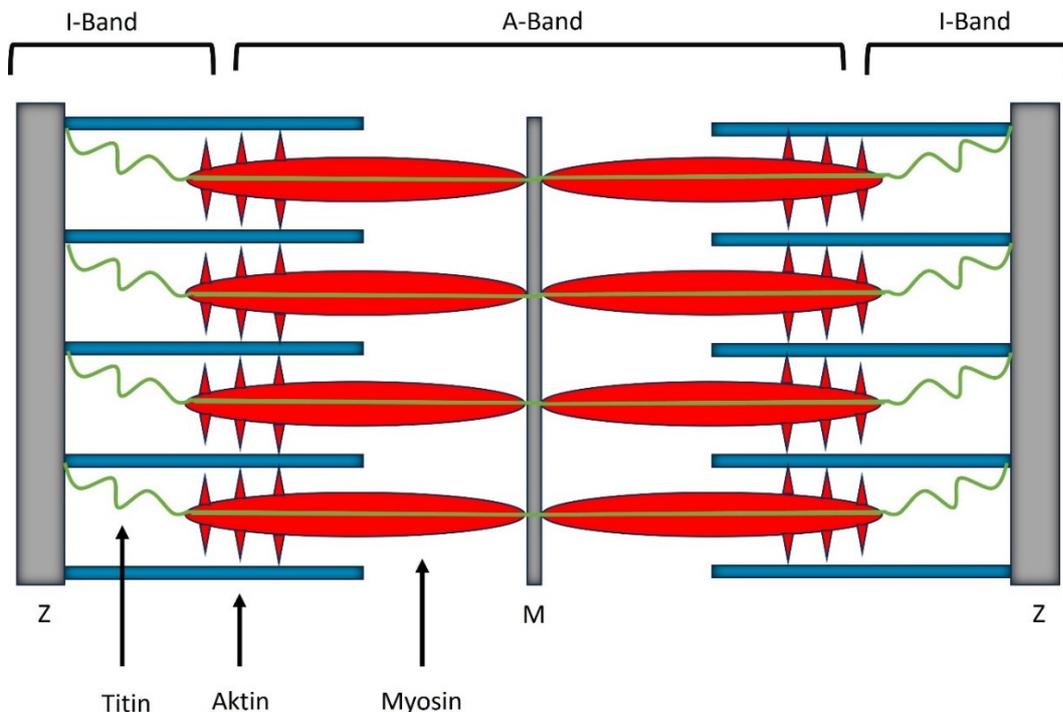


Abb. 1: Schematische Darstellung des Sarkomers: Durch gegenläufiges Verschieben der Muskelfilamente Aktin und Myosin kommt es zu einer Verkürzung des Sarkomers und folglich zur Kontraktion des Muskels. Das Sarkomer erstreckt sich zwischen zwei Z-Scheiben (Z) und wird durch die in der Mitte liegende M-Linie (M) in zwei Hälften geteilt. Im Bereich der M-Linie erfolgt die Assoziation von Titin an die Myosinmoleküle. Die um die M-Linie liegende A-Band Region setzt sich aus Myosin, Aktin und Titin zusammen, während die I-Band Region direkt an der Z-Scheibe liegt und nur Aktin und Titin enthält. Titin ist im Bereich der Z-Scheibe verankert und erstreckt sich über die Länge eines halben Sarkomers bis hin zur M-Linie.

1.2 Das Titinfilament

1.2.1 Struktur und Isoformen Titins

Das theoretische maximale Molekulargewicht von Titin beträgt etwa 4.2 MDa, was es zu dem größten bisher bekannten Protein macht [7]. Es erstreckt sich über die Länge eines halben Sarkomers und wird von etwa 300 repetitiven Domänen gebildet, die Immunglobulinen (Ig-Domänen) und Fibronectinen (Fibronectin type-3-Domänen) ähneln, sowie aus sogenannten *unique sequences* [8, 9].

Nach den Abschnitten des Sarkomers kann man Titin räumlich in einen Z-Scheiben Abschnitt, die I-Band-Region, die A-Band-Region, und einen M-Linien Abschnitt

unterteilen. Titin ist innerhalb des Z-Scheiben Abschnittes mit zwei charakteristischen N-terminalen Ig-Domänen Z1 und Z2 [10] in der Z-Scheibe verankert [4, 11-14]. Daran schließen sich bis zu sieben repetitive Sequenzen an, die sogenannten Z-repeats, welche zu den *unique sequences* zählen und durch alternatives *Splicing* abhängig vom Muskeltypen variieren [10]. Der I-Band-Abschnitt, welcher dem Protein seine elastischen Eigenschaften verleiht [15], wird zu großen Teilen von Ig-Domänen und weiteren *unique sequences* gebildet. Die Ig-Domänen werden in „proximale“, „mittlere“ und „distale“ Ig-Domänen unterteilt, wobei die proximale- und die distalen Ig-Domänen, als konservierte Strukturen in allen längeren Titin-Isoformen (N2A, N2B und N2BA) vorkommen [10]. Die proximale Ig-Domänenregion reicht von der Z-Scheibe ausgehend bis zur herzspezifisch N2-B Region, in der die N2-B *unique sequence*-, (N2-Bus) -, enthalten ist. Es schließt sich daran eine mittlere Ig-Domäne variabler Länge an, welche in der N2B Isoform fehlt, und die PEVK-Domäne, die ihren Namen den sie bildenden prädominanten Aminosäuren Prolin (P), Glutamin (E), Valin (V) und Lysin (K) verdankt [7]. Die distale Ig-Domäne bildet den letzten Abschnitt der elastischen I-Band-Region [10]. Anders als in der konservierten A-Band-Region variiert die Größe und Struktur der I-Band-Region innerhalb der verschiedenen Isoformen des Titins [8]. Die A-Band-Region, welche den größten Teil des Proteins ausmacht und eng mit Myosin und Myosin-Bindeprotein C verbunden ist, wird von Ig- und Fn3-Domänen gebildet. Übereinstimmend mit der Struktur Titins in der A-Band Region, weist diese Region eine konservierte Basenabfolge auf [5, 9, 13]. Die M-Band Region Titins beinhaltet unter anderem die Titin-Kinase-Domäne [9]. Weitere charakteristische Domänen dieses Titinabschnittes sind die Ig-Domänen M1, M5 und M10, welche einen Komplex mit Obscurin-like-1 bildet und damit zu der C-terminalen Verankerung Titins in der M-Linie beiträgt. Diese besteht durch die Verbindung mit den Proteinen Myomesin und Obscurin [4, 11, 12]. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Titinfilaments.

Kodiert wird Titin in einem einzigen Gen, aus welchem durch alternatives *Splicing* potenziell mehrere Millionen Titinisoformen unterschiedlicher Größen zwischen 625 kDa (seltener Noex-3 Isoform) und 3700 kDa (N2A-Isoform, charakteristisch für Skelettmuskulatur) entstehen können [10, 13]. Neben der I-Band Region, können auch in geringerem Maße die Z-Scheibe, sowie die M-Linie die Zielregion alternativen *Splicings* darstellen [10]. Während die genauen molekularen Mechanismen hinter der komplexen Regulation dieses *Splicings* noch nicht bekannt sind, konnte der

Splicingfaktor RBM20 als wichtiger Regulator identifiziert werden [16, 17]. Im Herzmuskel kommen hauptsächlich die kürzere und steifere Isoform N2B, mit einer Größe von 3000 kDa, sowie die längere und elastischere Isoform N2BA, mit einer variablen Größe von >3200 kDa vor [18]. Während der Fetalperiode, werden große Titinisoformen im Herzmuskel exprimiert [19], die dann im Zuge eines *Isoformenswitches* während der embryonalen und perinatalen Entwicklung gegen kleinere Isoformen ausgetauscht werden. Beim Herzen ist das die fetale N2BA Isoform (~3700 kDa), die gegen kleinere adulte N2BA-Isoformen, sowie durch die Isoform N2B ausgetauscht wird [20]. In der adulten humanen Herzmuskulatur herrscht ein Isoformenverhältnis von 30% N2BA: 70% N2B bis hin zu 40% N2BA: 60% N2B [10, 21, 22]. In Rattenkardiomyozyten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, liegt der Anteil der N2BA-Isoform bei 10% zu 90% N2B [21].

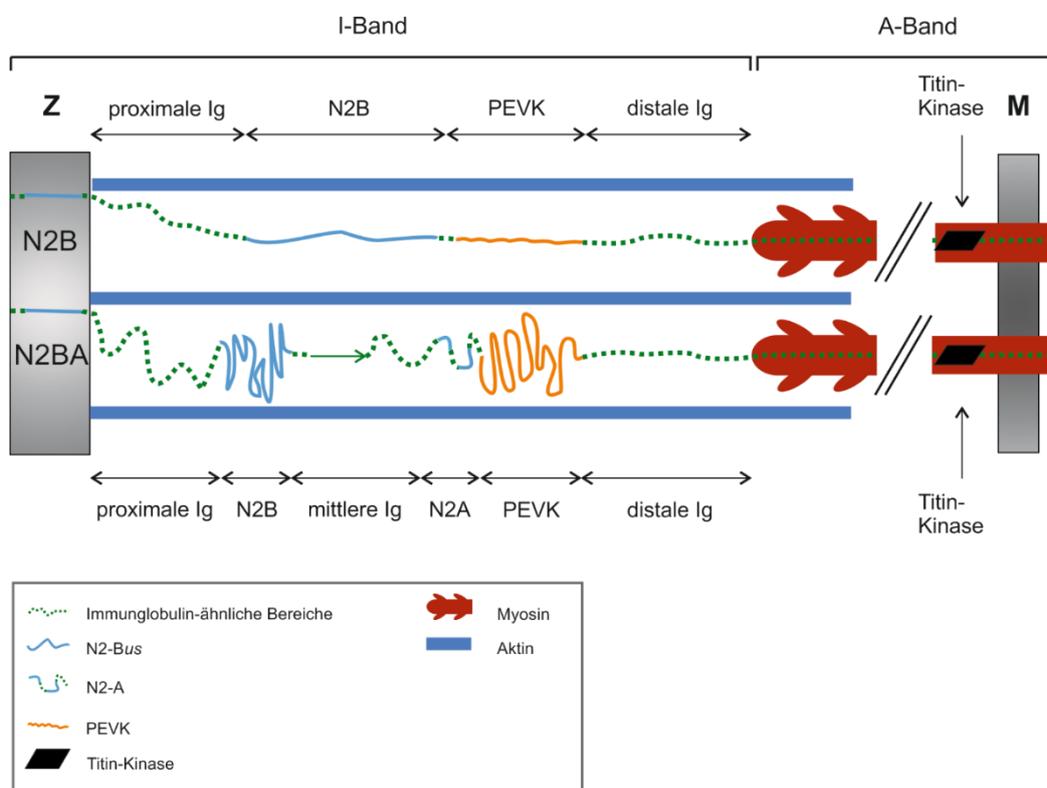


Abb. 2: Exemplarische Darstellung des Titinfilaments und seiner kardialen Isoformen im Bereich des Halbsarkomers. Die beiden Titin-Isoformen N2B und N2BA sind an der Z-Scheibe (Z) verankert und erstrecken sich bis zur M-Linie (M), wo sich jeweils eine Titin-Kinase-Domäne befindet. Proximal und distal enthalten sie Immunglobulin-ähnliche Bereiche, eine PEVK-Region und ein herzspezifisches N2B-Segment. Zusätzlich dazu beinhaltet die N2BA-Form neben zwischengeschalteten Ig-Domänen noch ein N2A-Segment. Modifiziert nach Ehler, E. und M. Gautel [23].

1.2.2 Funktionen von Titin

Titin übernimmt multiple Funktionen innerhalb der Muskelzelle. Seine gewaltige Größe macht es zu einem Gerüstprotein, welches bedeutend ist für die Genese des Sarkomers und der Assemblierung der Myofibrillen [8, 23]. Man geht davon aus, dass Titin die Länge des Sarkomers vorgibt, es in longitudinaler Ebene organisiert und die stabile Verankerung der Myosin- und Aktin-Filamenten gewährleistet [3, 11, 12]. Indem es bei einer Dehnung des Sarkomers zu einer reversiblen Extension der elastischen Domänen der I-Band-Region kommt, bestimmt Titin die passiven Rückstellkräfte der kontraktile Einheit und fungiert so als molekulare Sprungfeder [24]. Die Titin-abhängige Steifigkeit des kardialen Myofilaments wird dabei durch das Isoformenverhältnis von N2BA und N2B-Isoformen bestimmt, da diese unterschiedliche elastische Eigenschaften aufweisen [10]. Weiter kann die Titin-abhängige Steifigkeit durch posttranslationale Modifikationen moduliert werden, beispielsweise durch Phosphorylierungen innerhalb des I-Bandes. Es sind bisher Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) [25-27], cGMP-abhängige Protein Kinase (PKG) [26, 27], Ca²⁺-abhängige Protein Kinase C α (PKC α) [28], extrazelluläre Signalregulierte Kinase $\frac{1}{2}$ (Erk $\frac{1}{2}$) [29] und Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II δ (CaMKII δ) [28, 30] identifiziert worden. Abhängig von der Lokalisation der Phosphorylierung kann es zu einer herabgesetzten, oder aber zu einer gesteigerten Titin-abhängigen passiven Steifigkeit des Sarkomers kommen [26, 30, 31]. Es konnten veränderte Level der Phosphorylierung in menschlichen Herzmuskelzellen gefunden werden, die von Pathologien wie DCM, HCM oder Diabetes Mellitus Typ 2 betroffen waren und zu gesteigerter Steifigkeit Titins führten [27 Hopf et al circ res 2018 einfügen, 30]. Eine weitere wichtige Rolle spielt Titin in der Anpassung der Muskelzelle auf mechanischen Stress [7]. Durch die gewaltige Größe des Proteins und seine longitudinale Ausrichtung innerhalb des Sarkomers-, hat Titin beste Voraussetzungen dafür, die mechanische Beanspruchung der Zelle zu detektieren und entsprechend Signalkaskaden zu beeinflussen, die über Genexpression und Re-Aktivierung fetaler Gene die Anpassung des Muskels initiieren [7, 32]. Einige, der bisher identifizierten über 20 verschiedenen Titin-Protein Interaktionen (im Detail beschrieben in dem Review von Linke und Krüger 2010), verknüpfen Titin mit diesen Signalkaskaden [7]. Titin stellt sich daneben als wichtiger Signalgeber der Protein-Qualitäts-Kontrolle sarkomerischer Proteine dar. So konnten direkte und indirekte Verknüpfungen Titins mit dem UPS und anderen wichtigen Teilen

der PQC ausgemacht werden [7, 33], welche im weiteren Verlauf näher beschrieben werden.

1.3 Zelluläre Proteinqualitätskontrollsysteme/ zelluläre Abbausysteme

In jeder Zelle kommt es kontinuierlich zur Biosynthese oder zum Ausfall fehlgefalteter und beschädigter Proteine. Dies kann durch Fehler bei der Transkription, der Translation, der Posttranskription oder der Posttranslation bedingt sein, durch Mutationen im Genom oder durch Hitze und diverse andere Stressfaktoren. Außerdem geschieht es regelhaft nach Ablauf ihrer Lebensdauer. Da diese fehlerhaften Proteine ihre Funktion verlieren und die Zellfunktion durch Aggregation stören können, existieren intrazelluläre Degradationssysteme, um die potenziell toxischen Proteine abzubauen und zu recyceln, und damit die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten. Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington sind nur einige Beispiele für die Folgen pathologischer Proteinaggregation in menschlichen Zellen. Die Proteine werden häufig von Chaperonen anhand hydrophober Reste erkannt, die während des Faltungsprozesses im Zuge der Proteinbiosynthese oder in fehlgefalteten Zuständen exponiert werden und an die Degradationssysteme weitergeleitet [34]. Die zwei bekanntesten Abbausysteme in eukaryotischen Zellen sind das proteolytisch arbeitende Ubiquitin-Proteasomen System, sowie das lysosomale System der Autophagie, auf die in den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 näher eingegangen wird [35].

1.3.1 Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) ist für etwa 80-90% des zellulären Abbaus verantwortlich [36]. Der Mechanismus dieses Systems beruht auf der Markierung der abzubauenden Proteine, dem Transport dieser zum Proteasom und der anschließenden proteasomalen Hydrolyse. Fehlgefaltete Zielproteine werden zunächst ubiquitiniert. Das bedeutet, dass sie mit einem Lysin-Rest über eine kovalente Bindung an das C-terminale Glycin des Proteins Ubiquitin gebunden werden. Dazu muss Ubiquitin zunächst ATP-abhängig durch das aktivierende Enzym E1 über eine Thioesterbindung auf das konjugierende Carrierprotein E2 übertragen werden. Konsekutiv wird Ubiquitin dann mithilfe einer an das Zielprotein gebundenen E3 Ligase auf dieses übertragen. Ubiquitin formt dieselbe Isopeptidbindung zwischen seinem

carboxterminalen Ende und dem Lysin eines weiteren Ubiquitinmoleküls, sodass eine Polyubiquitininkette entsteht [36] (Abb. 3). Während Ubiquitin an der 6., 11., 27., 29., 33., 48. und 63. Position jeweils einen Lysin Rest besitzt, ist die Position, an welcher die Ubiquitinmoleküle untereinander verknüpft sind relevant für den weiteren Degradationsprozess. So konnte gezeigt werden, dass eine über K48 (Lysinrest der 48. Position) verknüpfte Ubiquitinkette die Proteine für den Abbau durch das Proteasom markiert, während beispielsweise eine Ubiquitinierung über K63 (Lysinrest der 63. Position) verknüpfte Ubiquitinketten ein Signal für den autophagosomalen Abbau, aber auch für DNA-Reparatur, und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sein kann [37, 38]. Eine hohe Substratspezifität des UPS wird erreicht, indem ca. 800 E3 Ligasen im menschlichen Genom exprimiert werden, die unterschiedliche Substrate anhand ihrer Degradationssignale erkennen [36, 39, 40]. Es folgt der Transport des polyubiquitinierten Substrats zum 26S Proteasom, einem großen zytosolischen Proteasekomplex, bestehend aus dem 20S Proteasom, das den proteolytischen Kern enthält und den 19S regulatorischen Einheiten, welche an entweder ein- oder an beide Enden der 20S Untereinheit des Proteasoms gebunden ist. Die 19S Untereinheit besteht aus vielen Untereinheiten mit vielfältigen Funktionen wie der Ubiquitin-Bindung, der Deubiquitinierung und einer ATPase Aktivität. Der Komplex hat eine Chaperon-Funktion, entfaltet die Substratproteine und eröffnet die enge Pore des 20S Komplexes, sodass die Proteine zu dem proteolytischen 20S Kern gelangen können. Das 20S Proteasom besteht aus 4 heptameren Ringen, wobei die äußeren Ringe aus alpha-Untereinheiten gebildet werden und eine Barriere zwischen dem katalytischen Kern und dem Zytoplasma bilden, und die inneren beta-Ringe, die katalytische Funktionen tragen. Diese proteolytisch aktiven Seiten des 20S Komplexes liegen auf der Innenseite des zylindrisch formierten Komplexes, um unspezifische Proteindegredation zu vermeiden. In Eukaryoten trägt das Proteasom drei Peptidaseaktivitäten: Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, Trypsin-ähnliche Aktivität und Caspase-ähnliche Aktivität, welche durch die drei Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 vermittelt werden [41]. Die Substratproteine werden hydrolysiert und damit zu Peptiden abgebaut [42].

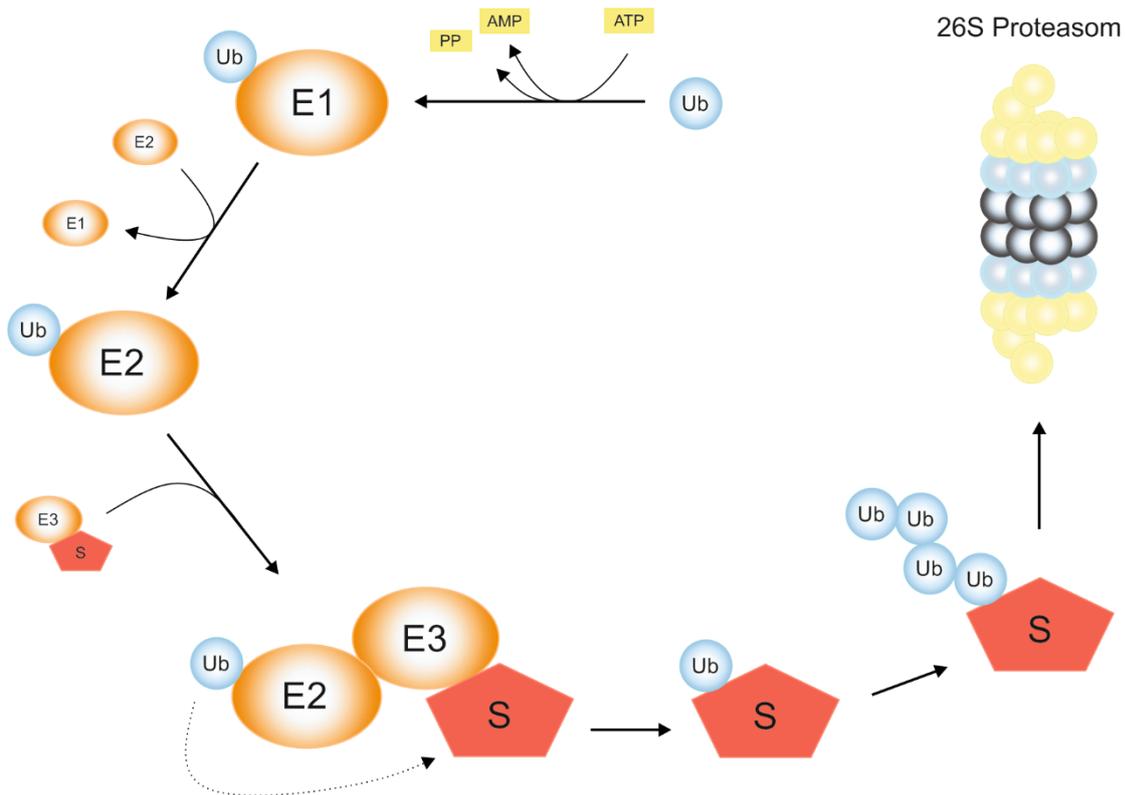


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Zunächst aktiviert Enzym E1 unter ATP-Verbrauch Ubiquitin, welches konsekutiv auf das konjugierende Enzym E2 übertragen wird. Die Ligase E3 bindet an das Zielsubstrat und katalysiert den Transfer des Ubiquitin-Moleküls auf dieses. Die Ubiquitinierung wird wiederholt, bis das polyubiquitinierte Zielsubstrat dem 26S Proteasom zugeführt und hydrolysiert wird. Modifiziert nach Schalla, J. [43].:

1.3.2 Die Autophagie

Die Autophagie ist ein Prozess zum Recycling zelleigener Bestandteile. Damit spielt sie eine entscheidende Rolle in der Energiehomöostase der Zelle, speziell in Zuständen der Nährstoffknappheit. Daneben ist die Autophagie als System der Protein-Qualitätskontrolle an der Degradation beschädigter Organellen beteiligt und sorgt so für die Instandhaltung der Zelle. Durch das Eliminieren beschädigter Zellbestandteile und Aggregate fehlgefalteter Proteine, schützt die Autophagie die Zelle vor genomischer Instabilität und Zellnekrose und damit vor der Ausbildung von Pathologien wie beispielsweise Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen [44]. Es gibt drei Typen der Autophagie: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. Allen gemein ist die proteolytische Degradation zytosolischer Komponenten innerhalb des Lysosoms, wobei es im Falle der Makroautophagie zunächst zur Bildung des Autophagosoms kommt. Das Autophagosom ist ein Doppel-Membran-Vesikel, in welchem zytosolische Bestandteile zum Lysosom transportiert werden. Nach Fusion des Autophagosoms mit

dem Lysosom entsteht das Autolysosom, in welchem die proteolytische Spaltung der Substrate stattfindet (Abb. 4). Bei der Mikroautophagie hingegen nimmt das Lysosom zytosolische Bestandteile durch Invagination direkt auf, ohne ein intermediäres Autophagosom zu bilden. Im Zuge der Chaperon-vermittelte Autophagie werden die Substrate in einem Komplex mit Chaperonen durch die lysosomale Membran transloziert und anschließend entfaltet und degradiert [44]. Im Folgenden wird lediglich auf die Makroautophagie näher eingegangen, da eine Beteiligung dieser Autophagie Form an der Degradation des Titinfilaments am ehesten vermutet wird.

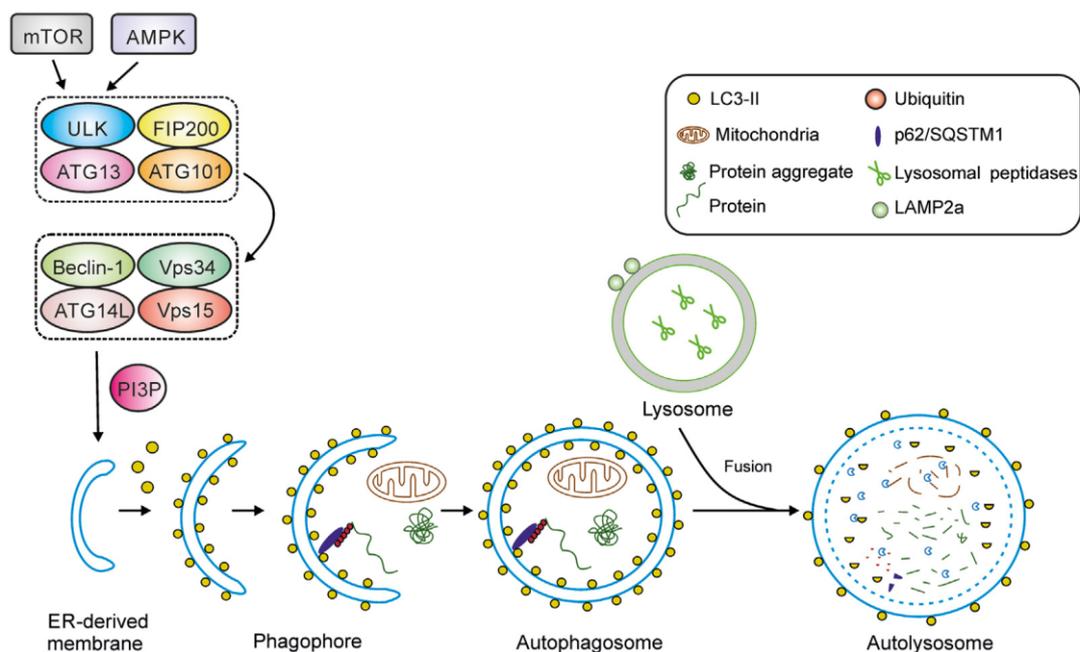


Abb. 4: Schematische Darstellung der Makroautophagie. Mithilfe des Initiationskomplexes, werden Membranbestandteile wie LC3-II rekrutiert und bilden die Doppelmembran der Phagophore. LC3-II wird zuvor gebildet, indem LC3-I und Phosphatidylethanolamin konjugiert werden. Durch Elongation der Phagophorenmembran kommt es zum Ringschluss und zur Bildung des Autophagosoms. Dieses fusioniert mit dem Lysosom und es entsteht das Autolysosom, innerhalb welches die Degradation der Zielsubstrate stattfindet. P62 ermöglicht als Adapterprotein den selektiven Abbau von Substraten, indem es über eine Ubiquitin-bindende Domäne (UBD) mit polyubiquitinierten Substraten (via K63) interagiert und über die LC3-interacting-region (LIR) mit den LC3-Molekülen des Autophagosoms. Abkürzungen: ATG, autophagy-related-gene; FIP200, focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD; LAMP2a, lysosomal-associated membrane protein 2a, LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; mTOR, mammalian target of rapamycin, PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; ULK1, unc-51-like autophagy-activating kinase 1; Vps34, class III phosphoinositide 3-kinase, Vps15, serine-threonine kinase Vps15/ird1. Modifiziert nach Kötter, S. und Krüger, M. [33].

Die Akkumulation von Proteinaggregaten, Inklusionskörperchen genannt, initiiert die *de-novo* Bildung eines Autophagosoms [45, 46]. Zu Beginn der Makroautophagie wird durch die Assemblierung von *autophagy related proteins*, hoch konservierten Proteinen, die abgekürzt Atg-Proteine genannt werden, eine Isolationsmembran an der *Phagophore Assembly Site* (PAS) gebildet. Durch schrittweise Elongation dieser Isolationsmembran, wird eine Doppelmembranstruktur namens Phagophore gebildet [45, 47, 48]. Mögliche Quellen der Membranbestandteile der Phagophore sind neben dem Endoplasmatischen Retikulum die Plasmamembran, der Golgi-Apparat und die Mitochondrien [47]. Damit es durch Expansion und sphärische Krümmung zu einem Ringschluss beider Enden der Doppelmembran kommen und so das Autophagosom, mit einem Durchmesser von (in Säugetieren) 0.5 bis 1.5 µm entstehen kann, müssen weitere Atg-Proteine wie Atg12, Atg5 oder Atg8 zu Atg7, Atg10, Atg5 oder Atg3 konjugiert werden, um zu Komplexen zur Rekrutierung von LC3 und für die Bildung der Membranen für das Autophagosom zu werden [45].

Ein wichtiger Bestandteil der inneren und äußeren Membran ist das Molekül LC3-II. LC3-II entsteht nach Konjugation mit Phosphatidylethanolamin aus dem zytosolischen LC3-I, welches wiederum nach der Abspaltung von 22 c-terminalen Aminosäuren aus neu synthetisiertem LC3 hervorgeht, und ist sowohl an der Innen- wie an der Außenseite der autophagosomalen Membran lokalisiert [47]. Die Menge an LC3-II korreliert mit der Anzahl der Autophagosomen, während das an der inneren Membran der Autophagosomen lokalisierte LC3-II im weiteren Prozess der Autophagie degradiert wird [49]. Sobald das Autophagosom nun das Lysosom erreicht, fusioniert die äußere Autophagosomenmembran mit der Membran des Lysosoms, sodass das Autolysosom gebildet wird. In dessen sauren Lumen findet die Degradation der Proteine und Organellen durch lysosomale Hydrolasen statt. Anschließend befördern lysosomale Permeasen und Transporter die Abfallprodukte und Aminosäuren der degradierten Substrate wieder zurück ins Zytoplasma, sodass diese recycelt und für den Aufbau neuer Proteine und Organellen genutzt werden können [44, 47].

Es gibt Autophagierezeptoren, die selektiv die gezielte Degradation von Proteinaggregaten-, und komplexen vermitteln. Ein Beispiel ist der Komplex aus p62/SQSTM1 und Nbr1 [50-52]. Es sind Adapterproteine mit spezifischen Bindungsstellen für Ubiquitin (Ubiquitin-assoziierte Domäne – UBA) und LC3 (LC3-*interacting-region* – LIR). Auf diese Weise binden sie spezifisch an K63

polyubiquitinierte Substrate und vermitteln diese über die Interaktion mit dem Membranmolekül LC3 an das Autophagosom [50, 52, 53].

1.3.3 Die Calpaine und Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2)

Calpaine sind ubiquitär exprimierte Ca^{2+} -abhängige, nicht-lysosomale Cystein Proteasen [54]. Sie erkennen und proteolysieren ihre Substrate ohne dabei ihre Degradation zu katalysieren, was sie von anderen proteolytischen Maschinerien der Zelle wie Proteasomen oder der Autophagie unterscheidet [55]. Bisher konnten drei von 15 im Menschen vorkommenden Calpaine im Muskelgewebe gefunden werden; Calpain-1 (μ -calpain), -2 (m-calpain) und Calpain-3. Dabei wird Calpain-3 vornehmlich in Skelettmuskulatur exprimiert, während Calpain-1 und -2 ubiquitär exprimiert werden [33, 54]. Alle drei in Muskelgewebe identifizierten Calpaine sind mit der Degradation von Sarkomerproteinen assoziiert, inklusive der Degradation des Titins [45]. An der Degradation von Bestandteilen extrazellulärer Matrix ist die Zink-abhängige Protease Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) beteiligt. Neben dem Abbau extrazellulärer Matrix und dortiger Lokalisation, konnte MMP2 auch intrazellulär innerhalb des Sarkomers lokalisiert werden [56]. In Kardiomyozyten liegt intrazelluläres MMP2 in der Z-Scheiben Region des Sarkomers. Es wird vermutet, dass es dort u.a. an der Degradation des Titinfilaments beteiligt ist, insbesondere nach experimentell herbeigeführter Ischämie und Reperfusion [56].

1.4. Interaktionen der PQC mit Titin

Die zellulären Degradationssysteme spielen bei dem Abbau und Umbau des Sarkomers eine entscheidende Rolle. Das Sarkomer ist keine starre, sondern eine dynamische Einheit des Muskels und somit einer permanenten Erneuerung einzelner Proteine/Bestandteile unterzogen, sodass eine enge Interaktion zwischen Systemen der Protein-Qualitätskontrolle und dem Sarkomer naheliegt. Es konnte gezeigt werden, dass das Sarkomerprotein Titin ein Interaktionszentrum des Sarkomers mit den PQC-Systemen darstellt, und die Degradation von Zielproteinen durch Signaltransduktion beeinflussen kann [7, 12] (Abb. 5).

Die Bedeutung einer funktionierenden Degradation von Muskelproteinen über das UPS zeigt sich darin, dass dieses in Patienten mit Erkrankungen des Herzmuskels wie Kardiomyopathien, Hypertrophie, Herzinsuffizienzen oder Atrophie des Herzmuskels

oft gestört ist [7]. Daneben stellt sich auch die Autophagie als relevantes System für die Proteindegradation heraus. Aktuelle Erkenntnisse lassen eine Beteiligung beider PQc Systeme in der Degradation Titins vermuten, wobei durch das Proteasom und die Autophagie offenbar jeweils unterschiedliche Bereiche des Proteins degradiert werden [33]. Weiterhin spielen Hitzeschockproteine (Heat-shock-proteins, HSPs), Calpaine und Metalloproteasen eine Rolle in der Protein-Qualitätskontrolle Titins [33].

Die kleinen Hitzeschockproteine (sHSP) α B-crystallin und HSP27, sowie HSP90 wurden als Bindungspartner von Titin identifiziert, wobei ihre Bindestellen innerhalb der I-Band Region liegen [57]. Es konnte gezeigt werden, dass sie die Folgen mechanischer Beanspruchung oder ischämischer Bedingungen, wie der Entfaltung von Titin-Domänen und konsekutiver Aggregation der Filamente-, und daraus resultierend den Anstieg der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit in kardialen Myozyten verhindern können [58].

Das UPS und Titin interagieren über die Bindung der E3-ligase Mice-double-minute 2 (Mdm2) und des titin-capping Protein Telethonin [7, 59]. Die E3-Ligasen MuRF-1 (*muscle RING-finger protein-1*) und MuRF-2, die an der proteasomalen Degradation vieler Muskelproteine wie Troponin, Telethonin und Nebulin beteiligt sind, binden an die A168-170, M-Band Domänen Titins [60]. Eine weitere Interaktion über MuRF-1 besteht zwischen Titin und dem Ubiquitin-Bindeprotein 9 [7]. Die Titinkinase-Domäne in der M-Band Region Titins interagiert mit einem Komplex aus dem Ubiquitin-assoziierten Zinkfingerproteine Nbr1 (*neighbor of BRCA1-gene-1*) und-, p62/SQSTM1. Dieser Komplex wiederum bewirkt die Rekrutierung von MuRF-2 zum Sarkomer [12, 61]. P62 kann als multifunktionales Adapterprotein, neben der erwähnten Funktion innerhalb der Autophagie auch in diversen weiteren biologischen Prozessen, wie Signaltransduktion, Differenzierung und insbesondere der Beseitigung toxischer Proteinaggregate eine Rolle spielen [50]. So kann es den proteasomalen Abbau größerer Signalosomen induzieren, indem es eine Bindung zwischen Liganden und Polyubiquitinketten herstellt. Ein selektiver Autophagierezeptor wird p62 hingegen durch direkte Bindung an das autophagosomale Membranprotein LC3, und führt damit K63 polyubiquitinierte Proteine dem Protein-Qualitätssystem der Autophagie zu [50]. Damit besteht eine Verknüpfung zwischen UPS und Autophagie über den p62/SQSTM1/Nbr1 Komplex [7]. Da autoinhibitorische Mutationen der Titin-Kinase einen insuffizienten Proteinabbau nach sich ziehen und zu Myopathien mit der

Aggregation von p62/SQSTM1 und der Akkumulation von Nbr1 einhergehen, lässt sich vermuten, dass die Titin-Kinase als Rezeptor für zelluläres Remodelling fungiert und relevant für den belastungsabhängigen Umbau des Muskels ist [12, 61].

Der Abbau zellulärer Proteine durch Calpaine stellt neben dem UPS und der Autophagie ein weiteres bedeutendes Degradationssystem dar. Vermutlich sind sie, insbesondere Calpain-1, zusätzlich erforderlich damit Ubiquitin-Ligasen Sarkomerproteine für die Degradation markieren können [62]. Calpain-1 ist direkt assoziiert mit der proximalen Ig-Domäne der I-Band-Region des Titins und Calpain-3 (im Skelettmuskel) mit der N2A-Domäne und der M-band Region. Vermutlich führt die Bindung von Calpain-3 an Titin dazu, dass es in einer autoinhibierten Konformation verbleibt und so in seiner proteolytischen Aktivität reguliert wird [63]. Des Weiteren könnten die Proteasen Calpain 1 und/oder Calpain 3 zusammen mit Metalloprotease MMP2 verantwortlich für den Titin-Vorverdau sein, der grundlegend für die weitere Degradation durch das UPS oder die Autophagie ist [64] [33]. Es konnte gezeigt werden, dass Calpain-1 und 3 an der N2A-Domäne Titins binden und dort sowohl Sequenzen innerhalb der N2A-Domäne abbauen (Calpain-1) [63] oder aber durch die Loslösung von der Domäne N2A die Proteolyse Titins Aktivieren (Calpain-3) [65]. MMP2 hingegen bindet in Nähe der Z-Scheibe an Titin und ist damit vermutlich Teil der Degradation der I-Band-Region Titins [56] [33]. So fragmentieren Calpaine und MMP2 die I-Band-Region Titins, sodass die resultierenden, kleinen I-Band-Teile vom Proteasomen erkannt und abgebaut werden können [33]. Als Produkt des Vorverdaus entsteht das Intermediat T2 [66], welches mit seiner Größe von 2-2.5 MDa leicht mit der Titin-Isoform Cronos verwechselt werden kann, welche mit ca. 2 MDa Größe in derselben Größenordnung liegt, ist [67]. Es wurden bisher je 2,3 oder mehr verschiedene T2-Banden gefunden, was angesichts der Tatsache, dass das T2-Intermediat hauptsächlich aus der wenig variablen A-Band-Domäne Titins stammt, durch die unterschiedliche Zusammensetzung der I-Band-Domäne Titins erklärt wird [33].

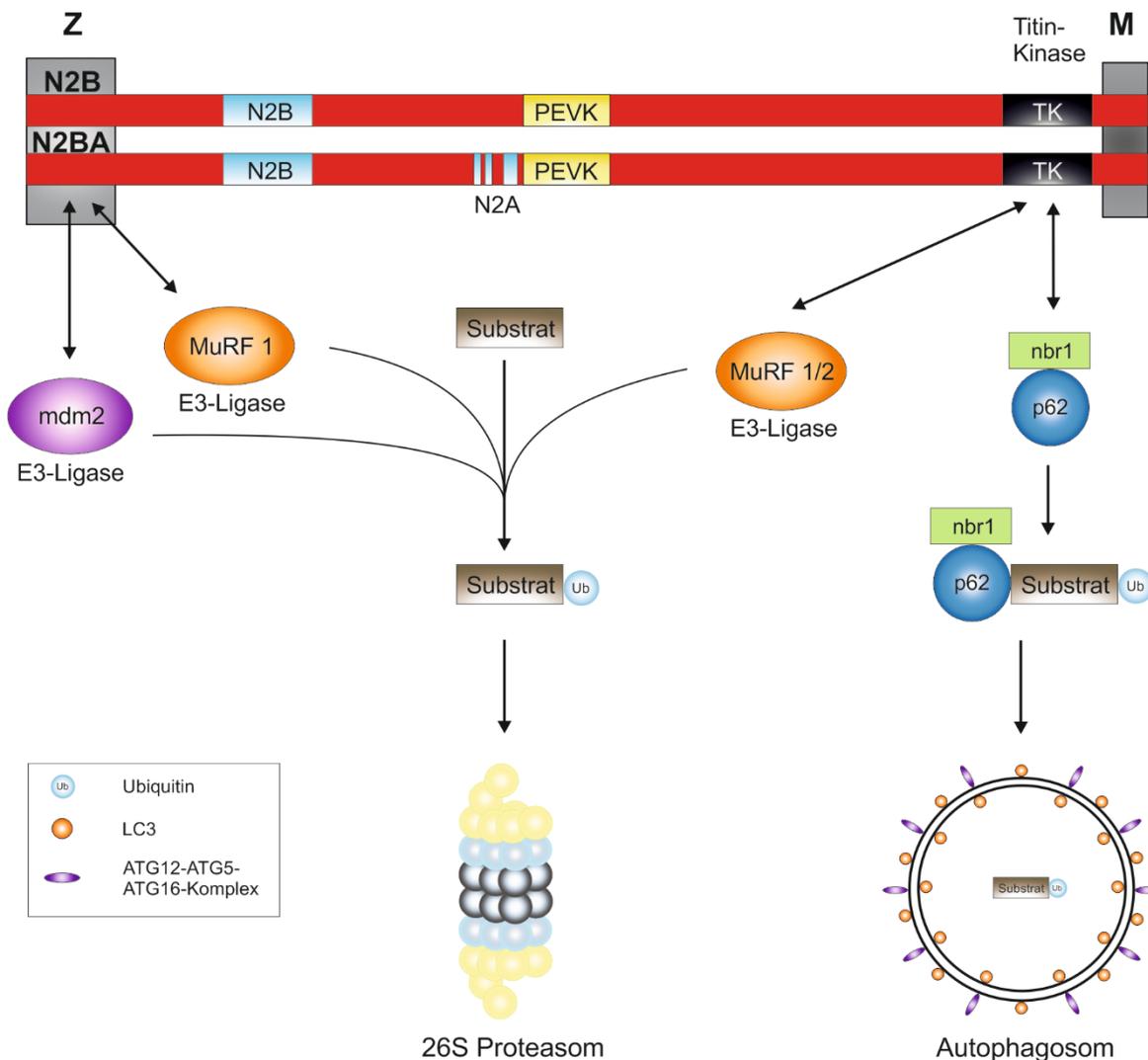


Abb. 5: Schematische Darstellung der Titin-Isoformen und ihrer Interaktionspartner. Z=Z-Scheibe. M=M-Linie. Es interagieren die E3-Ligasen mdm2 und MuRF-1 mit Titin im Abschnitt der Z-Scheibe. MuRF-1 kann zudem im M-Band nahen Bereich der Titin-Kinase-Domäne an Titin binden. Über die Interaktion mit den E3-Ligasen besteht eine mögliche Verbindung des Titinfilaments zum Ubiquitin-Proteasom-System. Im Bereich der Titin-Kinase-Domäne interagieren auch die autophagosomalen Adapterproteine p62 und nbr1 mit Titin, welche wiederum eine Verbindung zum Autophagosom herstellen können. Abkürzungen: ATG, autophagy-related-gene; mdm2, Mice-double-minute 2; MuRF-1/2, muscle RING-finger protein-1/2; nbr1, neighbour of BRCA1-gene-1. Modifiziert nach Schalla, J. [43].

1.5. Muskelkontraktion

Die Kontraktion eines Muskels resultiert aus der Verkürzung der kleinsten kontraktile Einheiten der Muskelzelle, den Sarkomeren. Der grundlegende Mechanismus ist das ATP-abhängige Ineinandergleiten der Muskelfilamente infolge elektrischer Exzitation der Zelle. Wird eine Herzmuskelzelle erregt, so kommt es zu einem Aktionspotenzial, im Zuge dessen Ca^{2+} von extrazellulär-, sowie aus dem intrazellulären Kalziumspeicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum, durch depolarisations-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle dem Kalziumkonzentrationsgradienten nach in die Zelle einströmt. Durch

die Kombination aus Kalzium-Influx und der Freisetzung Kalziums aus dem SR kommt es zu einer hohen intrazellulären Kalziumkonzentration [68]. Ca^{2+} bindet konsekutiv an Troponin C, welches als Myofilament-Protein nah am Aktin-Filament liegt und nach Kalziumbindung zu einer Lageveränderung des Proteins Tropomyosin führt. Hierdurch wird die Bindestelle der Myosinköpfe an den Aktin-Filamenten freigelegt. Myosin kann mit seiner Kopfreion an Aktin binden und es beginnt der sogenannte kontraktile Zyklus oder Querbrückenzyklus [69]. Das Myosinköpfchen bindet affin an Aktin, sobald das zuvor am Myosinköpfchen gebundenes ATP hydrolytisch zu ADP+P (Phosphat) gespalten worden ist. Durch die Bindung von Myosin an Aktin wiederum wird die Abspaltung des Phosphatrests und des ADP beschleunigt und es verbleibt an Aktin gebundenes Myosin. Dieser Schritt der Abspaltung des Phosphatrestes führt zu einer Rotation des Hebelarms und dadurch zu einer relativen axialen Gleitbewegung der Filamente Aktin und Myosin. Bei weiterhin vorhandenem ATP-Angebot binden die Myosinköpfchen in diesem Stadium wieder daran und lösen sich von Aktin. Mit der Hydrolyse des gebundenen ATP beginnt der Zyklus dann erneut, wohingegen bei ausbleibender ATP-Produktion beispielsweise nach Zelltod die Filamente starr verbunden bleiben, was sich als Rigor mortis manifestiert [69].

1.6. Kardioplegie

Der temporäre Arrest kardialer Kontraktion ist die Voraussetzung für ein bewegungsloses Operationsfeld in der Herzchirurgie. Nachdem mit der Entdeckung der Kardioplegie durch myokardiale Perfusion mit einer hyperkaliämischen Lösung in den 1950er Jahren der Grundstein gelegt war, wurden in den folgenden Jahren kardioplege Lösungen mit dem Ziel weiterentwickelt, eine Kaliumkonzentration zu finden, welche zu kardialem Arrest und Zellprotektion führt, dabei aber möglichst geringe strukturelle Veränderungen in den Myozyten auslöst. Mit der im Jahr 1975 durch Hearse et al. [70] entwickelten St. Thomas Lösung, die eine Kaliumkonzentration von 10-30 mM enthält, wurde der damalige Goldstandard zur Induktion des kardialen Arrestes durch hyperkaliämische Lösungen in der Herzchirurgie gefunden. Der physiologische Mechanismus beruht auf der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, welche das Ruhemembranpotenzial der Myozyten von -85mV auf Potenziale zwischen -65mV und -40mV hebt und so zu der Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanälen führt. Konsekutiv können keine Aktionspotenziale mehr ausgelöst werden und es kommt zu einem

Depolarisationsblock, sodass auch die elektromechanische Kopplung zwischen Aktionspotenzial und Muskelkontraktion ausbleibt und Muskelkontraktionen nicht mehr ausgelöst werden. Da das Sarkomer seine kontraktile Funktion durch die Behandlung mit einer kardioplenen Lösung nicht mehr ausführen kann, hat es für die Muskelzelle keinen Nutzen mehr. In Zellkultur kann dieser Effekt dafür genutzt werden, eine durch Nicht-Nutzung induzierte Degradation der Sarkomer-Proteine herbeizuführen, während andere Bestandteile der Zelle weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Aus diesem Grund war das Modell der Kardioplegie in dieser Arbeit geeignet, um den Abbau des kontraktiven Apparats vitaler Muskelzellen zu untersuchen.

1.7. Blebbistatin

Der selektive Myosin-II Inhibitor (*S*)-*Blebbistatin* ist ein seit dessen Entdeckung im Jahr 2001 breit eingesetztes, mikromolares Tool um die Aktin-Myosin-Interaktion und damit die Muskelkontraktion sowohl in der Herz- als auch der Skelettmuskulatur zu unterbinden. Indem es während des Querbrückenzyklus reversibel die ATPase-Aktivität des Myosin-ADP-P-Komplex inhibiert, bleibt der Phosphatrest nach der ATP-Hydrolyse gebunden und Myosin verbleibt in einem Stadium niedriger Aktinin-Affinität. Das Ineinandergleiten der Filamente wird verhindert und die Verkürzung des Sarkomers bleibt aus. (*S*)-*Blebbistatin* inhibiert hierbei selektiv Myosin-II. Zudem weist es in höherer Dosierung zytotoxische Eigenschaften auf, die zwar stark abhängig von der Inkubationszeit und der behandelten Zellspezies sind, einen therapeutischen Gebrauch jedoch unmöglich machen. Seine gute Membranpermeabilität, die reversible Inhibition, sowie die Schnelligkeit des Wirkeintritts machen (*S*)-*Blebbistatin* jedoch zu einem nützlichen Exzitation-Kontraktion Entkoppler in der physiologischen Forschung [71]. Dadurch eignet sich (*S*)-*Blebbistatin* auch zur Arretierung kontraktile Zellen, da der Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften gering zu sein scheint. Es konnte gezeigt werden, dass in ventrikulären Rattenzellen selbst bei maximalen (*S*)-*Blebbistatin* Konzentrationen von 10 μM , eine vollständige Blockierung der Kontraktion ohne signifikante Veränderungen der Aktionspotenziale auftraten, wobei die IC_{50} zur Arretierung der ventrikulären Rattenkardiomyozyten bei 0.43 μM lag [72].

1.8. Ziele der Arbeit

Titin hat durch seine zahlreichen Funktionen innerhalb des Sarkomers eine große klinische Bedeutsamkeit. Daher ist ein detailliertes Wissen über die Synthese und den Abbau des Filamentproteins von hoher Relevanz. Die Mechanismen der kontrollierten Degradation von Titin sind bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, genauere Kenntnisse über die Abbaumechanismen des Muskelfilaments Titin zu erlangen. Vorangegangene Arbeiten konnten bereits eine Beteiligung der zellulären Proteinqualitätskontrollsysteme der Autophagie und des UPS nachweisen. In der vorliegenden Arbeit, sollte nun gezeigt werden, in welchem Maße diese Systeme während des Abbaus von Titin aktiv sind, und ob sich deren Aktivitäten im zeitlichen Verlauf verändern. Untersucht werden soll der Titinabbau in Zellkulturen embryonaler Rattenkardiomyozyten. Aufgrund ihrer kontraktile Eigenschaften und der Tatsache, dass sich die embryonalen Rattenkardiomyozyten gut über einen langen Zeitraum kultivieren lassen und zudem einem hohen Protein-Turnover unterliegen, eignen sich dieses Modell für unsere Untersuchungen der Degradation an dem kontraktilem Apparat beteiligter Proteine besonders gut. Die Zellen werden in drei verschiedenen Ansätzen über einen Zeitraum von bis zu 17 Tagen kultiviert. Einer der drei Ansätze der Zellkultur stellt hierbei die Kontrollgruppe dar und wird lediglich mit einem Nährmedium kultiviert, während die Zellen der anderen beiden Ansätze durch die Zugabe zweier verschiedener Chemikalien zu dem Nährmedium mechanisch arretiert werden. In der ersten Versuchsgruppe soll durch die Zugabe von 35 mM KCl die Arretierung des kontraktilem Apparats erreicht werden. So kann perspektivisch der Titinabbau durch Nicht-Nutzung des Sarkomers induziert werden, und über den Zeitraum von 17 Tagen beobachtet werden. Um die Effekte der aufgehobenen Muskelkontraktion eindeutig auf diese zurückführen zu können, wird neben der Methode der Kardioplegie, die Arretierung in einem alternativen Ansatz durch die Anwesenheit des Myosin II Inhibitors *Blebbistatin* (21nM) im Nährmedium der Zellkultur versucht herbeizuführen. Neben der biochemischen Analyse des Titins autophagosomaler und proteasomaler Markerproteine durch *SDS-PAGE* und *Western Blot*, sollen die proteasomalen Trypsin- und Chymotrypsin Aktivitäten untersucht werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sollen unterschiedliche Titinepitope aus der Z-Scheibe, der I-Bande und der M-Linie dargestellt und somit die Hypothese geprüft werden, nach welcher ein sequenzieller Abbau der einzelnen Titin Z-Scheiben-I-Band- und A-Bandbereiche vorherrscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Blebbistatin	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (<i>Western blotting detection reagent</i>)	Cyanagen
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
<i>Imperial protein stain</i>	Thermo Scientific
Isofluran	Piramal Healthcare
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Ketaminhydrochlorid	Zoetis
Kollagenase Typ II	Biochrom
Methanol	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Nonident P40	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Penicillin / Streptomycin	Biochrom
Phenolrot	Sigma
Salzsäure 32%	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
β -Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth

TritonTM X-100	Sigma
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
10 x SDS - Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10 x – TBST (pH 7,4)	0,2M Tris / HCl 1,5M NaCl 1% Tween - 20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris / HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300mM Tris / HCl 100mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x -TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris / HCl
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 3 mM Natriumdihydrogenphosphat
PVDF <i>destain</i>	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
PVDF <i>stain</i>	0,075% Serva Blue in Methanol
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea 2M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05 M Tris / HCl
<i>Stripping Buffer</i>	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol
Verdaupuffer (pH 7,35-7,45)	137 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,7 mM Potassium chloride 406 μ M Natriumdihydrogenphosphat 12 mM Natriumhydrogencarbonat 190 U/mL Kollagenase Typ II 1512 USP-U*/mL Trypsin Phenolrot

2.1.3 Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Tab. 3: Kulturmedien für embryonale Rattenkardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium 20% FBS DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) (500ml) 20% (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin (Biochrom) 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids (Biochrom) 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma)
Kulturmedium 1% FBS DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) (500ml) 1% (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin (Biochrom) 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids (Biochrom) 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma)
Kulturmedium 1% FBS DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) (500ml) 1% (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin (Biochrom) 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids (Biochrom) 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma) 35 mM KCL
Kulturmedium 1% FBS DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM; Biochrom) (500ml) 1% (v/v) Fötale Kälberserum (Biochrom) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin (Biochrom) 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids (Biochrom) 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma) 21 nM Blebbistatin (Sigma)

2.1.4 Laborgeräte

Tab. 4: Laborgeräte

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Brutschrank	Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Feinwaage	AE163	Mettler
Fluoreszenzmikroskop	BZ-9000	Biorevo
Fluorometer, Luminometer	Glomax-Multi+ Detection System	Promega
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr

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

2.1.5 Antikörper

Tab. 5: Antikörper Western Blots

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti alpha-Actinin	1:5000	Maus	Sigma, #A7732
Anti AMPK	1:1000	Kaninchen	Abcam, #ab207442
Anti Atrogin	1:1000	Kaninchen	ECM Biosciences, #AP2041
Anti LC3B	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2775
Anti Phospho-mTor	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2971
Anti Phospho-AMPK	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2531
Anti P62	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #5114
Anti PSMA2	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #11864
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-mouse IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:5000	Pferd	Cell Signaling, #7076
Anti-rabbit IgG, horseradish-peroxidase-linked	1:5000	Ziege	Cell Signaling, #7074

Tab. 6 Antikörper Immunfluoreszenz

Primärer Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti alpha-Actinin	1:1000	Maus	Sigma, #A7732
Anti M8-M10	1:200	Kaninchen	Myomedix
Anti PEVK-total	1:200	Kaninchen	Eurogentec
Anti Z1Z2	1:200	Kaninchen	Myomedix
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Bestellnummer
Anti-Mouse IgG, Fab2, Alexa Fluor 488 Conjugate	1:500	Maus	Cell Signaling, #4408
Anti-Rabbit IgG, Fab2, Alexa Fluor 555 Conjugate	1:500	Kaninchen	Cell Signaling, #4413

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Präparation embryonaler Rattenkardiomyozyten

Für die Kultivierung embryonaler Rattenkardiomyozyten wurden trächtige Ratten am 18. Tag ihrer Schwangerschaft präpariert (Tierversuchsgenehmigung: 84-02.04.2017.A145). Die Anästhesie erfolgte durch die Injektion von Ketamin und Xylazin (100mg/kg Ketamin, 10mg/kg Xylazin). Per Kaiserschnitt wurden die Embryonen entnommen und sofort dekapitiert. Im Anschluss daran erfolgte die Tötung der Mutter per Dekapitation. Die embryonalen Herzen wurden mit Hilfe von feinen Pinzetten reseziert und in PBS auf Eis gesammelt. Unter der Zellbank wurde mit einem Skalpell zunächst der grobe Gewebsverband der Herzen durch behutsames Schneiden aufgebrochen. Darauffolgend wurde das Gewebe für insgesamt 60 Minuten in einem Trypsin- (2mg/ml) und collagenhaltigen (1mg/ml) Verdaupuffer zersetzt. In 15-minütigen Abständen wurde die Pufferlösung mit dem enthaltenen Gewebe auf- und abpipettiert, um eine durch Scherkräfte verbesserte Verdauung der Zellen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und anschließend für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in DMEM + 20% FBS resuspendiert. Je 1000 µl der Suspension wurden nun auf mit Gelatine beschichtete 6-Well-Platten mit 4 Deckgläschen/Well verteilt (Tag 0). Diese Ansätze wurden für die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbungen kultiviert. Die für die biochemischen Analysen bestimmten Zellen wurden, wie auch die Zellen für die Proteasomenaktivitätsmessung, auf mit Gelatine beschichteten 12-Well-Platten kultiviert, um eine größere Zahl an Ansätzen zu erzielen. Pro Well wurden hierzu 800 µl der Zellsuspension aufgetragen. Alle Platten wurden im Anschluss für 24 Stunden

im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. An Tag 1 wurden die Zellen für 60 Minuten mit Mitomycin (10 µL/mL DMEM + 20% FBS) behandelt, um die Proliferation von Fibroblasten zu inhibieren. Das Mitomycin wurde mit warmer PBS ausgewaschen und es wurden nun die Kontrollansätze mit 1500 µl/6-Well, beziehungsweise 800 µl/12-Well in DMEM + 1% FBS kultiviert. Um eine Arretierung der Zellen zu erreichen, wurden diese in Medium mit 35mM KCl, beziehungsweise 21nM Blebbistatin kultiviert. Die final verwendete Blebbistatin-Konzentration wurde zuvor experimentell etabliert, indem in verschiedenen Ansätzen Kulturmedien mit Blebbistatin-Konzentrationen zwischen 4.25 nM und 0.025 nM verwendet wurden, um je ca. 4 Wells der Zellkultur ab Tag 1 zu kultivieren. Es wurde täglich anhand der mikroskopischen Beobachtung der Zellen und derer kontraktile Bewegungen beurteilt, wie der Vitalitätszustand der Zellen ist. Während eine längere Kultivierung in Anwesenheit von KCl keine toxische Wirkung auf die Zellen hatte, musste die für eine längere Blebbistatin Stimulation zu verwendende Konzentration erst ermittelt werden. Hierbei wurde kontrolliert, bei welcher Blebbistatin Konzentration im Kulturmedium die Zellen arretiert waren, gleichzeitig aber über den geplanten Kultivierungszeitraum nicht abstarben. Bei höheren Blebbistatin Konzentrationen überlebten zunehmend weniger Zellen die Kultivierung, sodass wir nach der Austestung verschiedener Konzentrationen abschließend eine Konzentration von 0.21 nM für geeignet hielten, um damit arretierte Zellen kultivieren zu können, ohne dabei den Zelltod herbeizuführen. Alle zwei Tage wurden die Nährmedien ausgetauscht.

2.2.2 Proteinbiochemie

2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteinanalyse durchzuführen, wurde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese angewandt. Hierbei werden die Proteine ihrer Molekülmasse nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Zuvor wurden die zu analysierenden Zellen in SDS-Probenpuffer geerntet und für 3 Minuten auf 98°C erhitzt, sodass die Proteine denaturierten. Im Anschluss wurden die Zellen auf die Gele aufgetragen. Aufgrund der Größe des Proteins, wurden zur Auftrennung von Titin und den Titinisoformen spezielle Polyacrylamidgele mit einem Acrylamidanteil von 2,5% und 2,2% verwendet, welche mit 0,75% Agarose stabilisiert wurden. Zur Herstellung dieser Gele wurden außer APS und Agarose alle Komponenten (siehe Tab. 7) in einem 50 ml Falcon vermischt und im Wasserbad auf 48°C erwärmt. Agarose wurde in der Mikrowelle

verflüssigt und, wie auch APS, zügig hinzugefügt. Unmittelbar danach wurde das Gemisch 3-mal auf- und abpipettiert, um es in Suspension zu bringen. Die Flüssigkeit polymerisierte dann zwischen zwei Glasplatten mindestens zwei Stunden aus. Für die Gelelektrophorese wurden die Systeme Mini-Twin von Biometra und Mini-PROTEAN von Biorad verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 2-5 mA pro Gel, pro Tasche wurden 10-15 µL der Zelllösung aufgetragen.

Tab.7: Pipettierschema für je 2 Titingele und für je 2 SDS-Standardgele / Sammelgele

Lösung	Titingel 2,2%	Titingel 2,5%	Trenngel 7,5%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%	Sammelgel
30% Acrylamidlösung	1,46 ml	1,66 ml	3,75 ml	6,25 ml	7,5 ml	0,667 ml
H ₂ O _{bidest}	6,61 ml	6,41 ml	7,5 ml	5 ml	3,75 ml	3,025 ml
4 x SDS Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
4 x SDS Sammelgelpuffer	-	-	-	-	-	1,25 ml
SDS 20%	100 µL	100 µL	-	-	-	-
TEMED	11,5µL	11,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	15 µL
APS	150 µL	150 µL	75 µL	75 µL	75 µL	50 µL
Agarose 1,5%	6,67 ml	6,67 ml	-	-	-	-
Gesamtvolumen	20 ml	20 ml	15 ml	15 ml	15 ml	5 ml

Die Auftrennung aller weiteren Proteine erfolgte in diskontinuierlicher Gelektrophorese. Die Gele hierzu bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei das Trenngel abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine, einen Acrylamidgehalt von 7.5%-15% enthielten (siehe Tab. 7). Nach Vermengung der Komponenten wurde mit Zugabe von TEMED und APS die Polymerisation angestoßen, die für mindestens 45 Minuten zwischen zwei Glasplatten und unter Abschluss von Sauerstoff durch Isopropanol erfolgte. Folgend wurde das gemäß Tab. 7 angefertigte Sammelgel über das Trenngel gegossen und nach einer weiteren Polymerisationszeit von etwa 30 Minuten konnte das Gel mit 5-10 µL Probe pro Tasche beladen werden. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x-Laufpuffer bei 30-60 mA pro Gel . Dabei wurden ebenfalls die oben genannten Geräte verwendet.

2.2.2.2 Imperial Protein Stain

Um die Titinisoformen und das Titin/Myosin-Verhältnis zu analysieren wurden die 2,5% Titingele für mindestens eine Stunde in Imperial Protein Stain, einer Coomassie-basierten Proteinfärbelösung, gefärbt. Im Anschluss wurden die Gele in deionisiertem Wasser mindestens 2 Stunden entfärbt. Mit einem Durchlichtprogramm des Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat), konnten nun die Bandenstärken auf den Gelen digitalisiert werden. Die quantitative Bestimmung erfolgte dann anhand der Pixeldichte mit der Software Image J. Der Gesamtanteil an Titin ergab sich aus der Addition der beiden Isoformenbanden (N2BA und N2B). Zudem konnten die prozentualen Anteile der einzelnen Isoformen, sowie der prozentuale Anteil des Degradationsproduktes T2 angegeben werden. Hierzu wurde das Verhältnis von T2 zum Gesamttitin T1 ermittelt. Da neben den Titinisoformen auch Myosin auf den Gelen mitaufgetrennt wurde, konnte die Myosinbande analysiert werden, um das Verhältnis von Titin zu Myosin zu bestimmen.

2.2.2.3 Western Blot

Zwecks des Antikörpernachweises der zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden diese mittels *semidry*-Western Blot auf PVDF-Membranen übertragen. Zunächst wurden hierbei 5 Whatman-Papiere in Anodenpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur gelegt. Dann wurde eine PVDF-Membran in Ethanol aktiviert und darauf platziert. Nun wurde das zwischen den Glasplatten befindliche Gel vorsichtig herausgeholt und auf die PVDF-Membra gelegt. Mit 5 in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren wurde wiederum auf das Gel bedeckt und zur Vermeidung von Lufteinschlüssen wurde mit einer Rolle der Stapel mehrfach ausgestrichen, bevor die Blotting-Kassette geschlossen wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei 1,5A und einer maximalen Spannung von 20V für 12 Minuten für Standardgele und 40 Minuten für Titingele. Die PVDF-Membran wurde im Anschluss für etwa 20 Sekunden in PVDF-Stain angefärbt, und dann für 5-10 Minuten in PVDF-Destain wieder entfärbt, um die übertragenen Proteinbanden sichtbar zu machen und damit den Proteintransfer zu überprüfen. Die Destain-Lösung wurde mit 1x-TBST ausgewaschen, bevor die Membranen in einem mit TBST + 2% Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) befüllten 50 ml Falcon für mindestens eine Stunde auf dem Rollmischer blockiert wurden. Die primären Antikörper wurden gemäß Tabelle 5 in 1x-TBST + 0,5% BSA verdünnt und die Membranen wurden für mindestens 2 Stunden damit inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen 3-mal für je 10 Minuten in

1x-TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit den sekundären, Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörpern für mindestens 2 weitere Stunden folgte. Erneut wurden die Membranen 3-mal in 1x-TBST gewaschen. Die Visualisierung der Antikörperbindungen an den Bindestellen der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz. Die Signale wurden mit dem Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) detektiert. Es wurde zusätzlich ein Strukturprotein im Sinne einer Beladungskontrolle zur Normierung der Signalstärke auf jedem Western Blot analysiert, sodass durch Verrechnung der Beladungskontrolle mit dem zu analysierenden Protein eine Aussage über eine gesteigerte- oder verringerter Antikörperbindung getroffen werden konnte. Mit dem Programm Image J wurden über Pixeldarstellung die Signale quantifiziert und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Um den Phosphorylierungsstatus einiger Proteine zu bestimmen, wurden Phospho- und Pan-Antikörper nacheinander auf demselben Western Blot analysiert. Zwischen den beiden Antikörpern wurden die Membranen in Stripping Puffer inkubiert, um die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde der Blot erneut blockiert und mit dem jeweiligen Pan-Antikörper inkubiert. Auf diese Weise konnte das Verhältnis von phosphoryliertem- und Gesamtprotein bestimmt werden.

2.2.2.4 BCA-Proteinbestimmung

In Vorbereitung auf die Messung der Aktivität der Proteasomen in den embryonalen Rattenkardiomyozyten, führten wir zunächst eine Proteinbestimmung der Zell-Lysate durch. Sie wurden dazu in einer Verdünnung von 1:5 und 1:10 in eine 96-Well-Platte pipettiert und anschließend mit je 200µL BCA-Reagenz (Reagent A: Reagent B 50:1) versetzt, daraufhin mit Parafilm-Folie versiegelt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Absorption photometrisch im Glomax-Multi+ bei 562nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss mit Hilfe einer Eichgeraden von 0-2000 µg/ml BSA bestimmt.

2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

2.2.3.1 Fixierung und Färbung

Die auf den Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zunächst 1-mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend zur Fixierung für 10 Minuten mit 4% PFA in PBS inkubiert. Danach wurden sie erneut 2-mal mit PBS gespült und dann direkt gefärbt oder bei 4°C in PBS aufbewahrt.

Um die Zellmembran für die Zellfärbung permeabel zu machen, wurden die Zellen für 20 min in 2%iger Triton-X-100-PBS Lösung inkubiert. Die Lösung wurde 3-mal für 5 Minuten mit PBS abgewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Zellen zu blockieren, wurden sie daraufhin 30 Minuten lang in 3% PBS + BSA-Lösung inkubiert. Es wurden drei verschiedene Antikörper gegen spezifische Titin-Domänen verwendet, um die unterschiedlichen Regionen des Proteins über den Kultivierungszeitraum von 17 Tagen in der Immunfluoreszenzmikroskopie darstellen zu können und Veränderungen im Zuge des Degradationsprozesses darzustellen. Der Antikörper Z1Z2 markierte hierbei eine Domäne innerhalb der Z-Scheiben-Region, Anti-PEVK wurde gegen die entsprechende Domäne innerhalb der I-Band-Region verwendet und Anti-M8-M10 markierte eine Domäne innerhalb der M-Linien-Region. Es wurden bei den Färbungen jeweils ein primärer Antikörper gegen eine der genannten Titin-Domänen, sowie als zweiter Antikörper Anti-Alpha-Aktinin in einer Verdünnung gemäß Tabelle 6 zu der Inkubationslösung hinzugefügt. Der gegen das Sarkomerprotein Aktinin gerichtete Antikörper sollte das Sarkomer markieren, um bei der anschließenden Analyse Kardiomyozyten sicher von Fibroblasten abgrenzen zu können und die Lokalisation der markierten Titin-Domänen innerhalb des Sarkomers zu ermöglichen. Nachdem Die primären Antikörper wurden für 1-2 Stunden zur Inkubation auf den Deckgläschen belassen. Nachdem erneut 3-mal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper für weitere 1-2 Stunden im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen wieder 3-mal mit PBS gewaschen, mittels Einbettmedium auf Objektträgern fixiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Die Analyse der Zellen wurde unter dem Ti Eclipse Fluoreszenzmikroskop (Nikon) durchgeführt. Die Signale der zwei verschiedenen Antikörper wurden aufgezeichnet und die Immunfluoreszenzbilder der Zellen übereinandergelegt und visuell ausgewertet.

2.2.4 Trypsin/Chymotrypsin Assay

Die Aktivität der Proteasen Trypsin und Chymotrypsin wurden mithilfe von käuflichen Aktivitäts- Assays der Firma Promega gemessen. Hierzu wurden die zuvor in 12-Well-Platten kultivierten Zellen pro Well mit 50 µL des PBS-Lysepuffers (Tab. 2) geerntet. Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gekühlt und dann 3-mal für je 3 Minuten in einem Ultraschallbad sonifiziert. Daraufhin wurden sie bei 4°C mit 14000 RPM für 15 Minuten zentrifugiert. Nach abpipettieren des Überstandes in neue Eppendorf-Behälter wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten mittels BCA-

Proteinbestimmung (siehe 2.2.2.4) bestimmt. Die Proben wurden auf einen Proteingehalt von 0,1 µg/ml verdünnt und in einer Menge von je 100 µL auf eine schwarze 96-Well-Platte aufgetragen. Es wurden je 100 µL Reagenz mit enthaltenem Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Substrat (Trypsin- Glo3/7 und Chymotrypsin- Glo3/7) hinzugefügt und die 96-Well-Platte wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Inkubation ruhen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Durchführung des Proteasom Glo-Assays und die Lumineszenz der Proben wurde im Glomax-Multi+ detektiert.

2.2.5 Software

Für die Auswertungen und Ausarbeitung dieser Arbeit wurde neben den im Text genannten Programmen folgende Software verwendet: Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016, GraphPad Prism 9 XML Project und Adobe Photoshop CS6 verwendet.

2.2.6. Datenanalytische Statistik

Die statistische Verarbeitung der Daten wurde über die Anzahl der unabhängigen Experimente (n), den Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Analysiert wurden die Daten mittels der Tests One Way Anova, Kruskal-Wallis sowie Brown-Forsythe and Welch Anova durch Verwendung des Programms, GraphPad Prism 8.2. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt und statistische Signifikanz angenommen.

3 Ergebnisse

Die embryonalen Rattenkardiomyozyten (ERC) wurden ab Tag 1 in drei unterschiedlichen Ansätzen kultiviert. Zum einen in einem Kontrollmedium, alternativ in einem mit entweder 35mM KCl oder 0.21 nM Blebbistatin versetzten Medium. Von Tag 3 bis Tag 15 wurden Zellen aus jedem der drei Ansätze entweder in SDS-Probenpuffer- oder Lysepuffer geerntet, oder fixiert und mittels Immunfluoreszenz analysiert.

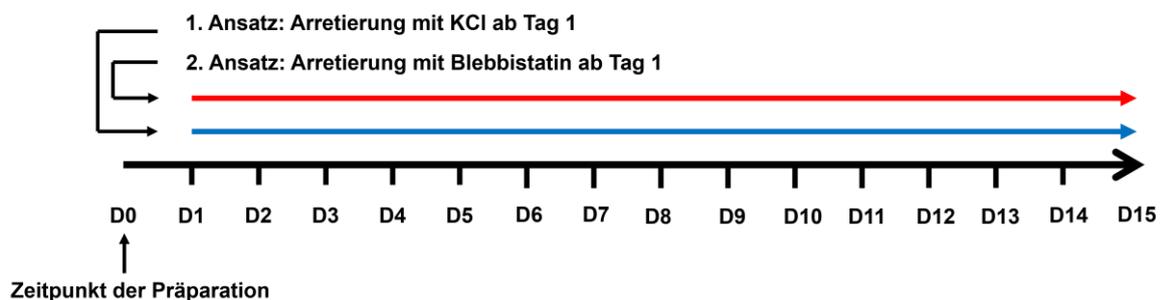


Abb. 6: Zeitachse mit Darstellung der Kultivierungszeiträume in hyperkaliämischen und Blebbistatin-versetzten Nährmedium: Im ersten Ansatz wurden die embryonalen Rattenkardiomyozyten ab Tag 1 arretiert, indem sie in einem Nährmedium mit Zusatz von 35 mM KCl kultiviert wurden. Im alternativen Versuchsmodell wurde die Arretierung erreicht, indem dem Nährmedium 21 nM Blebbistatin hinzugefügt wurde. Der letzte Kultivierungs- und Untersuchungszeitpunkt beider Versuchsansätze war der 15. Tag.

3.1 Arretierung der Kontraktilität induziert die Degradation des Titinfilaments

Im Folgenden wird der Einfluss des auf zwei unterschiedliche Weisen induzierten chemischen Zellarrests (Hyperkaliämie und Blebbistatin) auf den Abbau des Titinfilaments untersucht. Nach unserer Hypothese könnte die Arretierung des Sarkomers und die damit einhergehende mechanische Inaktivität einen durch Nicht-Nutzung induzierten Turnover der Sarkomerproteine und insbesondere des Titins hervorrufen. Daneben vermuten wir, dass für das nicht-kontrahierende Sarkomer erleichterte Bedingungen für Degradationsprozesse herrschen. Wir analysierten dazu die Degradationsbande T2, sowie das Verhältnis von Titin zu Myosin über die Dauer der Kultivierung von 15 Tagen, um außerdem Hinweise auf einen bevorzugten Abbau Titins gegenüber anderen Sarkomerproteinen zu finden. Abbildung 7 zeigt den Einfluss

der Hyperkaliämie, sowie des Blebbistatins auf die Degradationsbande T2. Weiterhin zeigt die Abbildung das Verhältnis von Titin zu Myosin.

Während sich zu Beginn der Kultivierung (Tag 3) keine signifikant erhöhte T2/T1 Ratio in den arretierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen darstellte, zeigte sich ab Tag 7

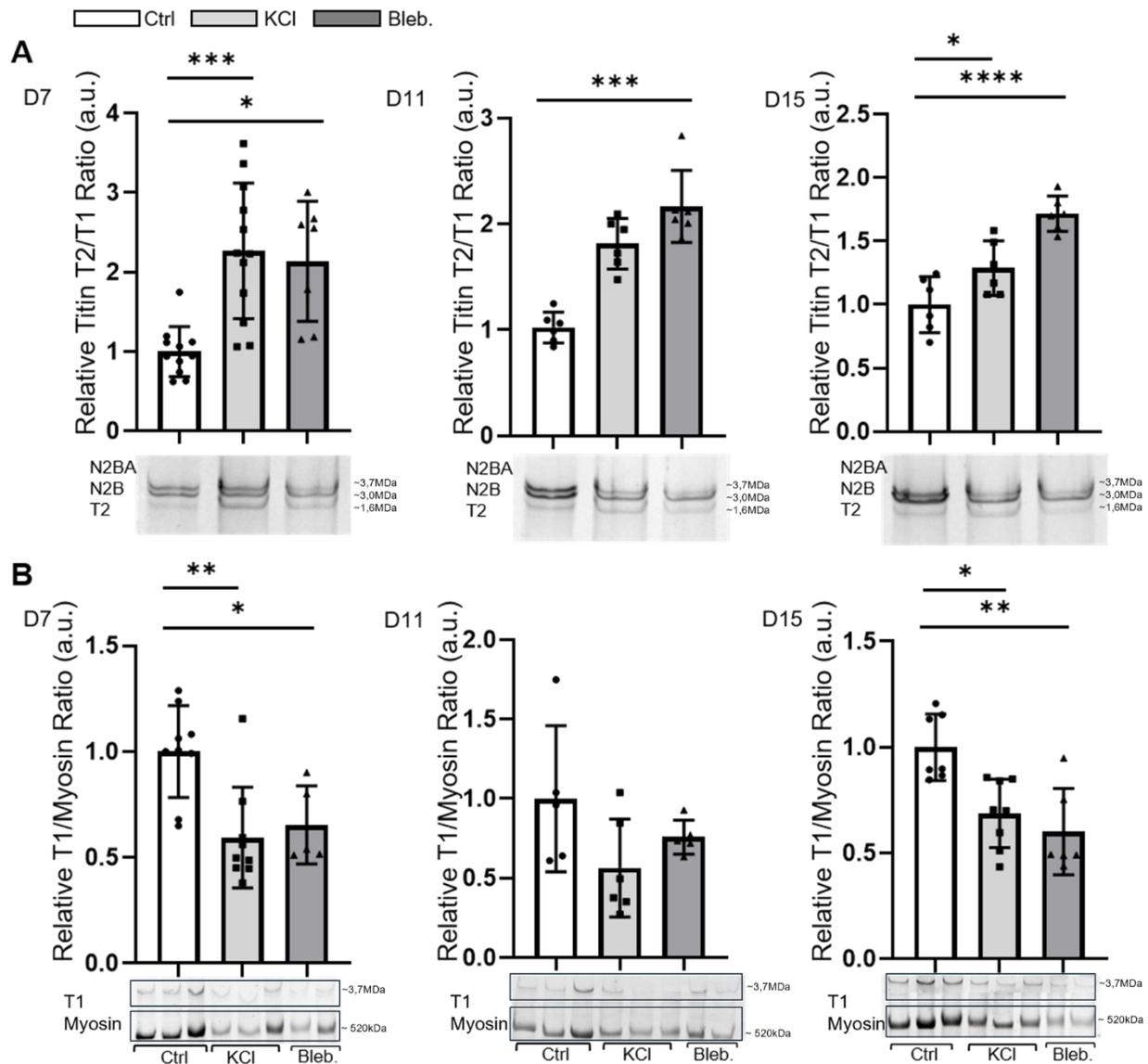


Abb.7: Einfluss der mechanischen Arretierung ab Tag 1 auf das T2/T1- und das Titin/Myosin-Verhältnis. (A) Verhältnis der Titin-Degradationsbande T2 zum Gesamtitin T1 (N2BA+N2B) mit zusätzlichen Daten von Dr. Sebastian Kötter für D7 und D15 (n=6 bis 12). (B) Verhältnis von Gesamtitin zu Myosin (n=5 bis 9). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Tage 7, 11 und 15. Die unter den Diagrammen gezeigten Gele zeigen repräsentativ die Titinisoformen N2BA und N2B, sowie die Titin-Degradationsbande T2 und Myosin. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert. Bei zwei Asterisken liegt der p-Wert $<0,01$ und bei drei Asterisken bei $<0,001$.

sowohl in den mit KCl als auch mit Blebbistatin arretierten Zellen eine signifikante Erhöhung des relativen T2-Anteils. In den durch Kardioplegie arretierten Zellen lag die T2/T1 Ratio an den Tagen 7, 11 und 15 bei den um die folgenden Werte erhöhten Verhältnissen von $+1,27 \pm 0,26$, $+0,89 \pm 0,28$ und $+0,29 \pm 0,11$ gegenüber der T2/T1 Ratio der Kontrollzellen, wobei die Ergebnisse für die Untersuchungszeitpunkte Tag 7 und Tag 15 statistische Signifikanz erreichten. In den durch Blebbistatin arretierten Zellen lagen die Ergebnisse mit Erhöhungen von $+1,14 \pm 0,30$, $+0,64 \pm 0,29$ und $+0,72 \pm 0,11$ statistisch signifikant über den T2/T1 Ratios der Kontrollzellen (Abb.7).

In der Analyse der Titin/Myosin Verhältnisse wurde das Gesamttitin T1 auf die Myosin-Bande bezogen, welches exemplarisch für ein Nicht-Titin Sarkomerprotein gewählt wurde. Die durch KCl arretierten Zellen zeigten an den Tagen 7 und 15 gegenüber den Kontrollzellen signifikant verringerte Werte von $-0,41 \pm 0,10$ und $-0,31 \pm 0,08$. Die durch Blebbistatin arretierten Zellen zeigten mit $-0,35 \pm 0,12$ und $-0,39 \pm 0,09$ ebenfalls verringerten Quotienten, verglichen mit den Kontrollzellen. An Tag 11 der Kultivierung war eine tendenzielle Verringerung des Verhältnisses von T1/Myosin in KCl-arretierten Zellen zu beobachten. Hier lagen die Werte bei $-0,44 \pm 0,20$.

3.2 Der Titin-Isoformenswitch wird durch Kardioplegie beschleunigt

Nachdem die vorherigen Ergebnisse Hinweise für einen erhöhten Titinabbau lieferten, beleuchtet dieser Abschnitt den postnatalen Isoformen-*Switch* Titins unter der chemischen Arretierung. Mit der Dauer der Kultivierung weisen embryonale Rattenkardiomyozyten einen progredient steigenden N2B- und eine kongruent sinkenden N2BA-Anteil auf. Gemessen wurden die prozentualen Anteile der N2B-Isoform am Gesamttitin. Ab Tag 7 der Kultivierung zeigte sich in den mit KCl arretierten Zellen ein tendenziell erhöhter-, und an Tag 15 ein signifikant erhöhter N2B-Anteil mit $+0,10 \pm 0,04$ an Tag 11 und $+0,06 \pm 0,02$ gemessen an Tag 15 gegenüber den Kontrollzellen. Der N2B-Anteil, der mit Blebbistatin arretierten Zellen, wich über die Dauer der Kultivierung weniger von dem der Kontrollzellen ab und lag tendenziell erhöht über dem N2B-Anteil der Kontrollzellen.

Da RBM20 als Spleißingfaktor für Titin identifiziert werden konnte [16], sollten die Level dieses Proteins neben der Untersuchung der oben beschriebenen Isoformenverhältnisse als Marker des Isoformen-*Switches* gemessen werden. Die

Arretierung der embryonalen Rattenkardiomyozyten mit Blebbistatin führte hierbei zu einem signifikant erhöhten Proteinlevel an RBM20 ab Tag 7. Die relativen RBM20 Level lagen hier bei $+0,51 \pm 0,14$, an Tag 11 bei $+0,65 \pm 0,25$ und an Tag 15 bei $+0,82 \pm 0,18$ gegenüber den Kontrollzellen. Anders, als aufgrund der in diesen Zellen deutlich veränderten Isoformenverhältnisse (s.o.) vermutet, zeigten sich in den mit KCl-arretierten Zellen nur tendenziell erhöhte RBM20 Level.

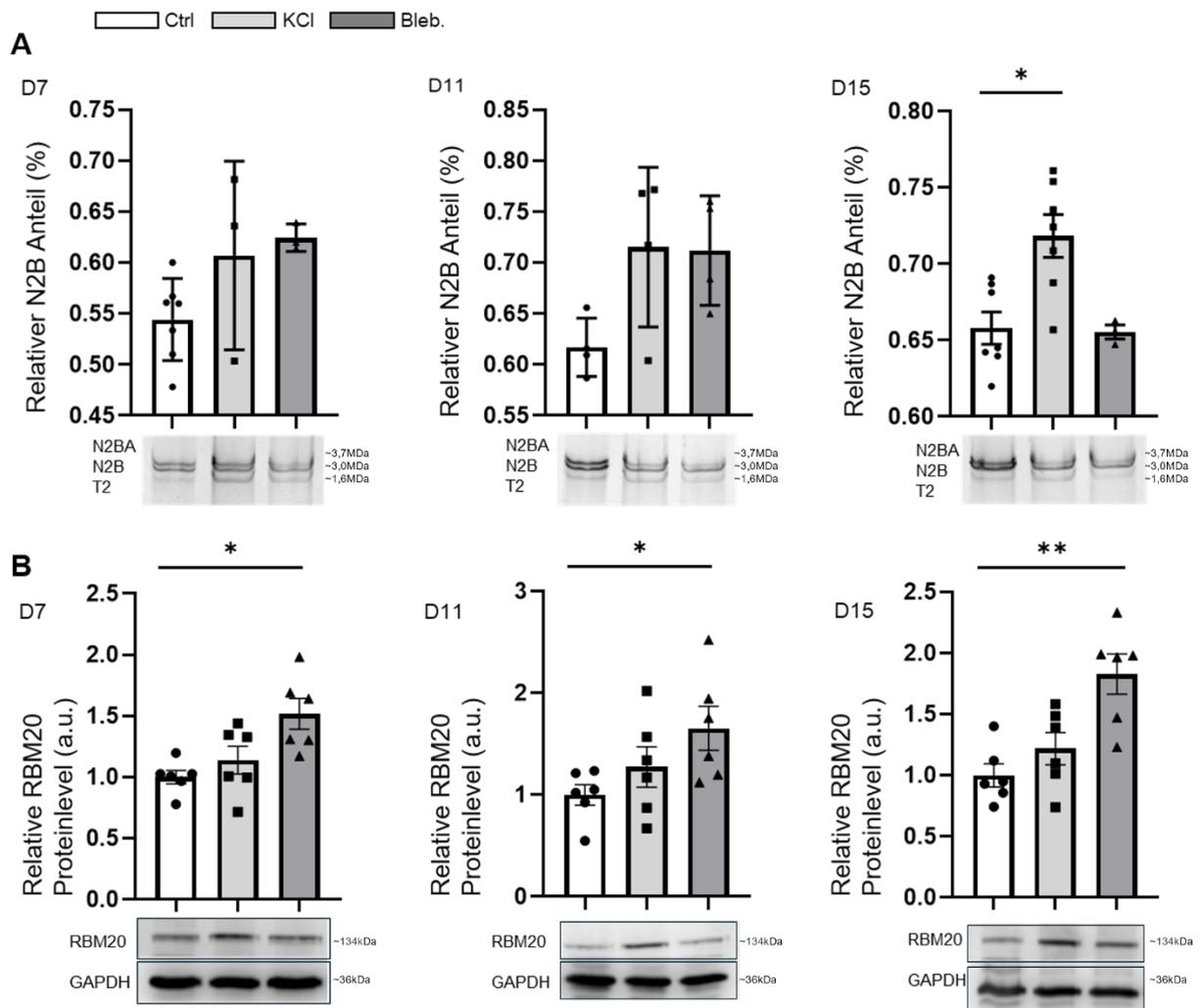


Abb.8: Einfluss der Kardioplegie und des Blebbistatins auf den Titin-Isoformenswitch und die Proteinlevel des Spleißingfaktors RBM20. (A) Anteil der adulten Titin-Isoform N2B am Gesamtittin (N2BA+N2B) in den arretierten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen (n=3-7). (B) RBM20-Proteinlevel bezogen auf GAPDH als Referenz (n=6). Die Abbildungen zeigen die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte \pm Standardabweichung an den Tagen 7, 11 und 15 der Kultivierung. Repräsentative Gelbbilder und Western Blots sind unter den Balkendiagrammen dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

3.4 Mechanische Arretierung triggert die Polyubiquitinierung des Titinfilaments

Nachdem die oben aufgeführten Ergebnisse Hinweise auf einen durch Arretierung verstärkten Abbau Titins, sowie einen beschleunigten Isoformen-Switch lieferten, sollte nachfolgend der Ubiquitinierungsstatus des Titinfilaments untersucht werden.

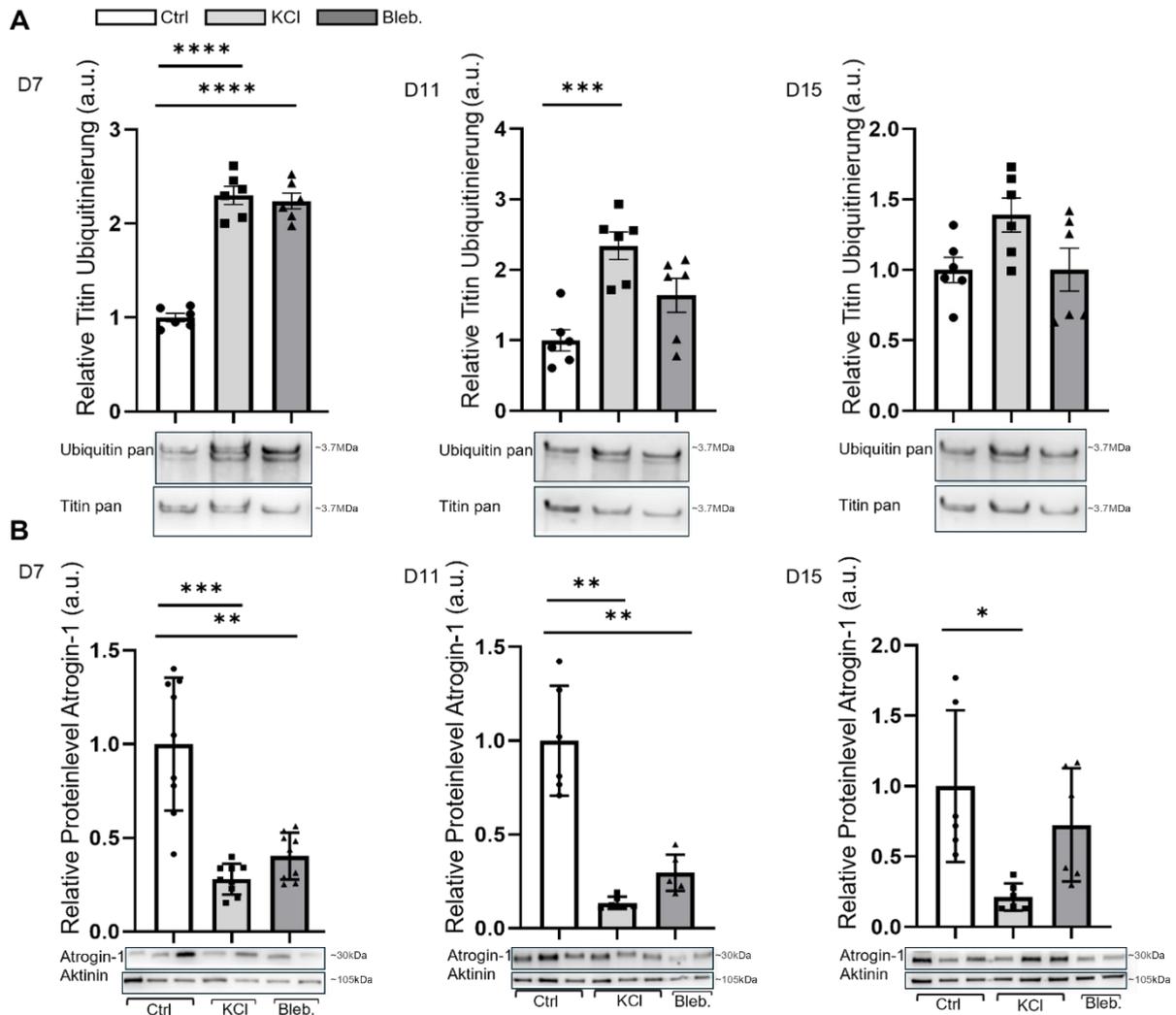


Abb.9: Darstellung der Titin-Ubiquitinierung in chemisch arretierten Kardiomyozyten und Proteinlevel der E3-Ligase Atrogin-1. (A) Darstellung der relativen Ubiquitin-Proteinlevel (n=6). (B) Proteinlevel der E3-Ligase Atrogin-1 bezogen auf Aktinin (n=6 bis n=9). Die Daten der Graphen aus (A) und (B) wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt. Die Diagramme zeigen die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte \pm Standardabweichung an den Tagen 7, 11 und 15 der Kultivierung. Blots zeigen exemplarisch die Proteinbanden für Ubiquitin, Titin, Atrogin-1 und Aktinin. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

Da Proteine sowohl für den Abbau durch die Autophagie als auch für den proteasomalen Abbau zunächst durch Ubiquitinierung markiert werden, wurde der Ubiquitinierungsstatus von Titin als Degradationsmarker untersucht. Abbildung 9 zeigt die Titin-Ubiquitinierung in den Kontrollzellen, in den mittels KCl arretierten Zellen, sowie in den durch Blebbistatin arretierten Zellen. Weiterhin zeigt die Abbildung die relativen Proteinlevel der E3-Ligase Atrogin-1, ein Protein, welches als weiterer Marker für die Ubiquitinierung von Titin genutzt werden sollte.

An Tag 7 war in beiden Versuchsgruppen ein gegenüber den Kontrollzellen stark erhöhtes Ubiquitinlevel gemessen worden und an Tag 11 ebenfalls in der KCl-Versuchsgruppe. Für die mit KCl arretierten Zellen lag der relative Ubiquitingehalt bei $+1,30 \pm 0,10$ an Tag 7 und $+1,34 \pm 0,28$ an Tag 11 über den Proteinleveln der Kontrollzellen. In den mit Blebbistatin arretierten Zellen lag die Erhöhung bei $+1,24 \pm 0,10$ und $+0,63 \pm 0,28$. Arretierte Zellen zeigten an Tag 7, an Tag 11, und die KCl-Versuchsgruppe auch an Tag 15 signifikant verringerte Proteinlevel an Atrogin-1. So lag der gemessene Wert in den mit KCl arretierten Zellen bei $-0,72 \pm 0,12$ an Tag 7, bei $-0,86 \pm 0,12$ an Tag 11 und bei $-0,78 \pm 0,22$ an Tag 15. In den Blebbistatin-Versuchszellen lagen die Proteinlevel mit $-0,60 \pm 0,13$ an Tag 7 und $-0,70 \pm 0,13$ an Tag 11 unter denen der Kontrollzellen.

3.5 Einfluss mechanischer Inaktivierung auf die proteasomale Aktivität

Es sollte der Einfluss mechanischer Inaktivierung auf die embryonalen Rattenkardiomyozyten untersucht werden, in dem Proteasomenaktivitätsmessungen für die Trypsin-ähnliche und die Chymotrypsin-ähnliche Enzym-Aktivität durchgeführt wurden. Neben dieser direkten Aktivitätsmessung sollte PSMA2, eine der 20S-Untereinheiten des Proteasoms [73], als Markerprotein für die Proteinexpression des Proteasoms in den Zellen gemessen werden.

Die Auswirkungen des Zellarrestes auf die PSMA2-Proteinlevel embryonaler Rattenkardiomyozyten sind ebenfalls in Abbildung 10 dargestellt. In den KCl-Versuchszellen zeigten sich ab Tag 11 signifikant erhöhte relative PSMA2 Proteinlevel. Sie lagen bei mit $+0,76 \pm 0,26$ und $+1,03 \pm 0,36$ an den Tagen 11 und 15, über denen der Kontrollzellen. In den Blebbistatin-Versuchszellen wurde an Tag 15 eine Erhöhung des PSMA2 Proteinlevels gemessen, hier lagen die Proteinlevel bei $+0,84 \pm 0,30$.

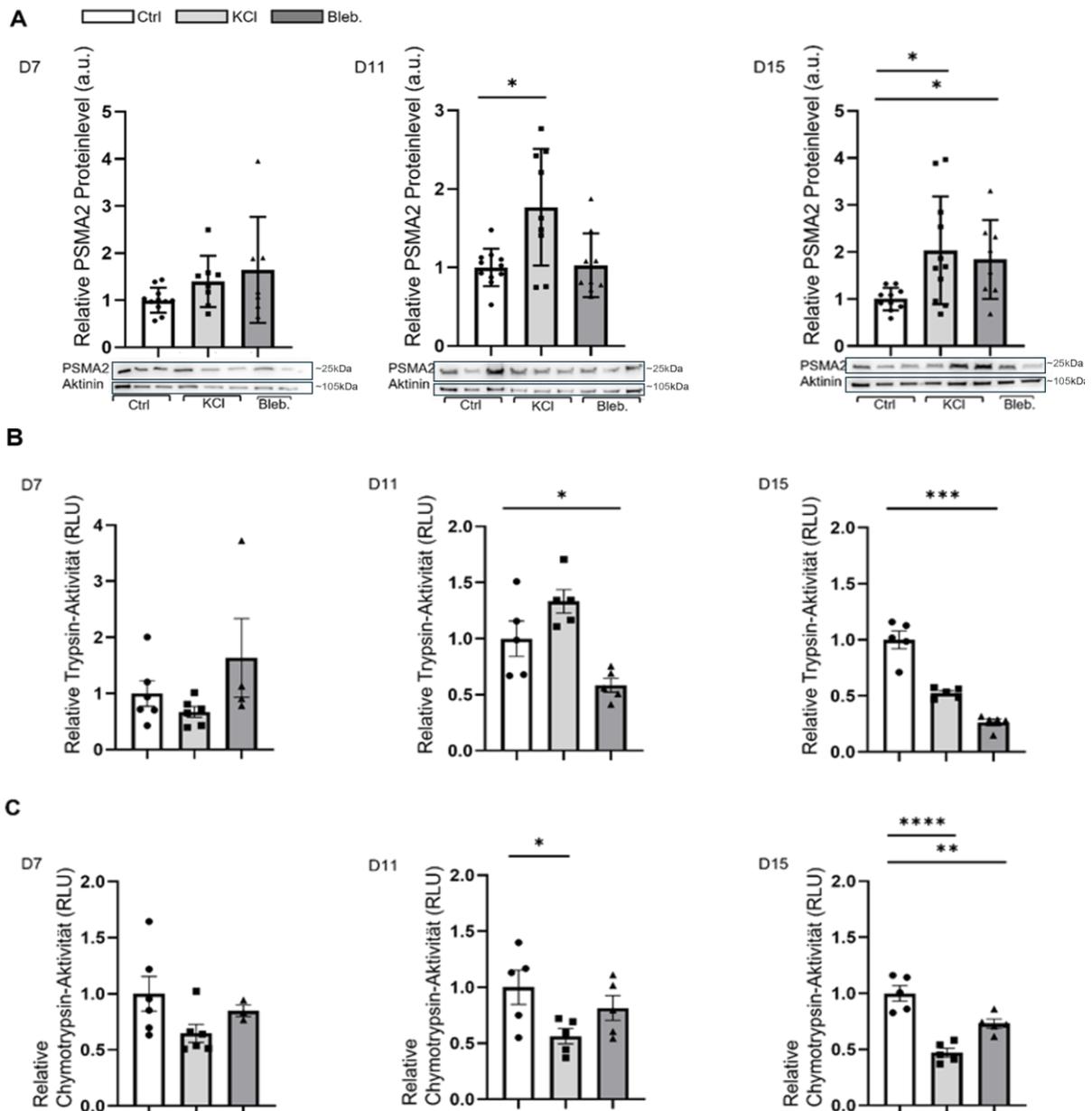


Abb.10: Der Proteasomenmarker PSMA2 und die proteasomale Chymotrypsin-ähnliche und Trypsin-ähnliche Aktivität nach chemischer Arretierung der ERC. (A) Gezeigt sind die relativen Proteinlevel des proteasomalen Proteins PSMA2 in den chemisch arretierten Versuchszellen, sowie in den Kontrollzellen (n=7-11). Repräsentative Western Blots sind darunter dargestellt. (B) Abgebildet sind die Trypsin-ähnlichen Enzymaktivitäten (n=4-6). (C) Abgebildet sind die Chymotrypsin-ähnlichen Enzymaktivitäten (n=3-6). Die Abbildungen zeigen die auf die Kontrollen normierten Mittelwerte \pm Standardfehler an den Tagen 7, 11 und 15 der Kultivierung. Die Daten der Graphen aus (A)-(C) wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Proteasomenaktivitätsmessungen an den Tagen 7, 11 und 15. Es zeigten sich in der arretierten Blebbistatin-Versuchsgruppe signifikant reduzierte Aktivitäten beider untersuchten proteasomalen Enzyme (die Trypsin-ähnliche Protease und die Chymotrypsin-ähnliche Protease) an Tag 15 der Kultivierung, sowie für die Trypsin-ähnliche Aktivität auch an Tag 11. Die Werte lagen an Tag 15 für Chymotrypsin bei $-0,27 \pm 0,07$ und für Trypsin bei $+0,76 \pm 0,26$. An Tag 11 lagen sie für Trypsin bei $-0,42 \pm 0,16$ unterhalb der Kontrollzellen. In der arretierten KCl-Versuchsgruppe zeigten sich verringerte Enzymaktivitäten für die Chymotrypsin-ähnliche Protease an den Tagen 11 und 15. Hier lagen die Aktivitäten mit $-0,44 \pm 0,16$ und $-0,53 \pm 0,07$ unterhalb der Aktivitäten in den Kontrollzellen.

3.6 Einfluss der Inaktivierung der ERC auf p62 und LC3 Proteinlevel

Als Marker für autophagosomale Degradationsmechanismen wurden das Adapterprotein p62 und das Protein LC3-II, ein Bestandteil der Autophagosomenmembran, analysiert. P62 besitzt Bindestellen für polyubiquitinierte Substrate und LC3-II und vermittelt so den Transport ubiquitinerter Substrate zum Autophagosom und zum Proteasom. Eine Akkumulation von p62 tritt bei Hemmung der Autophagie und des Proteasoms auf [50, 74], sodass die Reduktion von p62 möglicherweise auf eine erhöhte Aktivität dieser Degradationsmechanismen schließen lässt. Die Auswirkungen des chemischen Zellarrestes auf die embryonalen Rattenkardiomyozyten sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Arretierung der Zellen führte lediglich an Tag 15 der Kultivierung zu signifikant erniedrigten relativen p62 Proteinleveln. Es wurden in der Blebbistatin-Versuchsgruppe um $-0,36 \pm 0,11$ erniedrigte Level gemessen und in der KCl-Versuchsgruppe wurden um $-0,33 \pm 0,11$ erniedrigte Proteinlevel gemessen. Zu früheren Zeitpunkten der Kultivierung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den p62-Proteinleveln der arretierten Versuchsgruppen und den Kontrollzellen festgestellt werden.

Die Abbildung 11 zeigt zudem den Einfluss der Kardioplegie und der Arretierung mit Blebbistatin auf die relativen Proteinlevel von LC3-II. Es stellten sich in unserer Untersuchung keine Unterschiede zwischen den arretierten Zellen und den Kontrollzellen über die Dauer der Kultivierung dar. Lediglich die KCl-arretierten Zellen wiesen an den Tagen 11 und 15 tendenziell erhöhte Proteinlevel an LC3-II auf.

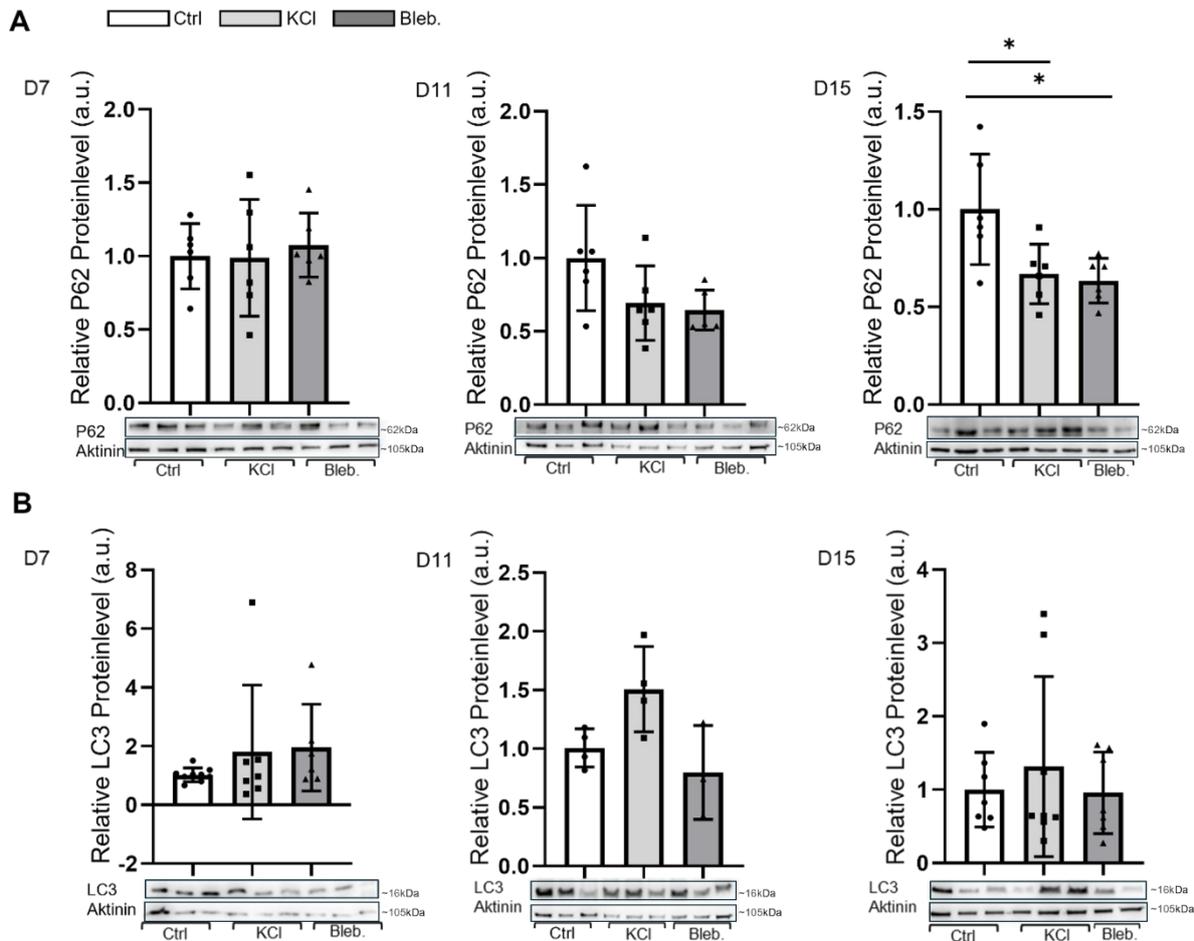


Abb.11: Abbildung der autophagosomalen Markerproteine P62 und LC3II in den arretierten Versuchszellen und den Kontrollzellen. (A) Darstellung der relativen Proteinlevel des Shuttleproteins P62 (n=6). Die Daten der Graphen aus (A) wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt (B) Darstellung der relativen Proteinlevel des Autophagie-Membranproteins LC3II (n=3-9). Die Diagramme zeigen auf die Kontrollen normierte Mittelwerte \pm Standardabweichungen an den Tagen 7, 11 und 15 der Kultivierung. Die darunter angefügten Blotbilder zeigen exemplarisch die Proteinbanden für P62, LC3 und Aktinin. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

3.7 Reduzierte AMPK-Phosphorylierung in mechanisch arretierten Zellen

Im Folgenden sollen die Proteine mTOR und AMPK untersucht werden. Die relativen Proteinlevel von mTOR und AMPK wurden als Marker für die Aktivität der Autophagie in den arretierten Versuchszellen, sowie den Kontrollzellen gemessen und sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Arretierung der embryonalen Rattenkardiomyozyten führte über die Zeit der Kultivierung hinweg zu keiner Abweichung der relativen MTOR-Proteinlevel gegenüber der MTOR-Phosphorylierung der Kontrollzellen. In der

Tendenz zeigten sich dann erhöhte relative Proteinlevel für mTOR in den arretierten Zellen beider Versuchsgruppen an Tag 15 der Kultivierung. Für AMPK zeigte sich an den Tagen 7 und 11 eine Diskrepanz zwischen den Versuchszellen und den Kontrollzellen. Die relativen Proteinlevel waren hier mit $-0,59 \pm 0,22$ in den Blebbistatin-Versuchszellen an Tag 7 gegenüber den Kontrollzellen signifikant erniedrigt, sowie mit $-0,29 \pm 0,11$ in den KCI-Versuchszellen an Tag 11.

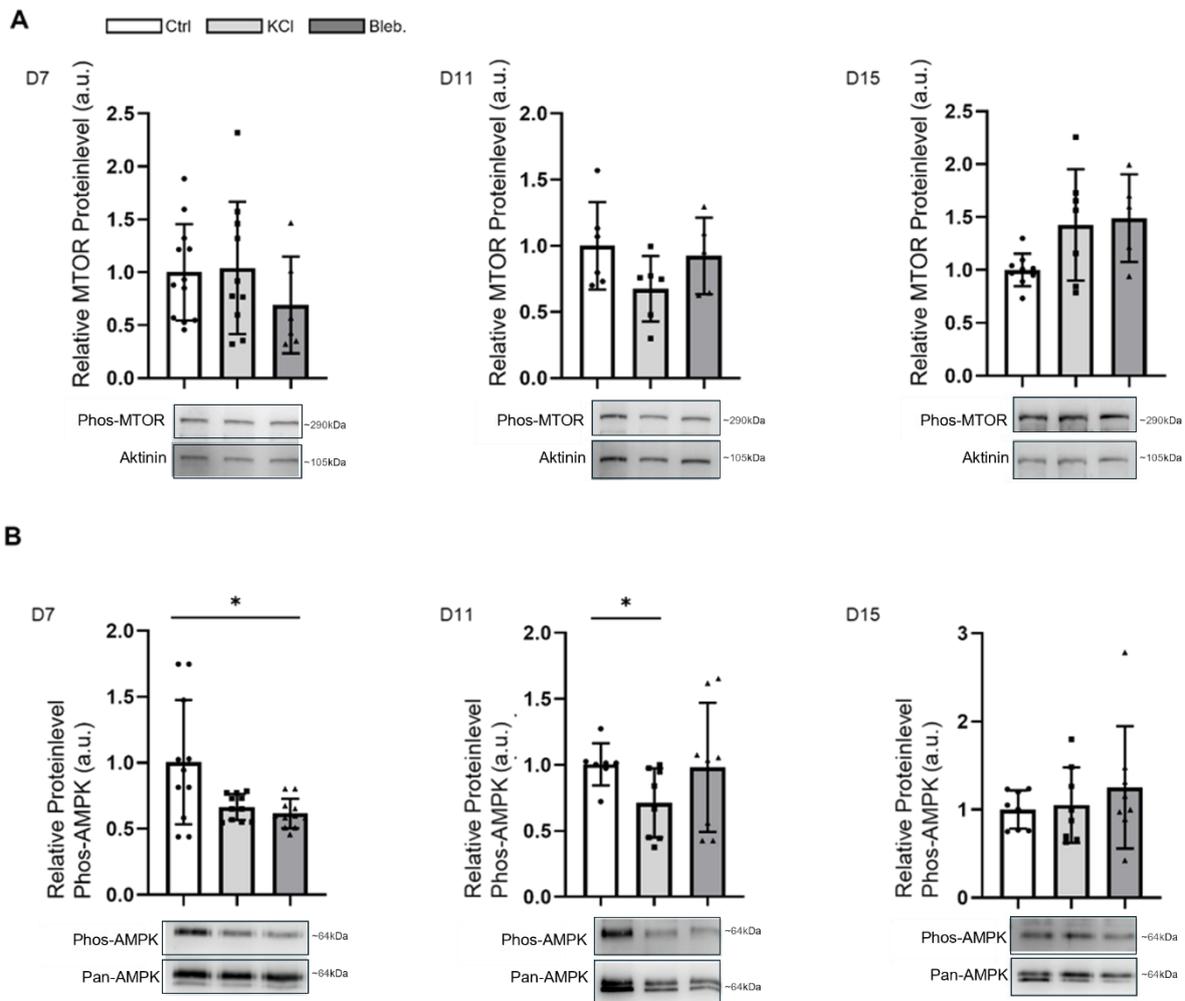


Abb.12: Abbildung der Proteine MTOR und AMPK in den arretierten Versuchszellen und den Kontrollzellen. (A) Darstellung der relativen mTOR-Phosphorylierung (n=5 bis n=12). (B) Darstellung der relativen Proteinlevel an phosphoryliertem AMPK bezogen auf die totalen AMPK-Proteinlevel (n=7 bis n=11). Die Daten der Graphen aus (A) wurden freundlicherweise von Dr. Sebastian Kötter zur Verfügung gestellt. Die Diagramme zeigen auf die Kontrollen normierten Mittelwerte \pm Standardabweichungen an den Tagen 7, 11 und 15 der Kultivierung. Die darunter angefügten Blotbilder zeigen exemplarisch die Proteinbanden für mTOR, Phos-AMPK und Pan-AMPK und Aktinin. Statistische Signifikanzen wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen und durch Asterisken markiert.

3.8 Ein sequenzieller Abbau Titins ist in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht eindeutig festzustellen

Unter der Annahme, dass die Degradation Titins durch die Behandlung induziert wird, sollte die Immunfluoreszenz-Färbung der Versuchszellen und der Kontrollzellen Aufschluss über die Strukturveränderungen des Titinfilaments im Degradationsprozess und über einen etwaigen sequenziellen Abbau des Proteins geben. Das ein sequenzieller Abbau Titins erfolgt, ist aufgrund der gewaltigen Größe des Proteins vorstellbar. Wir visualisierten mithilfe domänenspezifischer Antikörper drei verschiedene Regionen Titins, und zwar die Region der Z-Scheibe (Z1Z2-Domäne), die M-Bande (M8-M10-Domäne) und den Bereich der PEVK-Domäne in den Kontrollzellen und arretierten Versuchszellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. So konnten wir beobachten, dass die Region der Z-Scheibe zu einem früheren Zeitpunkt Merkmale der Degradation, wie eine weniger geordnete Querstreifung und weniger gleichmäßige Anfärbbarkeit der Domäne aufweist als die zwei anderen untersuchten Regionen des Proteins. Es zeigten sich diese Veränderungen in der Z-Scheiben-Domäne bereits an Tag 7 der Kultivierung, während sie in den anderen Domänen erst ab Tag 11 zunehmend beobachtet werden konnten. Eine korrekte Aussage dazu lässt sich jedoch aus den hier erhobenen Ergebnissen nicht treffen, da wir trotz hoher n-Zahlen keinen konsistent aufgetretenen sichtbaren Verlust der Sarkomerstrukturen in den Versuchsansätzen feststellen konnten. Insgesamt zeigten sich die Zellen über den Kultivierungszeitraum noch sehr vital. Exemplarisch sind in der folgenden Abbildung die unterschiedlichen Titinepitope an den Kultivierungstagen 7, 11 und 15 dargestellt.

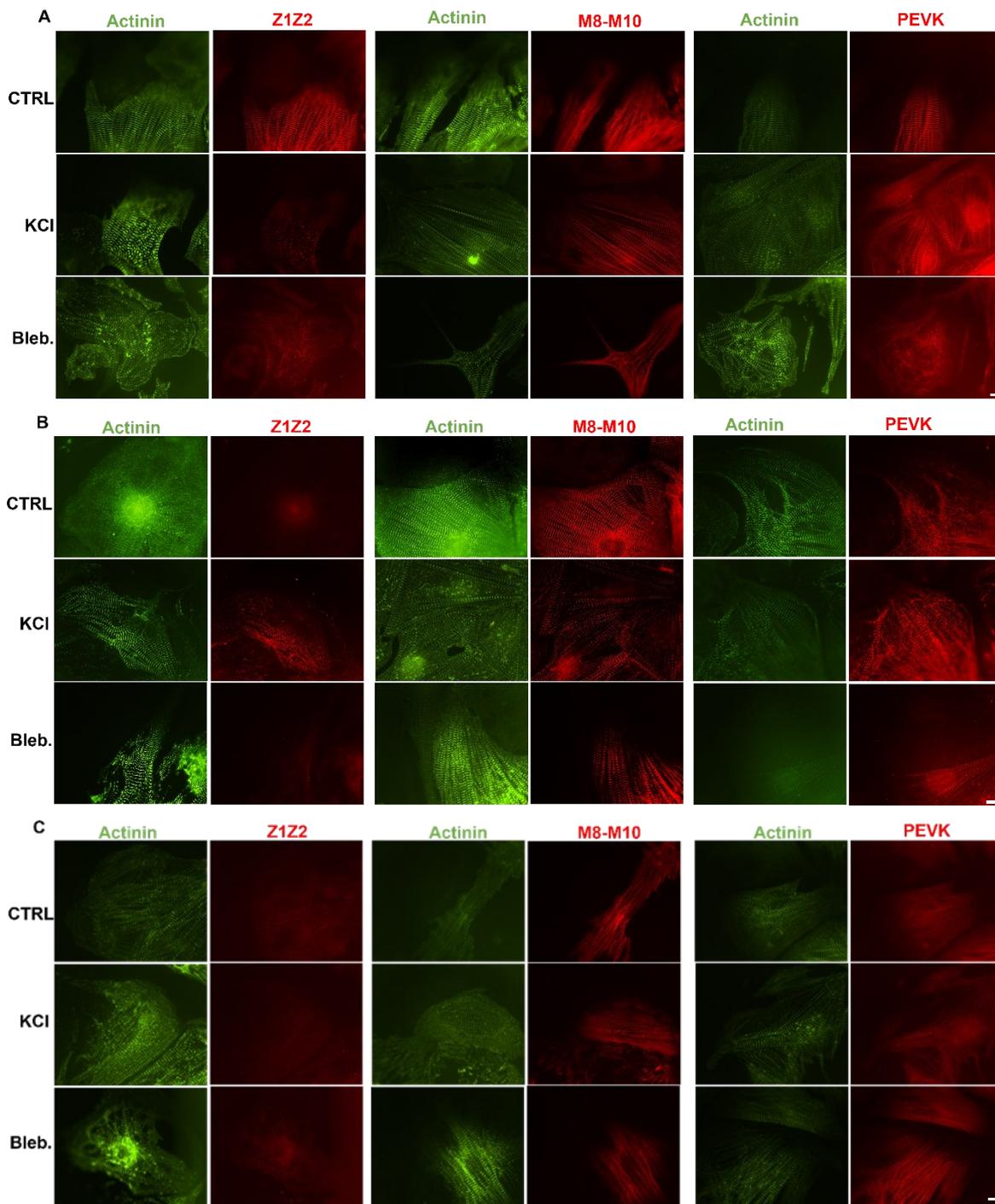


Abb. 13: Auswirkungen des ab Tag 1 induzierten Zellarrestes auf die verschiedenen Domänen des Sarkomerproteins Titin in embryonalen Rattenkardiomyozyten.(A) Färbungen der Domänen Z1Z2, M8-M10 und PEVK innerhalb des Proteins Titin an Tag 7 der Kultivierung (n=8) (B) Färbungen der genannten Titin Domänen an Tag 11 der Kultivierung und (C) zeigt die Färbungen der Titin-Domänen an Tag 15 der Kultivierung (n=7) . Neben den Titin-Domänen wurde Aktinin als weiterer Sarkomermarker angefärbt. Gezeigt sind jeweils Kontrollzellen und Versuchszellen beider arretierter Versuchsgruppen. Balkenlänge: 10 µm.

4 Diskussion

4.1 Mechanische Arretierung induziert die Titin-Degradation

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen eines chemisch induzierten Arrests der kontraktiven Zellaktivität, induziert durch Hyperkaliämie beziehungsweise durch die Inhibition des Myosins 2 mittels Blebbistatin auf die Auswirkung bezüglich der Degradation des Titins untersucht. Es wurde die Hypothese geprüft, nach welcher die durch den Zellarrest erreichte Nicht-Nutzung der Sarkomere zu einem beschleunigten Abbau der Sarkomerproteine, respektive Titins, führt und welche Rolle die zellulären Protein-Qualitäts-Kontrollsysteme bei dem Abbau des Titinfilaments spielen. Es wurde weiter analysiert, wie sich der Arrest der Zellkontraktion auf die Isoformen-Komposition Titins auswirkt. In dieser Arbeit wurden Zellkulturen embryonaler Rattenkardiomyozyten genutzt. Diese kontrahieren spontan, synchronisiert und hochfrequent. Um den Zellarrest in den embryonalen Rattenkardiomyozyten herbeizuführen, bedienten wir uns einerseits der etablierten Methode der Kardioplegie und wählten andererseits den Myosin-II Inhibitor Blebbistatin. Der zugrunde liegende Mechanismus der chemischen Arretierung durch Kardioplegie wird in Abschnitt 1.5 beschrieben. Kardioplegie durch Hyperkaliämie ist jedoch kein ideales Mittel zur Zellprotektion während kardiochirurgischer Eingriffe, da neben den beschriebenen physiologischen Effekten auch weitere unerwünschten Effekte auftreten. Aus diesem Grund, und um die Ergebnisse unserer Experimente sicherer auf die außer Kraft gesetzte Muskelkontraktion zurückführen zu können, wurde in dieser Arbeit neben der dafür bereits etablierten Methode der Kardioplegie, die Arretierung in einem alternativen Ansatz durch die Anwesenheit des Myosin-II Inhibitors Blebbistatin im Nährmedium der Zellkultur herbeigeführt. Erwartungsgemäß sollte dieser zweite Ansatz weniger zelluläre Mechanismen neben der Muskelkontraktion beeinflussen als die Arretierung mittels KCl. Uns interessierte dabei auch, ob der Effekt der beiden unterschiedlichen Ansätze der Arretierung auf den Abbau Titins verschieden stark ausfällt und ob die Systeme der Proteinqualitätskontrolle dadurch auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden.

Es besteht unter Standardbedingungen ein dynamisches Verhältnis zwischen der Synthese und der Degradation Titins und damit ein konstanter Turnover des Filaments [75]. Nicht-Nutzung sollte durch die Arretierung der Kontraktion und damit des

Sarkomers erreicht werden. Nach unserer Hypothese sollte sich damit in den ERC das Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation zugunsten der Degradation Titins verschieben. In unseren Experimenten zeigten sich in den arretierten Zellen beider Versuchsgruppen ab Tag 7 des Kultivierungszeitraums signifikant erhöhte T2/T1 Verhältnisse gegenüber den kontrahierenden Kontrollzellen. Es konnten zusätzlich signifikant reduzierte Titin/Myosin Verhältnisse an den Tagen 7 und 15 der Kultivierung in beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für einen verstärkten Abbau Titins in arretierten Zellen, im Vergleich zum Abbau anderer Muskelproteine wie Myosin. In vorherigen Arbeiten wurden bereits, mit unseren Resultaten konsistente Ergebnisse beobachtet. So konnte in einer Arbeit, in der vergleichbare Experimente durchgeführt wurden wie in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls signifikant erhöhte T2/T1 Verhältnisse in durch Kardioplegie arretierten ERC über einen Kultivierungszeitraum von 9 Tagen, sowie verringerte T1/Myosin Verhältnisse ab Tag 4 der Kultivierung beobachtet werden. Es wurde allerdings ein kürzer Kultivierungszeitraum von insgesamt 9 Tagen beobachtet und die mechanische Arretierung der Versuchszellen erfolgte lediglich in einem Ansatz mit KCl. In der erwähnten Arbeit wurde zusätzlich die T1/Aktin-Ratio bestimmt, welche ebenfalls in den kardioplegisch arretierten Zellen ab dem 4. Tag der Kultivierung signifikant verringert war [43]. Weiterhin existieren Untersuchungen, nach welchen die Arretierung durch operative Denervation ebenfalls zur vermehrten Degradation des Titinfilaments führte- allerdings in Skelettmuskulatur [76-78]. Es konnte hier ein erhöhter Gehalt der Titin-Degradationsbande T2, sowie eine Reduktion des Gesamttitins (T1) festgestellt werden [78]. In der genannten Arbeit wiesen die Versuchszellen erniedrigte Titin/Myosin- und Titin/Aktin-Ratios auf; das Aktin/Myosin-Verhältnis blieb dabei unverändert. Es wurde hier demnach ebenfalls eine schnellere und exzessivere Degradation des Titinfilaments im Vergleich zu anderen Sarkomerbestandteilen beschrieben [76, 77]. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die chemische Arretierung von Myozyten unseren Erwartungen entsprechend zu einem erhöhten Turnover des Titinfilaments führt. Die am Abbauprozess beteiligten Degradationsmechanismen werden im Folgenden untersucht.

4.2 Der Isoformenswitch in embryonalen Rattenkardiomyozyten wird durch die Kontraktionsinhibition beschleunigt

Es kann eine Re-Expression der embryonalen N2BA-Isoformen in Anpassung an eine reduzierte kontraktile Funktion in pathologisch veränderten Herzen beobachtet werden. So scheint ein Kompensationsmechanismus in dem Wiedereinbau dieser elastischen Titin-Isoform zu bestehen [21, 79-81], der beispielsweise in Patienten mit Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit und Aortenklappenstenose beobachtet werden konnte. In dem Wissen über diese physiologischen Anpassungsvorgänge innerhalb des Sarkomers und im Besonderen innerhalb Titins, soll neben der Degradation des Titinfilaments im folgenden Abschnitt der Einfluss der mechanischen Arretierung der Rattenkardiomyozyten auf den Isoformen-Switch im Zuge der embryonalen Entwicklung untersucht werden. Es zeigten sich hierbei tendenziell erhöhte N2B-Level in den Versuchszellen gegenüber den kontraktile Kontrollzellen ab Tag 7 der Kultivierung. Eine signifikante Erhöhung des N2B-Anteils ist in den durch Kardioplegie arretierten Zellen an Tag 15 festgestellt worden. Der erhöhte N2B-Gehalt impliziert einen beschleunigten Titinisoformen-Switch in den kardioplegisch arretierten Zellen. Die Inaktivierung des Sarkomers durch Blebbistatin zeigt an Tag 7 und Tag 11 einen tendenziellen Anstieg des N2B-Gehalts. Neben dem N2B-Gehalt untersuchten wir ebenfalls die Proteinlevel des Spleißingfaktors RBM20 in den ERC. Interessanterweise traten in den durch Blebbistatin arretierten Versuchszellen ab Tag 7 der Kultivierung signifikant erhöhte RBM20-Level auf, was ein Hinweis auf eine vermehrte Spleißaktivität sein könnte. In den kardioplegisch arretierten Zellen zeigte sich ein Anstieg des RBM20-Proteinlevels hingegen nicht. Untersuchungen anderer Einflüsse auf den Isoformen-Switch zeigten bereits, dass dieser Mechanismus auf verschiedene Weisen modulierbar ist.

Versuchstiere in einem Botuliumtoxin-induzierten Atrophiemodell zeigten neben einer vermehrten Titin-Degradation auch eine vermehrte Genexpression des Titinfilaments [82]. Sichtbar wurde dies durch die Beobachtung erhöhter mRNA-Level als Zeichen vermehrter Translation des Titin-Gens. Durch vermehrte Expression der N2B-Form könnte hierbei der Isoformen-Switch beschleunigt worden sein. [80]. Es könnte weiterhin vermehrt N2B aus einem mobilen Titin-Pool rekrutiert werden, welcher nicht mit dem Sarkomer assoziiert ist und 10-15% der Gesamtmenge an Titin ausmacht [75].

Auch hier trägt der verstärkte Einbau der N2B-Isoform möglicherweise zu einem akzelerierten *Switch* bei. In einem anderen Versuch führte die Applikation der anabolen Stoffwechselhormone T3 und Insulin in ERC zur vermehrten Expression der adulten Titinisoform N2B und damit zu einem beschleunigten perinatalen Isoformenswitch [79, 80]. In Adaptation an das hormon-induzierte hyperdynamische Herzwachstum kam es hierbei zu einer Regulation des Isoformen-Verhältnisses durch externe Reize. Es wurde bei den T3- und Insulin-behandelten ERC eine Aktivierung der PI3K/Akt-Signaltransduktion beobachtet, welche vermutlich mTOR aktiviert [80]. Auch erhöhte Level des Spleiß-Faktors RBM20 wurden in den T3-Versuchszellen gemessen [83], was vermuten lässt, dass eine Insulin/PI3K-getriggerte mTOR-Aktivität zu der vermehrten Expression von RBM20 und konsekutiv zu der Synthese der adulten Isoform N2B führt.

Es lässt sich schlussfolgern, dass der beschleunigte Titinisoformen-Switch in den kardioplegisch arretierten Kardiomyozyten auf mehreren Ursachen basieren könnte. Die fehlenden Kontraktionen könnten den Ein- und Abbau des Titinfilaments erleichtern. Weiterhin könnten der Einfluss der Kardioplegie auf die zelluläre Signaltransduktion die Ursache sein und es könnte einen reaktiv verstärkten N2B-Einbau in Folge verstärkter Degradation der N2BA-Bande geben, der den Isoform-Switch beschleunigt. Da in unserer Arbeit bereits der verstärkte Abbau Titins nachgewiesen wurde, wird diese Hypothese am ehesten davon gestützt.

4.3 Die Titin-Ubiquitinierung ist in chemisch arretierten Versuchszellen erhöht

Bei muskulärer Inaktivität kommt es in Myozyten durch Degradation und verringerter Proteinbiosynthese zu Atrophie. Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Autophagie sind hierbei neben den Calpainen die führenden Abbaumechanismen- [84], welche auch an der Degradation Titins beteiligt sind. Die Untersuchung des Ubiquitinierungsstatus des Titinfilaments in den chemisch arretierten ERC sollte Aufschluss über die Aktivität intrazellulärer Degradationsprozesse des UPS und der Autophagie geben und wird im Folgenden diskutiert.

Zunächst müssen die zellulären Substrate, durch Polyubiquitinierung für den Abbau markiert werden um anschließend den Degradationssystemen zugeführt- und konsekutiv abgebaut werden zu können. Die Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle

untereinander ist hierbei richtungsweisend für den weiteren Abbau der Substrate. So führt sie dazu, dass polyubiquitinierte Substrate entweder der Degradation durch das Ubiquitin-Proteasomen-System oder der Degradation durch Autophagie zugeführt werden [85] [36].

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass in den durch Kardioplegie arretierten Zellen, von Tag 7 bis Tag 11 der Kultivierung signifikant erhöhte Titin-Ubiquitinierungslevel gegenüber den Kontrollzellen auftraten. Für die Versuchsgruppe, der mittels Blebbistatin arretierten Zellen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Titin-Ubiquitinierung an Tag 7, sowie weiterhin tendenziell erhöhte Werte an Tag 11. Ursächlich für das Auftreten höherer Level an ubiquitinierten Substraten könnte die Inhibition nachfolgender Schritte innerhalb der Degradationsprozesse sein, was zu einer Akkumulation der bereits ubiquitinierten Substrate führen würde. So konnte in einer vorherigen Arbeit beispielsweise gezeigt werden, dass die Inhibition der Autophagie in ERC mit entweder Chloroquin oder Bafilomycin zu einem Anstieg ubiquitinierten Gesamt-Titins, sowie spezifisch K63-ubiquitiniertes Proteine führte [86]. Für diesen Erklärungsansatz wären Zeichen verringerter Aktivität der Degradationssysteme richtungsweisend, wie beispielsweise verringerte Aktivitäten in den Aktivitätsmessungen proteasomaler Enzyme als Hinweis auf eine verringerte Aktivität des UPS, die sich in der vorliegenden Arbeit in der Tat zeigten. Ein Beispiel aus einer anderen Arbeit hierfür wäre die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine als Folge stark reduzierter proteasomaler Aktivität in Kardiomyozyten unter ischämischen Bedingungen bei Myokardinfarkt [90]. Es wurde in der genannten Arbeit die Trypsin-ähnliche proteasomale Aktivität untersucht. Hinweise auf eine Inhibition der Autophagie, wie einen Anstieg der autophagosomalen Markerproteine p62 oder LC3-II konnten wir aus den Ergebnissen der Experimente in dieser Arbeit allerdings nicht erheben.

Eine alternative Erklärung für die erhöhten Ubiquitinlevel könnte eine gesteigerte Polyubiquitinierung aufgrund einer gesteigerten E3-Ligaseaktivität sein. Über Bindungsstellen für E3-Ligasen, welche die finale Reaktion innerhalb der Poly-Ubiquitinierung von Substraten katalysieren, interagiert Titin mit Proteinen der Enzymaschinerie, die die ATP-abhängige Polyubiquitinierung der Substrate vermitteln. Es konnten bisher Bindestellen für MuRF-1 und MuRF-2 lokalisiert werden, und zwar für MuRF-1 im M-Bandenbereich Titins [7, 87, 88], sowie im Bereich der Titin-

Kinase-Domäne, die ebenfalls im M-Bandenbereich Titins zu finden ist und bei mechanischer Belastung einen Komplex mit dem Zinkfingerprotein nbr1, dem Ubiquitin-assoziierten Adapterprotein p62, sowie der E3-Ligase MuRF2 eingehen kann [7, 89, 90]. Die Bindestellen von drei weiteren E3-Ligasen MuRF-3, CHIP und Fbx32 wurden ebenfalls in einer vorherigen Arbeit identifiziert [86]. Es interagieren demnach unterschiedliche Titinregionen mit verschiedenen E3-Ligasen, was ein Hinweis darauf sein kann, welchen Teil Titins sie ubiquitinieren. Statt dem erwarteten gesteigerten Vorkommen an E3-Ligasen, beobachteten wir in unseren Versuchen jedoch eine verringerte Proteinexpression der E3-Ligase Atrogin-1 an den Tagen 7, 11 und 15 in den arretierten Zellen. Hinsichtlich der Frage nach der Ursache der gesteigerten Ubiquitinierung können diese Ergebnisse eine Beteiligung der E3-Ligase Atrogin-1 zu den untersuchten Kultivierungszeitpunkten damit eher nicht zeigen. Es könnte jedoch eine vermehrte Ubiquitinierung durch alternative E3-Ligasen wie MuRF-1 (*muscle-ring-finger enzyme-1*), MuRF-2, MuRF-3, oder CHIP vorherrschen [86], weshalb die Hypothese einer gesteigerten Aktivität der Enzymmaschinerie der Ubiquitinierung durch unsere bisherigen Ergebnisse nicht verworfen werden sollte. Ob die von uns beobachtete und durch chemische Arretierung vermehrte, Titin-Ubiquitinierung auf eine erhöhte Aktivität von E3-Ligasen zurückzuführen ist, lässt sich aus dieser Arbeit schlussfolgernd für die E3-Ligase Atrogin-1 jedoch nicht bestätigen.

4.4 Zellulären Degradationssysteme sind an der Titindegradation beteiligt

4.4.1 Die autophagosomale Aktivität wird von der mechanischen Inaktivierung signifikant beeinflusst

Die These, nach welcher es durch Akkumulation der im ersten Schritt des Degradationsprozesses ubiquitinierten Substrate zur erhöhten Expression ubiquitinierten Titins führt, könnte eine über die Kapazitätsgrenzen der weiteren Abbauprozesse hinausgehende Ubiquitinierung als Ursache haben. Um die Aktivität der zellulären Abbausysteme zu untersuchen, wurden autophagosomale Markerproteine untersucht. Die Autophagie dient neben der Degradation fehlgefalteter Proteine und dysfunktionaler Organellen auch dem Sichern des zellulären Überlebens in Situationen des Energie- und Nährstoffmangels. Sowohl die Initiation als auch der Mechanismus der Autophagie selbst, werden durch Proteinkinasen gesteuert [91]. Um weitere Hinweise auf die Beteiligung der Autophagie an der Degradation Titins zu

finden, untersuchten wir daher die Proteinkinasen mTOR und AMPK, die an der Signalkaskade zur Anpassung der Zelle an die vorherrschenden Bedingungen beteiligt sind.

Zwischen den durch Hyperkaliämie arretierten Versuchszellen und den kontrahierenden Kontrollzellen zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den Proteinleveln der beiden autophagosomalen Markerproteine p62 und LC3-II lediglich für p62. Hier ließen sich an Tag 11 tendenziell erniedrigte- und an Tag 15 signifikant erniedrigte Proteinlevel in den arretierten Zellen feststellen. Die durch Blebbistatin arretierten Zellen wiesen verglichen mit den Kontrollzellen ebenfalls nur an Tag 15 der Zellkultur erniedrigte p62-Level, auf. Für LC3-II zeigte sich kein Unterschied zwischen der ermittelten relativen Proteinexpression der Versuchs- und Kontrollzellen. Die Phosphorylierungslevel an AMPK in den durch Blebbistatin arretierten Versuchszellen an den Tagen 7 und 11 zeigte sich signifikant erniedrigt. Für die Proteinkinase mTOR zeigten sich dagegen nur tendenziell erhöhte Phosphorylierungslevel in den Versuchszellen an Tag 15 der Kultivierung.

Es konnte in vorherigen Arbeiten ein Anstieg der p62-Proteinlevel sowohl bei Autophagie-, als auch Proteasominhibition gezeigt werden [86]. Im Zuge der Autophagie wird p62 degradiert, sodass verringerte Proteinlevel an p62 eine erhöhte autophagosomale Aktivität implizieren würden [92]. In einer vorherigen Arbeit konnte mit signifikant verringerten p62-Proteinleveln in den hyperkaliämisch arretierten Zellen ab Tag 7 der Zellkultur unter vergleichbaren Versuchsbedingungen eine Veränderung in diese Richtung gezeigt werden, die wir in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduzieren konnten [43]. Die LC3-II-Proteinlevel blieben dagegen auch in der eben zitierten Arbeit, konsistent mit unseren Resultaten, unverändert. Zusammengenommen könnten die analysierten Proteinlevel der autophagosomalen Marker p62 und LC3-II, zumindest zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung für eine erhöhte Aktivität der Autophagie sprechen. Allerdings müssen die Ergebnisse in der Zusammenschau mit weiteren Ergebnissen aus dieser Arbeit eingeordnet werden und deuten unter Einbezug der erhöhten Titinubiquitinierung und der AMPK-Expression eher nicht auf eine gesteigerte autophagosomale Aktivität hin.

Schlussendlich gehen wir aufgrund unserer Resultate von einer verringerten Aktivität der Autophagie in den ERC unter chemischer Arretierung aus. Hinweise dafür sind eine erniedrigte AMPK Phosphorylierung, und die Akkumulation ubiquitinierten

Titins. Es könnte weiterhin zu einer Änderung der autophagosomalen Aktivität im zeitlichen Verlauf kommen- mit einer Aktivitätssteigerung um den 15. Tag der Kultivierung. Die Verringerung der p62-Proteinexpression könnte als Hinweis für eine dann einsetzende Aktivitätssteigerung der Autophagie gewertet werden.

4.4.2 Die proteasomale Aktivität wird von der mechanischen Inaktivierung signifikant beeinflusst

In den durch Kardioplegie arretierten Versuchszellen zeigten sich bei uns im Laufe der Zellkultivierung signifikant erhöhte Proteinexpression an PSMA2. Auch in den Versuchszellen, die mit Hilfe von Blebbistatin arretiert worden sind, zeigte sich ein Anstieg der PSMA2-Proteinlevel, obgleich hier dieser Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung einsetzt. Innerhalb unseres Untersuchungszeitraums zeigte sich in den arretierten Versuchszellen außerdem erniedrigte Aktivitäten des Chymotrypsins ab Tag 11 in den durch KCl arretierten Zellen und ab Tag 15 in den durch Blebbistatin arretierten Zellen. Für Trypsin zeigte sich in den arretierten Zellen an Tag 15 eine erniedrigte Enzymaktivität.

Die Ergebnisse deuten auf einen quantitativen Zuwachs an Proteasomen unter mechanischer Inaktivität in den Kardiomyozyten hin. Prinzipiell könnte die größere Anzahl an Proteasomen auch mit einer gesteigerten proteasomalen Aktivität einhergehen, was eine gesteigerte Degradation polyubiquitinerter Substrate im 26S-Proteasom nach sich ziehen würde. Die in den Aktivitätsmessungen beobachtete reduzierte proteasomale Aktivität deutet jedoch eher darauf hin, dass die reduzierte Aktivität kompensatorisch zu einer verstärkten Expression an Proteasomen führt. Zusammen mit der vorher beschriebenen vermehrten Ubiquitinierung Titins, halten wir die Interpretation dieser Resultate als ein Hinweis auf eine verringerte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems für wahrscheinlich.

4.5 Ein sequenzieller Abbau der Domänen Titins konnte in Immunfluoreszenz gefärbten Zellen nicht gezeigt werden

Die gewaltige Größe Titins und seine feste Verankerung innerhalb des Sarkomers machen die Degradation dieses Proteins zu einer anspruchsvollen Aufgabe für die Zelle. Wir stellten uns daher die Frage, ob dieser Prozess simultan für alle Domänen geschieht, oder ein sequenzieller Abbau verschiedener Domänen Titins erfolgt.

Um den Abbauprozess innerhalb der drei Titin-Domänen der Z-Scheibe, des M-Bandes und des I-Bandes sichtbar zu machen, nutzten wir Immunfluoreszenz und Antikörper gegen die innerhalb der genannten Domänen liegenden Sequenzen Z1Z2, M8-M10 und PEVK. Es konnte so über den Zeitraum der Kultivierung in den Versuchs- und Kontrollzellen der Abbau Titins visualisierbar gemacht werden. Hierbei zeigten sich degenerationsbedingte Veränderungen in den arretierten Versuchszellen insgesamt etwas früher. Diese Beobachtung hatten wir erwartet, da wie in Abschnitt 4.1. beschrieben, in diesen Zellen der Titinabbau durch Nicht-Nutzung des Sarkomers induziert worden ist und daher schneller eintreten sollte. Bei der Analyse innerhalb der beiden Versuchsgruppen und innerhalb der Kontrollgruppe konnten wir geringe Unterschiede der Degeneration zwischen den drei visualisierten Titin-Domänen finden. Die Z-Scheibe schien hierbei in einem Teil der Färbungen zu einem früheren Zeitpunkt Abbauprozessen ausgesetzt zu sein, als die beiden anderen Domänen. Jedoch konnte in einem anderen Teil der analysierten Bilder kein eindeutiger Unterschied im Beginn erkennbarer degradationsbedingter Veränderungen zwischen den verschiedenen Titindomänen ausgemacht werden, weshalb aus den hier erfolgten Experimenten keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden kann, ob Titin tatsächlich sequentiell abgebaut wird. Es konnte in einer Arbeit mit adulten Rattenkardiomyozyten hingegen ein sequentieller Abbau Titins gezeigt werden- mit der Region der Z-Scheibe als führende Domäne [86]. Hier konnte weiterhin die vollständige Dedifferenzierung- und der anschließende Wiederaufbau der Sarkomerstruktur in der Kultur gezeigt werden. Hinweise, die für einen vergleichbaren Prozess in der Kultur embryonaler Rattenkardiomyozyten sprechen, konnten wir nicht feststellen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Inaktivierung der kontraktile Aktivität durch die Arretierung der embryonalen Rattenkardiomyozyten resultierte in einer gesteigerten Degradation der sarkomerischen Strukturen, sowie in einem beschleunigten Isoformen-*switch* der embryonalen- zu den adulten Titinisoformen. Der beobachtete beschleunigte Isoformen-*switch* könnte Resultat der durch die Arretierung beschleunigten Degradation Titins sein. So würde die embryonale Titin-Isoform N2BA schneller abgebaut werden und konsekutiv der Einbau der N2B-Bande zügiger erfolgen. Es könnte auch eine vermehrte Expression N2Bs die Ursache für den Isoformen-*switch* sein- wofür der Anstieg des Spleißfaktors RMB20 sprechen würde. Der Einfluss der

Arretierung auf den Abbau des Titinfilaments war größer als der Abbau anderer Sarkomerproteinen wie zum Beispiel Myosin. Dies zeigte sich in einer bevorzugten Degradation Titins vor Myosin. Der nachgewiesene Anstieg der Titin-Ubiquitinierung kann am ehesten als eine die Kapazität Degradationsmechanismen übersteigende Protein-Ubiquitinierung gedeutet werden. Dies könnte in Zusammenschau mit verringerter Phosphorylierung der AMPK auf eine verringerte Aktivität des zellulären Degradationsmechanismus der Autophagie hinweisen. Während erhöhte Expression des Proteins PSMA2 für eine gesteigerte Zahl an Proteasomen in arretierten Zellen sprechen und auf einen vermehrten Abbau Titins durch das UPS hinweisen könnte, zeigte die Proteasomenaktivitätsmessung allerdings eine Verringerung der proteasomalen Aktivitäten.

Unsere Hypothese, nach welcher die Degradation Titins einem sequenziellen Abbau folgt, wird durch die hier diskutierte Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht eindeutig gestützt. Hier zeichnet sich ein bevorzugter Abbau der Z-Scheibe lediglich in einem Teil der angefertigten Bilder ab. Weitere Bilder zeigen diesen Effekt nicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern somit in Teilen die in vorherigen Untersuchungen gezeigten Erkenntnisse hinsichtlich des komplexen Ab- und Umbaus des Titinfilaments in Kardiomyozyten und liefern darüber hinaus neue Erkenntnisse. Wir konnten erstmals über einen Kultivierungszeitraum von 15 Tagen die Induktion der Titindegredation durch mechanische Inaktivierung nachweisen. Die mechanische Arretierung der Kardiomyozyten erreichten wir, neben KCl, mit Blebbistatin und konnten somit eine weitere Methode zur Induktion mechanischer Arretierung embryonaler Rattenkardiomyozyten etablieren. Wir stellten eine gesteigerte Expression polyubiquitinerter Proteine bei reduzierter proteasomaler Enzymaktivität und AMPK-Phosphorylierung fest und werten diese Ergebnisse als Hinweise für eine verringerte Aktivität der zellulären Abbausysteme Autophagie und Ubiquitin-Proteasomen-System. Entgegen unserer Vermutung zeigte sich kein eindeutiger sequenzieller Abbau in den mikroskopisch untersuchten Immunfluoreszenz Bildern. Angesichts der Tatsache, dass Titin in der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten wie Myasthenia Gravis oder aber bei dem Remodelling nach Myokardinfarkt eine bedeutende Rolle spielt, tragen Untersuchungen zu den molekularen Vorgängen im Zuge des Titinstoffwechsels zu dem Verständnis der

genauen pathologischen Vorgänge bei und können hinsichtlich der Erforschung möglicher Targets für die pharmakologische Behandlung hilfreich sein. Unsere Erkenntnisse helfen damit dem Verständnis der Abbauvorgänge dieses wichtigen Herzmuskelproteins näher zu kommen.

Literaturverzeichnis

1. Pettinato, A.M., F.A. Ladha, and J.T. Hinson, *The Cardiac Sarcomere and Cell Cycle*. Curr Cardiol Rep, 2022. **24**(6): p. 623-630.
2. Henderson, C.A., et al., *Overview of the Muscle Cytoskeleton*. Compr Physiol, 2017. **7**(3): p. 891-944.
3. Boateng, S.Y. and P.H. Goldspink, *Assembly and maintenance of the sarcomere night and day*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 667-75.
4. Wang, Z., et al., *The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle*. Cell, 2021. **184**(8): p. 2135-2150.e13.
5. Lange, S., E. Ehler, and M. Gautel, *From A to Z and back? Multicompartments proteins in the sarcomere*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(1): p. 11-8.
6. Mao, Z. and F. Nakamura, *Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
7. Kötter, S., C. Andresen, and M. Krüger, *Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control*. Biol Chem, 2014. **395**(11): p. 1341-52.
8. Tskhovrebova, L. and J. Trinick, *Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 612482.
9. Bang, M.L., et al., *The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system*. Circ Res, 2001. **89**(11): p. 1065-72.
10. Krüger, M. and W.A. Linke, *The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 9905-12.
11. Gautel, M. and K. Djinović-Carugo, *The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion*. J Exp Biol, 2016. **219**(Pt 2): p. 135-45.
12. Gautel, M., *Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing*. Pflugers Arch, 2011. **462**(1): p. 119-34.
13. Tskhovrebova, L. and J. Trinick, *Titin: properties and family relationships*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 679-89.
14. Witt, C.C., et al., *Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo*. Embo j, 2006. **25**(16): p. 3843-55.
15. Linke, W.A., et al., *Towards a molecular understanding of the elasticity of titin*. J Mol Biol, 1996. **261**(1): p. 62-71.
16. Guo, W., et al., *RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 766-73.
17. Li, S., et al., *Rbm20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2659-72.
18. Freiburg, A., et al., *Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity*. Circ Res, 2000. **86**(11): p. 1114-21.
19. Ottenheijm, C.A., et al., *Tuning passive mechanics through differential splicing of titin during skeletal muscle development*. Biophys J, 2009. **97**(8): p. 2277-86.
20. Opitz, C.A., et al., *Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 967-75.
21. Neagoe, C., et al., *Titin isoform switch in ischemic human heart disease*. Circulation, 2002. **106**(11): p. 1333-41.
22. Loescher, C.M., A.J. Hobbach, and W.A. Linke, *Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance*. Cardiovasc Res, 2022. **118**(14): p. 2903-2918.
23. Ehler, E. and M. Gautel, *The sarcomere and sarcomerogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2008. **642**: p. 1-14.
24. Wang, K., R. Ramirez-Mitchell, and D. Palter, *Titin is an extraordinarily long, flexible, and slender myofibrillar protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(12): p. 3685-9.
25. Yamasaki, R., et al., *Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1181-8.

26. Krüger, M., et al., *Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs*. *Circ Res*, 2009. **104**(1): p. 87-94.
27. Kötter, S., et al., *Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts*. *Cardiovasc Res*, 2013. **99**(4): p. 648-56.
28. Hidalgo, C.G., et al., *The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **54**: p. 90-7.
29. Raskin, A., et al., *A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(35): p. 29273-84.
30. Hamdani, N., et al., *Crucial role for Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation*. *Circ Res*, 2013. **112**(4): p. 664-74.
31. Krüger, M. and W.A. Linke, *Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(4): p. 490-8.
32. Hunter, J.J. and K.R. Chien, *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(17): p. 1276-83.
33. Kötter, S. and M. Krüger, *Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 914296.
34. Ciechanover, A. and Y.T. Kwon, *Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration*. *Front Neurosci*, 2017. **11**: p. 185.
35. Amm, I., T. Sommer, and D.H. Wolf, *Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(1): p. 182-96.
36. Kwon, Y.T. and A. Ciechanover, *The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy*. *Trends Biochem Sci*, 2017. **42**(11): p. 873-886.
37. Weissman, A.M., *Themes and variations on ubiquitylation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(3): p. 169-78.
38. Su, H. and X. Wang, *The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective*. *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(2): p. 253-62.
39. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 503-33.
40. Semple, C.A., *The comparative proteomics of ubiquitination in mouse*. *Genome Res*, 2003. **13**(6b): p. 1389-94.
41. Heinemeyer, W., et al., *The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 25200-9.
42. Nandi, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system*. *J Biosci*, 2006. **31**(1): p. 137-55.
43. Schalla, *Der Einfluss eines hyperkaliämischen Zellarrests auf die Degradation und den Isoform-Switch des Titinfilaments in embryonalen Rattenkardiomyozyten*, in *Dissertation*. 2021.
44. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. *J Pathol*, 2010. **221**(1): p. 3-12.
45. Portbury, A.L., M.S. Willis, and C. Patterson, *Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 9929-34.
46. Tannous, P., et al., *Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy*. *Circulation*, 2008. **117**(24): p. 3070-8.
47. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(3): p. 460-73.
48. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(7): p. 713-20.
49. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing*. *Embo j*, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
50. Shaid, S., et al., *Ubiquitination and selective autophagy*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(1): p. 21-30.

51. Bjørkøy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
52. Kirkin, V., et al., *A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates*. Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 505-16.
53. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
54. Chen, L., et al., *CAPN3: A muscle-specific calpain with an important role in the pathogenesis of diseases (Review)*. Int J Mol Med, 2021. **48**(5).
55. Ono, Y. and H. Sorimachi, *Calpains: an elaborate proteolytic system*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 224-36.
56. Ali, M.A., et al., *Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2010. **122**(20): p. 2039-47.
57. Kötter, S., et al., *Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins*. J Cell Biol, 2014. **204**(2): p. 187-202.
58. Müller, A.E., et al., *Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament stiffness*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 449.
59. Tian, L.F., et al., *MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 355-61.
60. Witt, S.H., et al., *MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination*. J Mol Biol, 2005. **350**(4): p. 713-22.
61. Lange, S., et al., *The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1599-603.
62. Fareed, M.U., et al., *Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogenin-1/MAFbx and MuRF1 expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(6): p. R1589-97.
63. Hayashi, C., et al., *Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14801-14.
64. Barta, J., et al., *Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium*. Mol Cell Biochem, 2005. **278**(1-2): p. 1-8.
65. Adewale, A.O. and Y.H. Ahn, *Titin N2A Domain and Its Interactions at the Sarcomere*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(14).
66. Linke, W.A. and N. Hamdani, *Gigantic business: titin properties and function through thick and thin*. Circ Res, 2014. **114**(6): p. 1052-68.
67. Zou, J., et al., *An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish*. Elife, 2015. **4**: p. e09406.
68. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
69. Squire, J., *Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
70. Hearse, D.J., D.A. Stewart, and M.V. Braimbridge, *Hypothermic arrest and potassium arrest: metabolic and myocardial protection during elective cardiac arrest*. Circ Res, 1975. **36**(4): p. 481-9.
71. Roman, B.I., S. Verhasselt, and C.V. Stevens, *Medicinal Chemistry and Use of Myosin II Inhibitor (S)-Blebbistatin and Its Derivatives*. J Med Chem, 2018. **61**(21): p. 9410-9428.
72. Fedorov, V.V., et al., *Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts*. Heart Rhythm, 2007. **4**(5): p. 619-26.
73. Wu, X., et al., *Physical mapping of four porcine 20S proteasome core complex genes (PSMA1, PSMA2, PSMA3 and PSMA6)*. Cytogenet Genome Res, 2005. **108**(4): p. 363.
74. Albornoz, N., et al., *Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(14).

75. Rudolph, F., et al., *Resolving titin's lifecycle and the spatial organization of protein turnover in mouse cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(50): p. 25126-25136.
76. Chen, S.P., et al., *Decline in titin content in rat skeletal muscle after denervation*. Muscle Nerve, 2005. **32**(6): p. 798-807.
77. Tournel, T., et al., *Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(4): p. 1465-72.
78. Ulanova, A., et al., *Effect of L-Arginine on Titin Expression in Rat Soleus Muscle After Hindlimb Unloading*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 1221.
79. Krüger, M., et al., *Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 439-47.
80. Krüger, M., et al., *Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 910-6.
81. Gotzmann, M., et al., *Alterations in Titin Properties and Myocardial Fibrosis Correlate With Clinical Phenotypes in Hemodynamic Subgroups of Severe Aortic Stenosis*. JACC Basic Transl Sci, 2018. **3**(3): p. 335-346.
82. Legerlotz, K., et al., *Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle*. Muscle Nerve, 2009. **39**(4): p. 472-9.
83. Zhu, C., et al., *RBM20 is an essential factor for thyroid hormone-regulated titin isoform transition*. J Mol Cell Biol, 2015. **7**(1): p. 88-90.
84. Lang, F., et al., *Dynamic changes in the mouse skeletal muscle proteome during denervation-induced atrophy*. Dis Model Mech, 2017. **10**(7): p. 881-896.
85. Xu, P., et al., *Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation*. Cell, 2009. **137**(1): p. 133-45.
86. Müller, E., et al., *E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 21134.
87. Centner, T., et al., *Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain*. J Mol Biol, 2001. **306**(4): p. 717-26.
88. Witt, S.H., et al., *MURF-1 and MURF-2 Target a Specific Subset of Myofibrillar Proteins Redundantly: Towards Understanding MURF-dependent Muscle Ubiquitination*. Journal of Molecular Biology, 2005. **350**(4): p. 713-722.
89. van der Pijl, R.J., H.L. Granzier, and C.A.C. Ottenheijm, *Diaphragm contractile weakness due to reduced mechanical loading: role of titin*. Am J Physiol Cell Physiol, 2019. **317**(2): p. C167-c176.
90. Lange, S., et al., *The Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover*. 2005. **308**(5728): p. 1599-1603.
91. Xiang, H., et al., *Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose*. Acta Pharm Sin B, 2020. **10**(4): p. 569-581.
92. Zhou, J., et al., *Titin truncations lead to impaired cardiomyocyte autophagy and mitochondrial function in vivo*. Hum Mol Genet, 2019. **28**(12): p. 1971-1981.

Danksagung

Ich möchte mich zum Ende dieser Arbeit herzlich bei Martina (Prof. Dr. Martina Krüger) und Sepp (Dr. Sebastian Kötter) für die hervorragende Betreuung meines Projektes in ihrem Institut bedanken. Ohne die umfängliche Einführung in die experimentelle Forschung und in die Arbeit im Labor, sowie die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an die Mitglieder des Prüfungskomitees der Medizinischen Fakultät für die Begutachtung meiner Dissertation. Ein besonderer Dank geht an Sepp, der mich während des gesamten Prozesses unterstützt hat, vielen Fragen mit Geduld beantworten konnte und mich ermutigt hat weiterzumachen, wenn ich dachte ich schaffe es nicht. Auch bei Sabine möchte ich mich bedanken, denn sie hat mir den Einstieg in die Laborarbeit ermöglicht und mir die wichtigsten Dinge, insbesondere zu Beginn, beigebracht. Weiterhin möchte ich mich bei Katharina Voigt bedanken, die mir während der Zeit im Labor stets hilfsbereit zur Seite stand und stets versucht hat mit Tipps zu geben und meine Fragen zu beantworten. Mir wird darüber hinaus die fröhliche Zusammenarbeit mit den anderen Doktoranden in Erinnerung bleiben, sowie die aufregende Reise nach Kopenhagen und die dortige Teilnahme an dem Kongress „Europhysiology 2022“. Außerdem war das Durchstehen der Hochzeit der Covid-Pandemie mit Maske und Abstand im Labor sicher etwas weniger einsam, als zu der Zeit online weiter zu studieren.