

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

Titinmodifikationen durch simulierte Ischämie und Reperfusion in adulten Rattenkardiomyozyten

Dissertation

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

vorgelegt von
Johanna Köster
2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzkrankheit, zählen weiterhin zu den führenden Todesursachen weltweit. Der akute Myokardinfarkt stellt dabei aufgrund der damit verbundenen Morbidität und Mortalität eine der schwerwiegendsten Manifestationen dar. Ein detailliertes Verständnis der mit Ischämie und Reperfusion (I/R) einhergehenden pathophysiologischen Zusammenhänge ist entscheidend, um therapeutische Strategien weiter zu optimieren. Das zentrale sarkomerische Protein Titin übernimmt in Kardiomyozyten zahlreiche strukturelle, mechanische und regulatorische Aufgaben. Veränderungen und Modifikationen von Titin während eines Myokardinfarkts können daher entscheidende Ansatzpunkte für zukünftige therapeutische Strategien sein.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, ein funktionsfähiges und vielseitiges *in-vitro*-I/R-Modell zu entwickeln, mit dem Titin und potenzielle Modifikationen untersucht werden können. Im Rahmen des Forschungsprojekts wurde ein zellkulturelles I/R-Modell mit adulten Rattenkardiomyozyten etabliert. Die zentralen Elemente der Simulation waren eine mit sauerstoffarmem Mischgas gefüllte Hypoxiekammer sowie spezifisch auf die Stoffwechselsituation angepasste Pufferlösungen. Relevante Parameter konnten dabei zielgenau eingestellt und nach Bedarf variiert werden. Im Rahmen des Etablierungsprozesses wurden bereits erste Untersuchungen von Titinmodifikationen und zugehörigen Prozessen durchgeführt. Zu den Untersuchungen zählte die Analyse von posttranslationalen Titinphosphorylierungen der PEVK-Region, die Einfluss auf die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten haben. Darüber hinaus wurde die Titinubiquitinierung untersucht, die bei der Proteinqualitätskontrolle eine Rolle spielt. Vorherige Studien im Mausmodell mit kardialer I/R konnten eine PKC α -vermittelte Hyperphosphorylierungen der PEVK-Region von Titin an den Stellen S11878 und S12022 beschreiben, die mit einer Steigerung der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten einherging. Es wird angenommen, dass diese Veränderungen in der Frühphase des Infarkts zur Stabilisierung beitragen, bis ausreichend Narbengewebe gebildet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Titinmodifikationen in unterschiedlichen I/R-Simulationsmodellen mit variierenden Ischämiedauern von 45 Minuten, 120 Minuten und 16 Stunden sowie jeweils anschließenden Reperfusionssimulationen untersucht. Die Hyperphosphorylierung der PEVK-Region mit einhergehender Aktivitätssteigerung von PKC α konnte dabei nicht reproduziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Hypoxie und Teilkomponenten der Ischämie nicht die entscheidenden Reize für diese Titinmodifikationen sind und eine Beteiligung weiterer Einflussfaktoren wahrscheinlich ist. Um diese zu identifizieren, sind in Zukunft weitere Untersuchungen mit dem I/R-Modell notwendig. Die Proteinqualitätskontrolle spielt in Kardiomyozyten eine bedeutende Rolle für die Sicherstellung der Funktionsfähigkeit der Zellen. Auch unter Stressbedingungen können bestimmte Abbausysteme wie das autophagosomal-lysosomale System zum Überleben der Zellen beitragen. Titin stellt aufgrund seiner enormen Größe eine Herausforderung für die Proteinqualitätskontrolle und den Abbau dar. Die Prozesse des Titinabbaus, insbesondere unter Infarktbedingungen, sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Untersuchungen in einem *in-vivo*-Mausmodell konnten bereits zeigen, dass es in den ersten Tagen nach einem Infarkt zu einem gesteigerten Titinabbau, einhergehend mit einer gesteigerten proteasomalen Aktivität kam. Um weitere Erkenntnisse zum I/R-bedingten Titinabbau zu erlangen, erfolgte in dieser Arbeit die Analyse der Titindegradation im zellkulturellen I/R-Simulationsmodell. Da sich im Verlauf der Etablierung nach 16-stündiger Ischämie Veränderungen im Titinabbau andeuteten, erfolgte eine nähere Untersuchung der Prozesse mittels *Western-Blot*-Verfahren nach 16 Stunden Ischämie und nachfolgender 4-stündiger Reperfusion. Durch ergänzende Experimente mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A₁ konnte gezeigt werden, dass unter ischämischen Bedingungen ein vermehrter Abbau von ubiquitiniertem Titin über das Autophagosom stattfindet. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die hypoxische Komponente des ischämischen Reizes dafür von entscheidender Bedeutung ist. Dem gegenüber deuteten weitere Versuchsergebnisse darauf hin, dass Autophagie unter Basalbedingungen eine untergeordnete Rolle beim Abbau von Titin spielt. Die Analyse von autophagieassoziierten Proteinen nach Simulation von 16 Stunden Ischämie und 4 Stunden Reperfusion wiesen auf eine gesteigerte Autophagieaktivität hin. Die Messung der Aktivitätslevel bestimmter Autophagieregulatoren deutete jedoch insgesamt auf eine differenzierte Autophagieaktivität im Zeitverlauf der Ischämie hin. Um diese Abläufe und Mechanismen im Detail nachvollziehen zu können, bedarf es weiterer Messungen.

Insgesamt konnten mit dem hier etablierten Modell erste Erkenntnisse zu zwei Gruppen von Titinmodifikationen unter I/R-Simulationsbedingungen gewonnen werden. Während im Organismus eine Vielzahl an Infarkt-assoziierten Faktoren parallel wirken und sich gegenseitig beeinflussen, gelingt durch das *in-vitro*-I/R-Simulationsmodell eine selektive Analyse spezifischer Mechanismen in ausgewählten Zellarten. Folglich stellt es eine wertvolle Ergänzung zu komplexen multifaktoriellen *in-vivo*-Modellen dar. Für die weitere Infarktforschung steht somit ein Modell bereit, welches vor allem in Kombination mit *in-vivo*-Experimenten und klinischen Daten relevante Erkenntnisse liefern kann.

Abstract

Cardiovascular diseases, especially coronary heart disease, remain among the leading causes of death worldwide. One of the most severe manifestations of this disease is the myocardial infarction due to its associated morbidity and mortality. A detailed understanding of the underlying pathophysiological mechanisms of ischemia and reperfusion (I/R) is crucial for optimising therapeutic strategies. In cardiomyocytes the central sarcomeric protein titin has numerous structural, mechanical and regulatory functions. Alterations and modifications of titin during ischemia and reperfusion may therefore be crucial starting points for future therapeutic approaches.

For this reason, the aim of this study was to develop a functional and versatile *in vitro* I/R model to investigate titin and potential modifications. A main part of the research project was to establish a cell culture I/R model with adult rat cardiomyocytes. The central components of the simulation were a hypoxia chamber filled with a low-oxygen gas mixture and buffers adjusted to the specific metabolic situation. It was possible to set up relevant parameters precisely and modify them as needed. While establishing the I/R model, first investigations of titin modifications and associated processes have already been carried out. The analyses included posttranslational titin phosphorylation of the PEVK region, which influences the passive stiffness of cardiomyocytes. In addition, titin ubiquitination, which plays a role in protein quality control, was investigated. Previously, PKC α mediated hyperphosphorylation of the PEVK region at the sites S11878 and S12022, which was associated with an increase in passive stiffness, has been described in mouse models. It has been assumed that these changes contribute to ventricular stability in the early phase of infarction until sufficient scar tissue has been formed. In the current investigation, these titin modifications were examined in different I/R models with varying durations of ischemia of 45 minutes, 120 minutes and 16 hours, each followed by reperfusion simulations. The hyperphosphorylation of the PEVK region with increase in PKC α activity could not be reproduced. This leads to the conclusion that hypoxia and components of ischemia may not be the key stimuli for these titin modifications and that other factors are likely to be involved. To identify these factors, further investigations with the I/R model are required. Protein quality control plays an important role in ensuring the functionality of cardiomyocytes. Moreover, under stressful conditions, certain degradation systems, such as the autophagy, can contribute to cell survival. Due to its enormous size, titin is a challenge for protein quality control and degradation. The processes of titin degradation, particularly under myocardial infarction, are not yet fully understood. Studies in an *in vivo* mouse model have already shown that increased titin degradation, accompanied by increased proteasomal activity, occurs in the remote area of the heart in the first few days after a myocardial infarction. Here, in order to obtain further insights into I/R-induced titin degradation, it was analysed in cell cultural I/R simulation models. Since changes in titin degradation were observed during the development of the *in vitro* I/R model after 16 hours of ischaemia, the underlying mechanisms were investigated in more detail using western blot analysis after 16 hours of ischemia followed by 4 hours of reperfusion. Additional experiments with the autophagy inhibitor bafilomycin A₁ showed that under ischaemic conditions there is an increased degradation of ubiquitinated titin via the autophagosome. In this context, it was demonstrated that the hypoxic component of the ischaemic stimulus is crucial for the increased autophagosomal-lysosomal degradation. At the same time, further results indicated that autophagy plays a minor role in degradation of titin under basal conditions. The analysis of autophagy-associated proteins after 16 hours of ischemia and after 4 hours of reperfusion may indicate an increase in autophagy activity. However, assessments of the activity of certain autophagy regulators suggested differentiated autophagy activity over the ischaemic period. Further measurements are required to understand these processes and mechanisms in detail.

Overall, the established I/R simulation model has yielded initial insights into two different groups of titin modifications under I/R conditions. While a multitude of I/R-associated factors act simultaneously in the organism and interact with each other, the *in vitro* model makes a selective analysis of specific mechanisms possible. Therefore, it represents a valuable addition to complex multifactorial *in vivo* models. For further research on myocardial infarction the established model can provide important findings, especially when combined with *in vivo* experiments and clinical data.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
a.u.	<i>arbitrary units</i>
A-Bande	Anisotrope Bande
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
aRCM	Adulte Rattenkardiomyozyten
Atg	<i>Autophagy-related</i> (Protein)
ATP	Adenosintriphosphat
BAF	Bafilomycin A ₁
BSA	Bovines Serumalbumin
CAMKIIδ	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II δ
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CUT	Verdaulösung zur Isolation adulter Kardiomyozyten
DAG	Diacylglycerol
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DCP-Lösung	Verdaulösung für die Isolation adulter Kardiomyozyten
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	Fötales Rinderserum
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FIP200	<i>FAK family Interacting Protein of 200 kDa</i>
FN3-Domänen	Fibronektin-Typ-III-Domänen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GLUT	Glukosetransporter
HECT	<i>Homologous to E6-AP C-Terminus</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HI-Calcium	Lösung zur Isolation adulter Kardiomyozyten mit hoher Calciumkonzentration
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
Hsc	<i>Heat shock cognate</i>
I.E.	Internationale Einheit
I/R	Ischämie/Reperfusion
I-Bande	Isotrope Bande
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP16	Kultivierung für 16 Stunden in Ischämiepuffer unter Normoxie
IκB	Inhibitor von NFκB
K	Kontrolle
KP16	Kultivierung für 16 Stunden in Kontrollpuffer unter Normoxie
K-sl120	Kontrolle für sl120
K-sl16	Kontrolle für sl16
K-sl16BAF	Kontrolle für sl16BAF
K-sl45	Kontrolle für sl45
K-sR2	Kontrolle für sR2
K-sR20	Kontrolle für sR20
K-sR4	Kontrolle für sR4
LAD	<i>Left Anterior Descending</i> (linke Vorderwandarterie)
LAMP	Lysosom-assoziiertes Membranprotein
LC3	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1, leichte Kette 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LIR	<i>LC3-Interacting Region</i>
LO-Calcium	Lösung zur Isolation adulter Kardiomyozyten mit niedriger Calciumkonzentration
Ly-6C	Lymphozyten-Antigen 6C
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMP2	Matrix-Metalloproteinase-2
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin Complex</i>
MuRF	<i>Muscle RING-finger protein</i>
n	Versuchsansatz

N2Bus	<i>N2B unique sequence</i>
NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEVK	Proline-, Glutamat-, Valin- und Lysin-reiche Region Titins
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKCα	Proteinkinase Cα
PKG	Proteinkinase G
PQC	Proteinqualitätskontrolle
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTP	<i>Permeability Transition Pore</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf1	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RBR	<i>RING-between-RING</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTP	<i>Regulatory Particle Triple-A ATPase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard Error of the Mean</i>)
sHSP	<i>small Heat Shock Protein</i>
sl	simulierte Ischämie
sl120	120 Minuten simulierte Ischämie
sl16	16 Stunden simulierte Ischämie
sl16BAF	16 Stunden simulierte Ischämie mit Bafilomycin A ₁ -Exposition
sl45	45 Minuten simulierte Ischämie
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i>
sR	simulierte Reperfusion
sR2	2 Stunden simulierte Reperfusion
sR20	20 Stunden simulierte Reperfusion
sR4	4 Stunden simulierte Reperfusion
SQSTM1	Sequestosom 1

T2	Degradationsbande von Titin
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Titinub.	Titinubiquitinierung
TK	Titin-Kinase
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ub. Titin	ubiquitiniertes Titin
ULK	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	<i>unique sequence</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vps	<i>Vacuolar Protein Sorting</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokardinfarkt	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie der Ischämiephase	1
1.1.3	Pathophysiologie der Reperfusionsphase	3
1.1.4	Pathophysiologie der Inflamationsreaktion	3
1.1.5	Modelle zur Simulation eines Myokardinfarkts	5
1.1.5.1	<i>In-vitro</i> -I/R-Simulation	5
1.1.5.2	<i>Ex-vivo</i> -I/R-Simulation	6
1.1.5.3	<i>In-vivo</i> -Infarktsimulation	6
1.2	Das Sarkomer	7
1.3	Titin	8
1.3.1	Aufbau	8
1.3.2	Funktionen	10
1.3.3	Modulation der passiven Steifigkeit	10
1.3.3.1	Isoformen	11
1.3.3.2	Posttranslationale Modifikationen der I-Band-Region	11
1.4	Proteinqualitätskontrolle	14
1.4.1	Ubiquitinierung von Proteinen	14
1.4.2	Ubiquitin-Proteasom-System	16
1.4.3	Autophagosomal-lysosomales System	17
1.4.4	Proteinqualitätskontrolle von Titin	21
1.5	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Labormaterial	26
2.1.3	Geräte	27
2.1.4	Spezielles Material zur Simulation der Hypoxie	29
2.1.5	Antikörper	31
2.1.6	Inhibitoren und Aktivatoren	33
2.1.7	Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten	34
2.1.8	Gase	34
2.1.9	Puffer und Lösungen	35
2.1.10	Tiere	38
2.2	Methoden	38
2.2.1	Etablierung eines zellkulturellen I/R-Simulationsmodells	38
2.2.1.1	Auswahl der Zellen	38
2.2.1.2	Definition eines unabhängigen Versuchsansatzes	39
2.2.1.3	Isolation adulter Rattenkardiomyozyten	39
2.2.1.4	Aufbau und Ablauf der I/R-Simulation	41
2.2.1.4.1	Simulation der Ischämie	41
2.2.1.4.2	Simulation der Reperfusion	44
2.2.1.5	Anwendung und Entwicklung des Modells	45
2.2.1.5.1	Simulationsmodell 1: 45 min SI mit Reperfuisionsreihe	46

2.2.1.5.2	Simulationsmodell 2: 120 min sl mit Reperfusionsreihe.....	46
2.2.1.5.3	Simulationsmodell 3: 16 h sl und 4 h sR.....	46
2.2.1.5.4	Simulationsmodell 4: 16 h sl mit Autophagieinhibition	47
2.2.1.5.5	Modell zur Messung der Hypoxiewirkung	47
2.2.2	Biochemische Analyse	48
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	48
2.2.2.1.1	Diskontinuierliche SDS-PAGE	48
2.2.2.1.2	Agarose-stabilisierte SDS-PAGE zur Darstellung von Titin	49
2.2.2.2	Western Blot.....	50
2.2.2.3	Immundetektion.....	50
2.2.2.4	Stripping.....	51
2.2.2.5	Nachweis der Hypoxie.....	52
2.2.3	Auswertung.....	52
2.2.3.1	Verwendete Computerprogramme.....	52
2.2.3.2	Densitometrische Auswertung der Western Blots	52
2.2.4	Statistische Datenanalyse.....	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Modifikationen von Titinphosphorylierungen unter I/R	54
3.1.1	Simulationsmodell 1: 45 min sl mit Reperfusionsreihe	54
3.1.1.1	Relative PEVK-Phosphorylierung nach I/R-Simulation	54
3.1.1.2	PKC α -Aktivität nach I/R-Simulation.....	56
3.1.2	Simulationsmodell 2: Verlängerung auf 120 min sl mit Reperfusionsreihe	57
3.1.2.1	Relative PEVK-Phosphorylierung nach I/R-Simulation	57
3.1.2.2	PKC α -Aktivität nach I/R-Simulation.....	59
3.1.3	Simulationsmodell 3: Verlängerung auf 16 h sl mit 4 h sR	60
3.1.3.1	Relative PEVK-Phosphorylierung nach 16 h sl und nach 4 h sR	60
3.1.3.2	PKC α -Aktivität nach 16 h sl und nach 4 h sR.....	62
3.2	Titin-Turnover unter I/R-Simulation im zellkulturellen Modell	63
3.2.1	Zusätzliche Degradationsbande nach 16 Stunden Ischämie als Zeichen eines gesteigerten Titin-Turnovers	63
3.2.2	Analyse des Titin-Turnovers nach 16 h sl und 4 h sR	63
3.2.2.1	Relative Titinubiquitinierung und Gesamtubiquitinierung nach 16 h sl und nach 4 h sR.....	64
3.2.2.2	Relative Proteinexpression titinassoziierter E3-Ligasen nach 16 h sl und nach 4 h sR.....	66
3.2.2.3	Relative Proteinmenge Autophagie-assoziierter Proteine nach 16 h sl und nach 4 h sR	68
3.2.2.4	Aktivität von Autophagieregulatoren nach 16 h sl und 4 h sR.....	70
3.2.3	Analyse der relativen Titinubiquitinierung und Autophagie-assoziierter Proteine nach 16 h sl und BAF-Exposition	72
3.3	Nachweis der Hypoxiewirkung	74
3.3.1	Analyse der Hypoxie-assozierten Proteine HIF-1 α und GLUT1	74
3.3.2	Messung des Einflusses der Hypoxie auf die Autophagie-assozierten Veränderungen nach 16 h sl.....	75
4	Diskussion	78
4.1	Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin im <i>in-vitro</i> -I/R-Modell.....	78
4.1.1	Ischämiesimulation führt in isolierten Kardiomyozyten zu keiner PKC α -Aktivierung und PEVK-Hyperphosphorylierung	79

4.1.2	Reperfusionssimulation führt in isolierten Kardiomyozyten zu keiner PKC α - Aktivierung und PEVK-Hyperphosphorylierung	81
4.1.3	Die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region von Titin scheint durch komplexe Infarktassoziierte Vorgänge ausgelöst zu werden	82
4.2	Einfluss von I/R auf den Titinabbau und die Autophagieaktivität.....	85
4.2.1	Proteinqualitätskontrolle und Abbau von Titin im <i>in-vitro</i> -I/R-Simulationsmodell	86
4.2.1.1	I/R führt zu einer reduzierten Titinubiquitinierung.....	86
4.2.1.2	Die Gabe von BAF zeigt, dass ubiquitiniertes Titin unter Ischämie vermehrt durch Autophagie abgebaut wird	87
4.2.2	I/R nimmt Einfluss auf die Autophagieaktivität.....	88
4.2.2.1	Die I/R-bedingte Reduktion der relativen Proteinmenge von p62 und LC3-II deuten auf eine gesteigerte Autophagieaktivität hin.....	88
4.2.2.2	I/R nimmt Einfluss auf die Aktivität von Autophagie-Regulatoren.....	89
4.2.2.3	Veränderungen autophagieassoziiierter Proteine unter BAF-Exposition deuten eine komplexe Autophagiereaktion unter Ischämie an	91
4.2.3	Hypoxie trägt wesentlich zu den beobachteten Veränderungen bei	92
4.2.4	Ubiquitiniertes Titin wird unter Ischämie verstärkt über Autophagie abgebaut...	93
4.3	Analyse des etablierten <i>in-vitro</i> -I/R-Simulationsmodells	96
4.3.1	Stärken des Modells	96
4.3.2	Limitationen des Modells.....	97
4.4	Fazit	99
5	Abbildungsverzeichnis	100
6	Tabellenverzeichnis.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	103

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen sowohl weltweit und auch in Deutschland weiterhin zu den führenden Todesursachen (World Health Organization, 2024, Statistisches Bundesamt, 2025b). Der akute Myokardinfarkt gehört dabei in Deutschland zu den bedeutsamsten Manifestationen und ist nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit die zweithäufigste kardiovaskuläre Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2025a, Statistisches Bundesamt, 2025b). Grundlage des Infarktgeschehens ist in den meisten Fällen die koronare Herzkrankheit mit Manifestation von Atherosklerose an den Koronargefäßen. Entzündliche lipidhaltige Plaques, die sich langsam progredient über Jahre in den Koronararterien entwickeln, führen dabei zu einer fortschreitenden Lumeneinengung und damit zu einer verminderten Myokardperfusion distal der Stenose (Ross, 1993).

1.1.2 Pathophysiologie der Ischämiephase

Kommt es zur Ruptur der fibrösen Kappe eines meist instabilen atherosklerotischen Plaques, kann die Freilegung von thrombogenem Material innerhalb kürzester Zeit zur Bildung eines Thrombus führen, der das Gefäß vollständig verschließt (Abb. 1). In der Konsequenz kommt es im Versorgungsgebiet des verschlossenen Gefäßes zu einer ausbleibenden oder stark reduzierten Durchblutung (**Ischämie**). Der resultierende Sauerstoffmangel (**Hypoxie**) führt im betroffenen Gewebe durch eingeschränkte mitochondriale oxidative Phosphorylierung zu einer reduzierten ATP-Produktion (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018). Das Myokard verfügt lediglich über geringe Speicher von ATP, Kreatinphosphat und Sauerstoff, welche nur für einige Sekunden ausreichen (Stanley et al., 2005). Nach Ausschöpfung der intrazellulären ATP-Vorräte kommt es innerhalb kurzer Zeit zur Reduktion der Kontraktionsvorgänge im betroffenen Bereich (Hibernation). Da ein Großteil des Energieumsatzes im Herzen für die Myokardkontraktion benötigt wird, kann der Energiebedarf der ischämischen Zellen auf diese Weise reduziert werden (Stanley et al., 2005).

Durch alternative Energiegewinnung mittels **anaerober Glykolyse**, kann der Abfall des ATPs zusätzlich verlangsamt werden, sodass dieses erst nach 30-40 Minuten unter 10% des Normalwertes sinkt. Aus dem dabei entstehenden Pyruvat wird unter den vorherrschenden Stoffwechselbedingungen vermehrt Laktat gebildet (De Villiers and Riley, 2020). Protonen, Laktat und weitere Stoffwechselprodukte akkumulieren extrazellulär aufgrund der eingeschränkten Perfusion, sodass eine Gewebsazidose resultiert (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018, Ostadal et al., 2009). Die extrazelluläre Laktatakkumulation verhindert im Weiteren einen Ausstrom von Laktat aus den Kardiomyozyten. Dies wiederum verstärkt die

intrazelluläre Azidose und führt zu einer reduzierten Glykolyse (Halestrap et al., 1997, Chen and Vunjak-Novakovic, 2018). Schlussendlich kann die anaerobe Glykolyse den Energiebedarf des Herzens nicht längerfristig abdecken, sodass es bei vollständigem Gefäßverschluss nach ca. 20 Minuten zu ersten irreversiblen Zellschäden und Nekrose kommt (Timmers et al., 2012).

Direkt von der Ischämie betroffen sind dabei die Kardiomyozyten im Versorgungsgebiet des okkludierten Gefäßes. Die **Infarktzone** (Abb. 1) stellt somit das primär geschädigte Areal dar, in dem die Ischämie zu irreversibler Schädigung der Kardiomyozyten, Entzündungsreaktionen und im Verlauf zur Narbenbildung führt (Timmers et al., 2012, Frangogiannis, 2014). Umgeben ist dieser Kern von einer vulnerablen **Randzone** (Abb. 1), in der die Kardiomyozyten während des Infarkts perfundiert werden, allerdings trotzdem funktionelle Beeinträchtigungen aufweisen können (Jackson et al., 2002). Als **Remote-Areal** (Abb. 1) wird der Teil des Herzens bezeichnet, der nicht direkt von der Ischämie betroffen ist und sich auch nicht in direkter Nachbarschaft zu den ischämischen Zellen befindet. Allerdings kann es auch in diesem Bereich durch verschiedene Faktoren und Stressoren zu Veränderungen kommen (French and Kramer, 2007).

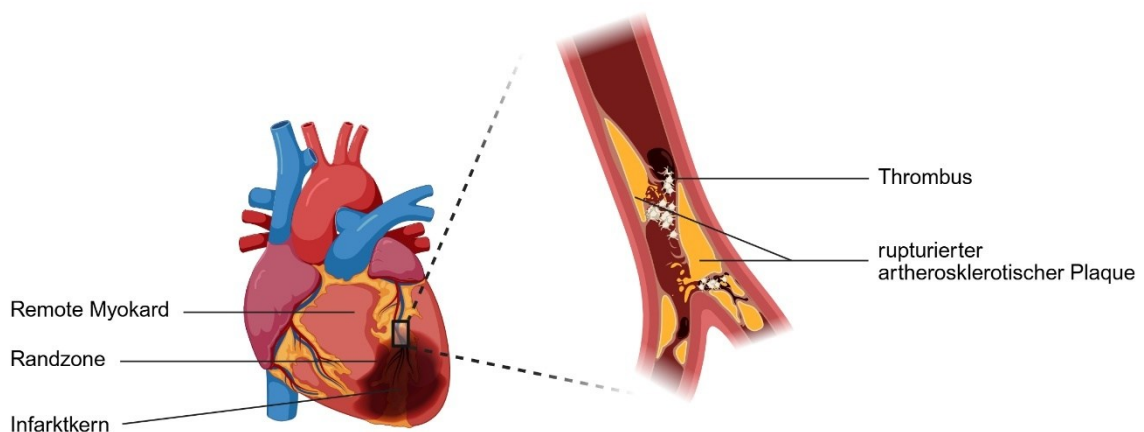


Abb. 1: Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Die Abbildung zeigt die Vorgänge bei einem akuten Myokardinfarkt. Nach teilweise jahrelanger Entwicklung atherosklerotischer Plaques, kann es innerhalb von Sekunden zur Ruptur dieser Plaques mit konsekutiver Thrombenbildung kommen. Dies führt zur Unterbrechung des Blutflusses distal des Verschlusses. Der Bereich des Herzens, der direkt von der Ischämie betroffen ist, wird als Infarktkern bezeichnet. Umgeben ist dieser von einer vulnerablen Randzone. Das Remote-Areal hat keinen direkten Kontakt zur Infarktzone, kann allerdings im Verlauf trotzdem Veränderungen aufweisen. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Diagnostisch kann der akute Schaden der Kardiomyozyten durch den Anstieg und die Dynamik kardialer Biomarker, insbesondere des kardialen Troponins, festgestellt werden (Thygesen et al., 2010). Die Dauer der Ischämie beeinflusst maßgeblich wie viele Kardiomyozyten einen irreversiblen Schaden erleiden (Reimer et al., 1977). Daher steht therapeutisch bei Vorliegen eines Myokardinfarkts eine schnelle Reperfusion im Vordergrund (Byrne et al., 2023, Ibanez et al., 2018).

1.1.3 Pathophysiologie der Reperfusionsphase

Das Ziel der interventionellen oder medikamentösen Reperfusion ist die Wiederherstellung des koronaren Blutflusses, sodass die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten wieder gewährleistet ist. Die schnellstmögliche Reperfusion stellt dabei einen entscheidenden Faktor für die Infarktgröße und das klinische Outcome dar, allerdings kann die Reperfusion selbst durch unterschiedliche Mechanismen auch zu Schäden am Myokard führen (Hausenloy and Yellon, 2013).

Im Rahmen des **letalen myokardialen Reperfusionsschadens**, kann es aufgrund der abrupten metabolischen Veränderungen nach der Reperfusion, zum Absterben von zum Zeitpunkt der Ischämie noch vitalen Kardiomyozyten kommen (Piper et al., 1998). Die Reoxygenierung und beginnende Inflamationsprozesse führen zur Bildung großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Yellon and Hausenloy, 2007, Zweier, 1988). Sowohl die Bildung von ROS als auch die abrupten pH-Veränderungen tragen wesentlich zur Öffnung der mitochondrialen *Permeability Transition Pore* (PTP) bei, was zum Kollaps des Membranpotentials und einer Funktionsstörung der Atmungskette führt (Yellon and Hausenloy, 2007, Hausenloy and Yellon, 2003). Zusätzlich schädigen ROS DNA, Proteine und Membranen und führen dadurch unter anderem zu einer Verstärkung der intrazellulären Calciumüberladung. (Yellon and Hausenloy, 2007, Griffiths and Halestrap, 1995). Diese löst unter ansteigender ATP-Produktion weitere Zellschäden durch Hyperkontraktion aus (Ibanez et al., 2015).

Des Weiteren kann das **No-reflow Phänomen** auftreten, bei dem es trotz Wiederherstellung der Durchgängigkeit des epikardialen Koronargefäßes, zu Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation in der Infarktzone kommt (Ito, 2006, Krug et al., 1966). Zum eingeschränkten Fluss tragen verschiedene Faktoren bei, die durch die Reperfusion verstärkt werden. Dazu zählen das Gewebeödem, Endotheldefekte, Entzündungsprozesse, die Kontraktion benachbarter Kardiomyozyten und Mikrothromboembolie infolge einer perkutanen Koronarintervention (PCI) (Ito, 2009, Manciet et al., 1994, Reynolds and McDonagh, 1989). Durch die unvollständige Perfusion bleibt die Sauerstoffversorgung sowie der Abtransport toxischer Metabolite in dem betroffenen Gebiet weiter eingeschränkt, sodass der Gewebeschaden trotz epikardialer Reperfusion weiter fortschreiten kann (Manciet et al., 1994).

1.1.4 Pathophysiologie der Inflamationsreaktion

Der Körper reagiert auf die massive Schädigung des Myokards im Rahmen eines Myokardinfarkts, mit einem mehrschrittigen Prozess, bestehend aus einer anfänglichen sterilen Inflamationsreaktion, in der geschädigte und abgestorbene Zellen entfernt werden. Darauf folgen die Reparations- und Reifungsphase, in denen die Inflamationsreaktion beendet wird und es zur Ausbildung und Reifung einer Narbe im Infarktgebiet kommt (Ong

et al., 2018). Dies ist aufgrund der eingeschränkten regenerativen Kapazität der Kardiomyozyten zur Aufrechterhaltung der Herzwandstrukturen unter dauerhafter mechanischen Beanspruchung essenziell (Prabhu and Frangogiannis, 2016, Ong et al., 2018). Die **Inflammationsphase** wird durch die absterbenden und geschädigten Zellen im Infarktgebiet initiiert. Diese Zellen setzen Gefahrensignale, sogenannte *Damage associated molecular pattern* (DAMP) Moleküle frei, welche im Folgenden das angeborene Immunsystem aktivieren können. Dafür binden sie an spezielle Rezeptoren, die *pattern recognition receptors* (PRR) von Immunzellen, Fibroblasten oder benachbarten Kardiomyozyten. Dadurch kommt es im weiteren Verlauf über intrazelluläre Signalkaskaden zur NFκ-b Aktivierung (Anzai et al., 2022, Ghigo et al., 2014, Shinde and Frangogiannis, 2014). Die Aktivierung und nukleäre Translokation von NFκ-b führt zur Transkription und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, TNF-α, IL-6, IL-18), Chemokinen und endothelialen Adhäsionsmolekülen, welche im weiteren Verlauf zur Rekrutierung und Einwanderung von Immunzellen in die Infarktzone führen (Prabhu and Frangogiannis, 2016, Anzai et al., 2022). Auch die einwandernden Immunzellen produzieren in der Inflammationsphase proinflammatorische Zytokine, sodass es zur Amplifikation der inflammatorischen Reaktion und einer ausgedehnten Immunantwort kommt (Timmers et al., 2012). Zu den ersten Immunzellen, welche aus dem Knochenmark mobilisiert werden und die durch chemotaktische Signale in das verletzte Myokard gelangen, gehören die neutrophilen Granulozyten. Im Myokard phagozytieren sie zellulären Debris, setzen proteolytische Enzyme frei und erzeugen chemotaktische Signale, welche zur Rekrutierung von Monozyten in den Infarktgebiet führen (Ong et al., 2018, Prabhu and Frangogiannis, 2016). Dabei dominieren in der Inflammationsphase die proinflammatorischen Ly-6C^{high}-Monozyten, welche zu M1-Makrophagen differenzieren können und als diese in der Infarktzone Zelldebris entfernen (Nahrendorf et al., 2007, Ong et al., 2018).

Vier bis sieben Tage nach dem akuten Myokardinfarkt beginnt die **antiinflammatorische proliferative Phase**, im Rahmen derer es zur Sekretion von antiinflammatorischen, profibrotischen Zytokinen (z.B. IL-10, TGF-β) und proangiogenetischen Faktoren (z.B. VEGF) kommt (Ong et al., 2018, Prabhu and Frangogiannis, 2016). Diese werden unter anderem von antiinflammatorischen Monozyten vom Phänotyp Ly-6C^{low} und M2-Makrophagen ausgeschüttet (Nahrendorf et al., 2007, Prabhu and Frangogiannis, 2016). Während der proliferativen Phase kommt es zur Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten, die entscheidend an der Formation einer robusten und flexiblen Narbe beteiligt sind (Shinde and Frangogiannis, 2014, Turner and Porter, 2013).

Im weiteren Verlauf nimmt in der **Maturationsphase** die Dichte an Myofibroblasten wieder ab. Abschließend kommt es zur Reifung der Narbe mit Quervernetzung der Kollagenfasern, sodass am Ende eine ausgereifte Narbe besteht (Shinde and Frangogiannis, 2014, Anzai et al., 2022, Prabhu and Frangogiannis, 2016).

1.1.5 Modelle zur Simulation eines Myokardinfarkts

Zur Erforschung der pathophysiologischen Prozesse im Rahmen eines Myokardinfarkts existieren verschiedene experimentelle Ansätze, die sich in ihren Charakteristika unterscheiden und je nach Zielsetzung unterschiedlich geeignet sind. Im Folgenden werden übergeordnete Modelle zur Infarkt- beziehungsweise I/R-Simulation in ihren Grundzügen dargestellt.

1.1.5.1 *In-vitro*-I/R-Simulation

Bei der *in-vitro*-Simulation von Ischämie und Reperfusion werden isolierte Zellen – häufig isolierte adulte Kardiomyozyten – unter Bedingungen kultiviert, die einem Myokardinfarkt nachempfunden sind (Lindsey et al., 2018). Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, mit deren Hilfe die spezifischen Stoffwechselsituationen simuliert werden können. Eine Möglichkeit besteht darin, die Kardiomyozyten nach Zentrifugation in einer minimalen Menge Nährmedium unter einer **Mineralölschicht** zu kultivieren. Diese Ölschicht verhindert die Sauerstoffdiffusion und führt somit zu hypoxischen Bedingungen (Armstrong et al., 1995, Chen and Vunjak-Novakovic, 2018). Bei einer weiteren Methode werden zur Erzeugung einer Hypoxie **Zyanide** verwendet, welche an den mitochondrialen Komplex IV der Atmungskette binden und so die Zellatmung blockieren (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018, Cavalheiro et al., 2010). Allerdings ist bei dieser Methode die realitätsnahe Simulation einer Reperfusion nur eingeschränkt umsetzbar (Diaz and Wilson, 2006). Ein weiteres weit verbreitetes zellkulturelles Modell basiert auf der Modifikation der Umgebungsluft mithilfe einer **Hypoxiekammer**. Dabei wird ein sauerstoffarmes Mischgas in eine Kammer geleitet, in der die Zellen kultiviert werden. Dieser Versuchsaufbau kann in unterschiedlichen Variablen gezielt verändert werden. Zu den häufig verwendeten Komponenten zählen die Hypoxie sowie die Nährstoffdeprivation durch ein glukose- und serumfreies Medium. Zusätzlich können weitere Modifikationen vorgenommen werden – zum Beispiel eine Hyperkaliämie, eine Azidose oder die Zugabe von Laktat zur Simulation der Akkumulation anaerober Metabolite bei gestörter Perfusion (Lindsey et al., 2018, Chen and Vunjak-Novakovic, 2018, Diaz and Wilson, 2006). Die Reperfusion wird simuliert, indem das nährstoffarme Ischämiemedium durch ein nährstoffhaltiges Kulturmedium ersetzt wird und eine Kultivierung außerhalb der Hypoxiekammer unter Normoxie erfolgt. Durch den Mediumwechsel werden gleichzeitig zuvor angefallene Metabolite entfernt, ähnlich wie dies auch bei der Wiederherstellung des Blutflusses nach einem Myokardinfarkts geschieht. (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018). Insgesamt kann mit einer zellkulturellen I/R-Simulation die präzise Kontrolle der zellulären und extrazellulären Bedingungen erreicht werden. Dabei ist eine gezielte Untersuchung der Effekte auf eine spezifische Zellart möglich, da der Einfluss anderer Zellpopulationen und zirkulierender Faktoren in diesem Setting weitgehend ausgeschlossen ist (Lindsey et al., 2018).

1.1.5.2 *Ex-vivo*-I/R-Simulation

Bei *ex-vivo*-I/R-Modellen mit isolierten perfundierten Herzen nach Langendorff erfolgt die Infarktsimulation an einem schlagenden Herzen, welches sich nicht mehr im Organismus befindet. Dafür wird das gesamte Herz aus dem Versuchstier entnommen und an eine spezielle Vorrichtung angeschlossen, über die es mit einer Pufferlösung retrograd über die kanülierte Aorta perfundiert wird. Dadurch bleibt das Herz funktionell aktiv und kontrahiert außerhalb des Körpers weiter (Bell et al., 2011). Eine globale Ischämie kann simuliert werden, indem der Perfusionsfluss vollständig unterbrochen wird. Alternativ ist auch die Simulation einer regionalen Ischämie möglich, indem gezielt einzelne Koronargefäße – etwa durch Ligaturen – temporär verschlossen werden. Nach einer definierten Ischämieperiode kann die Reperfusion, durch Wiederherstellung des Gesamtflusses oder Öffnen zuvor abgebundener Gefäße, simuliert werden. In diesem Modell kann das funktionsfähige Herz ohne systemische Einflüsse des restlichen Organismus untersucht werden (Bell et al., 2011, Lindsey et al., 2018).

1.1.5.3 *In-vivo*-Infarktsimulation

Bei *in-vivo*-Modellen wird ein Myokardinfarkt am lebenden Versuchstier simuliert. Dabei erfolgt nach linksseitiger Thorakotomie der Verschluss der linken Vorderwandarterie (Kolk et al., 2009). Dieser kann entweder permanent und ohne Reperfusion oder transient mit anschließender Reperfusion erfolgen (De Villiers and Riley, 2020, Lindsey et al., 2018). Dieses Verfahren wird seit über 60 Jahren in Kleintiermodellen eingesetzt (Johns and Olson, 1954). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Modellen, erlaubt dieses Vorgehen die Untersuchung systemischer Effekte myokardialer Ischämie und Reperfusion im lebenden Organismus (De Villiers and Riley, 2020).

1.2 Das Sarkomer

Das Zytoskelett der quergestreiften Muskulatur besteht aus spezialisierten, geordneten Strukturen – den Sarkomeren (Krüger and Linke, 2011). Diese stellen die kleinste kontraktile Einheit der quergestreiften Muskulatur dar. Dabei bilden viele hintereinander geschaltete Sarkomere eine Myofibrille, die in ihrer Gesamtheit das kontraktile Gerüst der Zelle bilden (Abb. 2).

Die charakteristischen lichtmikroskopischen hellen und dunklen Banden lassen sich durch die strukturierte Anordnung der sarkomerischen Proteine erklären. Im Zentrum des Sarkomers befindet sich die anisotrope dunkle A-Bande mit den Myosinfilamenten, die in der M-Linie verankert sind (Tskhovrebova and Trinick, 2004). In den Z-Scheiben sind die Aktinfilamente verankert – diese reichen bis zwischen die Myosinfilamente. Die I-Bande repräsentiert den Bereich des Sarkomers, in dem ausschließlich Aktinfilamente, aber keine Myosinfilamente vorliegen (Abb. 2). Durch diese Anordnung ist eine calciuminduzierte ATP-abhängige zyklische Wechselwirkung zwischen den Aktinfilamenten und den Myosinköpfchen möglich. Dieser Prozess wird als Querbrückenzyklus bezeichnet und führt gemäß der Gleitfilamenttheorie zum Ineinandergleiten der Filamente und damit zur Verkürzung des Sarkomers. Auf Ebene des gesamten Muskels, kommt es dadurch zur Kontraktion.

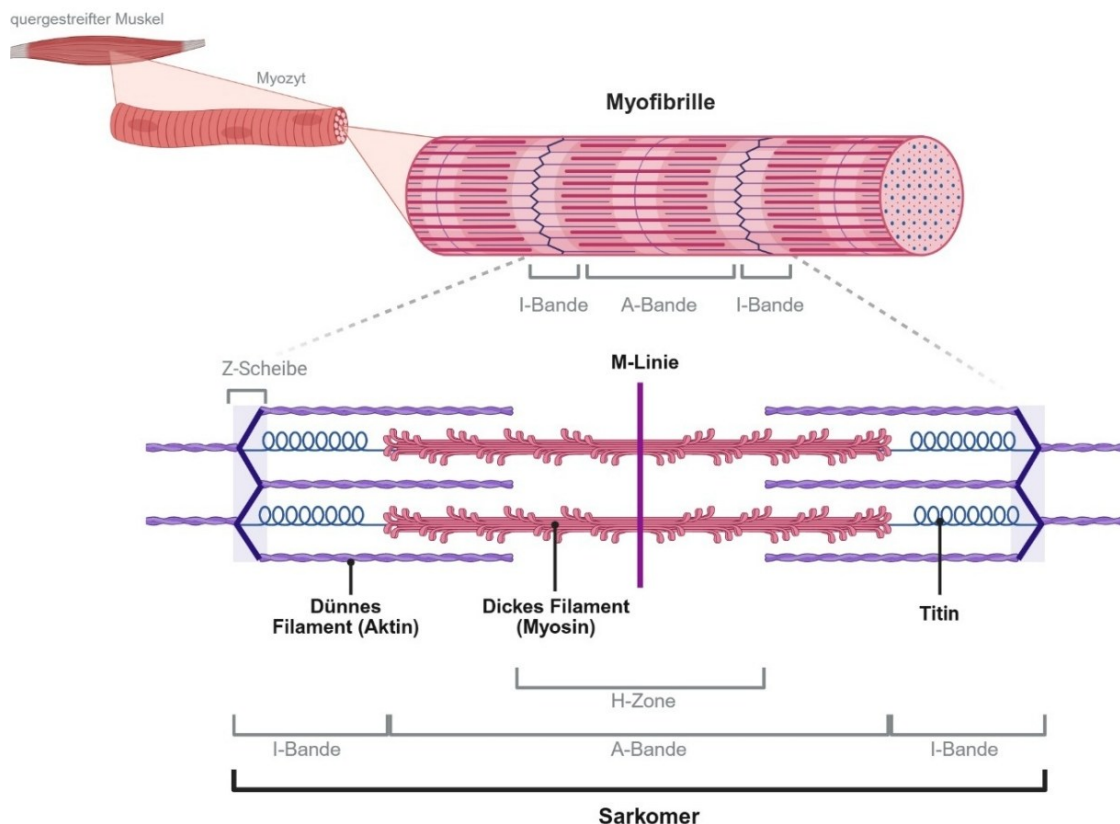


Abb. 2: Aufbau eines Sarkomers

Dargestellt ist der Aufbau des Sarkomers, der kleinste kontraktile Einheit in der quergestreiften Muskulatur, durch den das charakteristische lichtmikroskopische Bandenmuster entsteht. Viele hintereinander geschaltete Sarkomere bilden eine Myofibrille. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

1.3 Titin

Neben Aktin und Myosin, ist auch Titin ein wesentlicher Bestandteil der Sarkomere mit zahlreichen Funktionen (Krüger and Linke, 2011, Linke and Hamdani, 2014). In den folgenden Abschnitten wird näher auf den Aufbau, die Funktionen und die Besonderheiten dieses Proteins eingegangen.

1.3.1 Aufbau

Titin ist das größte monomere Protein im menschlichen Körper (Linke, 2008), welches zwischen M-Band und Z-Linie gespannt, eine Länge von 1 μm überbrücken kann (Fürst et al., 1988, Maruyama, 1994). Je nach Isoform weist Titin dabei ein Molekulargewicht von 3-3,7 MDa auf (Krüger and Linke, 2011, Freiburg et al., 2000). Für die Expression des kardialen Proteins existiert nur ein Gen mit insgesamt 363 Exons, welche für 38.138 Aminosäuren kodieren (Bang et al., 2001). Dieses Gen befindet sich bei Säugetieren auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (Labeit et al., 1990). Durch alternatives Spleißen können aus diesem Gen verschiedene muskelspezifische Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen (Krüger and Kötter, 2013).

In der Grundstruktur kann Titin in vier Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt werden: Die Z-Scheibe, die I-Band-Region, die A-Band-Region und die M-Band-Region (Abb. 3).

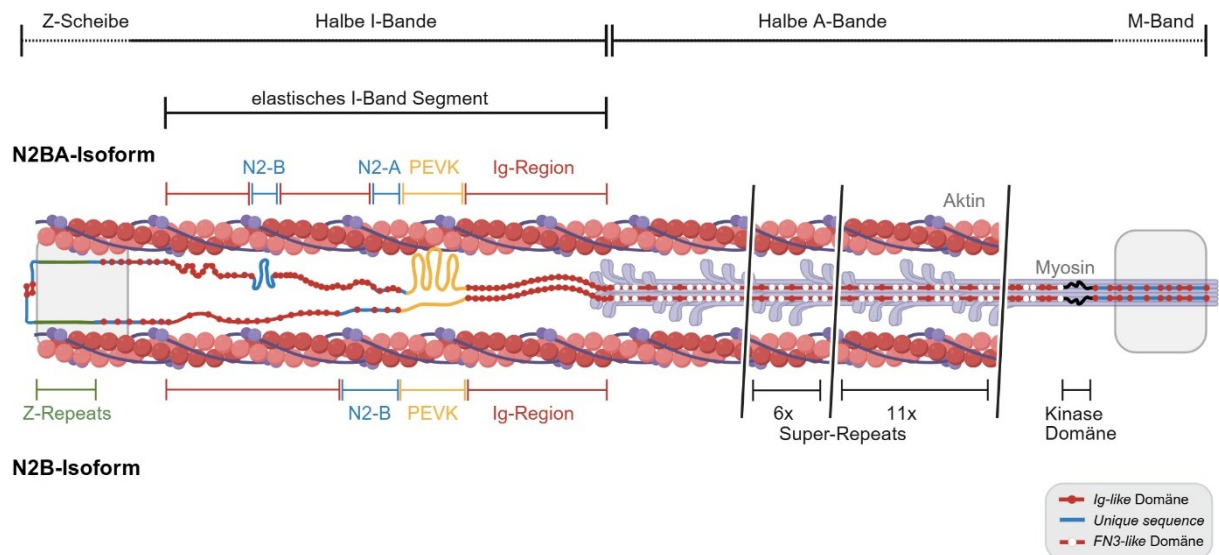


Abb. 3: Schematischer Aufbau der N2BA-Isoform und der N2B-Isoform von Titin (angelehnt an (Krüger and Linke, 2011) und (Kötter et al., 2014))

Titin erstreckt sich als sarkomerisches Protein vom M-Band bis zur Z-Scheibe und interagiert dabei mit vielen weiteren Proteinen. Die verschiedenen Regionen von Titin weisen dabei sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Funktion Unterschiede auf. Durch alternatives Spleißen entstehen zudem verschiedene Isoformen, die sich unter anderem in der Zusammensetzung der I-Band-Region voneinander unterscheiden. Hier ist der Aufbau der herzspezifischen Isoformen N2BA und N2B dargestellt, welche in ihren elastischen Eigenschaften variieren. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

N-Terminal ist Titin in die **Z-Scheibe** des Sarkomers verankert (Labeit and Kolmerer, 1995) (Abb. 3). In diesem Bereich setzt sich Titin aus 9 Ig-Domänen und *unique sequences* (Linke, 2008) sowie einer variierenden Menge *Z-Repeats* zusammen (Labeit and Kolmerer, 1995, Gautel et al., 1996). Titin interagiert im Bereich der Z-Scheibe mit zahlreiche Proteine (Witt et al., 2006, Labeit et al., 2006, Linke, 2008). darunter auch mit Aktin, wodurch es an dieser Stelle nicht dehnbar ist (Linke et al., 1997, Trombitas and Granzier, 1997).

Ungefähr 100 nm vom Zentrum der Z-Scheibe entfernt, schließt sich die **elastische I-Band-Region** von Titin an (Abb. 3), welche als molekulare Feder wirkt (Krüger and Linke, 2011). Vor allem in diesem Bereich kommt es durch alternatives Spleißen zu isoformenspezifischen Unterschieden. Im adulten Herzen werden dabei vorrangig die N2B-Isoform und die N2BA-Isoform in einem speziesspezifisch variierenden Verhältnis exprimiert (Freiburg et al., 2000). In der Nähe der Z-Scheibe und angrenzend an den A-Band-Anteil, enthält die I-Band-Region beider Isoformen Tandem-Ig-Domänen (Labeit and Kolmerer, 1995). Auf die Ig-Domänen im Bereich der Z-Scheibe, folgt bei beiden Isoformen das N2B-Segment, welches einen 572 Aminosäuren langen, elastischen Abschnitt namens N2B *unique sequence* (**N2Bus**) enthält (Linke, 2008, Linke et al., 1999, Leake et al., 2006, Li et al., 2002). In der N2BA-Isoform befindet sich im Anschluss an eine mittlere Ig-Domäne, das N2A-Segment (Linke and Grutzner, 2008). In beiden Isoformen folgt ein elastischer Sequenzabschnitt variierender Länge, welcher zu 70% aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) besteht und aus diesem Grund als **PEVK-Domäne** bezeichnet wird (Labeit and Kolmerer, 1995). Innerhalb der I-Band-Region befinden sich damit insgesamt drei seriell angeordnete elastische Elemente – dies sind die poly-Ig-Regionen, die PEVK-Domäne und die N2Bus (Linke et al., 1999).

Die **A-Band-Region** (Abb. 3) von Titin wird sowohl im Herzen als auch im Skelett konstitutiv exprimiert (Krüger and Linke, 2011, Tskhovrebova and Trinick, 2010). Mehr als die Hälfte des gesamten Titinmoleküls ist in diesem Bereich über die Fibronectin-Typ-III-Domänen fest an Myosin gebunden und daher nicht beweglich (Tskhovrebova and Trinick, 2004, Labeit et al., 1997). Titin besteht in der A-Band-Region vor allem aus Ig-Domänen und FN3-Domänen, welche sich in einem speziellen Muster wiederholen. Der sieben Domänen lange *super repeat* wiederholt sich dabei sechs Mal und der elf Domänen lange *super repeat* elf Mal (Tskhovrebova and Trinick, 2004, Labeit and Kolmerer, 1995, Tskhovrebova et al., 2010). Nach der *Molecular-Ruler*-Theorie wird vermutet, dass die A-Band-Region von Titin aufgrund des speziellen Aufbaus wichtige Funktionen bei der Assemblierung der Myosinfilamente übernimmt (Labeit et al., 1992, Krüger and Linke, 2011).

In der Nähe des **M-Bandes** befindet sich die konstitutiv exprimierte autoinhibierte Titin-Kinase-Domäne (TK) (Krüger and Linke, 2011). Diese kann durch Dehnung aktiviert werden, sodass sie im Sarkomer die Aufgabe eines Mechanosensors übernimmt (Puchner et al., 2008). Der

C-terminale Bereich von Titin befindet sich im M-Band und setzt sich aus einer Reihe von Ig-Domänen und *unique sequences* zusammen (Bang et al., 2001, Obermann et al., 1996).

1.3.2 Funktionen

Titin übernimmt in Muskelzellen viele verschiedene Aufgaben. So fungiert es in den Sarkomeren der quergestreiften Skelettmuskulatur als Gerüstprotein, welches die **strukturelle Integrität** aufrechterhält (Tskhovrebova and Trinick, 2004). Titin sichert zudem die zentrale Position der Myosinfilamente im Sarkomer, indem es eine elastische Verbindung zwischen diesen und der Z-Scheibe herstellt (Tskhovrebova and Trinick, 2004, Linke, 2018, Granzier and Labeit, 2004).

Außerdem wirkt Titin als *molecular blueprint* für die **Assemblierung** sarkomerischer Strukturen. In diesem Zusammenhang trägt es zur exakten Anordnung und zur korrekten Länge der Myosinfilamente bei (Whiting et al., 1989). Darüber hinaus wird auch ein Einfluss auf die Assemblierung der Aktinfilamente vermutet (Wang and Wright, 1988).

Titin ist zudem ein **Knotenpunkt unterschiedlicher Signalwege** (Krüger and Linke, 2011). Es trägt beispielsweise über mehrere Mechanismen zum Hypertrophie-Signaling bei (van der Pijl et al., 2018, Krüger and Kötter, 2016). Außerdem wird Titin eine wichtige Rolle in den Signalprozessen der sarkomerischen Proteinqualitätskontrolle zugeschrieben (Kötter et al., 2014). Des Weiteren kann Titin als **Mechanosensor** fungieren, der unterschiedliche biomechanische Signale erfassen kann (Miller et al., 2004, Lange et al., 2005).

Eine ebenfalls bedeutende Funktion von Titin ist die als **molekulare Feder**. Titin ist maßgeblich an den passiven Rückstellkräften und der passiven Steifheit der Muskulatur beteiligt (Kötter et al., 2014). Entscheidend dafür sind die seriell angeordneten elastischen Elemente in der I-Band-Region, welche sich durch Zug reversibel dehnen (Linke et al., 1996, Li et al., 2002, Koser et al., 2019). Gemeinsam mit Kollagen wirkt Titin durch die passiven Rückstellkräfte der sarkomerischen Dehnung entgegen und bestimmt damit die maximale physiologische Sarkomerlänge (Granzier and Labeit, 2004). Im Herzen nimmt Titin so entscheidenden Einfluss auf die Füllung der Ventrikel in der Diastole (Krüger and Kötter, 2013). Nach der diastolischen Dehnung unterstützt Titin in der Systole durch die elastischen Rückstellkräfte die aktive Muskelkontraktion (Opitz et al., 2003). Zudem beeinflusst Titin die längenabhängige Calciumsensitivierung und spielt damit eine Rolle im Frank-Starling-Mechanismus (Fukuda and Granzier, 2005, Linke, 2018).

1.3.3 Modulation der passiven Steifigkeit

In der Rolle als molekulare Feder ist Titin keineswegs starr und unveränderlich. Durch unterschiedliche kurzfristige und mittel- bis langfristige Mechanismen, passt es sich den Gegebenheiten und Bedingungen an. Diese Modulationsmechanismen der passiven Steifigkeit werden im Folgenden näher erläutert.

1.3.3.1 Isoformen

Die verschiedenen Titinisoformen unterscheiden sich maßgeblich in der I-Band-Region und differieren daher vor allem in ihrer passiven Steifigkeit und ihren elastischen Eigenschaften (Freiburg et al., 2000). Im Herzen werden die Isoformen N2B und N2BA in einem speziesspezifischen Verhältnis koexprimiert (Cazorla et al., 2000, Freiburg et al., 2000). Diese Koexpression ist bis auf die Ebene einzelner Halbsarkomere vorzufinden, da beide Isoformen hier nebeneinander vorhanden sind (Granzier and Labeit, 2004). Die N2B-Isoform ist insgesamt kürzer und steifer, während die N2BA-Isoform länger und dehnbarer ist (Cazorla et al., 2000, Freiburg et al., 2000). Das Isoformenverhältnis im gesunden menschlichen Herzen beträgt ungefähr 70% N2B zu 30% N2BA (Neagoe et al., 2002). Kleinere Säugetiere, wie Ratten, exprimieren im Herzen fast ausschließlich die N2B-Isoform (Freiburg et al., 2000). In dieser Arbeit wurde mit adulten Rattenkardiomyozyten aus Ventrikeln gearbeitet, sodass die N2B-Isoform dominierte.

Über Zeiträume von Tagen bis Wochen kann es im Rahmen unterschiedlicher physiologischer und pathologischer Vorgänge zu Veränderungen des Isoformenverhältnis und somit der passiven Steifigkeit des Herzens kommen (Linke and Hamdani, 2014). Zu den physiologischen Prozessen dieser Art gehört im Herzen der perinatale Isoformenswitch von fetalen, längeren und dehnbareren Isoformen hin zu den adulten, kürzeren und steiferen Isoformen (Granzier and Labeit, 2004, Opitz et al., 2004). Auch im Laufe verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen kann sich das Isoformenverhältnis verändern (Neagoe et al., 2002, Makarenko et al., 2004).

1.3.3.2 Posttranslationale Modifikationen der I-Band-Region

Neben der Zusammensetzung und dem Verhältnis verschiedener Isoformen gibt es weitere kurzfristige Mechanismen, welche Einfluss auf die elastischen Eigenschaften von Titin nehmen können. Dabei spielen Phosphorylierungen im Bereich der N2Bus und PEVK-Domäne im I-Band eine entscheidende Rolle.

Sowohl für den konstitutiv exprimierten Anteil der PEVK-Region als auch für die N2Bus sind mehrere Stellen bekannt, die durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden können (Abb. 4) (Hamdani et al., 2017). Dabei führen die Phosphorylierungen der beiden elastischen Federelemente zu gegensätzlichen Einflüssen auf die mechanischen Eigenschaften des Titinfilaments. Die Phosphorylierung der N2Bus trägt zur reduzierten passiven Steifigkeit von Titin bei, wohingegen die Phosphorylierung im Bereich der PEVK-Domäne eine erhöhte passive Steifigkeit zur Folge hat (Hudson et al., 2010, Hidalgo and Granzier, 2013). Nach aktuellen Theorien hängt der Effekt der Phosphorylierung von der Gesamtladung der Aminosäuresequenz des zu phosphorylierenden Bereichs ab. Die N2Bus hat durch viele negativ geladene, saure Aminosäuren einen niedrigen isoelektrischen Punkt. Werden in diesen Bereich negativ geladene Phosphatgruppen hinzugefügt, führen elektrostatische

Abstoßungskräfte zu einer Auflockerung des Moleküls und damit zu einer erhöhten Dehnbarkeit. Die PEVK-Region beinhaltet viele basische Aminosäuren und hat somit eine positive Gesamtladung mit höherem Isoelektrischen Punkt. Werden hier negativ geladene Phosphatgruppen eingefügt, kommt es durch elektrostatische Anziehung zur Verdichtung in dem Abschnitt des Moleküls und damit zu einer erhöhten passiven Steifigkeit (Kötter et al., 2013). In Abhängigkeit von der Kinase und dem Ort der Phosphorylierung, kann dieser schnelle Anpassungsmechanismus die mechanischen Eigenschaften je nach Erfordernissen also in beide Richtungen beeinflussen. Dies führt zu der Annahme, dass diese posttranslationalen Titinmodifikationen eine Feinjustierung der passiven Steifigkeit ermöglichen (Kötter et al., 2013).

Die **PEVK-Region** wird durch zwei Kinasen phosphoryliert – erstens durch die Proteinkinase Cα (PKCα) und zweitens durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IIδ (CAMKIIδ) (Abb. 4) (Hamdani et al., 2017). Die **PKCα** ist eine herzspezifische Isoform, welche Titin an den hochgradig konservierten und konstitutiv exprimierten Serinresten S12022 und S11878 phosphorylieren kann (Hidalgo et al., 2009). PKCα ist Teil der Inositol-Phospholipid-Signalkaskade und kann nach Aktivierung, beispielsweise durch α1-adrenerge Stimulation oder Insulin (Hidalgo and Granzier, 2013, Hopf et al., 2018), Serin- und Threoninreste bestimmter Proteine phosphorylieren (Murphy and Frishman, 2005, Maltsev et al., 2021). Der PKCα-Signalweg ist der erste und bisher einzig bekannte, welcher durch Phosphorylierung zu einer Steigerung der passiven Steifigkeit von Titin führt (Hidalgo et al., 2009, Hudson et al., 2010, Hamdani et al., 2017, Anderson et al., 2010). Bei der **CAMKIIδ** handelt es sich ebenfalls um eine herzspezifische Isoform, die durch Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert wird (Couchonnal and Anderson, 2008). Diese Serin/Threonin-Kinase kann ebenfalls S12022 und S11878 phosphorylieren und bevorzugt dabei die Stelle S12022 (Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013) (Abb. 4). Zudem phosphoryliert die CAMKIIδ auch Stellen der **N2Bus** (S3750, S4209, S4062) (Hidalgo et al., 2013, Hamdani et al., 2013). Insgesamt kommt es durch die Titinmodifikationen dieser Kinase zu einer reduzierten passiven Steifigkeit, da die Effekte in der N2Bus-Region überwiegen (Perkin et al., 2015, Hamdani et al., 2013). Neben der CAMKIIδ wird N2Bus, wie Abb.4 zeigt, durch die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase G (PKG) und die *extracellular-signal regulated* Kinase 2 (ERK2) phosphoryliert (Linke and Hamdani, 2014). Die **PKA** kann durch β-adrenerge Stimulation cAMP-vermittelt aktiviert werden (Yamasaki et al., 2002, Krüger and Linke, 2006). Die Phosphorylierung durch PKA reduziert ebenfalls die passive Steifigkeit (Yamasaki et al., 2002, Krüger and Linke, 2006, Fukuda et al., 2005). **ERK2** ist eine Effektor-Kinase des MAPK-Wegs, welche Stellen der N2Bus phosphorylieren kann. Allerdings zeigte sich dadurch bisher nur ein geringer Effekt auf die passive Steifigkeit (Perkin et al., 2015, Raskin et al., 2012, Hidalgo and Granzier, 2013). Die cGMP-abhängige **PKG** kann durch Stickstoffmonoxid (NO) und natriuretische Peptide

aktiviert werden und durch Phosphorylierung der N2Bus zu einer reduzierten passiven Steifigkeit beitragen (Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2013).

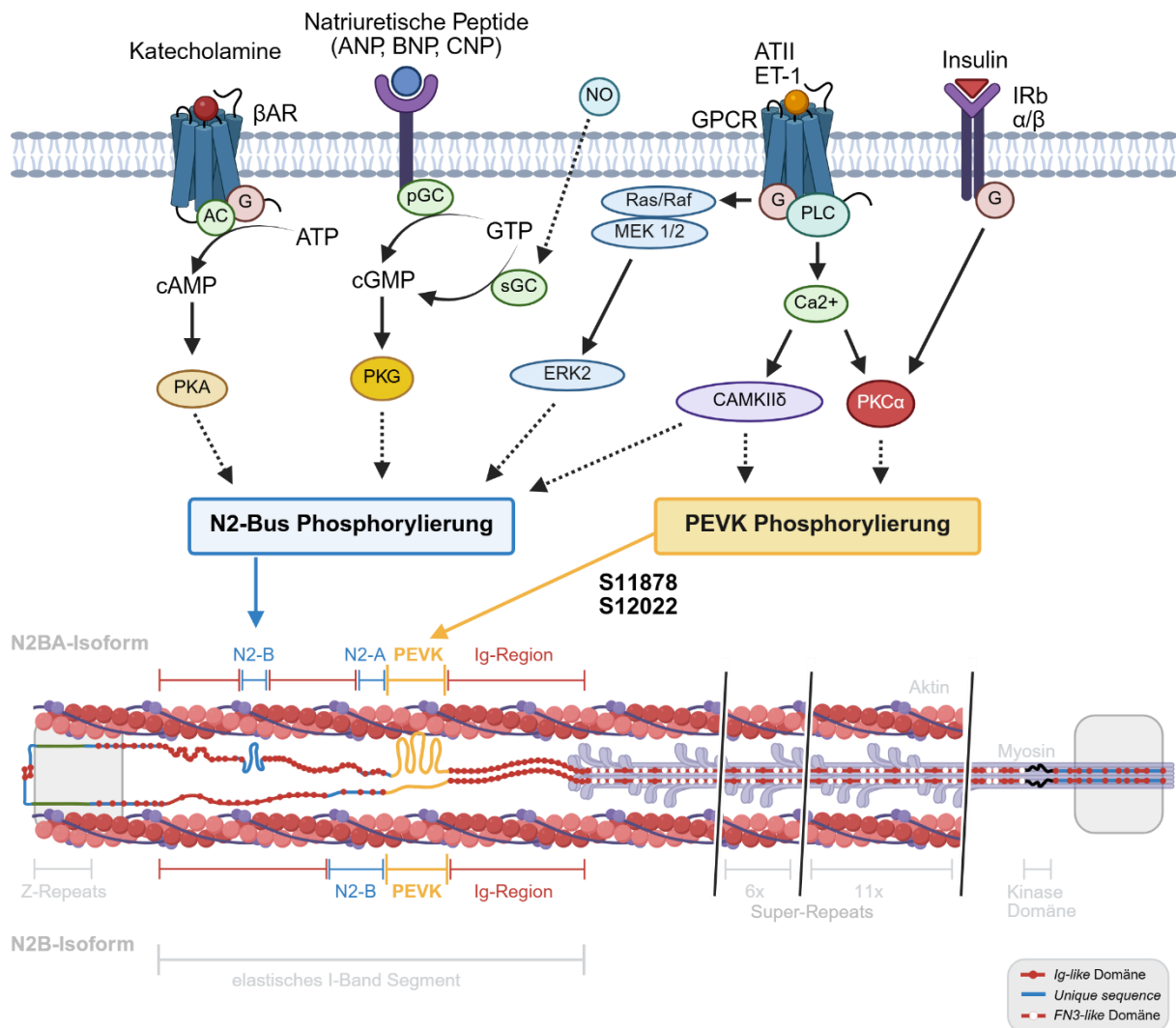


Abb. 4: Signalwege zur posttranslationalen Titinphosphorylierung in der I-Band-Region (angelehnt an (Krüger, 2015), (Krüger and Linke, 2011) und (Kötter et al., 2014))

Dargestellt sind die Signalwege, welche Titin posttranslational durch Phosphorylierungen modifizieren und damit Einfluss auf die passive Steifigkeit nehmen. Dabei unterscheiden sich die Phosphorylierungsstellen und die Auswirkungen auf die passive Steifigkeit je nach Signalweg bzw. Kinase. Eine Phosphorylierung in der N2Bus ist durch PKA, PKG, ERK 2 und CAMKIIδ möglich, während die PEVK-Region durch CAMKIIδ und durch PKCα phosphoryliert werden kann. Wichtige Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region, welche auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind: S11878 und S12022. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich das Phosphorylierungsmuster von Titin auch während eines Myokardinfarkts in bestimmten Bereichen des Herzens verändert. Dabei zeigte sich unter anderem eine gesteigerte Phosphorylierung der PEVK-Region an den Stellen S12022 und S11878 und eine damit einhergehende Steigerung der passiven Steifigkeit. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus in der Frühphase nach einem Infarkt zur Aufrechterhaltung der Ventrikelintegrität bis zur Ausbildung einer Narbe beiträgt (Kötter et al., 2016).

1.4 Proteinqualitätskontrolle

Für die kardiale Funktion ist die Aufrechterhaltung der sarkomerischen Strukturen durch kontinuierliche Proteinqualitätskontrolle (PQC) mit Degradation und Synthese von Proteinen essenziell (Martin and Kirk, 2020). Diese eng aufeinander abgestimmten Aufbau- und Abbauvorgänge finden während der kontinuierlichen Kontraktion des Herzens statt und ermöglichen unter anderem eine Anpassung an Stressoren, sowie die Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des kontraktilen Systems (Willis et al., 2009). Wesentliche Bestandteile des Netzwerks zur Proteinqualitätskontrolle sind das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das Autophagosomen/Lysosomen-System und verschiedene Proteasen, wie die Matrixmetalloprotease 2 und Calpaine (Kötter and Krüger, 2022, Pohl and Dikic, 2019).

1.4.1 Ubiquitinierung von Proteinen

Als ersten Schritt der Proteindegradation werden abzubauen Proteine oder Komplexe durch Polyubiquitin-Ketten für den Abbau markiert. Ubiquitin ist ein konserviertes Protein, welches aus 76 Aminosäuren besteht (Kötter and Krüger, 2022, Rogov et al., 2014). Im Rahmen einer mehrschrittigen ATP-abhängigen enzymatischen Reaktion kann Ubiquitin auf das Zielsubstrat übertragen werden (Abb. 5) (Pohl and Dikic, 2019). An diesem Prozess sind drei Enzymgruppen beteiligt: das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1), das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3) (Wang et al., 2011, Hershko et al., 1983).

Zu Beginn der Reaktionskaskade aktiviert E1 unter ATP-Verbrauch Ubiquitin. Aktuell sind für den Menschen zwei Ubiquitin-aktivierende Enzyme bekannt (Pohl and Dikic, 2019). Im Rahmen der Aktivierung wird der C-Terminus von Ubiquitin über eine Thioester-Verbindung an E1 gebunden (Abb. 5). Im weiteren Verlauf wird das aktivierte Ubiquitin dann auf E2 übertragen (Berndsen and Wolberger, 2014). Dieses unterstützt den Transport von Ubiquitin zum Substrat (Nandi et al., 2006). Aktuell sind mehr als 50 verschiedene Ubiquitin-konjugierende Enzyme bekannt (Pohl and Dikic, 2019). Die E3-Ligase bindet selektiv ein bestimmtes Substrat sowie das mit Ubiquitin beladene konjugierende Enzym und katalysiert die Übertragung von Ubiquitin auf das Zielprotein (Abb. 5). Dabei kann Ubiquitin an einen Lysinrest oder an den N-Terminus des Substrates binden. Aktuell sind mehrere hundert verschiedene substratspezifische E3-Ligasen bekannt, die anhand ihrer strukturellen Eigenschaften und ihres Reaktionsmechanismus in drei Klassen eingeteilt werden können: Die RING-Familie (*Really Interesting New Gene*), die HECT-Familie (*Homologous to E6AP C-Terminus*) und die RBR-Familie (*RING-between-RING*) (Berndsen and Wolberger, 2014, Li et al., 2008).

Eine Polyubiquitinierung entsteht, wenn dieser Prozess mehrfach wiederholt wird, wobei entweder weitere Ubiquitinmoleküle an ein bereits gebundenes Ubiquitin angefügt werden oder direkt eine Polyubiquitinkette an das Substrat gekoppelt wird (Wang et al., 2011). Dabei kann die Bindung an jeden der sieben Lysin-Reste von Ubiquitin erfolgen, sodass variierende

Polyubiquitinketten entstehen (Berndsen and Wolberger, 2014). Aus den daraus resultierenden variierenden Polyubiquitinketten, ergeben sich unterschiedliche Effekte auf das gebundene Substrat. So erfolgt ein proteasomaler Abbau voranging von Proteinen, welche mit einer K48-verbundenen Polyubiquitinkette markiert sind (Wang et al., 2011). Der Abbau über das autophagosomal-lysosomale System wird vor allem bei Substraten eingeleitet, welche mit K63-verbundenen Polyubiquitinketten markiert sind (Tan et al., 2008, Ji and Kwon, 2017). Die Ubiquitinierung von Substraten kann durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) wieder rückgängig gemacht werden (Trulsson et al., 2022, Rogov et al., 2014).

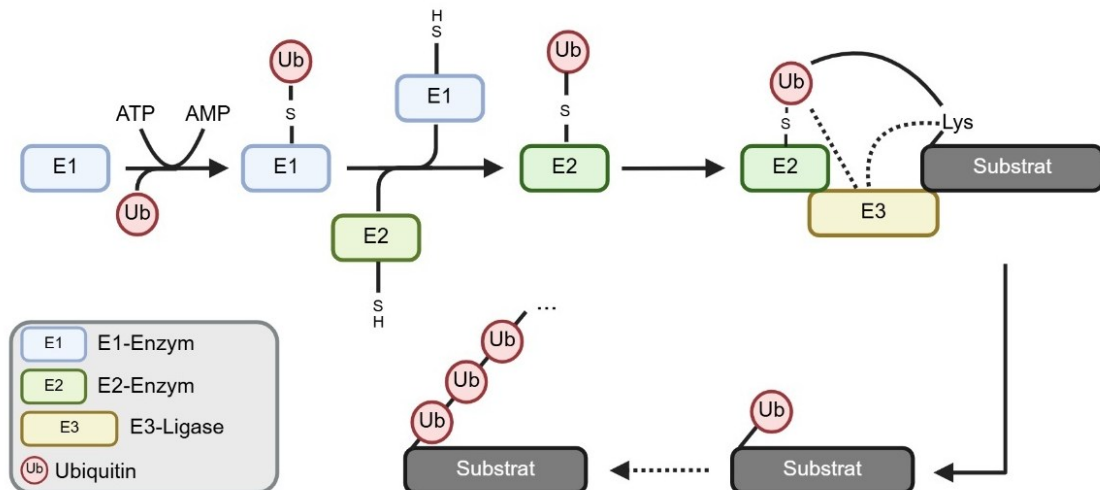


Abb. 5: Ubiquitinierung von Proteinen (angelehnt an (Kötter and Krüger, 2022))

Proteine können durch Ubiquitinierung für den proteasomalen oder autophagosomal-lysosomalen Abbau markiert werden. Dafür wird unter ATP-Verbrauch Ubiquitin an E1 gebunden. Daraufhin wird Ubiquitin auf E2 übertragen, welches den Transport zum Substrat unterstützt. Eine E3-Ligase überträgt Ubiquitin von E2 auf ein spezifisches Substrat. Dieser Prozess kann mehrfach wiederholt werden, sodass eine Polyubiquitinkette resultiert. Der weitere Substratabbau hängt davon ab, über welche Lysin-Reste die Polyubiquitinketten verbunden sind. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

1.4.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Das 26S-Proteasom ist ein großer Proteinkomplex, welcher in eukaryotischen Zellen für die Proteindegradation zuständig ist. Im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle baut das Proteasom beschädigte und fehlgefaltete Proteine ab und stellt die entstandenen Abbauprodukte für weitere Syntheseprozesse zur Verfügung (Bard et al., 2018, Nandi et al., 2006). Das 26S-Proteasom ist 2,5 MDa groß und besteht aus einer zylindrischen 20S-Untereinheit, in der die Proteolyse abläuft, sowie bis zu zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten, welche polyubiquitinierte Proteine binden und in die katalytische 20S-Kammer leiten können (Abb. 6) (Grice and Nathan, 2016). Für den proteasomalen Abbau ist in den meisten Fällen eine Polyubiquitinmarkierung erforderlich, die aus mindestens vier über Lysin-48 verknüpften Ubiquitinmolekülen besteht (Willis and Patterson, 2006).

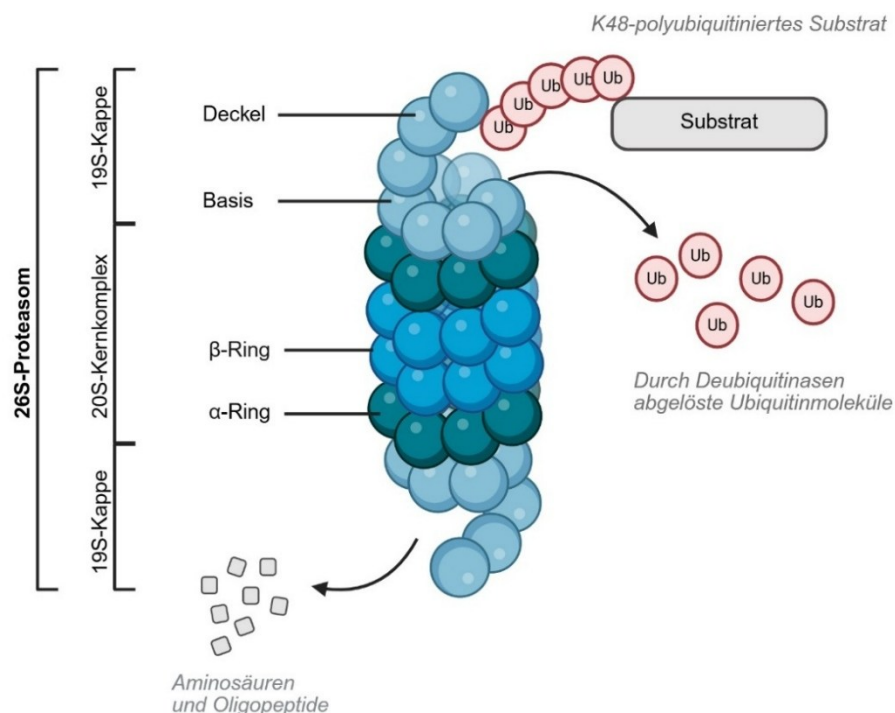


Abb. 6: Substratabbau über das 26S-Proteasom (angelehnt an (Kötter and Krüger, 2022))

Abgebildet ist der Substratabbau eines K48-polyubiquitinierten Proteins durch das 26S-Proteasom. Dazu bindet das ubiquitinmarkierte Substrat an den Deckel der 19S-Kappe und wird an der Basis der 19S-Einheit entfaltet. Daraufhin kann der Abbau in einzelne Aminosäuren und Oligopeptide im 20S-Kernkomplex durch verschiedene proteolytisch aktive Einheiten erfolgen. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Die ca. 700 kDa große **20S-Untereinheit** setzt sich aus vier axial angeordneten heptameren Ringen zusammen, die einen zentralen Tunnel bilden (Abb. 6). Zwei β-Ringe bilden dabei die katalytische Kammer, in welcher der Substratabbau stattfindet (Orlowski and Wilk, 2000, Wang et al., 2011). Die α-Ringe stellen durch eine verschließbare Pore eine Barriere zwischen dem Zytosol und dem proteolytischen Zentrum her. (Nandi et al., 2006, Bard et al., 2018, Wang et al., 2011). Die **19S-Untereinheiten** bestehen aus einer Basis und einem Deckel (Abb. 6). Der Deckel beinhaltet Ubiquitinrezeptoren zur Bindung von Polyubiquitinketten und

Deubiquitinasen zur Entfernung der Ubiquitinierung vor Aufnahme des Proteins (Nandi et al., 2006, Bard et al., 2018). Die Basis besteht aus 6 RTP-Proteinen, welche Energie für die Entfaltung der abzubauenen Proteine bereitstellen, damit die Passage durch die schmale Öffnung des α -Ringes möglich ist (Bard et al., 2018, Orlowski and Wilk, 2000).

Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) während eines Myokardinfarkts ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Beteiligung des Proteasoms an der Aktivierung der infarktassoziierten Inflammationsreaktion durch Abspaltung des NF κ B-Inhibitors I κ B wird beschrieben (Wang and Hill, 2015, Pye et al., 2003, Stansfield et al., 2007). Allerdings scheint das Proteasom durch erhöhten oxidativen Stress und daraus resultierenden oxidativen Modifikationen in seiner Funktion eingeschränkt zu werden (Bulteau et al., 2001, Powell et al., 2005, Tian et al., 2012). Zudem ist die Datenlage zum Effekt einer externen Proteasominhibition während eines Infarkts uneindeutig. In einigen tierexperimentellen Studien zeigte sich durch proteasomale Inhibition ein kardioprotektiver Effekt (Wang and Hill, 2015, Pye et al., 2003, Stansfield et al., 2007). Im Gegensatz dazu kam es in einem anderen I/R-Modell unter Proteasominhibition zu einer gesteigerten Apoptose der Kardiomyozyten und einem größeren I/R-bedingten Schaden (Tian et al., 2012).

1.4.3 Autophagosomal-lysosomales System

Als Autophagie wird ein kataboler Prozess bezeichnet, bei dem intrazelluläre Bestandteile zum Lysosom transportiert und dort abgebaut werden. Insgesamt handelt es sich bei der Autophagie um einen über verschiedene Spezies konservierten Prozess (Ravikumar et al., 2010, Pankiv et al., 2007). Dabei können drei Arten der Autophagie unterschieden werden: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie (Rogov et al., 2014, Gatica et al., 2015, Ravikumar et al., 2010). In dieser Arbeit soll ausschließlich die Makroautophagie näher betrachtet und thematisiert werden, sodass im Folgenden mit Autophagie die Makroautophagie gemeint ist.

Der Ablauf der Makroautophagie kann in mehrere Stadien unterteilt werden, an denen jeweils verschiedene Proteine und Komplexe beteiligt sind (Abb. 7). Bisher sind über 30 mitwirkende Atg-Gene bzw. Proteine bekannt (Sciarretta et al., 2018, Gatica et al., 2015). In einem ersten Schritt werden die Substrate von einer Doppellipidmembran, der sogenannten Phagophore umgeben (Abb. 7). Für die **Initiation** der Formation einer Phagophore ist ein makromolekularer Komplex von Bedeutung. Der ULK1/2ATG13-FIP200-Komplex – bestehend aus ULK1 oder ULK2, Atg13, Atg101 und FIP200 – kann die Formation der Isolationsmembran induzieren (Ravikumar et al., 2010, Johansen and Lamark, 2011, Rogov et al., 2014, Jung et al., 2009). Daneben ist für die Initiation der Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex notwendig, der sich aus Beclin 1, Atg14L und den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Untereinheiten Vps34 und Vps15 zusammensetzt. Dieser Komplex führt zur Bildung von Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P), welches für die Rekrutierung weiterer Atg-Proteine

notwendig ist (Ravikumar et al., 2010, Rogov et al., 2014, Johansen and Lamark, 2011). Im Verlauf kommt es zur **Expansion und Reifung** der Isolationsmembran. Dabei spielt auch ein Komplex aus Atg12, Atg5 und Atg16L eine Rolle (Gatica et al., 2015, Ravikumar et al., 2010). Dieser Komplex ist unter anderem an der Konjugation von Phosphatidylethanolamin an LC3-I beteiligt, wodurch LC3-II entsteht. Dieses wird an die innere und äußere Membran der Phagophore gebunden und schließt die Reifung ab (Kabeya et al., 2000, Sciarretta et al., 2018, Levine and Kroemer, 2008) (Abb. 7). Sobald die Enden der Isolationsmembran fusionieren und die abzubauenen Substrate vollständig umschlossen sind, wird das Doppelmembran-Vesikel als **Autophagosom** bezeichnet (Ravikumar et al., 2010). Dieses wird mithilfe des Dynein-Motor-Komplex entlang der Mikrotubuli zu Lysosomen transportiert (Kimura et al., 2008), sodass eine **Fusion** mit diesen unter Beteiligung von Atg 14 und SNARE-Proteinen erfolgen kann (Diao et al., 2015). Sobald ein Lysosom mit dem Autophagosom fusioniert ist, werden die Inhalte des **Autolysosoms** einschließlich der inneren Membran durch lysosomale Hydrolasen degradiert (Abb. 7). Die dabei entstehenden Aminosäuren werden für die Wiederverwertung ins Zytoplasma transportiert (Gatica et al., 2015, Mizushima et al., 2008).

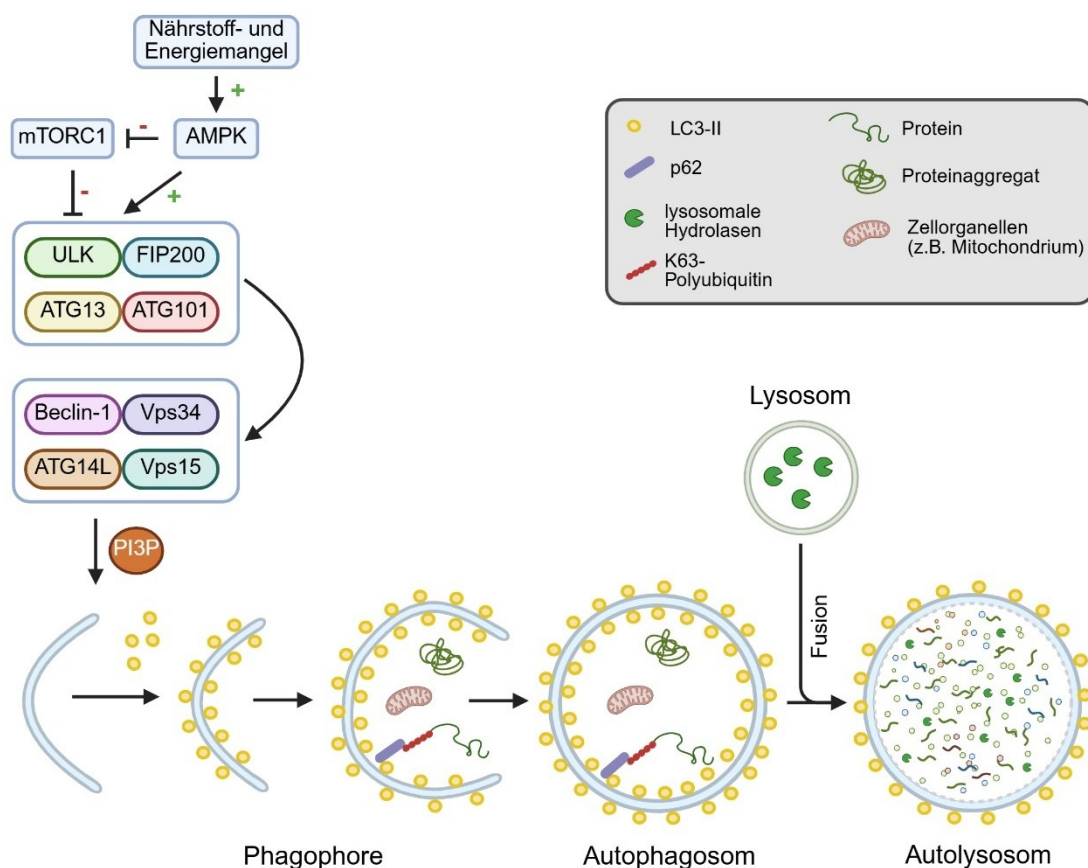


Abb. 7: Degradation zellulärer Bestandteile durch Autophagie
(angelehnt an (Kötter and Krüger, 2022))

Schematische Darstellung der Substratdegradation durch Makroautophagie. Unter Beteiligung mehrerer Proteine und Komplexe kommt es zur Ausbildung einer Phagophore. Nachdem diese die abzubauenen Substrate vollständig umschlossen hat, wird das Doppelmembran-Vesikel als Autophagosom bezeichnet. Im Anschluss erfolgt durch Fusion mit einem Lysosom die Bildung des Autolysosoms. Der Inhalt des Autolysosoms wird daraufhin durch lysosomale Hydrolasen degradiert und dabei entstehende Aminosäuren werden ins Zytoplasma transportiert. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Im Unterschied zum Proteasom können über das autophagosomal-lysosomale System auch größere Proteine, Aggregate und ganze Zellorganellen abgebaut werden, da sich das Autophagosom der Größe der Substrate anpassen kann. Unter Basalbedingungen ist die Autophagie durch den Abbau defekter Proteine, Aggregate und Organellen, ein wichtiger Bestandteil der **Proteinqualitätskontrolle** (Rogov et al., 2014, Levine and Kroemer, 2008). So trägt Autophagie vor allem auch in den differenzierten, postmitotischen Kardiomyozyten durch den kontinuierlichen *Turnover* zur Homöostase und somit zur Sicherstellung der Funktionalität der Zellen bei (Nakai et al., 2007, Levine and Kroemer, 2008). Im Rahmen der PQC wird eine Selektivität der Autophagie durch Markierung der abzubauenden Substrate mit Polyubiquitinketten gewährleistet (Johansen and Lamark, 2011). An diese können verschiedene Adapterproteine wie NBR1 und p62/SQSTM1 (im Folgenden als p62 bezeichnet) über die Ubiquitin-assoziierte Domäne binden (Waters et al., 2009, Pankiv et al., 2007). Gleichzeitig binden die Adapterproteine mit dem LIR-Motiv an LC3-II, welches sich in der Membran der Phagophore befindet (Pankiv et al., 2007, Rogov et al., 2014). Mit dieser Interaktion wird die Phagophore zu dem polyubiquitinierten Aggregat rekrutiert (Johansen and Lamark, 2011). Im weiteren Verlauf erfolgt dann die Degradation der markierten Zellbestandteile und der Adapterproteine (Pankiv et al., 2007).

Auch bei Nährstoffmangel und in Stresssituationen spielt Autophagie als Überlebensmechanismus eine wichtige Rolle. So können durch Degradation zellulärer Bestandteile Bausteine für die ATP-Synthese und für die *de-novo* Synthese relevanter Proteine zur Adaptation an die Stresssituation bereitgestellt werden (Sciarretta et al., 2018, Rogov et al., 2014, Levine and Kroemer, 2008). Autophagie kann durch unterschiedliche Stressoren verstärkt aktiviert werden, zum Beispiel durch oxidativen, genotoxischen oder metabolischen Stress – darunter Nährstoffmangel, Mangel an Wachstumsfaktoren und Hypoxie (Sciarretta et al., 2018, Levine and Kroemer, 2008). Eine zentrale Rolle spielt dabei die Autophagie-aktivierende-Kinase ULK1, die durch mTORC1 (*mammalian target of rapamycin Complex 1*) und durch AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*) in ihrer Aktivität beeinflusst werden kann (Abb. 7) (Kim et al., 2011, Klionsky et al., 2021). Die Serin/Threonin-Kinase mTOR ist Teil des Multiproteinkomplexes **mTORC1** (Kim et al., 2002, Sciarretta et al., 2014, Shi et al., 2019), einem Regulator verschiedener zellulärer Prozesse und auch einem der wichtigsten Inhibitoren der Autophagie (Sciarretta et al., 2018, Levine and Kroemer, 2008). Bei ausreichendem Nährstoffangebot inhibiert dieser Komplex Autophagie (Levine and Kroemer, 2008). Dafür bindet und phosphoryliert mTORC1 ULK1 am Serinrest Ser757 und hemmt damit dessen Kinaseaktivität, sodass die Initiation der Phagophorenbildung ausbleibt (Kim et al., 2011, Hosokawa et al., 2009, Jung et al., 2009).

Unter Hungerbedingungen und in Abhängigkeit vom zellulären Energiestatus – bei ansteigendem AMP und abfallenden ATP – kann **AMPK** aktiviert werden und im Folgenden Autophagie stimulieren (Sciarretta et al., 2018, Kim et al., 2011, Kahn et al., 2005). Dazu

inhibiert AMPK mTORC1 und phosphoryliert zusätzlich ULK1 an den Stellen Ser317 und Ser777, die zu dessen Aktivierung führen (Kim et al., 2011).

Auch im Rahmen eines **Myokardinfarkts** kann Autophagie sowohl während der Ischämiephase (Decker and Wildenthal, 1980, Matsui et al., 2007, Kanamori et al., 2011), als auch nach Reperfusion (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2018) verstärkt aktiviert werden. In der Ischämiephase des Infarkts mit Nährstoffmangelsituation erfolgt die Autophagieaktivierung vorrangig über eine verstärkte Aktivität von AMPK und damit einhergehender Inhibition von mTORC1 (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2011). Während der Reperfusion verändert sich die metabolische Situation mit plötzlich ansteigendem Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Bildung von ROS. Autophagie wird auch in dieser Phase sogar noch stärker als in der Ischämiephase aktiviert (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2018). Aufgrund des hohen Nährstoffangebots spielt AMPK bei der Aktivierung eher eine untergeordnete Rolle. Es wird stattdessen eine Beteiligung von Beclin-1 an der Autophagieaktivierung, bedingt durch erhöhten oxidativen Stress, vermutet (Matsui et al., 2007, Hariharan et al., 2011, Sciarretta et al., 2011). Die Auswirkungen von Autophagie auf die Kardiomyozyten während eines Myokardinfarkts sind komplex und kontextabhängig (Wang and Hill, 2015, Xu et al., 2015, Sciarretta et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass Autophagie durch Bereitstellung von Energiesubstraten und den Abbau von geschädigten Mitochondrien als Überlebensmechanismus in der ischämischen Phase kardioprotektiv wirkt (Wang and Hill, 2015, Sciarretta et al., 2018, Kanamori et al., 2011, Popov et al., 2023). So konnte unter Autophagieinhibition mittels Bafilomycin A₁ nach permanenter Ligatur der A. interventricularis anterior (LAD) eine vergrößerte Infarktausdehnung festgestellt werden (Kanamori et al., 2011). Gleichzeitig konnte in verschiedenen Modellen ein kardioprotektiver Effekt und eine reduzierte Infarktgröße durch gesteigerte AMPK-vermittelte Autophagie in der Ischämiephase nachgewiesen werden (Mo et al., 2016, Kanamori et al., 2011). Während der Reperfusion wird eher ein negativer Effekt der Autophagie angenommen. So zeigte sich in Mäusen mit heterozygoter Beclin-1-Deletion eine geringere Autophagieaktivität und damit einhergehend eine signifikant geringere Infarktgröße, die auf einen nachteiligen Effekt der Beclin-1-vermittelten Autophagie hindeutet (Matsui et al., 2007). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass es durch die Beclin-1-vermittelte starke Autophagieaktivierung während der Reperfusion vermehrt zu einer speziellen Form des Zelltodes namens Autosis kommt (Shi et al., 2019, Kötter and Krüger, 2022, Liu et al., 2013).

1.4.4 Proteinqualitätskontrolle von Titin

Da Titin hohem mechanischem Stress ausgesetzt ist, spielt die Proteinqualitätskontrolle eine wichtige Rolle für die Sicherstellung der Muskel-Funktionalität. Dabei ist der *Turnover* von Titin durch mehrere Faktoren eine Herausforderung für die Zelle. Zum einen erschwert die Größe und die Einbettung ins Sarkomer dessen Degradation und nachfolgenden Einbau, zum anderen stellt auch die kontinuierliche Kontraktion und Relaxation eine Herausforderung für diese Prozesse dar (Kötter and Krüger, 2022). Nichtsdestotrotz liegt die Halbwertszeit eines Titinmoleküls unter *Baseline*-Bedingungen bei ca. 70 Stunden, sodass von einem kontinuierlichen und dynamischen Auf- und Abbau ausgegangen werden muss (Isaacs et al., 1989, da Silva Lopes et al., 2011). Dabei finden in adulten Kardiomyozyten bestimmte Prozesse des Auf- und Abbaus in gewissen Kompartimenten vermehrt statt. So konnte gezeigt werden, dass die Translation von Titin-mRNA vorrangig im Bereich der Z-Scheibe und des I-Bandes stattfindet (Rudolph et al., 2019). Anders als bislang angenommen konnten Rudolph et al. (2019) zudem zeigen, dass der Einbau von Titin dabei nicht graduell, sondern als Gesamtes und zeitgleich im Bereich der Z-Scheibe und der M-Linie stattfindet (Rudolph et al., 2019). Neben der *de-novo* Synthese von Titin existiert mit einem Pool aus freiem, nicht sarkomerisch gebundenem Titin eine weitere Titinquelle für den dynamischen Einbau ins Sarkomer. Dieser Pool von freiem Titin macht ca. 15% der Gesamtmenge von Titin in der Zelle aus (Rudolph et al., 2019). Insgesamt sind die genauen Abläufe der Titinintegration ins Sarkomer noch Gegenstand der Forschung und auch in Bezug auf den Titinabbau gibt es noch viele offene Fragen. Dabei wird aktuell von einer Beteiligung mehrerer Systeme an der Degradation von Titin ausgegangen (Kötter and Krüger, 2022, Linke and Hamdani, 2014). So wird vermutet, dass verschiedene **Proteasen** am Titinabbau beteiligt sind und durch proteolytische Spaltung eine Art Vorverdau übernehmen können (Portbury et al., 2011, Kötter and Krüger, 2022). Eine Beteiligung am proteolytischen Abbau von Titin konnte im Herzen für die calciumabhängige Cysteinprotease Calpain-1 gezeigt werden (Barta et al., 2005, Raynaud et al., 2005, Coulis et al., 2008). Des Weiteren kann auch die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) zur proteolytischen Spaltung von Titin beitragen. Vor allem nach akuter myokardialer Ischämie und Reperfusion zeigte sich eine Akkumulation von MMP2 im Bereich der Z-Scheibe und ein MMP2-bedingter proteolytischer Abbau von Titin (Ali et al., 2010). In Bezug auf den weiteren Titinabbau wird aktuell eine Beteiligung sowohl des **Proteasoms** als auch der **Autophagie** vermutet (Kötter and Krüger, 2022). Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, spielt für beide Systeme die vorherige Markierung durch Ubiquitin eine Rolle (Tan et al., 2008, Wang et al., 2011). Durch den experimentellen Nachweis einer verstärkten K48-Titinubiquitinierung nach Inhibition des Proteasoms sowie einer verstärkten K63-Titinubiquitinierung nach Inhibition der Autophagie, konnte die Hypothese bestätigt werden, dass beide Systeme an der Degradation von Titin beteiligt sind (Kötter et al., 2016, Müller et al., 2021). Zurzeit wird davon ausgegangen, dass der Abbau von Titin in bestimmten

Bereichen präferentiell von einem der beiden Systeme durchgeführt wird (Kötter and Krüger, 2022). Ein bevorzugter autophagosomaler Abbau wird im Bereich der Titin-Kinase vermutet, da dort eine Ubiquitinierung durch die E3-Ligase MuRF-1 zu einer Rekrutierung der Autophagie-assoziierten Adapterproteine p62 und NBR1 beiträgt (Bogomolovas et al., 2021, Lange et al., 2005). Im Bereich der Z-Scheibe konnte in adulten Muskelzellen eine Anreicherung von Proteasomen nachgewiesen werden (Rudolph et al., 2019). In Bezug auf die Abbauprozesse während eines Myokardinfarkts, ließen sich mit einer verstärkten K48-Polyubiquitinierung im Remote-Areal Hinweise auf eine Beteiligung des Proteasoms am Titinabbau in diesem Infarktgebiet feststellen (Kötter et al., 2016). Die genauen Abläufe der Titindegradation nach einem Myokardinfarkt bzw. nach I/R sind allerdings noch Gegenstand der Forschung (Kötter and Krüger, 2022).

1.5 Ziele der Arbeit

Der akute Myokardinfarkt und die häufig folgende Herzinsuffizienz sind weltweit weiterhin mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden (Ong et al., 2018). Das genaue Verständnis der pathophysiologischen Abläufe unter Ischämie und Reperfusion ist daher essenziell für die weitere Optimierung der therapeutischen Optionen.

Als zentraler Bestandteil der Sarkomere übernimmt Titin in der Herzmuskulatur vielfältige Aufgaben. Die Analyse der Modifikationen und Anpassungen von Titin an Ischämie und Reperfusion sind daher von entscheidender Bedeutung, um das komplexe Bild des Myokardinfarkts in seiner Gesamtheit zu verstehen. Aus diesem Grund war ein primäres Ziel dieser Arbeit die **Etablierung eines I/R-Simulationsmodells**, welches sich für die nähere Erforschung von Titinmodifikationen unter Ischämie und Reperfusion eignet. In diesem Kontext eröffnen *in-vitro*-Modelle die Möglichkeit, spezifische Pathomechanismen mit hoher Präzision und Selektivität in definierten Zelltypen unter standardisierten Parametern zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Etablierung eines zellkulturellen I/R-Simulationsmodells unter Verwendung von adulten Rattenkardiomyozyten erfolgen.

Dieses Modell sollte im weiteren Verlauf des Projekts, unter dem Forschungsschwerpunkt **I/R-bedingter Titinmodifikationen**, erstmals Anwendung finden. Dabei sollte analysiert werden, ob sich eine zuvor beobachtete infarktassoziierte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region (Kötter et al., 2016) in dem zellkulturellen I/R-Modell reproduzieren lässt. Zu diesem Zweck sollten Untersuchungen der Aktivitäts- und Phosphorylierungslevel beteiligter Proteine nach I/R-Simulation mittels *Western-Blot*-Verfahren erfolgen. Die Titinubiquitinierung und der damit assoziierte Titinabbau unter I/R stellten einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt dieses Projekts dar. Diese Titinmodifikation und die damit einhergehenden I/R-assoziierten Abbauprozesse sollten mittels *Western-Blot*-Verfahren analysiert werden. Dabei sollte fokussiert der Einfluss der Autophagie, durch Analyse spezifischer Autophagie-assoziiierter Proteine und Regulatoren, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

In Tabelle 1 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid/ Bisacrylamid Stammlösung (29:1)	Bio-Rad, Hercules, USA
Acrylamid/ Bisacrylamid Stammlösung (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacillol-AF Flächendesinfektionsmittel	Paul Hartmann AG, Heidenheim
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, DE
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Carnitin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D(+)-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (vergällt mit 1% Petrolether)	VWR Chemicals, Wien, AT Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, DE
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fötales Rinderserum <i>superior</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Guanidinhydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Heparinpulver (195 I.E./mg)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Inlab Storage Solution	MettlerToledo, Columbus, USA

Chemikalie	Hersteller
Isofluran	Piramal critical care Deutschland GmbH, Hallenbergmoos, DE
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagenase Typ II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kreatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Laminin aus Engelbrecht-Holmswurm murine Sarcoma	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Medium 199 mit Earle's balanced salt solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Plus vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mucosol Universalreiniger	BRAND, Wertheim, DE
Natrium-L(+)-Lactat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin (10.000 Einheiten) - Streptomycin (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pepsin/HCl	MettlerToledo, Columbus, USA
Phenolrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease aus Streptomyces griseus Typ XIV ($\geq 3,5$ Einheiten/mg)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pufferlösungen (pH 4,0; 7,0; 10,0)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Restore Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Waltham, USA

Chemikalie	Hersteller
<i>Restore PLUS Western Blot Stripping Puffer</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Serva Blue R	SERVA, Heidelberg, DE
Sterillium-classic pure Händedesinfektionsmittel	BODE Chemie GmbH, Hamburg, DE
SDS 20%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE,
Thiourea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trisaminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton x-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trockenmilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE,
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Urea	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien

2.1.2 Labormaterial

In Tabelle 2 sind die verwendeten Labormaterialien mit Hersteller aufgeführt.

Material	Hersteller
10-Well-Kämme (0,75 mm;1 mm)	Bio-Rad, Hercules, USA
15-Well-Kämme (1,5 mm)	Bio-Rad, Hercules, USA
6 Well-Platten	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Bemis Parafilm Labor-Verpackungsfolie	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Blotting Papier	Macherey-Nagel, München, DE
ECO LEAK FINDER	CRC, Zele, BE
Entsorgungsbeutel	BRAND, Wertheim, DE
Handschuhe	Ansell Healthcare Europe N.V., Brüssel, BE WRP Asia Pacific sdn Bhd, Malaysia
Hypoxiekammer	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Mini-PROTEAN Glasplatten	Bio-Rad, Hercules, USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg, DE
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, DE
Pasteurpipetten (3 ml)	A Laboratories limited, Hampshire, UK
Pasteurpipetten aus Glas (150 mm)	BRAND, Wertheim, DE
Perfusor-Spritzen (50 ml)	B.Braun, Melsungen, DE
Petrischalen	VWR, Darmstadt, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen mit Filter (200 µl, 100 µl, 20 µl)	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen mit Filter (1250 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Pipettenspitzen ohne Filter (1000 µl, 200 µl, 20 µl)	Tipone, Hamburg, DE
Präparierbesteck	DUMONT, Montignez, CHE B.Braun, Melsungen, DE
PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Single Flow Meter	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
TipOne Repeat Dispenser Tips (5 ml)	Starlab, Hamburg, DE
Wägerspapier	Carl Roth, Karlsruhe, DE VWR, Darmstadt, DE

Wägerschalen	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellsieb (200 µm)	pluriSelect Life Science, Leipzig, DE
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Labormaterialien

2.1.3 Geräte

In Tabelle 3 sind die verwendeten Geräte mit Bezeichnung des Typs und mit Hersteller aufgelistet.

Geräte	Typ	Hersteller
Autoklav	VX-100	Systec, Erkrath, DE
Biologische Sicherheitswerkbank	SAFE 2020 1.5	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules, USA
	Power Blotter Station	invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Brutschrank	Heracell VIOS 250i	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Chemilumineszenz Imager	Fusion FX	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Elektrophorese-kammer	Mini-PROTEAN R Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Feinwaage	AE 163	Mettler, Columbus, USA
Gefrierschrank, -20°C	Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, CH
Kühlschrank, 4°C	2 6196 4	Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer	IKA RCT basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
	VWR 7x7 HOT/STIR	VWR, Darmstadt, DE
Mikroskop	AE2000	Motic, Barcelona, SP
Mikrowelle	Micromat	AEG, Berlin, DE
Orbitalschüttler	SM-30	Edmund Bühler, Tübingen, DE
pH-Messsonde	InLab Expert Pro	Mettler Toledo, Columbus, USA
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Präzisionswaage	KERN ADB 200-4	KERN, Balingen, DE
Rollenmischer	RMS-30V	CAT, Ballenrechten-Dottingen, DE
Rollpumpe	minipuls 3	Gilson, Middleton, USA
SDS-Page Netzgerät/ Power Pack	Standard Power Pack P25 T	Biometra, Göttingen, DE

Geräte	Typ	Hersteller
	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, DE
Thermoblock	Compact 5350	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermostat	C1	HAAKE, Karlsruhe, DE
	julabo VC	JULABO GmbH, Seelbach, DE
Tischzentrifuge	VWR mini auto stirrer	VWR, Darmstadt, DE
Vakuumpumpe	WELCH	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Vortexschüttler	Reax top	Heidolph, Schwabach, DE
	Ministar	VWR , Darmstadt, DE
Waage	KERN 572	KERN, Balingen, DE
Wasserbäder	Thermo Haake® B3	Thermo Elektron Cooperation, Beverly, USA
	3043	Köttermann, Uetze, DE
	julabo 20B	JULABO GmbH, Seelbach, DE
Zentrifugen	Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Rotofix 32 A	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, DE

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Geräte

2.1.4 Spezielles Material zur Simulation der Hypoxie

Zur Erzeugung hypoxischer Bedingungen als Teil der Ischämie wurde die **Hypoxie-Inkubations-Kammer**, im Folgenden als Hypoxiekammer bezeichnet, von der Firma Stemcell Technologies verwendet. Diese Kammer setzt sich aus mehreren Teilen zusammen (Abb. 8), welche im Folgenden beschrieben werden. Die Hypoxiekammer besteht aus einem durchsichtigen Polycarbonat-Deckel und einem ebenfalls durchsichtigen Polycarbonat-Bodenteil. Diese beiden Teile können durch eine Ringklemme konnektiert werden. Mithilfe einer kreisförmigen Gummidichtung kann die Hypoxiekammer durch Verschluss der Ringklemme luftdicht geschlossen werden (Abb. 8 a). Die Ringklemme kann über einen Schraubmechanismus in ihrer Spannung adjustiert werden. In dem Bodenteil der Kammer befinden sich zwei Schläuche, jeweils mit einer Schlauchklemme (Abb. 8 b). An einen dieser Schläuche wird bei der Füllung der Kammer die Gasquelle angeschlossen, während über den zweiten das überschüssige Gas aus der Kammer entweichen kann. Nach Füllung der Kammer mit dem entsprechenden Gasgemisch erfolgt abschließend der luftdichte Verschluss der beiden Schlauchklemmen. Es können optional Gitterböden eingesetzt werden, um mehrere Schalen oder Platten gleichzeitig in der Kammer zu platzieren.

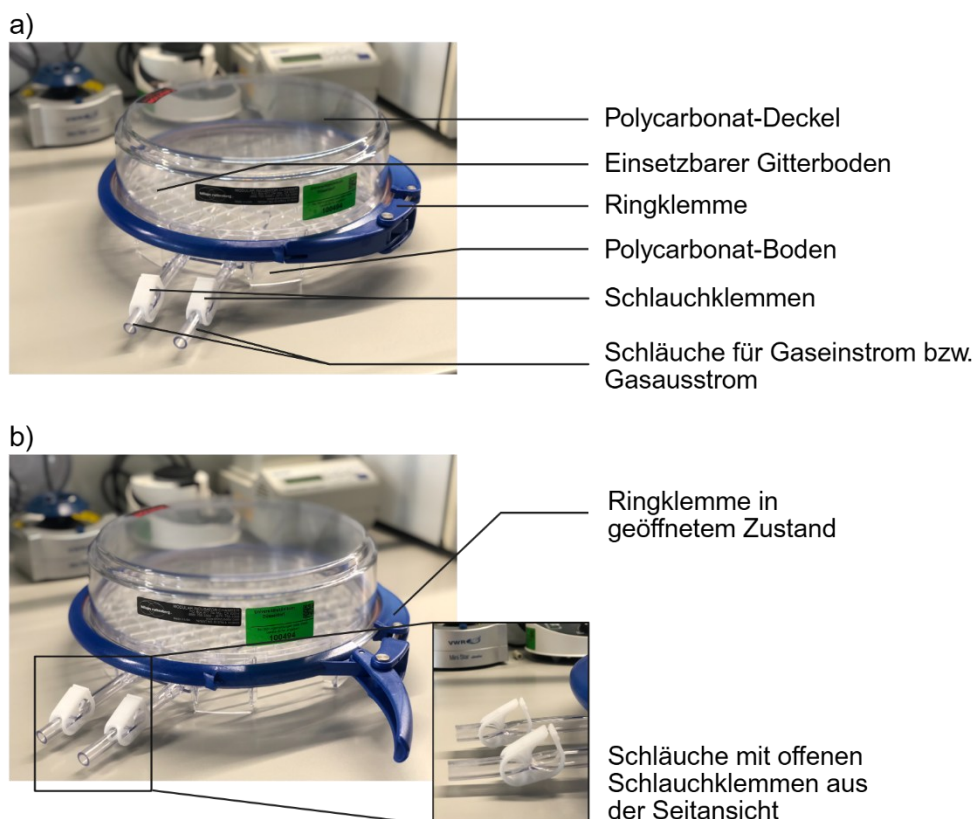


Abb. 8: Aufbau der Hypoxiekammer

Darstellung der verwendeten Hypoxiekammer der Firma Stemcell Technologies in a) mit geschlossener und in b) mit geöffneter Ringklemme. Bei verschlossenen Schlauchklemmen und verschlossener Ringklemme wird ein luftdichter Raum im Inneren der Kammer hergestellt, der die Simulation hypoxischer Bedingungen ermöglicht. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Zur kontrollierten Füllung der Hypoxiekammer mit einem sauerstoffarmen Mischgas wurde das **Single-Flow-Meter** der Firma Stemcell Technologies verwendet (Abb. 9). Dieses besteht aus einem Zuflussschlauch, an welchen die Gasquelle angeschlossen wird. Zwischen der Gasquelle und dem Zuflussschlauch befindet sich ein Luftfilter. Eine Anzeige auf dem Single-Flow-Meter zeigt den aktuellen Gasfluss in L/min an. Dieser kann mit einem Drehregler gesteuert werden. Das Mischgas strömt dann mit dem eingestellten Fluss über den zweiten Schlauch weiter. Nach Konnektion mit der Hypoxiekammer ist auf diese Weise eine kontrollierte Füllung dieser nach Herstellerangaben möglich.

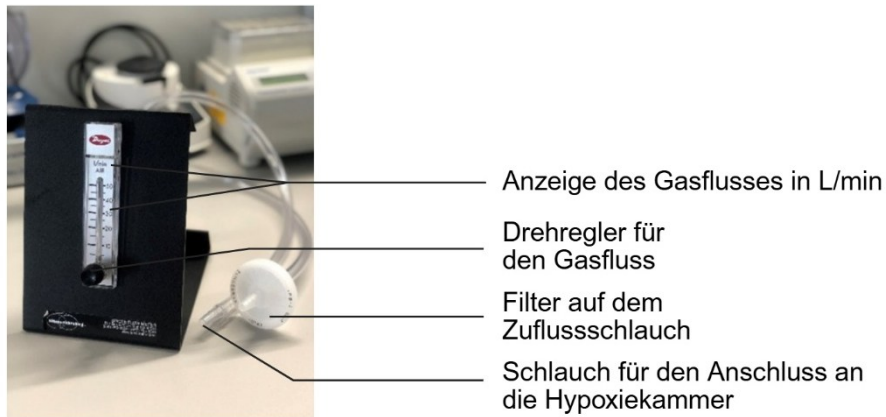


Abb. 9: Single-Flow-Meter zur Kontrolle des Gasflusses

Dargestellt ist das Single-Flow-Meter der Firma Stemcell Technologies, welches zur Regulation und Kontrolle des Gasflusses bei der Füllung der Hypoxiekammer verwendet wurde. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.1.5 Antikörper

In Tabelle 4 sind die verwendeten Primärantikörper aufgelistet, welche an spezifische Bereiche von Titin binden. Bei den Antikörpern handelt es sich um *phosphosite*-spezifische Antikörper, die speziell für die Arbeitsgruppe hergestellt wurden.

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller
Titin PEVK	1:1000	Kaninchen	immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt, DE
Titin S11878	1:1000	Kaninchen	immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH, Himmelstadt, DE
Titin S12022	1:2000	Kaninchen	Eurogentec, Seraing, BE

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper für Titin

In Tabelle 5 sind die Primärantikörper aufgelistet, welche für *Western-Blot*-Analysen weiterer Proteine verwendet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller	Nummer
AMPK phospho Thr172	1:2000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	2531
AMPK α	1:1000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab207442
CHIP	1:10.000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab134064
Fbx32	1:1000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab168372
GAPDH	1:10.000	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G8795
GLUT1	1:1000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	12939
HIF-1α	1:1000	Maus	Abcam, Camebridge, UK	AB1
	1:500	Maus	Novus Biologicals, Centennial, USA	NB100-105
	1:1000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab179483

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller	Nummer
LC3B	1:2000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	2775
mTOR phospho Ser2448	1:2000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	2971
mTor	1:2000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	2972
MuRF1	1:1000	Kaninchen	Merck KGaA, Darmstadt, DE	ABS532
PKCα phospho T497	1:5000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab76016
PKCα	1:10.000	Kaninchen	Abcam, Camebridge, UK	ab32376
SQSTM1/p62	1:2000	Kaninchen	Cell signaling Technology, Danvers, USA	5114
Ubiquitin	1:5000	Maus	Cell signaling Technology, Danvers, USA	3936
α-Aktinin	1:10.000	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A7732

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper

In Tabelle 6 sind die verwendeten Sekundärantikörper aufgelistet.

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller	Nummer
Anti-mouse IgG, horseradish- peroxidase linked	1: 5000	Pferd	Cell signaling Technology, Danvers, USA	7076
Anti-rabbit IgG, horseradish- peroxidase linked	1: 3000	Ziege	Cell signaling Technology, Danvers, USA	7074

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper

2.1.6 Inhibitoren und Aktivatoren

In Tabelle 7 sind die Inhibitoren und Aktivatoren mit der verwendeten Konzentration beziehungsweise mit der verwendeten Verdünnung angegeben.

Bezeichnung	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
Bafilomycin A₁	20 nM		Cayman Chemical; Ann Arbor, USA
(-)-Blebbistatin (5 mg/ml in DMSO)		1: 2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphataseinhibitor-Cocktail		1:100	Bimake, Houston, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail A		1:100	Bimake, Houston, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail B		1:100	Bimake, Houston, USA

Tabelle 7: Zusammenstellung der verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren

2.1.7 Kulturmedien für adulte Rattenkardiomyozyten

In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung der Kulturmedien für die Kultivierung adulter Rattenkardiomyozyten aufgeführt, außerdem sind die Bestandteile der Laminin-Lösung aufgelistet.

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium mit 1% FBS	500 ml Medium 199 mit <i>Earle's balanced salt solution</i>
	1% (v/v) FBS superior
	1% (v/v) Penicillin (10.000 Einheiten)-Streptomycin (10mg/ml)
	5 mM Kreatin
	5 mM Carnitin
	5 mM Taurin
	10 mM HEPES
Kulturmedium mit 10% FBS	500 ml Medium 199 mit <i>Earle's balanced salt solution</i>
	10% (v/v) FBS superior
	1% (v/v) Penicillin (10.000 Einheiten)-Streptomycin (10mg/ml)
	5 mM Kreatin
	5 mM Carnitin
	5 mM Taurin
	10 mM HEPES
Laminin Lösung	0,5% Gelatine
	800 µl Laminin (1-2 mg/ml)
	in PBS

Tabelle 8: Zusammenstellung der verwendeten Kulturmedien

2.1.8 Gase

In Tabelle 9 sind die verwendeten Gase mit der Zusammensetzung und dem Hersteller aufgelistet.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Stickstoff 5.0	≥ 99,999 % Stickstoff	Linde, Pullach, Deutschland
Sauerstoff 5.0	≥ 99,999 % Sauerstoff	Linde, Pullach, Deutschland
Mischgas	5% Kohlendioxid, 1% Sauerstoff, 94% Stickstoff	Linde, Pullach, Deutschland

Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten Gase

2.1.9 Puffer und Lösungen

In Tabelle 10 ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
	2 M Glycin
	1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	pH > 8,3
10x TBS	0,2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	1,5 M Natriumchlorid
	pH 7,4
10x TBST	0,2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	1,5 M Natriumchlorid
	1% (v/v) Tween-20
	pH 7,4 mit HCl
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	pH 6,8 mit HCl
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	pH 8,8 mit HCl
Anodenpuffer	300 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	100 mM Tricine
	pH auf 8,8 mit HCl
Blockierlösung für Polyvinylfluorid-Membranen	2% (w/v) Bovines Serumalbumin in 1 x TBST
	5% (w/v) Trockenmilchpulver in 1 x TBST
CUT	12,5 ml DCP-Lösung
	50 µM Calciumchlorid
	1% (w/v) Bovines Serumalbumin
DCP-Lösung	50 ml Perfusionspuffer
	50 µM Calciumchlorid
	4000 Einheiten Kollagenase Typ II
	6 Einheiten Protease
	aus Streptomyces griseus Typ XIV
HI-Calcium	25 ml Perfusionspuffer
	400 µM Calciumchlorid
	1% (w/v) Bovines Serumalbumin

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ischämiepuffer	125 mM Natriumchlorid
	8 mM Kaliumchlorid
	1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	1,25 mM Magnesiumsulfat
	1,2 mM Calciumchlorid
	6,25 mM Natriumhydrogencarbonat
	20 mM HEPES
	5 mM Natrium-L(+)Latat
	pH 6,6 mit HCl/NaOH
Kathodenpuffer	300 mM Aminocapronsäure
	30 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	pH auf 8,7 mit HCl
Kontrollpuffer	110 mM Natriumchlorid
	4,7 mM Kaliumchlorid
	1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	1,25 mM Magnesiumsulfat
	1,2 mM Calciumchlorid
	25 mM Natriumhydrogencarbonat
	20 mM HEPES
	15 mM Glukose
	pH 7,4 mit HCl/NaOH
LO-Calcium	25ml Perfusionspuffer
	200 µM Calciumchlorid
	1% (w/v) Bovines Serumalbumin
Lösungen für Antikörper	0,5% (w/v) BSA in 1 x TBST
	2,5 % (w/v) Trockenmilchpulver in 1 x TBST
Perfusionspuffer	130 mM Natriumchlorid
	5,4 mM Kaliumchlorid
	1,25 mM Magnesiumchloridhexahydrat
	0,33 mM Natriumdihydrogenphosphat
	25 mM HEPES
	20 mM Glukose
	3 mM Pyruvat
	5 mM Kreatine
	2 mM Carnitin
	5 mM Taurin

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	pH 7,35-7,45 mit NaOH
Perfusionspuffer + Heparin	50 ml Perfusionspuffer
	~ 50-100 I.E.Heparin
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	2,7 mM Kaliumchlorid
	1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	140 mM Natriumchlorid
	10 mM di-Natriumhydrogenphosphat
	pH 7,4
PVDF <i>destain</i>	10% (v/v) Essigsäure
	40% (v/v) Ethanol
PVDF <i>stain</i>	0,075%(w/v) Serva blue
	in Methanol
Stop-Lösung	Perfusionspuffer
	1% (w/v) Bovines Serumalbumin
	50 µM Calciumchlorid
Strippingpuffer für Standardblots	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	0,2% (v/v) Nonident P40 (Igepal)
	0,1 M β-Mercaptoethanol
	pH 7,5
Modifizierter Lämmli-Puffer	8 M Urea
	2 M Thiourea
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	3% SDS (w/v)
	0,035% Serva Blue (w/v)
	10% Glycerol (w/v)
TRIS/HCl	50mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	Destilliertes Wasser
	pH 6,8

Tabelle 10: Zusammenstellung der verwendeten Puffer

2.1.10 Tiere

Die adulten Rattenkardiomyozyten (aRCM) wurden aus acht bis zwölf Wochen alten männlichen Wistar-Ratten gewonnen. Es handelte sich dabei um Wildtypen. Diese stammten von der Firma Janvier-Labs (Hauptsitz: Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) oder aus Beständen der örtlichen Tierversuchsanstalt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Organentnahmen und die Arbeit mit primären Zellen aus Tieren erfolgte gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Aktenzeichen der ZETT: O29/11).

2.2 Methoden

2.2.1 Etablierung eines zellkulturellen I/R-Simulationsmodells

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung eines *in-vitro*-I/R-Modells zur Untersuchung von Titinmodifikationen unter Ischämie und Reperfusion angestrebt. Wie bereits in Kapitel 1.1.5.1 beschrieben, gibt es verschiedene Methoden zur I/R-Simulation in zellkulturellen Modellen. In einem 2014 veröffentlichten Positionspapier, von einer Arbeitsgruppe der *European Society of Cardiology (ESC)* (Lecour et al., 2014), wurde zur *in-vitro*-Simulation einer Ischämie die Kultivierung mit einem Ischämiepuffer in einer luftdichten Hypoxiekammer empfohlen. Zur Simulation der Reperfusion wurde ein Wechsel des Puffers zu einem nährstoffhaltigem Puffer und eine Inkubation außerhalb der Hypoxiekammer empfohlen (Lecour et al., 2014). Auf Grundlage dieser Empfehlungen wurde ein entsprechendes Hypoxiekammer-basiertes I/R-Modell für die fokussierte Untersuchung von Titin etabliert.

2.2.1.1 Auswahl der Zellen

Ziel des zellkulturellen I/R-Modells war es, Titinmodifikationen, die im Rahmen von Ischämie und Reperfusion im Herzen auftreten, analysieren zu können. Da das sarkomerische Protein charakteristischerweise in Kardiomyozyten vorkommt, wurden diese als zu untersuchende Zellen ausgewählt. Andere Zellarten, welche im Herzen vorhanden sind oder an der Reaktion auf einen Myokardinfarkt beteiligt sind, waren nicht Teil des Modells. Da der Myokardinfarkt epidemiologisch betrachtet bei Menschen vor allem im mittleren bis höheren Lebensalter auftritt, wurden für die Untersuchungen adulte differenzierte Zellen ausgewählt (Lindsey et al., 2018). Dies entspricht ebenfalls den Empfehlungen der genannten Arbeitsgruppe der *ESC* (Lecour et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Kardiomyozyten aus Ratten gearbeitet, da sich diese aufgrund ihrer metabolischen Stabilität in Kultur, vor allem im Vergleich zu murinen Kardiomyozyten (Liu et al., 2019), für experimentelle Modellierungen mit potenziell mehrtägigen Versuchsprotokollen eignen. Die vorhandene laborinterne Infrastruktur und

etablierte Protokolle ermöglichten darüber hinaus einen effizienten Zugang zu und Arbeit mit diesen Zellen. Dabei wurden Kardiomyozyten aus Wildtyp-Tieren verwendet, da der Fokus des Projektes auf der Etablierung der zellkulturellen I/R-Simulation lag. Um also eine möglichst stabile und aussagekräftige Grundlage für weitere Arbeiten mit der Methode zu schaffen, sollten weitere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel durch Modifikation der Versuchstiere, auf ein Minimum reduziert werden.

2.2.1.2 Definition eines unabhängigen Versuchsansatzes

Zu Beginn sollte definiert werden, was im Rahmen dieser Arbeit als ein unabhängiger Versuchsansatz (n) gewertet wird. Nach der Isolation der Kardiomyozyten aus einem Versuchstier und der Verteilung dieser auf mehrere Wells, war im weiteren Verlauf der Kultivierung jederzeit eine räumliche Separation der verschiedenen Ansätze gewährleistet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Kardiomyozyten der verschiedenen Wells unabhängig voneinander auf die Simulationen reagieren. Aus diesem Grund wurde ein Well jeweils als ein unabhängiger Ansatz (n) gewertet. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit wurden insgesamt, nach Möglichkeit, in den unterschiedlichen Ansätzen Kardiomyozyten verschiedener Versuchstiere verwendet. Gleichzeitig wurde im Sinne des 3R-Prinzips, insbesondere unter Berücksichtigung des Aspekts der Reduktion, die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere auf das wissenschaftlich notwendige Minimum reduziert (Flecknell, 2002). Zur Sicherstellung der Transparenz, wird in der Ergebnisdarstellung, wie auch von Lindsey et al. (2018) empfohlen, jeweils sowohl die Anzahl der Ansätze (n) als auch die Anzahl der Versuchstiere, aus denen die Kardiomyozyten gewonnen wurden, genannt (Lindsey et al., 2018).

2.2.1.3 Isolation adulter Rattenkardiomyozyten

Die Isolation der adulten Rattenkardiomyozyten erfolgte nach einem bereits etablierten Modell der Arbeitsgruppe, welches im Folgenden erläutert wird. Zur Isolation wurden Herzen von acht bis zwölf Wochen alten männlichen Wistar-Ratten vom Wildtyp verwendet. Die Tiere wurden nach Betäubung mit Isofluran durch fachkundiges Personal getötet. Die Haut im Bereich des Abdomens und Thorax wurde mit Ethanol desinfiziert und unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Nach Durchtrennung des Diaphragmas wurde der Thorax nach kranial eröffnet, sodass das Herz mit der Aorta ascendens entnommen werden konnte. Dieses wurde anschließend in ein Becherglas mit kaltem Perfusionspuffer gegeben. Daraufhin wurden Herz und Aorta auf einer Petrischale von übrigen Geweberesten freipräpariert. Im Anschluss konnte das Rattenherz zur retrograden Perfusion an der Langendorff-Anlage aufgehängt werden. Dazu wurde die Aorta über eine Kanüle gezogen und mit einer Klemme und einem Faden fixiert. Im Folgenden wurden, wie in Abb. 10 a) zu sehen, Blutreste mit 50 ml gewärmtem Heparin-haltigen Perfusionspuffer im nicht-zirkulierenden Modus mit einer Flussrate von 30 ml/min aus dem Herzen gespült. Anschließend erfolgte die zirkulierende Perfusion mit einer

erwärmten Verdaulösung (DCP-Lösung) für 30 Minuten (Abb. 10 b). Zur Sicherstellung von näherungsweise physiologischen Gewebetemperaturen wurde das Herz für die Dauer der Perfusion zur Minimierung des Wärmeverlusts kontaktlos mit Aluminiumfolie ummantelt.

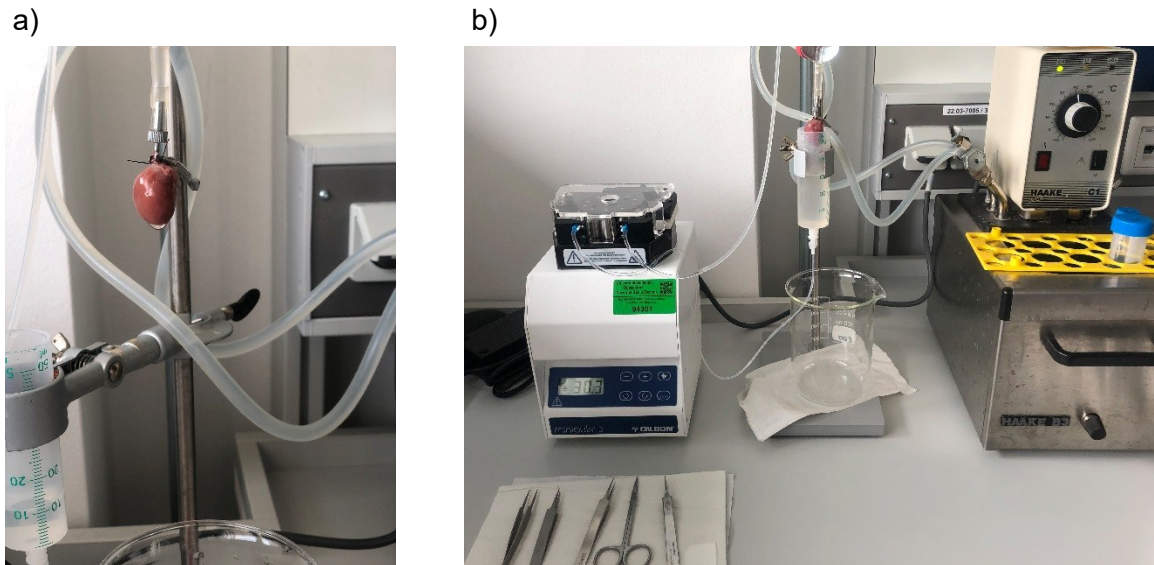


Abb. 10: Retrograde Perfusion an Langendorff-Anlage

Dargestellt ist die retrograde Perfusion des Rattenherzens an der Langendorff-Anlage. In a) ist das Spülen des Herzens mit heparinhaltigem Perfusionspuffer abgebildet und b) zeigt die Perfusion mit dem Verdaupuffer in einem zirkulierenden System. Die Flüssigkeiten wurden mithilfe einer Rollenpumpe über ein Schlauchsystem erwärmt und zum Herzen transportiert, dort erfolgte die retrograde Perfusion.

Nach 30-minütigem Verdau wurde das Herz von der Langendorff-Anlage abgenommen. Anschließend wurden die Vorhöfe und die großen Blutgefäße mit einer Schere entfernt und verworfen, sodass nur noch Ventrikelmyokard vorhanden war. Dieses wurde mit einer weiteren Verdaulösung (CUT-Lösung) benetzt und zerkleinert. Die zerkleinerten Bestandteile des Kammermyokards wurden daraufhin in ein Falcon mit 12,5 ml CUT-Lösung überführt. Der Stand des Verdaus wurde mikroskopisch begutachtet. Je nach Fortschritt konnte dieser sofort oder nach einigen Minuten, durch Verdünnung der CUT-Lösung, mithilfe der Stop-Lösung beendet werden. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 200 μm gefiltert, um unverdaute Gewebereste zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung für zwei Minuten bei 500 *rpm* zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Zellpellet in einer Lösung mit niedriger Calciumchlorid-Konzentration (200 μM) (LO-Calcium) resuspendiert werden. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 500 *rpm*. Der Überstand wurde erneut verworfen und eine höherkonzentrierte Calciumchlorid-Lösung (400 μM) (HI-Calcium) wurde zum Pellet hinzugegeben. Nach einer dritten Zentrifugation für eine Minute bei 500 *rpm* und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% FBS und Blebbistatin (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.7 und Kapitel 2.1.6) resuspendiert. Nach 3-5 Minuten, sobald sich die Kardiomyozyten im Falcon abgesetzt hatten, wurde der Überstand verworfen. In Abhängigkeit von der geschätzten Zellmenge wurden daraufhin 20-25 ml des vorher beschriebenen Kulturmediums mit den

genannten Zusätzen hinzugegeben. Von dieser Zelllösung wurden 500 µl pro Well zu jeweils 1000 µl des Kulturmediums mit Zusätzen in Laminin-beschichtete 6-Well-Platten aufgetragen. Dabei konnte die Kontraktion der Kardiomyozyten durch den Myosin-II-Inhibitor Blebbistatin unterdrückt werden, sodass diese auf den Laminin-beschichteten Platten anhefteten. Dies ermöglichte im weiteren Versuchsverlauf den Austausch der Kulturmedien und die Kultivierung in spezifischen Puffern. Nach 3 Stunden Inkubation im Zellinkubator bei 37°C, 95% Sauerstoff- und 5% Kohlenstoffdioxidanteil erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, um abgestorbene Zellen und andere Verunreinigungen zu entfernen. Je nach Simulationsmodell variierte dabei die Zusammensetzung des Kulturmediums (siehe Kapitel 2.2.1.5).

2.2.1.4 Aufbau und Ablauf der I/R-Simulation

Es wurde ein Grundkonzept für die I/R-Simulation entworfen (Abb. 12), von dem aus einzelne Variablen im Verlauf des Etablierungsprozesses verändert werden konnten. Diese Grundstruktur soll im Folgenden dargestellt werden.

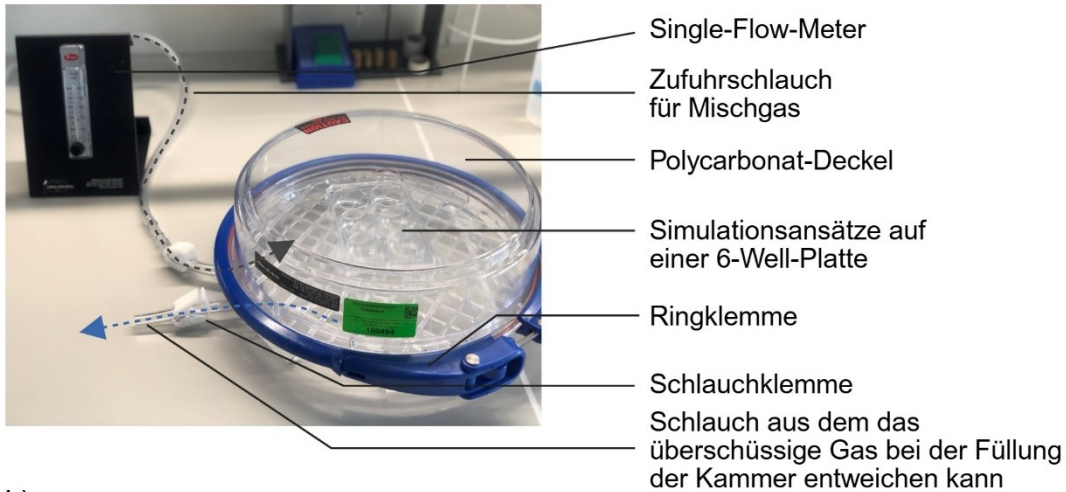
Die adulten Rattenkardiomyozyten wurden nach der **Isolation** (Tag 0) bis zum Folgetag in serumhaltigem Kulturmedium mit Blebbistatin (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.7 und Kapitel 2.1.6) kultiviert. An Tag 1 wurden die **I/R-Simulationen** durchgeführt. Diese können grundsätzlich in zwei Phasen unterteilt werden, die je nach Versuchsaufbau in ihrer Dauer variierten – die **Ischämiephase (sl)** und die **Reperusionsphase (sR)** (Abb. 12). In jedem Simulationsmodell wurden Kardiomyozyten direkt im Anschluss an die Ischämiephase ohne Reperfusion geerntet. Diese wurden nach einem einheitlichen System benannt: Die Abkürzung sl verdeutlichte dabei, dass ausschließlich eine Ischämiesimulation erfolgte. Die Dauer der Ischämie wurde nach der Abkürzung sl ohne Zeiteinheit angegeben. Alle Ansätze, in denen im Anschluss eine Reperfusion erfolgte, wurden mit der Abkürzung sR benannt. Da sich die Dauer der Ischämie in einem Simulationsmodell nicht veränderte, wurde diese aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gesondert aufgeführt. Die Dauer der Reperfusion wurde ebenfalls ohne Einheit nach der Abkürzung sR aufgeführt. Für alle sl- und sR-Gruppen wurden jeweils entsprechende Kontrollgruppen festgelegt. Auch diese wurden nach dem vorgestellten Prinzip benannt, sodass die Kontrollgruppen der Ischämiesimulationen ohne Reperfusion als K-sl und die Kontrollgruppen der Reperusionsimulationen als K-sR bezeichnet wurden. Die entsprechende Ischämie- beziehungsweise Reperusionsdauer wurde dabei ebenfalls als Zahlenwerte ohne Einheit aufgeführt.

2.2.1.4.1 Simulation der Ischämie

Die möglichst realitätsnahe Simulation einer Ischämie erfolgte durch die Kultivierung in einem speziellen Ischämiepuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.9) und durch sauerstoffarme Umgebungsluft. Der verwendete **Ischämiepuffer** enthielt 5 mM Natrium-Laktat. Dies simulierte die extrazelluläre Akkumulation von Laktat, welches im Körper unter hypoxischen Bedingungen im Rahmen der anaeroben Glykolyse gebildet wird und sich durch die

eingeschränkte Perfusion im Gewebe anreichert (siehe Kapitel 1.1.2). Zur Simulation der unter Ischämie auftretenden Gewebsazidose wurde der pH-Wert des Puffers mit NaOH beziehungsweise HCl auf 6,6 eingestellt (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018). Außerdem wurde im Ischämiepuffer eine Hyperkaliämie mit einer Kaliumchlorid-Konzentration von 8 mM simuliert, da eine interstitielle Hyperkaliämie im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts bereits nach kurzer Zeit vor allem in der Infarktzone auftritt (Weiss et al., 2017, Hill and Gettes, 1980, Shivkumar et al., 1997). Des Weiteren wurde der Ischämiepuffer direkt vor der Verwendung für 20 Minuten mit Stickstoff begast, um gelösten Sauerstoff aus dem Puffer zu entfernen. Die Verwendung einer deoxygenierten Pufferlösung zur Ischämiesimulation wird ebenfalls von der bereits beschriebenen Arbeitsgruppe der ESC empfohlen (Lecour et al., 2014). Der Ischämiepuffer wurde steril filtriert, bevor er auf die verschiedenen Gruppen verteilt wurde. Daraufhin wurden die Ansätze der sI- und sR-Gruppen mit 2 ml des Ischämiepuffers gewaschen, sodass Reste des Nährmediums entfernt wurden. Auf diese Weise sollten Einflüsse durch verbleibende Nährstoffe ausgeschlossen werden. Der Ischämiepuffer und die Mediumreste wurden abgetragen, bevor jedes Well mit 1,5 ml Ischämiepuffer gefüllt wurde. Der verringerte Sauerstoffpartialdruck, als Bestandteil ischämischer Bedingungen im Rahmen eines Myokardinfarkts, wurde mithilfe der in Abb. 11 dargestellten **Hypoxiekammer** erreicht (Aufbau siehe Kapitel 2.1.4). Zur I/R-Simulation wurden die sI- und sR-Ansätze, nach Zugabe des Ischämiepuffers, in der Hypoxiekammer positioniert. Eine Petrischale mit autoklaviertem Wasser war nach Herstellerangaben zur Regulation der Luftfeuchtigkeit ebenfalls in der Hypoxiekammer vorhanden. Zur Füllung der Kammer mit dem sauerstoffarmen Gasgemisch wurde diese mit einer Ringklemme verschlossen und anschließend für 5 Minuten bei einer Flussrate von 20 L/min mit dem Mischgas (94% Stickstoff, 5% Kohlenstoffdioxid, 1% Sauerstoff) geflutet. Das Mischgas, welches über einen Schlauch in die Kammer geleitet wurde, verdrängte dabei die sauerstoffhaltige Umgebungsluft aus der Kammer. Diese konnte über einen zweiten Schlauch entweichen (Abb. 11 a). Nach 5 Minuten Gasfluss bei einer Flussrate von 20 L/min ist nach Herstellerangaben ein kompletter Austausch der Luft in der Kammer erfolgt. Der Fluss des Mischgases wurde dabei mittels Single-Flow-Meter kontrolliert und reguliert. Nach Ablauf von 5 Minuten wurden die Schläuche über die Schlauchklemmen luftdicht verschlossen und die Gasquelle demontiert. Um auch das Entweichen kleinster Gasmengen zu verhindern, wurde eine flexible Verschlussfolie an den Schlauchenden angebracht (Abb. 11 b). Nach luftdichtem Verschließen der Hypoxiekammer, wurde diese in einem Inkubator bei 37°C für einen vorab definierten Zeitraum inkubiert.

a)



b)

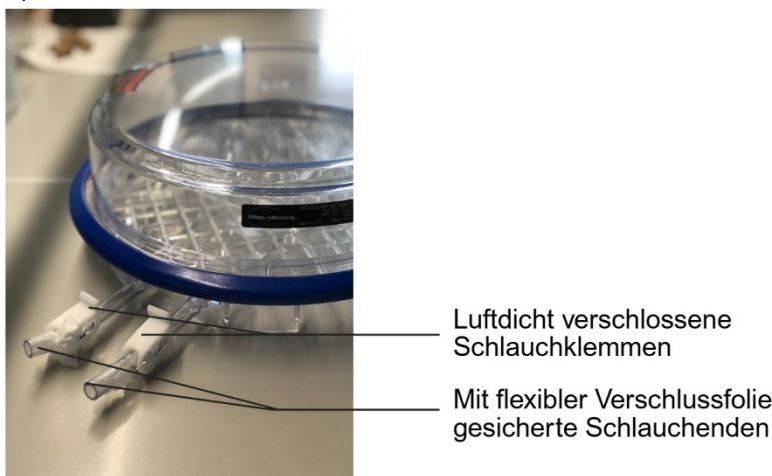


Abb. 11: Füllung der Hypoxiekammer mit sauerstoffarmem Mischgas

In a) wird die Füllung der Hypoxiekammer mit einem sauerstoffarmen Mischgas dargestellt (-----➔). Über einen zweiten Schlauch kann die Raumluft und das überschüssige Gas entweichen (-----➔). Die Regulierung und Kontrolle des Gasflusses erfolgten mithilfe des Single-Flow-Meters. Nach Füllung der Kammer erfolgte, wie in b) dargestellt, der luftdichte Verschluss der Schlauchklemmen. Um das Entweichen kleinster Gasmengen zu verhindern, wurde an die Schlauchenden eine flexible Verschlussfolie angebracht. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

Die sl-Ansätze wurden im Anschluss an die Ischämiesimulation ohne Reperfusion in modifiziertem Lämmli-Puffer für biochemische Analysen geerntet (Abb. 12). Dem modifizierten Lämmli-Puffer wurden dabei vor Gebrauch unter allen Versuchsbedingungen Protease- und Phosphataseinhibitor-Cocktails (siehe Kapitel 2.1.6) im Verhältnis 1:100 und DTT im Verhältnis 1:20 zugesetzt. Nach grober mikroskopischer Einordnung der Vitalität und Zelldichte wurden 70-150 µl des modifizierten Lämmli-Puffers kontaktlos auf jedes Well der sl-Ansätze aufgetragen, um die Denaturierung in allen Ansätzen zeitgleich einzuleiten. Daraufhin wurden die Kardiomyozyten mit Zellschabern von den Kulturplatten abgelöst und in dem modifizierten Lämmli-Puffer denaturiert. Dabei wurde für jeden Ansatz ein separater Zellschaber verwendet, um die strikte Trennung der einzelnen Ansätze und gleichzeitig ein schnelles Arbeiten zu

gewährleisten. Die geernteten Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert. Zu jeder Versuchsreihe wurden Kontrollen erhoben (Abb. 12). Die Kardiomyozyten der Kontrollansätze wurden zeitgleich zur Ischämiesimulation in Kontrollpuffer inkubiert. Dabei handelte es sich um einen glukosehaltigen Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 und einer physiologischen Kaliumchlorid-Konzentration (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.9). Dazu wurde ebenfalls jeder Kontrollansatz mit 2 ml Kontrollpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden 1,5 ml des Puffers in jedes Well gegeben und die Zellen bei 37°C, einem Sauerstoffgehalt von 95% und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% inkubiert. Zum Zeitpunkt der Ernte der Ischämie-Ansätze wurden entsprechende Kontrollen (K-sl) nach mikroskopischer Sichtprüfung der Vitalität und der Zelldichte in modifiziertem Lämmli-Puffer geerntet.

2.2.1.4.2 Simulation der Reperfusion

Zur Simulation der Reperfusion (sR) wurden die Reperusionsansätze im Anschluss an die Ischämie in serumhaltigem Kulturmedium mit Blebbistatin (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.7 und Kapitel 2.1.6) bei 37°C inkubiert. Der Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft lag dabei bei 95% und der Kohlenstoffdioxidgehalt bei 5% (Abb. 12). Durch ein rasches Abtragen des Ischämiepuffers und Auftragen von nährstoffreichem Kulturmedium wurde der abrupte Wechsel der Umgebungsbedingungen simuliert, wie er im Rahmen einer Reperfusion auftritt. Die Zellernte in modifiziertem Lämmli-Puffer erfolgt nach vorher festgelegter Dauer der Reperfusionssimulation nach mikroskopischer Prüfung der Zelldichte und Vitalität.

Die Kontrollansätze (K-sR), welche zuvor keinen Ischämischen Bedingungen ausgesetzt waren, wurden nach Abtragen des Kontrollpuffers ebenfalls in serumhaltigem Kulturmedium inkubiert. Nach entsprechender Zeit erfolgte die Ernte in modifiziertem Lämmli-Puffer.

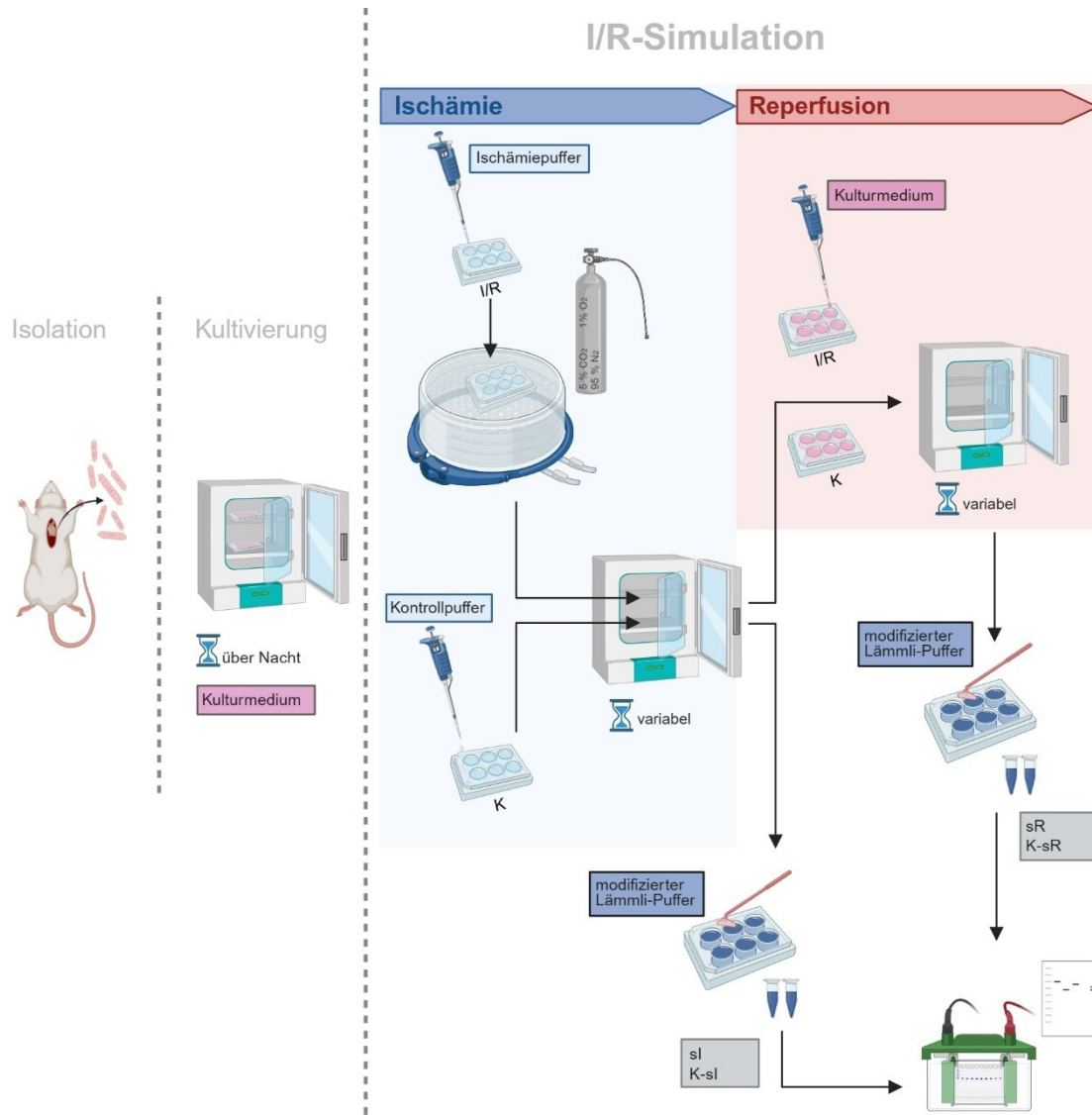


Abb. 12: Ablauf der I/R-Simulation

Dargestellt ist der grundlegende Versuchsablauf des zellkulturellen I/R-Modells. Nach der Isolation der Kardiomyozyten aus adulten Wistar-Ratten erfolgte die Kultivierung unter sauerstoffreichen Bedingungen in Kulturmedium bis zum Folgetag. Im Rahmen der I/R-Simulation wurde die Ischämie durch einen Ischämiepuffer und ein sauerstoffarmes Mischgas in der Hypoxiekammer erzeugt. Entsprechende Kontrollen wurden zeitgleich in einem Kontrollpuffer unter sauerstoffreichen Bedingungen kultiviert. Nach der Ischämie wurde ein Teil der Ansätze ohne Reperfusion (sI) sowie entsprechende Kontrollen (K-sI) für die biochemische Analyse direkt geerntet. In den übrigen Ansätzen wurde eine Reperfusion mittels Kulturmedium und Normoxie simuliert. Im Anschluss an die Reperfusion wurden die Ansätze (sR) und entsprechende Kontrollen (K-sR) ebenfalls für die biochemische Auswertung geerntet. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.2.1.5 Anwendung und Entwicklung des Modells

Basierend auf diesem grundlegenden Versuchsaufbau wurden unterschiedliche Simulationsmodelle untersucht. Dabei wurden jeweils einzelne Variablen, wie zum Beispiel die Dauer der Ischämie sowie der Reperfusion, der Anteil des Serums im Kulturmedium und verschiedene andere Zusätze variiert. Je nach Modell wurde der Fokus bei der Analyse und Auswertung auf unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge gelegt. Im Folgenden erfolgt

eine Darstellung der einzelnen Simulationsmodelle, dabei wird vor allem auf Aspekte eingegangen, die den grundlegenden Versuchsaufbau ergänzen.

2.2.1.5.1 Simulationsmodell 1: 45 min SI mit Reperfuionsreihe

Nach der Isolation erfolgte die Kultivierung bis zum Folgetag in Kulturmedium mit Blebbistatin und 1 % FBS (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.6 und Kapitel 2.1.7). An Tag 1 erfolgte die Ischämiesimulation nach dem beschriebenen Grundprinzip (Kapitel 2.2.1.4.1). Dabei wurde die Dauer der Ischämiesimulation auf 45 Minuten festgelegt. Nach Ablauf der Ischämie wurde ein Teil der Proben ohne Reperfusion direkt geerntet (SI45), gleichzeitig wurden auch entsprechende Kontrollen (K-SI45) gesichert. In den übrigen Ansätzen erfolgte eine Reperfusionssimulation für 2, 4 und 20 Stunden unter sauerstoffreichen Bedingungen in Kulturmedium mit Blebbistatin und 1% FBS. Nach Vollendung der Reperfusionssimulation wurden die Ansätze (SR2, SR4, SR20) sowie jeweils entsprechende Kontrollen (K-SR2, K-SR4, K-SR20) für die biochemischen Analysen der relativen Titinphosphorylierung, der PKC α -Aktivität und die Auswertung hypoxieassoziiierter Proteine, nach dem in Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Prinzip geerntet.

2.2.1.5.2 Simulationsmodell 2: 120 min SI mit Reperfuionsreihe

Im weiteren Verlauf der Etablierung erfolgte eine Verlängerung der Ischämiedauer auf 120 Minuten, dabei wurden alle weiteren Parameter aus dem Simulationsmodell 1 beibehalten. Nach Ablauf der 120-minütigen Ischämiesimulation wurde ein Teil der Proben ohne Reperfusion direkt geerntet (SI120). Gleichzeitig erfolgte auch die Sicherung von Kontrollen (K-SI120). In den übrigen Ansätzen wurde eine simulierte Reperfusion ebenfalls für 2, 4 und 20 Stunden durchgeführt. Nach Vollendung der Reperfusion wurden die Ansätze (SR2, SR4, SR20) sowie entsprechende Kontrollen (K-SR2, K-SR4, K-SR20) für die biochemische Analyse geerntet. Auch in diesem Modell war die Darstellung posttranslationaler Titinmodifikationen durch PKC α -bedingte Phosphorylierung der PEVK-Region sowie der Nachweis hypoxiespezifischer Proteine zentral.

2.2.1.5.3 Simulationsmodell 3: 16 h SI und 4 h SR

Im dritten Simulationsmodell erfolgte eine deutliche Verlängerung der Ischämiedauer auf 16 Stunden. Die Kultivierung bis Tag 1 nach Isolation erfolgte in Kulturmedium mit Blebbistatin und 10% FBS (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.6 und Kapitel 2.1.7). Es wurden ebenfalls Durchgänge mit 1% FBS durchgeführt. Da sich keine wesentlichen Unterschiede zeigten, wurde für dieses Simulationsmodell das Kulturmedium mit 10% Serum gewählt. Die Simulation der Ischämie erfolgte für 16 Stunden (SI16) mit entsprechender Kontrolle (K-SI16). Daran anschließend erfolgte eine Reperfusion für 4 Stunden in Kulturmedium mit 10% FBS (SR4) ebenfalls mit entsprechender Kontrolle (K-SR4). Auch in diesem Modell erfolgte die Auswertung der relativen Phosphorylierung von Titin an den Stellen S11878 und S12022

sowie die Analyse der PKC α -Aktivität. Außerdem wurde der Titinabbau durch Analyse der relativen Titinubiquitinierung, Messung der Proteinexpression titinassoziierter E3-Ligasen, Bestimmung der relativen Proteinmenge Autophagie-assoziiierter Proteine sowie Aktivitätsbestimmung von Autophagieregulatoren untersucht.

2.2.1.5.4 Simulationsmodell 4: 16 h sl mit Autophagieinhibition

Ergänzend zur Ischämiesimulation des Modells 3 wurde hier eine Autophagieinhibition mit Bafilomycin A₁ (BAF) durchgeführt. BAF inhibiert Autophagie im Schritt der Fusion des Lysosoms mit dem Autophagosom und verhindert zudem die Ansäuerung des Lysosoms, sodass die Funktionsfähigkeit der Hydrolasen beeinträchtigt wird (Yamamoto et al., 1998, Mauvezin et al., 2015). Unter BAF-Exposition kann der Autophagiefluss beurteilt werden, da es bei aktiver Autophagie zur Akkumulation spezifischer Autophagie-assoziiierter Proteine kommt (Klionsky et al., 2021). Um den Autophagiefluss sowie die Ergebnisse in Bezug auf den Titinabbau einordnen zu können, erfolgte daher eine 16-stündige Behandlung mit BAF. Die vorherige Isolation und Kultivierung wurden dabei identisch zum Simulationsmodell 3 durchgeführt. Insgesamt wurden vier Versuchsgruppen untersucht. Die erste Gruppe wurde 16 Stunden Ischämie ohne BAF ausgesetzt (sl16). Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um die entsprechende Kontrollgruppe (K-sl16). Die dritte Gruppe erhielt während der 16-stündigen Ischämiesimulation 20 nM BAF (sl16BAF). Die entsprechende Kontrollgruppe erhielt unter Kontrollbedingungen für 16 Stunden 20 nM BAF (K-sl16BAF). Im Anschluss erfolgte jeweils die Ernte der Ansätze für die biochemische Auswertung der Titinubiquitinierung und von Autophagie-assoziierten Proteinen.

2.2.1.5.5 Modell zur Messung der Hypoxiewirkung

Zusätzlich zum Simulationsmodell 3 wurden Messungen zur Einordnung des Einflusses der hypoxischen Komponente des ischämischen Reizes durchgeführt. Dabei erfolgte die Isolation und anschließende Kultivierung der Ansätze wie bereits für das Simulationsmodell 3 beschrieben (Kapitel 2.2.1.5.3). Danach wurden die Ansätze auf drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde für 16 Stunden in Ischämiepuffer kultiviert (IP16). Die Zusammensetzung des Ischämiepuffers und das Auftragen erfolgten nach dem oben beschriebene Grundmodell (siehe 2.2.1.4). Abweichend von der Ischämiesimulation wurde die IP16-Gruppe unter sauerstoffreichen Bedingungen (95% O₂, 5% CO₂) kultiviert. Die zweite Gruppe (KP16) wurde als Kontrollgruppe behandelt und für 16 Stunden unter sauerstoffreichen Bedingungen in Kontrollpuffer kultiviert. In der dritten Gruppe (sl16) erfolgte eine 16-stündige Ischämiesimulation, die den Abläufen aus Simulationsmodell 3 entspricht (siehe Kapitel 2.2.1.5.3). Nach Ernte der Ansätze in modifiziertem Lämmli-Puffer wurden *Western-Blot*-Analysen von Autophagie-assoziierten Proteinen durchgeführt, um die Wirkung der hypoxischen Komponente des ischämischen Reizes zu messen.

2.2.2 Biochemische Analyse

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur biochemischen Analyse der Zelllysate erfolgte eine Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Nach vollständiger Denaturierung der Proteine durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C wurden die Proben zur Analyse auf ein acrylamidhaltiges Gel aufgetragen. Bei der anschließenden Gelelektrophorese wanderte der negativ geladene linearisierte SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld von der Kathode Richtung Anode. Die Polyacrylamidmatrix trennt die Proteine beim Durchwandern nach ihrem Molekulargewicht auf. Dabei erscheinen größere Proteine höher im Trenngel, während kleinere Proteine näher Richtung Anode vorwandern können.

2.2.2.1.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE ist dem Trenngel, in welchem die Proteine nach ihrer Größe separiert werden, ein Sammelgel vorgeschaltet, um die Proteine zu fokussieren und die Bandenschärfe zu erhöhen. Je nach Molekulargewicht des Zielproteins wurden unterschiedliche Trenngele verwendet. Die Gele mit einem Polyacrylamidanteil von 7,5% eigneten sich vor allem für Proteine im Größenbereich von 75-289 kDa. Die 10%igen Polyacrylamidgele wurden für den Größenbereich 35-120 kDa verwendet und für kleinere Proteine eigneten sich Gele mit einem Polyacrylamidanteil von 15%.

Bei der Zubereitung dieser Gele wurden zunächst alle Bestandteile des Trenngels, wie in Tabelle 11 aufgelistet, zusammengegeben und zwischen zwei abgedichtete Glasplatten mit definierten Spacer-Abständen (0,75 mm; 1 mm; 1,5 mm) gegossen. Die feinporige Vernetzung im Gel entsteht dabei durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid, nach Zugabe von APS als Radikalspender und TEMED als Katalysator. Für eine gleichmäßige Oberfläche wurde Isopropanol während der Polymerisation auf das Trenngel gegeben.

Bestandteile	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 15%
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	3,75 ml	5 ml	7,5 ml
H ₂ O (deionisiert)	7,5 ml	6,25 ml	3,75 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml		
TEMED	7,5 µl		
APS	75 µl		

Tabelle 11: Rezept für die Trenngele (Gesamtvolumen: 15 ml)

Nach einer Stunde, sobald das Trenngel ausgehärtet war, konnte eine schmale Schicht Sammelgel aufgetragen werden. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist in Tabelle 12 aufgelistet. Durch Einbringen eines Kamms in das flüssige Sammelgel konnten Taschen für die Beladung geformt werden.

Bestandteile	Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	0,667 ml
H ₂ O (deionisiert)	3,025 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
Temed	15 µl
APS	50 µl

Tabelle 12: Rezept für das Sammelgel (Gesamtvolumen: 5 ml)

Bei der Beladung des Gels wurden 5-10 µl der Proben in die Taschen aufgetragen. Zur Größeneinordnung der Proteinbanden wurde eine Tasche mit 2,5 µl Molekulargewichtsmarker (*Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*) beladen. Dieser beinhaltet neun gefärbte Proteine mit definiertem Molekulargewicht zwischen 10 kDa und 250 kDa. Bei der Gelelektrophorese trennen sich auch diese Proteine nach ihrer Größe auf und bilden somit Referenzbanden zur Einordnung der zu analysierenden Proteinbanden.

Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel. Beim Durchlaufen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht.

2.2.2.1.2 Agarose-stabilisierte SDS-PAGE zur Darstellung von Titin

Aufgrund der Größe von bis zu 3,7 MDa müssen für die Darstellung von Titin mittels SDS-PAGE spezielle Gele angefertigt werden, denn die beschriebenen 7,5-15%igen Trenngele können Proteine in diesem Größenbereich nicht auftrennen.

Die verwendeten Titingele enthielten 2,1-2,2% Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1. Die dadurch entstehende großporigere Netzstruktur ist geeignet, um große Proteine wie Titin aufzutrennen. Zur Herstellung des Gels wurden die Bestandteile aus Tabelle 13 zusammengegeben. Dabei wurde zur Stabilisation der Titingele 1,5%ige-Agarose verwendet. Diese wurde mit APS zu dem im Wasserbad auf 48°C erwärmten Gemisch der übrigen Bestandteile hinzugefügt. Das Gel wurde zur Polymerisation zwischen zwei Glasplatten mit einem Spacer-Abstand von 0,75 mm gegossen und mit einem Kamm wurden die Beladungstaschen geformt. Nach einer Stunde war das Gel gebrauchsfertig.

Es wurden 5-10 µl der Proben in jede Beladungstasche aufgetragen. Hierbei wurde kein Molekulargewichtsmarker verwendet, da die gängigen Marker ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweisen. Da kein anderes Protein in dem Größenbereich von Titin bekannt

ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinbande nach Gelelektrophorese Titin darstellt. Das Einlaufen der Proben erfolgte mit 2 mA pro Gel. Die Stromstärke konnte im Verlauf der Gelelektrophorese auf 5 mA pro Gel erhöht werden.

Bestandteile	2,1%ige Gele	2,2%ige Gele
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (29:1)	1,4 ml	1,46 ml
H ₂ O (deionisiert)	6,67 ml	6,61 ml
Trenngelpuffer	5ml	
SDS 20%	100 µl	
TEMED	11,5 µl	
APS	150 µl	
Agarose (1,5%)	6,67 ml	

Tabelle 13: Rezept für Titingele

2.2.2.2 Western Blot

Für die weitere Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte nach SDS-PAGE eine Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels *semi-dry Western-Blot*-Verfahren. Dafür wurden bei Standardgelen jeweils 4 und bei Titingelen jeweils 5 *Blotting*-Papiere in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Anschließend wurden die in Anodenpuffer getränkten Papiere in die *Blotting*-Kassette gelegt. Daraufhin wurde die PVDF-Membran mit Ethanol aktiviert und auf den *Blotting*-Papieren platziert. Im Anschluss wurde das entsprechende Gel luftblasenfrei auf der PVDF-Membran abgelegt. Abschließend wurden darauf vier bzw. fünf in Kathodenpuffer getränkte *Blotting*-Papiere aufgelegt. Die Standardgele wurden für 15 Minuten bei 1,5 A und 20 V geblottet. Die Übertragung von Titin auf die PVDF-Membran erfolgte für 40 Minuten bei 1,0 A und 20 V.

Danach wurden die Membranen für 30-60 Sekunden in PVDF-*Stain* angefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte in PVDF-*Destain* für 3-5 Minuten auf dem Orbitalschüttler. Daraufhin wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten Membranen mit Hilfe des Fusion FX Imagers mit einer Belichtungszeit von 120-160 ms eingescannt.

2.2.2.3 Immundetektion

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden unterschiedliche Proteine und posttranslationale Modifikationen mit einem Enzym-gekoppelten Chemilumineszenzverfahren nachgewiesen.

Dafür wurden die Membranen mithilfe des Molekulargewichtsmarkers und der sichtbaren Banden für die entsprechende Proteingröße zugeschnitten. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde 2% BSA in TBST bzw. bei einigen Antikörpern 5% Trockenmilchpulver

in TBST verwendet. Nach 1-2 Stunden erfolgte die Beladung mit dem spezifischen Primärantikörper. Der Antikörper wurde in einer 0,5%igen BSA/TBST-Lösung, wie in Tabelle 4 und Tabelle 5 angegeben, verdünnt und die Membran wurde über Nacht in dieser Antikörpermischung bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Daraufhin wurde die Membran mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper behandelt, welcher in einer 0,5%igen BSA/TBST-Lösung verdünnt wurde. Der Sekundärantikörper richtete sich speziesspezifisch gegen den Fc-Teil der Primärantikörper und konnte an diesen binden. Je nach Primärantikörper wurde entweder ein *anti-rabbit* (Verdünnung 1:3000) oder ein *anti-mouse* (Verdünnung 1:5000) Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 6). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden ungebundene Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit TBST entfernt. Daraufhin wurde ECL-Reagenz auf die Membran aufgetragen. Das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol reagierte mit der Meerrettichperoxidase, welche an den Sekundärantikörper gebunden war. Das oxidierte Luminol emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses Signal wurde mittels Chemilumineszenzimager festgehalten.

2.2.2.4 Stripping

Zur Analyse der relativen Phosphorylierung von Proteinen wurde eine Membran mit mehreren Primärantikörpern nacheinander behandelt, um im Anschluss das Verhältnis des phosphospezifischen Signals zum Gesamtsignal zu berechnen. Dafür wurde zunächst der phosphospezifische Antikörper und der entsprechende Sekundärantikörper wie oben beschrieben aufgetragen und das Signal im Chemilumineszenzimager ausgelesen. Daraufhin wurden die gebundenen Antikörper durch *Stripping* entfernt. Für Titinblots wurden dabei ausschließlich die *Strippingpuffer Restore Western Blot Stripping Puffer* und *Restore Western Blot Stripping Puffer plus* von Thermo Scientific verwendet. Nach Waschen der Membran für 5 Minuten in TBS, erfolgte eine 15-minütige Inkubation im *Strippingpuffer* bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer. Anschließend wurde der Puffer gesondert entsorgt und die Membran wurde dreimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Nach Blockierung in 2%igem BSA in TBST konnte die Beladung mit dem zweiten Primärantikörper erfolgen.

Zum *Strippen* einiger Antikörper eignete sich ebenfalls ein β -Mercaptoethanol-haltiger *Strippingpuffer* (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.9). Die Membran wurde für 20 Minuten mit diesem Puffer behandelt. Anschließend wurde der Strippingpuffer den Vorgaben entsprechend entsorgt. Die Membran wurde 4-5-mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen, bevor sie für den zweiten Primärantikörper erneut blockiert wurde.

2.2.2.5 Nachweis der Hypoxie

Ein Ziel im Rahmen der Modelletablierung war die Entwicklung einer geeigneten Hypoxie-Nachweismethode. Aus diesem Grund erfolgten *Western-Blot*-Analysen nach Ischämie mit mehreren verschiedenen Antikörpern, die den Hypoxie-assoziierten Transkriptionsfaktor HIF-1 α nachweisen sollten (Majmundar et al., 2010, Zheng et al., 2021). Da unter Hypoxie ebenfalls ein Anstieg der GLUT1-Expression beschrieben worden ist, wurde zusätzlich die relative GLUT1-Expression analysiert (Sivitz et al., 1992, Ebert et al., 1995, Bashan et al., 1992).

2.2.3 Auswertung

2.2.3.1 Verwendete Computerprogramme

Für die Auswertung und die Anfertigung dieser Arbeit wurden die folgenden Programme verwendet: Adobe Photoshop CS6, Endnote20, Image-J, Microsoft Excel 2016, Microsoft Power Point 2016, Microsoft Word 2016 und GraphPad Prism 9, GraphPad Prism 10, BioRender, Adobe Lightroom.

2.2.3.2 Densitometrische Auswertung der *Western Blots*

Das Lichtsignal, welches im Rahmen der Chemilumineszenzreaktion entsteht, konnte mit dem Chemilumineszenz-Imager fotografisch festgehalten werden. Die Signalintensität wurde mit Hilfe des Programms Image-J densitometrisch ausgewertet.

Um die **relative Phosphorylierung** des Zielproteins zu beurteilen, wurden die Signale der Banden nach Auftragen des phosphospezifischen Antikörpers mit den Signalen nach Auftragen des Total-Antikörpers verglichen. Das Verhältnis aus phosphoryliertem Zielprotein zur Gesamtmenge des Zielproteins wurde dabei auf die entsprechenden Kontrollen des Blots normiert, sodass ein relatives Verhältnis gebildet wurde. Die Kontrollgruppe wurde dabei als Referenzwert (100%) definiert. Zur Analyse der **relativen Proteinmenge** wurden die Signale des Zielproteins mit den Signalen einer Beladungskontrolle (z.B. GAPDH, α -Aktinin) verglichen. Auch dieses Verhältnis wurde auf die entsprechende Kontrolle normiert, welche auf 100% gesetzt wurde.

2.2.4 Statistische Datenanalyse

Die Ergebnisse werden aus n unabhängigen Versuchen als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für die Signifikanz-Prüfung wurde nach der Identifikation von Ausreißern (*Outlier* Analyse) je nach Versuchsaufbau entweder ein t-Test, eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Dazu wurde das Programm GraphPad Prism (Version 9 und 10) verwendet.

Bei der statistischen Analyse von zwei Versuchsgruppen, in dieser Arbeit der Vergleich einer I/R-Simulationsgruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe, erfolgte zur Testung der statistischen Signifikanz nach Annahme der Normalverteilung der Daten ein **t-Test**. Vor Durchführung des t-Tests erfolgte ein F-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität. Bei signifikanter Varianzheterogenität wurde im Folgenden ein Welchs t-Test durchgeführt. Lag keine signifikante Varianzheterogenität im F-Test vor, konnte ein Students t-Test erfolgen. Wenn nicht näher spezifiziert, handelt es sich in dieser Arbeit bei einem t-Test um einen Students t-Test. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

Bei dem Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen, die sich in einer Variable unterschieden, erfolgte eine **one-way ANOVA**. Vor der Durchführung der *one-way ANOVA* wurde die Normalverteilung der Daten geprüft. Zur Testung der Varianzhomogenität wurde der Brown-Forsythe-Test durchgeführt. Zeigte sich dabei keine Abweichung von der Varianzhomogenität, erfolgten eine klassische *one-way ANOVA* und *post-hoc* Tests mit Bonferroni-Korrektur. Zeigten sich im Brown-Forsythe-Test Abweichungen von der Varianzhomogenität, wurden eine Welch-ANOVA und paarweise Mittelwertsvergleiche mit Dunnett's T3-Test durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten aus Simulationsmodell 4 erfolgte mittels klassischer **two-way ANOVA**, da in dem experimentellen Design zwei unabhängige Variablen berücksichtigt wurden. Vor der Durchführung der *two-way ANOVA* wurde die Normalverteilung der Daten geprüft. Für *two-way ANOVAs* stellt GraphPad Prism keine Möglichkeit zur formalen Prüfung der Varianzhomogenität bereit. Die klassische *two-way ANOVA* wurde dennoch durchgeführt, die Ergebnisse sind aufgrund dessen allerdings mit entsprechender Vorsicht zu interpretieren. Zur detaillierten Analyse signifikanter Gruppenunterschiede erfolgten im Anschluss Šídáks-*Post-hoc*-Tests.

Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden in den Abbildungen durch Sternchen (*) markiert. Die Anzahl der Sternchen hängt dabei vom p-Wert ab (siehe Tabelle 14).

Markierung	Bedeutung
*	$p < 0,05$
**	$p \leq 0,01$
***	$p \leq 0,001$
****	$p \leq 0,0001$

Tabelle 14: Markierung signifikanter Ergebnisse in Abhängigkeit vom p-Wert

3 Ergebnisse

3.1 Modifikationen von Titinphosphorylierungen unter I/R

Zur Untersuchung, ob eine I/R-bedingte PEVK-Hyperphosphorylierung durch PKC α in den zellkulturellen I/R-Modellen reproduziert werden kann, erfolgten nach den Simulationen (Simulationsmodell 1-3) *Western-Blot*-Analysen der relativen Phosphorylierung von Titin sowie die Aktivitätsbestimmung von PKC α . Dabei wurde die relative Titin-Phosphorylierung an den Stellen S11878 und S12022 in Bezug auf die Gesamtmenge von PEVK bestimmt. Die Aktivität von PKC α wurde durch die relative Phosphorylierung des Proteins an der Stelle T497 gemessen, da diese Stelle im Bereich der katalytischen Einheit liegt und die Phosphorylierung dieser maßgeblich an der Aktivierung beteiligt ist (Cazaubon et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Analysen sind, geordnet nach den drei Simulationsmodellen, im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Simulationsmodell 1: 45 min SI mit Reperfusionsreihe

3.1.1.1 Relative PEVK-Phosphorylierung nach I/R-Simulation

Bei der Analyse der relativen Titinphosphorylierung an der Stelle **S11878** zeigte sich nach 45-minütiger Ischämie mit $95,66 \% \pm 8,89 \%$ keine signifikante Veränderung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 2,02 \%$) (Abb. 13 a und c). Nach zweistündiger Reperfusion im Anschluss an die Ischämie zeigte sich ein Trend zu einer gesteigerten Phosphorylierung der PEVK-Region. Die relative Phosphorylierung an der Stelle S11878 war im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 3,98 \%$) mit $116,5 \% \pm 0,57 \%$ tendenziell erhöht (Welchs t-Test, $p = 0,0507$). Nach 4-stündiger Reperfusion zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 4,5 \%$). Die relative Phosphorylierung an der Stelle S11878 lag nach 4-stündiger Reperfusion bei $100,7 \% \pm 2,82 \%$. Abschließend wurde die relative Titinphosphorylierung der Stelle S11878 nach 20-stündiger Reperfusion untersucht. Diese war im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 3,51 \%$) signifikant um $19,05 \% \pm 3,59 \%$ auf einen Wert von $80,95 \% \pm 0,72 \%$ ($p = 0,006$) verringert (Abb. 13 a und c).

Auch an der Stelle **S12022** war die relative Phosphorylierung – wie Abb. 13 b) zu entnehmen ist – mit $110,50 \% \pm 7,3 \%$ nach 45-minütiger Ischämie nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 12,76 \%$). Auch nach anschließender 2-stündiger Reperfusion war die relative Phosphorylierung mit $108,70 \% \pm 8,07 \%$, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 3,15 \%$), nicht signifikant verändert. Ebenso konnte nach 4-stündiger Reperfusion ($63,97 \% \pm 4,99 \%$) (Abb. 13 b und c) kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen ($100 \% \pm 23,73 \%$) festgestellt werden ($p = 0,2115$). Anders als an der Stelle S11878 zeigte sich an S12022 nach 20-stündiger Reperfusion keine Veränderung der relativen

Phosphorylierung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 7,42 \%$). Diese lag nach 20 Stunden Reperfusion bei $98,54 \% \pm 9,38 \%$.

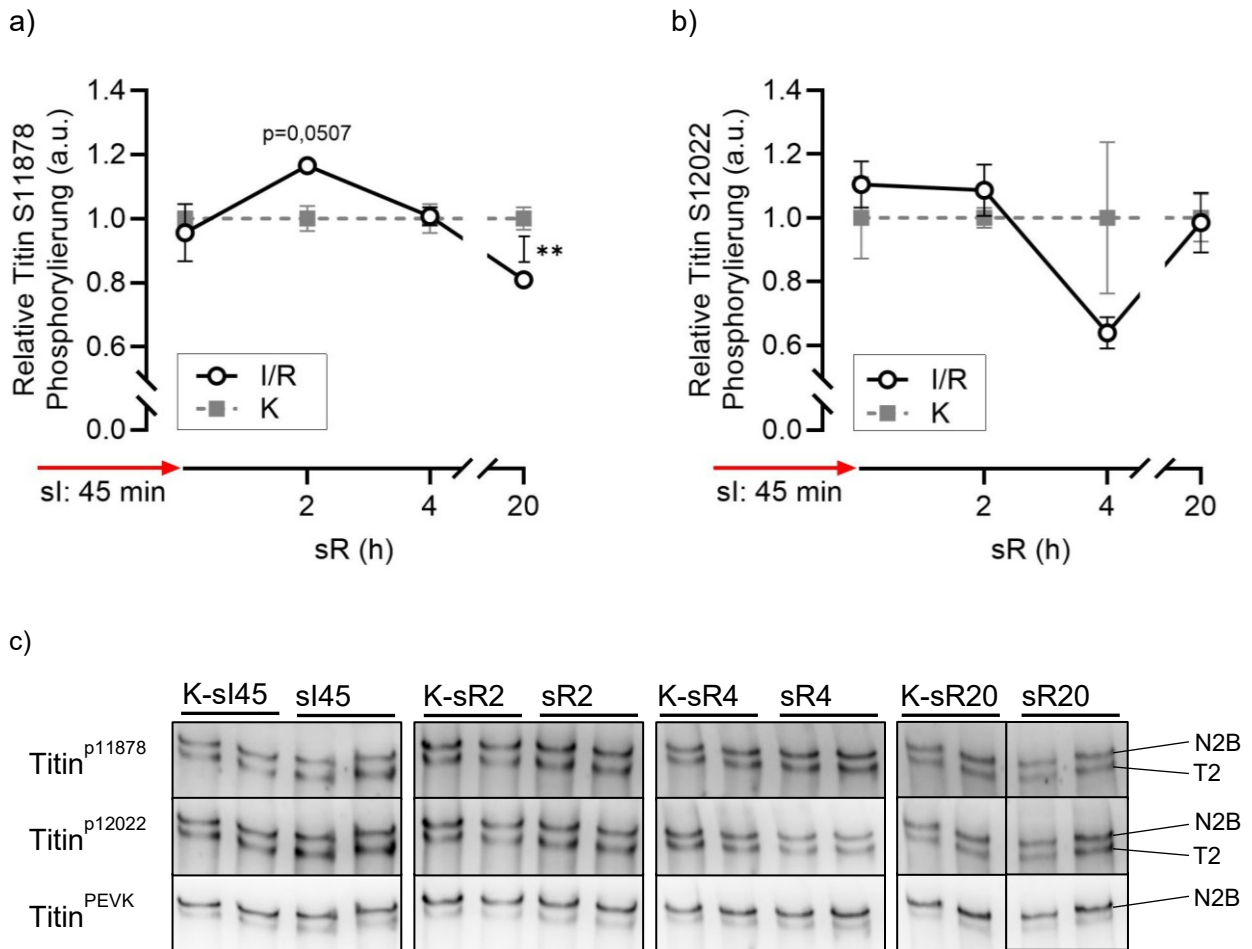


Abb. 13: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin nach 45 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)

Relative Phosphorylierung von Titin im PEVK-Segment an den Serinresten a) S11878 und b) S12022 nach 45 Minuten simulierter Ischämie (sl45) und darauffolgender 2-stündiger, 4-stündiger und 20-stündiger simulierter Reperfusion (sR2, sR4, sR20). Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test oder Welchs t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Analyse von $n = 3$ Ansätzen aus aRCM. Insgesamt wurden Kardiomyozyten aus einem Individuum verwendet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*.

Repräsentative Bilder der analysierten Blots sind in c) dargestellt. sl45 = 45-minütige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl45. sR2, sR4, sR20 = 2, 4 und 20 Stunden Reperfusion nach 45 Minuten Ischämie mit entsprechenden Kontrollen K-sR2, K-sR4, K-sR20.

3.1.1.2 PKC α -Aktivität nach I/R-Simulation

Nach 45-minütiger Ischämie zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ($100 \% \pm 3,06 \%$) mit $96,58 \% \pm 1,77 \%$ kein signifikanter Unterschied der PKC α T497 Phosphorylierung und daraus resultierend kein Unterschied der Kinaseaktivität. Auch die Ansätze mit anschließender 2-stündiger Reperfusion zeigten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Phosphorylierung ($97,29 \% \pm 4,33 \%$) verglichen mit der Kontrolle ($100 \% \pm 0,742 \%$) (Abb. 14). Ebenso konnte nach 4-stündiger Reperfusion mit einem Phosphorylierungslevel von $104,20 \% \pm 3,32 \%$ kein Unterschied zur Kontrolle ($100 \% \pm 5,45 \%$) festgestellt werden. Nach 20 Stunden Reperfusion war die relative Phosphorylierung von PKC α T497 im Vergleich zu den Kontrollen ($100 \% \pm 0,806 \%$) signifikant um $13,92 \% \pm 3,67 \%$ auf $86,08 \% \pm 3,58 \%$ reduziert ($p = 0,0192$).

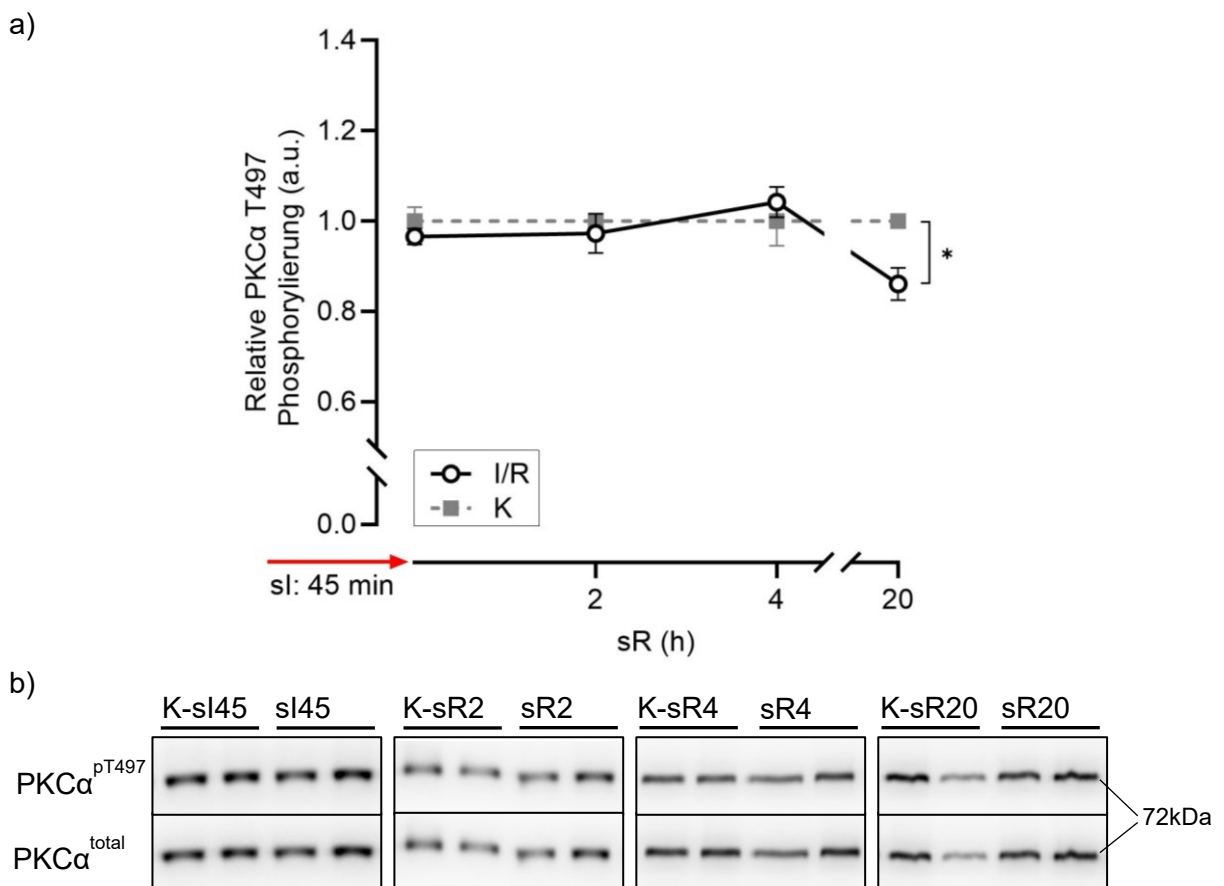


Abb. 14: Relative PKC α T497 Phosphorylierung nach 45 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)

a) Western-Blot-Analyse der relativen Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 als Indikator für die Kinaseaktivität. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Es wurden $n = 3$ unabhängige Ansätze von aRCM nach 45-minütiger simulierter Ischämie (sl45) und nach 2, 4 und 20 Stunden simulierter Reperfusion (sR2, sR4, sR20) sowie entsprechende Kontrollen (K) untersucht. Insgesamt wurden Kardiomyozyten aus einem Individuum verwendet. Unter dem Graphen sind in b) repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. sl45 = 45-minütige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl45. sR2, sR4, sR20 = 2, 4 und 20 Stunden Reperfusion nach 45 Minuten Ischämie mit entsprechenden Kontrollen K-sR2, K-sR4, K-sR20.

3.1.2 Simulationsmodell 2: Verlängerung auf 120 min SI mit Reperfusionsserie

Aufgrund der geringen Veränderungen der Titinphosphorylierung in Simulationsmodell 1 erfolgte im zweiten Schritt eine Verlängerung der Ischämiedauer zur Prüfung, ob ein stärkerer Ischämischer Stimulus für bestimmte Reaktionen der Kardiomyozyten in Zellkultur notwendig ist. In diesem Modell wurde der Ischämiestimulus auf 120 Minuten gesteigert, während alle weiteren Parameter identisch zum Simulationsmodell 1 blieben.

3.1.2.1 Relative PEVK-Phosphorylierung nach I/R-Simulation

Für die verlängerte Ischämiedauer erfolgte ebenfalls eine Analyse der relativen Titinphosphorylierung der PEVK-Region. Nach 120-minütiger Ischämie konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der relativen Phosphorylierung an der Stelle **S11878** ($101,20 \% \pm 4,31 \%$) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 4,61 \%$) festgestellt werden (Abb. 15 a und c). Nach 2-stündiger Reperfusion lag mit einer relativen Phosphorylierung von $87,26 \% \pm 5,31 \%$ im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 11,67 \%$) ebenfalls kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,3765$). Auch nach 4-stündiger Reperfusion ($95,21 \% \pm 4,34 \%$) zeigte sich keine signifikante Veränderung zur Kontrolle ($100 \% \pm 2,6 \%$). Nach 120 Minuten Ischämie und 20 Stunden Reperfusion lag mit einer relativen Phosphorylierung von $98,41 \% \pm 5,03 \%$ kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vor ($100 \% \pm 6,73 \%$) (Abb. 15 a und c).

Ebenfalls an der Stelle **S12022** war die relative Phosphorylierung nach der 120-minütigen Ischämie ($104,60 \% \pm 9,2 \%$) nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 2,37 \%$) (Abb. 15 b und c). Auch war nach 2 Stunden Reperfusion ($104,0 \% \pm 9,85 \%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100 \% \pm 9,64 \%$) keine signifikante Veränderung feststellbar (Abb. 15 b und c). Ebenso war die relative Phosphorylierung an S12022 nach 4 Stunden Reperfusion ($109,90 \% \pm 6,18 \%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100 \% \pm 3,95 \%$) nicht signifikant verändert ($p = 0,2469$) und auch nach 20 Stunden Reperfusion zeigte sich mit einer relativen Phosphorylierung von $97,48 \% \pm 7,98 \%$ keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 8,04 \%$).

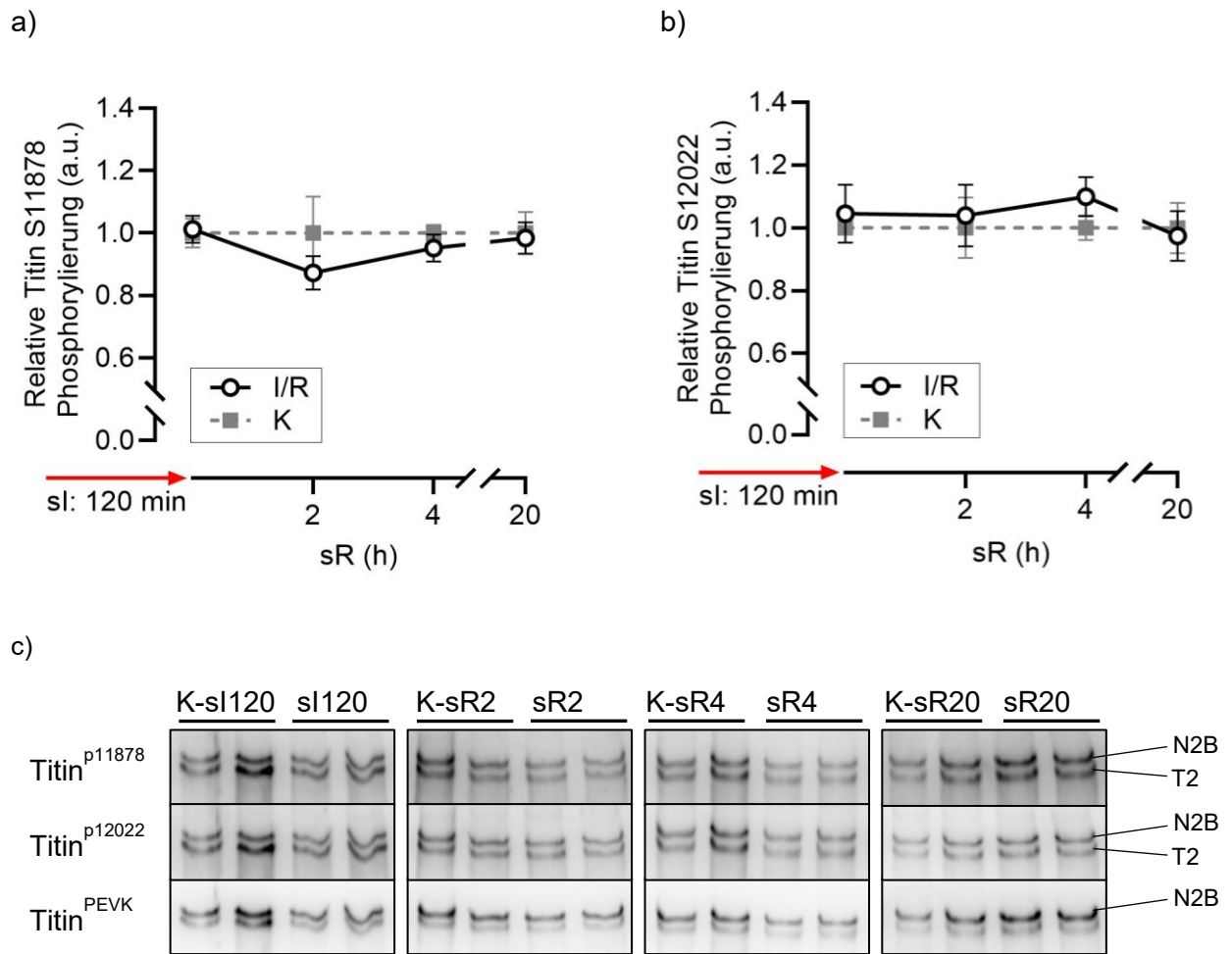


Abb. 15: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin nach 120 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)

Relative Phosphorylierung von Titin im PEVK-Segment an den Serinresten a) S11878 und b) S12022 nach 120 Minuten simulierter Ischämie (sl120) und darauffolgender 2-stündiger, 4-stündiger und 20-stündiger simulierter Reperfusion (sR2, sR4, sR20). Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Analyse von $n = 3$ Ansätzen aus aRCM. Insgesamt wurden Kardiomyozyten aus einem Individuum verwendet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*.

Repräsentative Bilder der analysierten Blots sind in c) dargestellt. sl120 = 120-minütige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl120. sR2, sR4, sR20 = 2, 4 und 20 Stunden Reperfusion nach 120 Minuten Ischämie mit entsprechenden Kontrollen K-sR2, K-sR4, K-sR20.

3.1.2.2 PKC α -Aktivität nach I/R-Simulation

Die PKC α T497 Phosphorylierung und damit die Aktivität der Kinase war, wie Abbildung Abb. 16 zeigt, nach 120-minütiger Ischämie ($95,50 \% \pm 7,97 \%$) unverändert im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 10,39 \%$). Auch nach 2-stündiger Reperfusion lag mit $108,30 \% \pm 2,62 \%$ im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 3,28 \%$) keine signifikante Veränderung vor ($p = 0,1194$). Obwohl der Mittelwert der relativen PKC α -Phosphorylierung nach 4-stündiger Reperfusion auf $186,20 \% \pm 54,95 \%$ erhöht war, lag bei gleichzeitig hoher Streuung der Einzelwerte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($100 \% \pm 9,31 \%$) vor ($p = 0,1968$). Nach 20 Stunden Reperfusion zeigte sich, wie auch schon in Simulationsmodell 1, eine signifikante Reduktion der PKC α -Phosphorylierung auf $76,11\% \pm 3,04\%$ im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 7,95 \%$) ($p = 0,0484$).

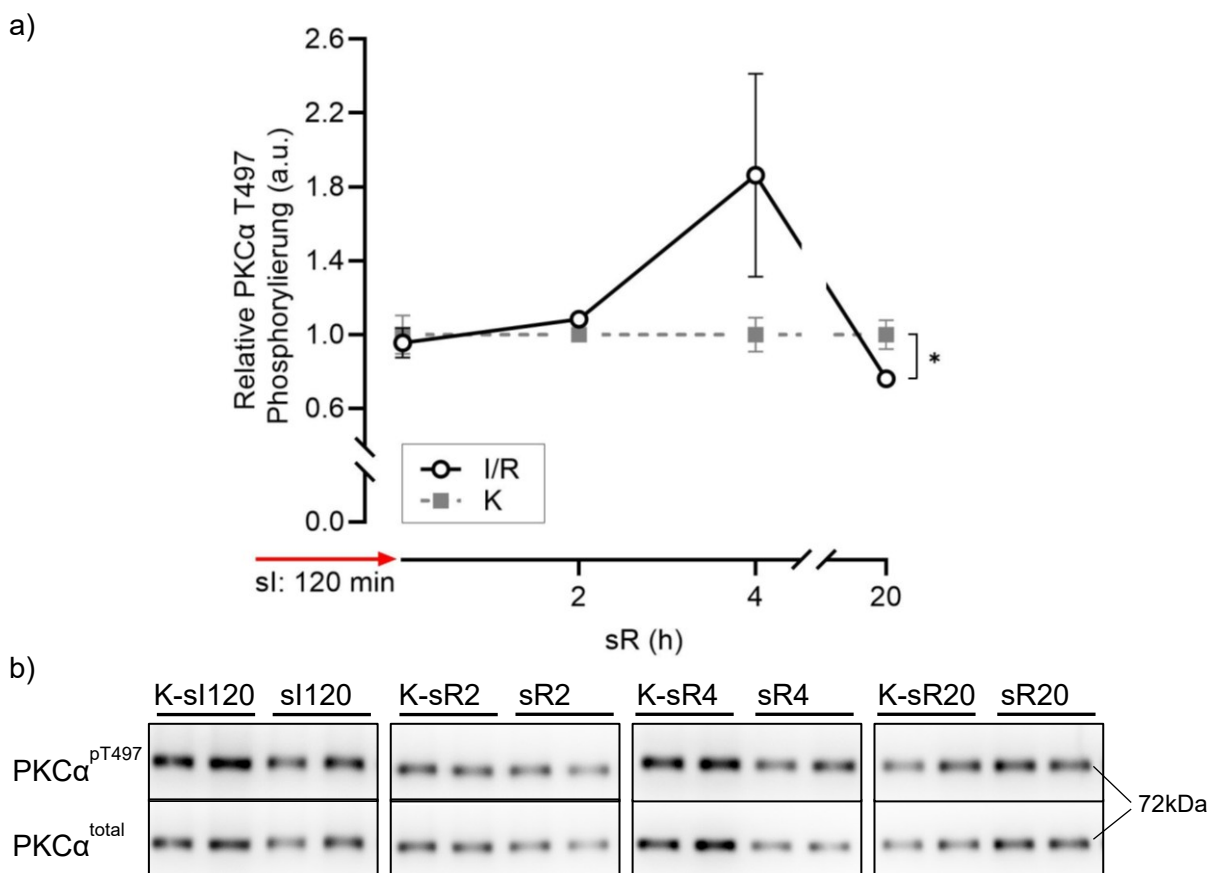


Abb. 16: Relative Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 nach 120 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)

a) *Western-Blot*-Analyse der relativen Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 als Indikator für die Kinaseaktivität. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. Es wurden $n = 3$ unabhängige Ansätze von aRCM nach 120-minütiger simulierter Ischämie (sl120) und nach 2, 4 und 20 Stunden Reperfusion (sR2, sR4, sR20) sowie entsprechende Kontrollen (K) untersucht. Insgesamt wurden Kardiomyozyten aus einem Individuum verwendet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind in b) repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. sl120 = 120-minütige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl120. sR2, sR4, sR20 = 2, 4 und 20 Stunden Reperfusion nach 120 Minuten Ischämie mit entsprechenden Kontrollen K-sR2, K-sR4, K-sR20.

3.1.3 Simulationsmodell 3: Verlängerung auf 16 h sI mit 4 h sR

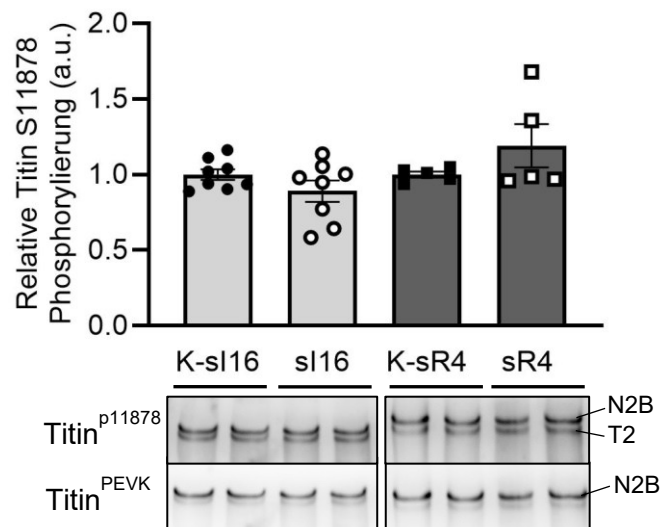
Aufgrund der ausbleibenden I/R-assoziierten PEVK-Hyperphosphorylierung in den bisher untersuchten Simulationsmodellen, die sich bei der Ischämiedauer vor allem auch an *in-vivo*- oder *ex-vivo*-Modellen mit kontrahierenden Kardiomyozyten orientierten, wurde im nächsten Schritt eine deutliche Verlängerung der Ischämiesimulation auf 16 Stunden durchgeführt. Der Stimulus der Ischämie wurde in diesem Modell gesteigert, um ebenfalls abdecken zu können, dass ein geringerer Energiebedarf der nicht-kontrahierenden Zellen zu einer Verzögerung der Zellreaktion geführt haben könnte. Denn, wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, wird ein Großteil der Energie – zwischen 60-85 % – in den Kardiomyozyten für die Kontraktion benötigt (Stanley et al., 2005, Challoner, 1968, McDougal and Dewey, 2017). Im Anschluss an die 16-stündige Ischämie erfolgte eine 4-stündige Reperfusion. Auch in diesem Modell wurden die Veränderungen der Titinphosphorylierung sowie die PKC α -Aktivität untersucht.

3.1.3.1 Relative PEVK-Phosphorylierung nach 16 h sI und nach 4 h sR

Die Analyse der relativen Titinphosphorylierung erfolgte ebenfalls an den Stellen S11878 und S12022 mittels *Western-Blot*-Verfahren. Nach 16 Stunden simulierter Ischämie ohne Reperfusion zeigte sich an **S11878** mit 89,00 % $\pm$ 7,07 % kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (100 % $\pm$ 3,55 %) ($p = 0,1861$) (Abb. 17 a). Auch nach 4 Stunden Reperfusion konnte an der Stelle S11878 mit 119,00 % $\pm$ 14,35 % keine signifikante Veränderung der relativen Phosphorylierung im Vergleich zur zeitlich entsprechenden Kontrolle (100 % $\pm$ 1,99 %) festgestellt werden (Welchs t-Test, $p = 0,2569$).

An **S12022** konnte nach 16 Stunden simulierter Ischämie mit einer relativen Phosphorylierung von 103,30 % $\pm$ 2,7 % ebenfalls keine signifikante Veränderung im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (100 % $\pm$ 2,99 %) festgestellt werden und auch nach einer anschließenden 4-stündigen Reperfusion (103,50 % $\pm$ 4,83 %) zeigte sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (100 % $\pm$ 2,33 %) (Abb. 17 b).

a)



b)

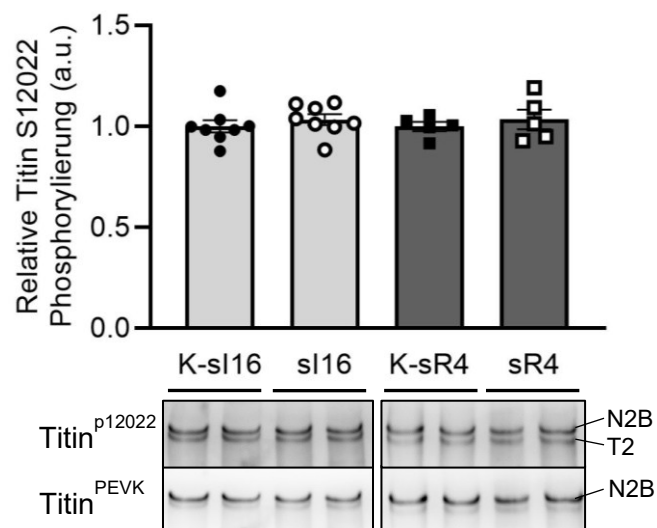


Abb. 17: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region nach 16 Stunden simulierter Ischämie und nach anschließender 4-stündiger Reperfusion

Relative Phosphorylierung von Titin im PEVK-Segment an den Serinresten a) S11878 und b) S12022 nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sl16) und darauffolgender 4-stündiger simulierter Reperfusion (sR4). Die Phosphorylierungslevel wurden auf die Gesamtmenge von PEVK mithilfe eines PEVK-Antikörpers bezogen. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test oder Welchs t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. In sl16 und K-sl16 erfolgte die Analyse von $n = 8$ Ansätzen aus aRCM (aus 3 Versuchstieren) und in sR4 und K-sR4 von $n = 5$ Ansätzen aus aRCM (aus 2 Versuchstieren). Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Es sind jeweils repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. sl16 = 16-stündige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl16. sR4 = 4 Stunden Reperfusion nach 16 Stunden Ischämie mit entsprechender Kontrolle K-sR4.

3.1.3.2 PKC α -Aktivität nach 16 h sl und nach 4 h sR

Nach 16 Stunden simulierter Ischämie ohne Reperfusion konnte eine relative PKC α -Phosphorylierung von $104,20 \% \pm 3,3 \%$ an der Stelle T497 und somit kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 2,61 \%$) festgestellt werden (Abb. 18). Auch nach anschließender vierstündiger Reperfusion konnte kein Unterschied der relativen Phosphorylierung der Kinase ($96,43 \% \pm 6,37 \%$) im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 3,22 \%$) beobachtet werden (Abb. 18).

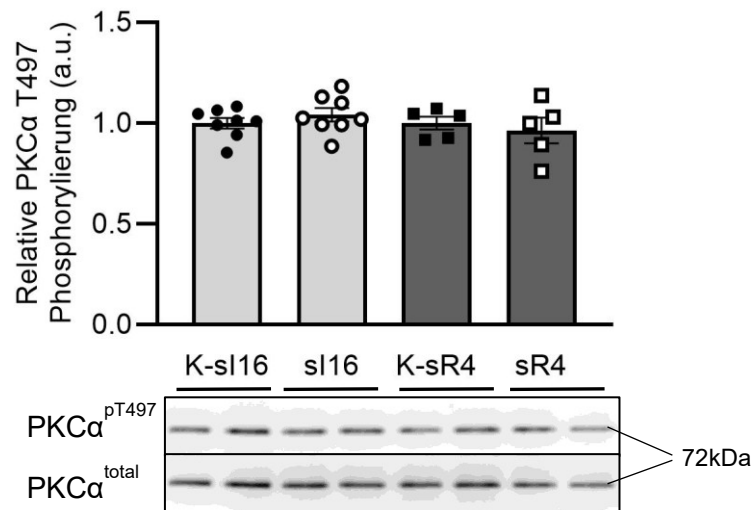


Abb. 18: Relative Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und simulierter Reperfusion für 4 Stunden

Western-Blot-Analyse der relativen Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 bezogen auf die Gesamtmenge von PKC α als Indikator für die Kinaseaktivität nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sl16) und darauffolgender vierstündiger simulierter Reperfusion (sR4). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ im Students t-Test wurden durch Sternchen (*) gekennzeichnet. In sl16 und K-sl16 erfolgte die Analyse von $n = 8$ Ansätzen aus aRCM (aus 3 Versuchstieren) und in sR4 und K-sR4 von $n = 5$ Ansätzen aus aRCM (aus 2 Versuchstieren). Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Es sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. sl16 = 16-stündige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sl16. sR4 = 4 Stunden Reperfusion nach 16 Stunden Ischämie mit entsprechenden Kontrollen K-sR4.

3.2 Titin-*Turnover* unter I/R-Simulation im zellkulturellen Modell

3.2.1 Zusätzliche Degradationsbande nach 16 Stunden Ischämie als Zeichen eines gesteigerten Titin-*Turnovers*

Nach der Verlängerung der Ischämiezeit auf 16 Stunden (siehe Simulationsmodell 3 in Kapitel 2.2.1.5.3) zeigte sich, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, keine Veränderung der PKC α -Aktivität oder der PEVK-Phosphorylierung. Allerdings konnte ein Hinweis auf einen gesteigerten Titin-*Turnover* beobachtet werden. Wie in Abb. 19 zu sehen, war nach 16-stündiger Ischämie eine weitere Degradationsbande sichtbar, die sich in vorher untersuchten Modellen mit kürzerer Ischämiedauer nicht dargestellt hatte. Diese Beobachtung stellte den Auslöser für die Untersuchung des Titin-*Turnovers* nach 16 Stunden Ischämie und 4 Stunden Reperfusion dar.

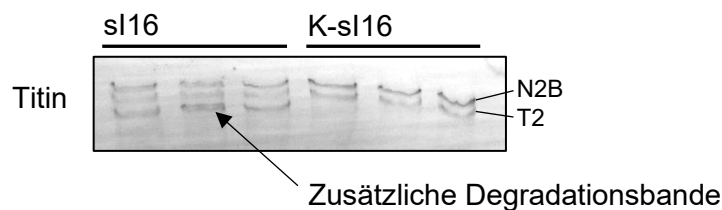


Abb. 19: Angefärbte PVDF-Membran von Titin nach 16 Stunden Ischämie

Dargestellt sind Titinbanden auf einer PVDF-Membran, welche mit PVDF-*Stain* angefärbt wurde. Die zusätzliche Degradationsbande nach 16-stündiger Ischämie (sl16) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (K-sl16) lieferte erste Hinweise für einen veränderten Titin-*Turnover* unter langanhaltender Ischämie.

Die zusätzliche Degradationsbande konnte in einem Durchgang beobachtet werden, in dem die vorangehende Kultivierung in Kulturmedium mit 1 % Serum durchgeführt wurde. Dieser Befund ließ sich in weiteren Durchläufen nicht sicher reproduzieren. Da sich aber deutliche Veränderungen weiterer abbauassoziierter Marker und Modifikationen andeuteten, erfolgten weiterführende Analysen der Degradationsprozesse in Simulationsmodell 3. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Kapitel dargestellt.

3.2.2 Analyse des Titin-*Turnovers* nach 16 h sl und 4 h sR

Zur Analyse des Titin-*Turnovers* unter 16-stündiger Ischämie und 4-stündiger Reperfusion erfolgte die Messung der relativen Titinubiquitinierung sowie die Untersuchung der relativen Proteinexpression von drei titinassozierten E3-Ligasen. Des Weiteren wurden Analysen Autophagie-assoziiierter Proteine durchgeführt und die Aktivität von Autophagieregulatoren wurde bestimmt.

3.2.2.1 Relative Titinubiquitinierung und Gesamtubiquitinierung nach 16 h sI und nach 4 h sR

Durch Ubiquitinierung werden Proteine für den Abbau, entweder über das Proteasom oder das Autophagosom, markiert. Veränderungen in der Ubiquitinierung von Titin können aus diesem Grund ein Zeichen für einen veränderten *Turnover* des Proteins sein (Kötter and Krüger, 2022, Müller et al., 2021, Kötter et al., 2016). Es erfolgte daher die Untersuchung der **relativen Titinubiquitinierung** mittels *Western-Blot*-Verfahren nach 16 Stunden Ischämie und anschließender 4-stündiger Reperfusion. Dabei konnte nach 16 Stunden Ischämie eine signifikante Reduktion der relativen Titinubiquitinierung beobachtet werden (Abb. 20 a). Im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 2,23 \%$) war die relative Ubiquitinierung von Titin mit $59,46 \% \pm 7,8 \%$ signifikant geringer (Welchs t-Test, $p = 0,0002$). Auch nach anschließender 4-stündiger Reperfusion war die relative Titinubiquitinierung mit $62,15 \% \pm 6,24 \%$ signifikant geringer als in der entsprechenden Kontrollgruppe ($100 \% \pm 8,93 \%$) (Students t-Test, $p = 0,0084$).

Zur groben visuellen Einschätzung, ob die reduzierte Ubiquitinierung unter den Simulationsbedingungen ubiquitär auftritt, wurde die **Gesamtubiquitinierung** aller Proteine über das gesamte aufgetrennte Proteinspektrum eines Standard-*Western-Blots* untersucht (Abb. 20 b). Als Ladekontrolle wurde die Anfärbung der Proteinbanden mittels *PVDF-stain* verwendet. Dabei zeigte sich sowohl in sI16 als auch in sR4 keine visuell erkennbare reduzierte Gesamtubiquitinierung.

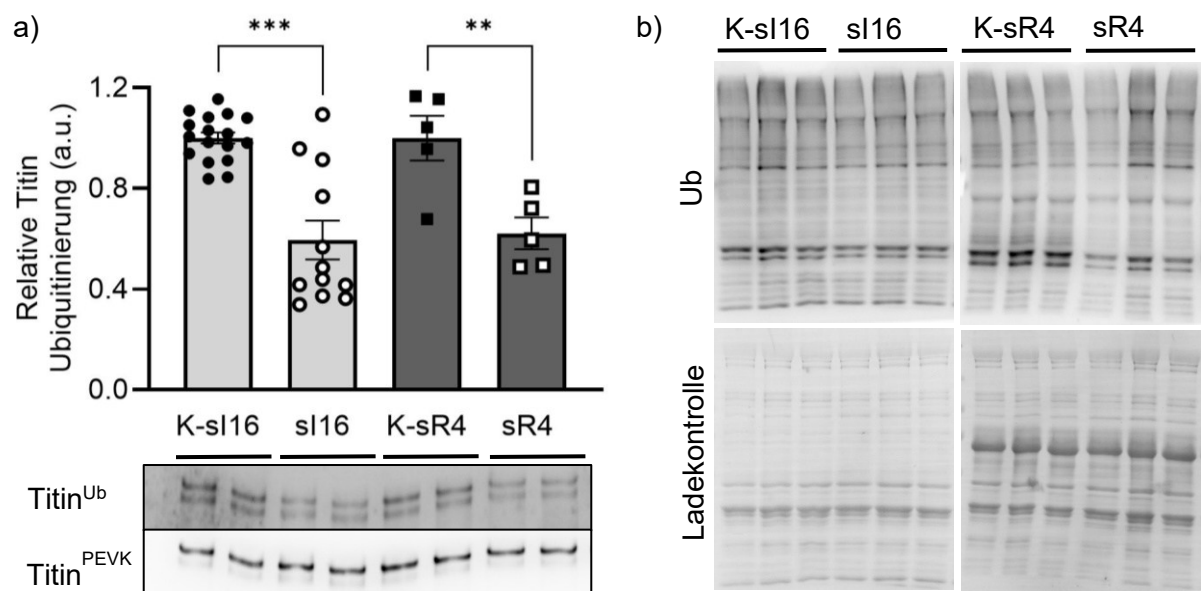


Abb. 20: Relative Titinubiquitinierung und Gesamtubiquitinierung nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

In a) sind *Western-Blot*-Analysen der relativen Ubiquitinierung von Titin bezogen auf das Gesamt-Titin, gemessen mit einem PEVK-Antikörper, nach I/R-Simulation dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die Normierung erfolgte jeweils auf die entsprechende Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mit Students t-Test oder Welchs t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

In sI16 erfolgte die Auswertung von $n = 12$ Proben aus aRCM (aus 5 Versuchstieren) und in K-sI16 erfolgte die Analyse von $n = 17$ Ansätzen aus aRCM (aus 5 Versuchstieren). In sR4 und K-sR4 wurden jeweils $n = 5$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) ausgewertet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

In b) ist die Gesamtubiquitinierung aller Proteine im Größenbereich eines Standard-*Western-Blots* mithilfe eines Ubiquitin-Antikörpers abgebildet. Als Ladekontrolle ist die mit PVDF-stain angefärbte Membran abgebildet. sI16 = 16-stündige Ischämiesimulation ohne Reperfusion und entsprechende Kontrolle K-sI16. sR4 = 4 Stunden Reperfusion nach 16 Stunden Ischämie mit entsprechender Kontrolle K-sR4.

3.2.2.2 Relative Proteinexpression titinassoziierter E3-Ligasen nach 16 h sI und nach 4 h sR

Um zu analysieren, ob eine Veränderung der Proteinexpression der E3-Ligasen zur Veränderung der Titinubiquitinierung unter I/R-Simulation beigetragen hat, wurde die relative Expression von MuRF1, CHIP und Fbx32 bestimmt. Für diese E3-Ligasen konnte eine Beteiligung an der Ubiquitinierung von Titin gezeigt werden (Müller et al., 2021). Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet.

Die relative Proteinmenge von **MuRF1** lag nach 16 Stunden simulierter Ischämie bei $113 \% \pm 16,48 \%$ und war somit nicht signifikant verändert im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100\% \pm 5,51$) (Abb. 21 a). Auch nach 4 Stunden Reperfusion zeigte sich keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle ($100\% \pm 5,74\%$) (Welchs t-Test). Die relative MuRF1-Expression nach Reperfusion lag dabei bei $95,27 \pm 1,28\%$.

Die relative Expression von **CHIP** lag nach 16-stündiger Ischämiesimulation bei $108,10 \% \pm 8,85 \%$ (Abb. 21 b). Diese war im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert ($100 \% \pm 6,18 \%$). Nach 4-stündiger Reperfusion war die relative CHIP-Expression ($93,96 \% \pm 20,26\%$) ebenfalls nicht verändert im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 4,63 \%$). Für die Auswertung nach 4-stündiger Reperfusion erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test, da die Normalverteilung durch vorherige Tests nicht bestätigt werden konnte.

Die relative **Fbx32**-Expression war nach 16-stündiger simulierter Ischämie ($87,95 \% \pm 10,49 \%$) unverändert im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100\% \pm 3,65 \%$). Auch nach 4-stündiger Reperfusion war die relative Proteinexpression von Fbx32 mit $87,94 \% \pm 8,41\%$ unverändert zur Kontrolle ($100\% \pm 8,3 \%$) (Abb. 21 c).

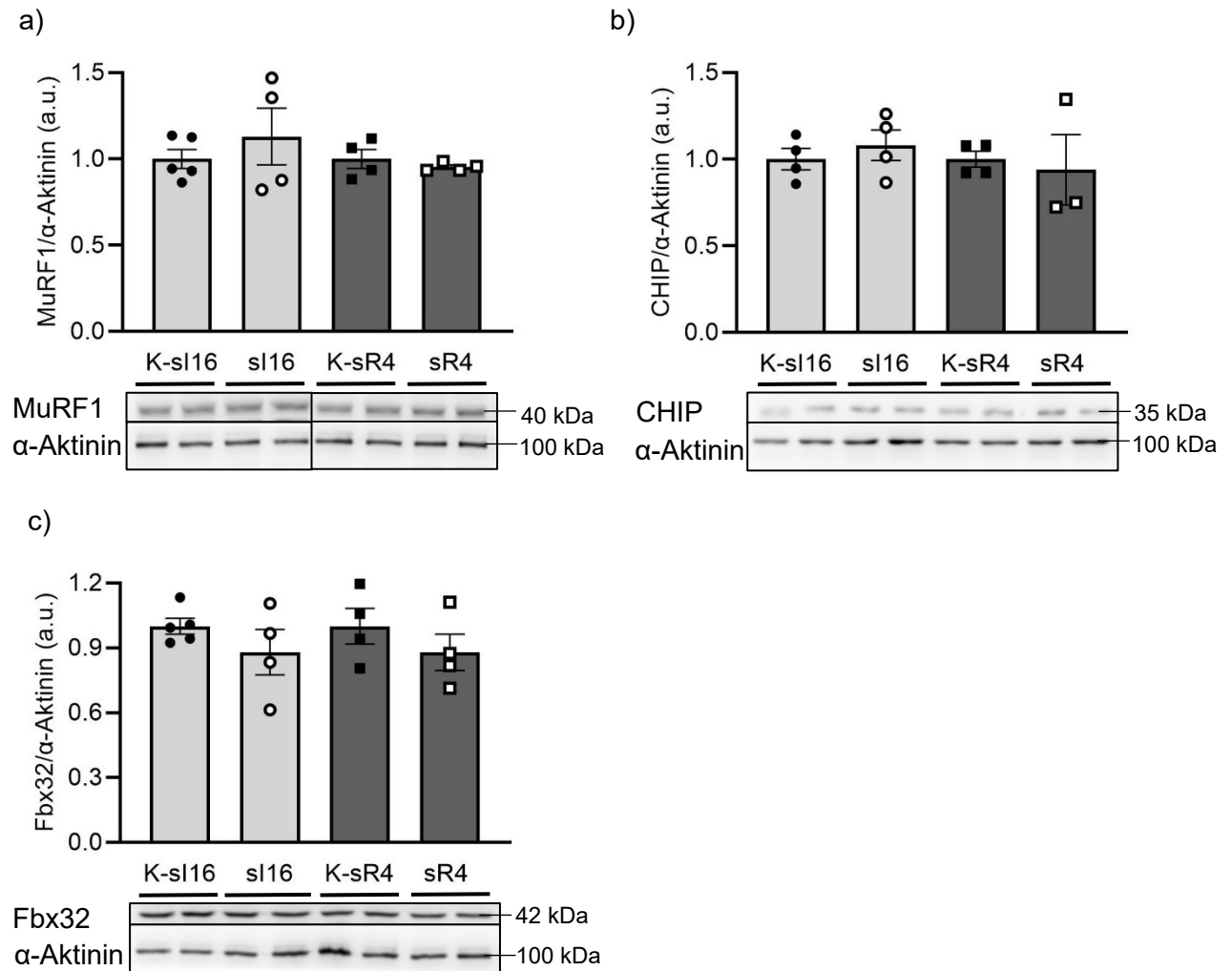


Abb. 21: Relative Proteinexpression der E3-Ligasen MuRF1, CHIP und Fbx32 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

Dargestellt sind die *Western-Blot*-Analysen der relativen Proteinexpression der E3-Ligasen a) MuRF1, b) CHIP und c) Fbx32 nach Simulation von 16 Stunden Ischämie und 4 Stunden Reperfusion. Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet. Die Normierung erfolgte jeweils auf die entsprechende Kontrollgruppe. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Students t-Test oder Mann-Whitney-U-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Nach 16-stündiger Ischämiesimulation (sl16), nach 4 Stunden Reperfusion (sR4) und in der entsprechenden Kontrollgruppe (K-sR4) erfolgte jeweils die Auswertung von $n = 4$ Proben aus aRCM (aus 2 Versuchstieren). In der Kontrollgruppe der Ischämiesimulation (K-sl16) erfolgte die Analyse von $n = 5$ Ansätzen aus aRCM (aus 2 Versuchstieren). Abweichend davon erfolgte bei der Analyse der CHIP-Expression in K-sl16 die Auswertung von $n = 4$ Proben aus aRCM und in sR4 die Auswertung von $n = 3$ Proben aus aRCM (jeweils aus 2 Versuchstieren). Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

3.2.2.3 Relative Proteinmenge Autophagie-assoziiierter Proteine nach 16 h sI und nach 4 h sR

Zur Analyse der Einflüsse von I/R auf das autophagosomal-lysosomale System wurden Autophagie-assoziierte Proteine mittels *Western-Blot*-Verfahren untersucht. Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet.

P62 ist als Ubiquitin-bindendes Protein an der Autophagie beteiligt, indem es die Interaktion von ubiquitinierten Proteinen mit der Phagophore ermöglicht. Bei der anschließenden Degradation der Proteine im Autophagosom wird auch p62 abgebaut (Pankiv et al., 2007). Die p62-Proteinmenge kann somit Hinweise auf den *Turnover* über das autophagosomal-lysosomale System geben (Klionsky et al., 2021).

Nach 16 Stunden Ischämie war die relative Proteinmenge von p62 im Vergleich zu den Kontrollansätzen ($100 \% \pm 3,55 \%$) mit $65,95 \% \pm 4,61 \%$ signifikant um $34,05 \% \pm 5,72 \%$ reduziert ($p < 0,0001$) (Abb. 22). Nach anschließender 4-stündiger Reperfusion lag die relative p62-Proteinmenge, wie in Abb. 22 zu sehen, bei $60,49 \% \pm 6,98 \%$ und war somit im Vergleich zu den Kontrollen ($100 \% \pm 3,22 \%$) signifikant um $39,51 \% \pm 7,69 \%$ reduziert ($p = 0,0021$).

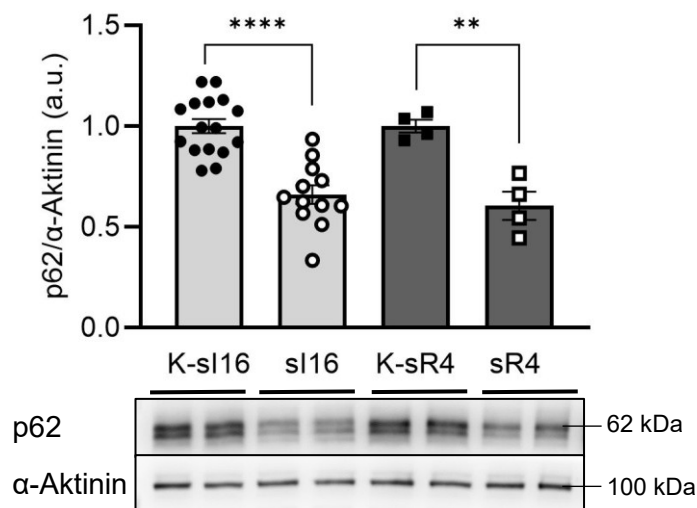


Abb. 22: Relative Proteinmenge von p62 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

Western-Blot-Analysen der relativen p62-Proteinmenge nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sl16) und 4 Stunden simulierter Reperfusion (sR4). Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K-sl16 bzw. K-sR4) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Für die Analyse von sl16 wurden $n = 12$ Ansätze aus aRCM (aus 5 Versuchstieren) und für K-sl16 wurden $n = 16$ Ansätze aus aRCM (aus 5 Versuchstieren) betrachtet. Für sR4 und K-sR4 wurden $n = 4$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) untersucht. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

Als weiterer Marker für die Aktivität der Autophagie wurde die relative **LC3-II**-Proteinmenge bestimmt. LC3-II befindet sich in der Lipiddoppelmembran des Autophagosoms und interagiert mit Ankerproteinen, welche ubiquitinierte Proteine zum Autophagosom transportieren (Rogov et al., 2014). Da die Menge von LC3-II von der Menge der Autophagosomenformation abhängt, kann die Aktivität der Autophagie biochemisch durch LC3-II gemessen werden (Kabeya et al., 2000, Levine and Kroemer, 2008).

Dabei zeigte sich nach 16-stündiger Ischämiesimulation mit $85,88 \% \pm 6,13 \%$ ein Trend zu einer reduzierten relativen Proteinmenge von LC3-II im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ($100 \% \pm 2,44 \%$) (Welchs t-Test, $p = 0,0538$) (Abb. 23). Nach vierstündiger Reperfusion lag die relative LC3-II-Proteinmenge bei $51,95 \% \pm 5,4 \%$ und war im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer ($100 \% \pm 4,22 \%$) (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,0079$) (Abb. 23). Da mehrere Tests die Normalverteilung der Daten nicht bestätigten, wurde für die Auswertung der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

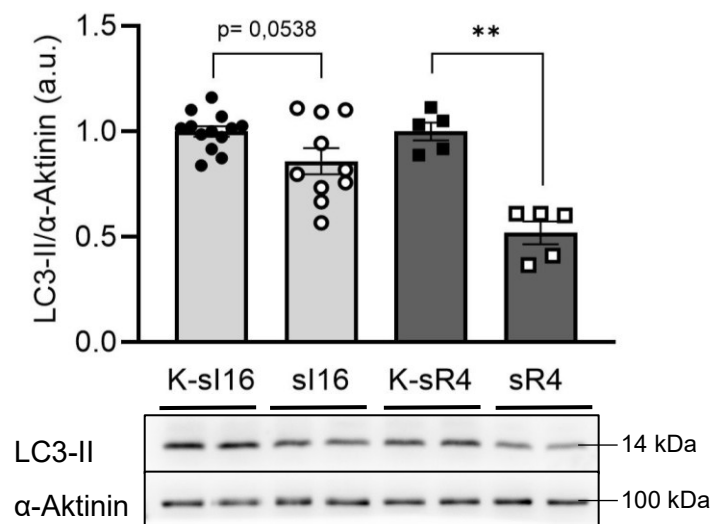


Abb. 23: Relative Proteinmenge von LC3-II nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

Western-Blot-Analysen der relativen LC3-II-Proteinmenge nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sl16) und 4 Stunden simulierter Reperfusion (sR4). Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K-sl16 bzw. K-sR4) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Welchs t-Test und Mann-Whitney-U-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Für die Analyse von sl16 wurden $n = 10$ Ansätze aus aRCM (aus 4 Versuchstieren) und für K-sl16 wurden $n = 13$ Ansätze aus aRCM (aus 4 Versuchstieren) betrachtet. Für sR4 und K-sR4 wurden $n = 5$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) untersucht. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

3.2.2.4 Aktivität von Autophagieregulatoren nach 16 h sI und 4 h sR

Die Aktivität der Autophagie wird durch verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren beeinflusst und über diese an die aktuelle Stoffwechselsituation angepasst. Zwei wesentliche Regulatoren sind der Autophagie-Inhibitor mTORC1 und der Autophagie-Aktivator AMPK (Kim et al., 2011, Klionsky et al., 2021). Die Aktivität dieser wurde mittels *Western-Blot*-Verfahren durch die Analyse der Phosphorylierungen untersucht.

Als Aktivitätsindikator für den Autophagie-Inhibitor mTORC1 wurde die relative **mTOR-Phosphorylierung** an der Stelle Ser2448 untersucht, da diese mit der Aktivität korreliert (Chiang and Abraham, 2005, Klionsky et al., 2021). Wie in Abb. 24 zu sehen, konnte nach 16 Stunden simulierter Ischämie eine signifikant auf $86,76 \% \pm 5,29 \%$ reduzierte mTOR-Phosphorylierung der Stelle Ser2448 im Vergleich zu den Kontrollen ($100 \% \pm 3,37 \%$) festgestellt werden ($p = 0,0474$). Somit kann von einer abnehmenden Aktivität des Autophagieinhibitors unter Ischämie ausgegangen werden. Nach 4-stündiger Reperfusion zeigte sich mit $113,10 \% \pm 5,97 \%$ ein Trend zu einer gesteigerten mTOR-Phosphorylierung an Ser2448 und somit zu einer gesteigerten mTOR-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($100 \% \pm 0,942 \%$) (Welchs t-Test, $p = 0,0923$).

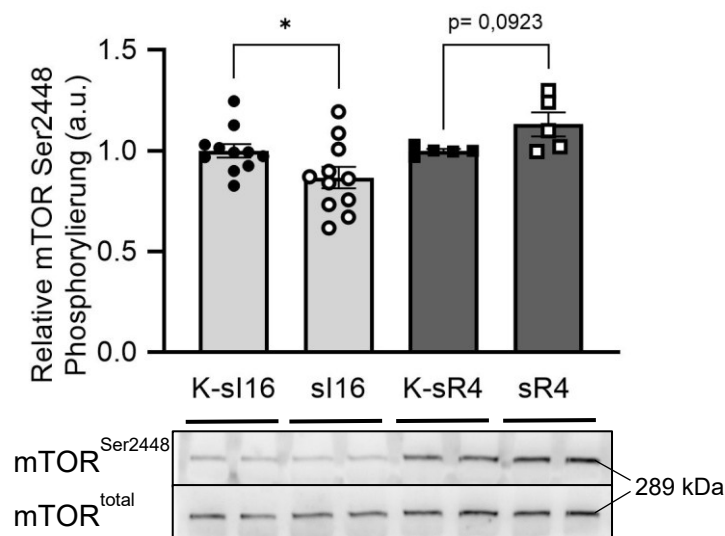


Abb. 24: Relative mTOR Ser2448-Phosphorylierung zur Aktivitätsbestimmung von mTORC1 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung von mTOR an der Stelle Ser2448 bezogen auf das Gesamtlevel von mTOR als Indikator für die mTORC1-Aktivität nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sI16) und darauffolgender 4-stündiger simulierter Reperfusion (sR4). Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K-sI16 bzw. K-sR4) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test und Welchs t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Für die Analyse von sR16 und K-sR16 wurden $n = 11$ Ansätze aus aRCM (aus 4 Versuchstieren) betrachtet. Für sR4 und K-sR4 wurden $n = 5$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) untersucht. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

Bei AMPK handelt es sich um einen Autophagie-Aktivator, der durch Phosphorylierung von ULK1 zur gesteigerten Autophagietätigkeit führt (Kim et al., 2011). Zur Analyse der Aktivität von AMPK wurde die **relative AMPK-Phosphorylierung** im Bereich der Kinase-Domäne an der Stelle Thr172 untersucht. Diese Phosphorylierung aktiviert AMPK, sodass eine Aktivitätsbestimmung der Kinase dadurch möglich ist (Hawley et al., 1996, Steinberg and Hardie, 2023, Klionsky et al., 2021).

Nach 16 Stunden Ischämie zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (100 % $\pm$ 3,87 %) eine um 72,14 % $\pm$ 4,07 % signifikant reduzierte relative Phosphorylierung von AMPK an der Stelle Thr172 (Abb. 25) (Welchs t-Test, $p < 0,0001$). Nach anschließender 4-stündiger Reperfusion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der relativen Phosphorylierung der entsprechenden Kontrolle (100 % $\pm$ 3,15 %) und der nach Reperfusion festgestellt werden (Welchs t-Test, $p = 0,2976$). Das Phosphorylierungslevel nach vierstündiger Reperfusion lag dabei bei 80,57 % $\pm$ 16,1 %.

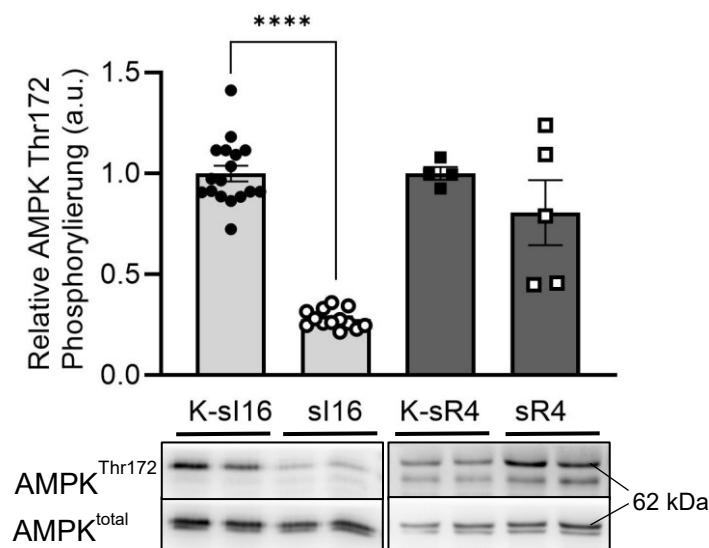


Abb. 25: Relative AMPK Thr172 Phosphorylierung zur AMPK-Aktivitätsbestimmung nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion

Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung von AMPK an der Stelle Thr172 bezogen auf die Gesamtmenge von AMPK als Indikator für die AMPK-Aktivität nach 16 Stunden simulierter Ischämie (sI16) und darauffolgender 4-stündiger simulierter Reperfusion (sR4). Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende Kontrolle (K-sI16 bzw. K-sR4) normiert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Welchs t-Test. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Für die Analyse von sI16 wurden $n = 13$ Ansätze aus aRCM (aus 5 Versuchstieren) und für K-sI16 wurden $n = 17$ Ansätze aus aRCM (aus 5 Versuchstieren) betrachtet. Für sR4 wurden $n = 4$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) und für K-sR4 wurden $n = 5$ Ansätze aus aRCM (aus 2 Versuchstieren) untersucht. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter dem Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

3.2.3 Analyse der relativen Titinubiquitinierung und Autophagie-assoziiierter Proteine nach 16 h sl und BAF-Exposition

Um die I/R-assoziierten Veränderungen des Titinabbaus und den Autophagiefluss unter den Simulationsbedingungen aus Modell 3 weiter einzuordnen, wurde ergänzend eine Autophagieinhibition mittels BAF durchgeführt (Versuchsablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.4). In dem Versuch ergaben sich insgesamt vier Gruppen: K-sl16 (Kontrollgruppe ohne BAF-Exposition), K-sl16BAF (16 Stunden unter Normoxie in Kontrollpuffer + BAF), sl16 (16-stündige Ischämiesimulation ohne BAF) und sl16BAF (16-stündige Ischämiesimulation mit BAF). Im Anschluss an die Simulation wurden abbauassoziierte Proteine und Modifikationen mittels *Western-Blot*-Verfahren gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels klassischer *two-way ANOVA* und Šidáks *Post-hoc*-Tests. Die Normierung erfolgte dabei auf K-sl16. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Folgenden dargestellt.

Die **relative Titinubiquitinierung** wurde als Indikator für einen veränderten Titinabbau analysiert. Vor der *two-way ANOVA* wurde die Normalverteilung der Daten mithilfe mehrerer Tests und durch Betrachtung des QQ-Plots geprüft und angenommen. Im Vergleich der beiden Gruppen welche BAF erhielten konnte zwischen der nicht Ischämie-exponierten Gruppe (K-sl16BAF) ($91,36 \% \pm 8,42 \%$) und der Ischämie-Gruppe (sl16BAF) ($88,39 \% \pm 5,94 \%$) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,9982$). Ebenso konnte zwischen K-sl16 ($100 \% \pm 2,23 \%$) und K-sl16BAF kein Unterschied in der Titinubiquitinierung festgestellt werden ($p = 0,8229$). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Betrachtung von sl16 ($59,46 \% \pm 7,7 \%$) im Vergleich zu sl16BAF ($88,39 \% \pm 5,94 \%$) ($p = 0,0184$) (Abb. 26 a und d). Außerdem wurde die **relative Proteinmenge von p62** mit α -Aktinin als Beladungskontrolle analysiert. Dabei konnte vor der *two-way ANOVA* die Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigt werden. Die relative p62-Proteinmenge war in sl16BAF ($139,30\% \pm 5,86\%$) signifikant niedriger als in K-sl16BAF ($229,40\% \pm 27,35$) ($p < 0,0001$). Eine signifikant erhöhte relative p62-Proteinmenge nach BAF-Gabe konnte sowohl zwischen K-sl16 ($100 \% \pm 3,55 \%$) und K-sl16BAF ($p < 0,0001$), als auch zwischen sl16 ($65,95 \% \pm 4,61 \%$) und sl16BAF ($p < 0,0001$) beobachtet werden (Abb. 26 b und d). Auch die **relative Proteinmenge von LC3-II** wurden gemessen. Zur Auswertung erfolgte vor der *two-way-ANOVA* die Prüfung und Bestätigung der Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test. Die relative Proteinmenge von LC3-II in K-sl16 ($100 \% \pm 2,44 \%$) war signifikant geringer als die in K-sl16BAF ($137,70 \% \pm 14,23 \%$) ($p = 0,0016$). Bei dem Vergleich von sl16 ($85,88 \% \pm 6,13 \%$) und sl16BAF ($99,72 \% \pm 6,86 \%$) zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied. Die relative LC3-II-Proteinmenge in K-sl16BAF war signifikant erhöht im Vergleich zu sl16BAF ($p = 0,0089$) (Abb. 26 c und d).

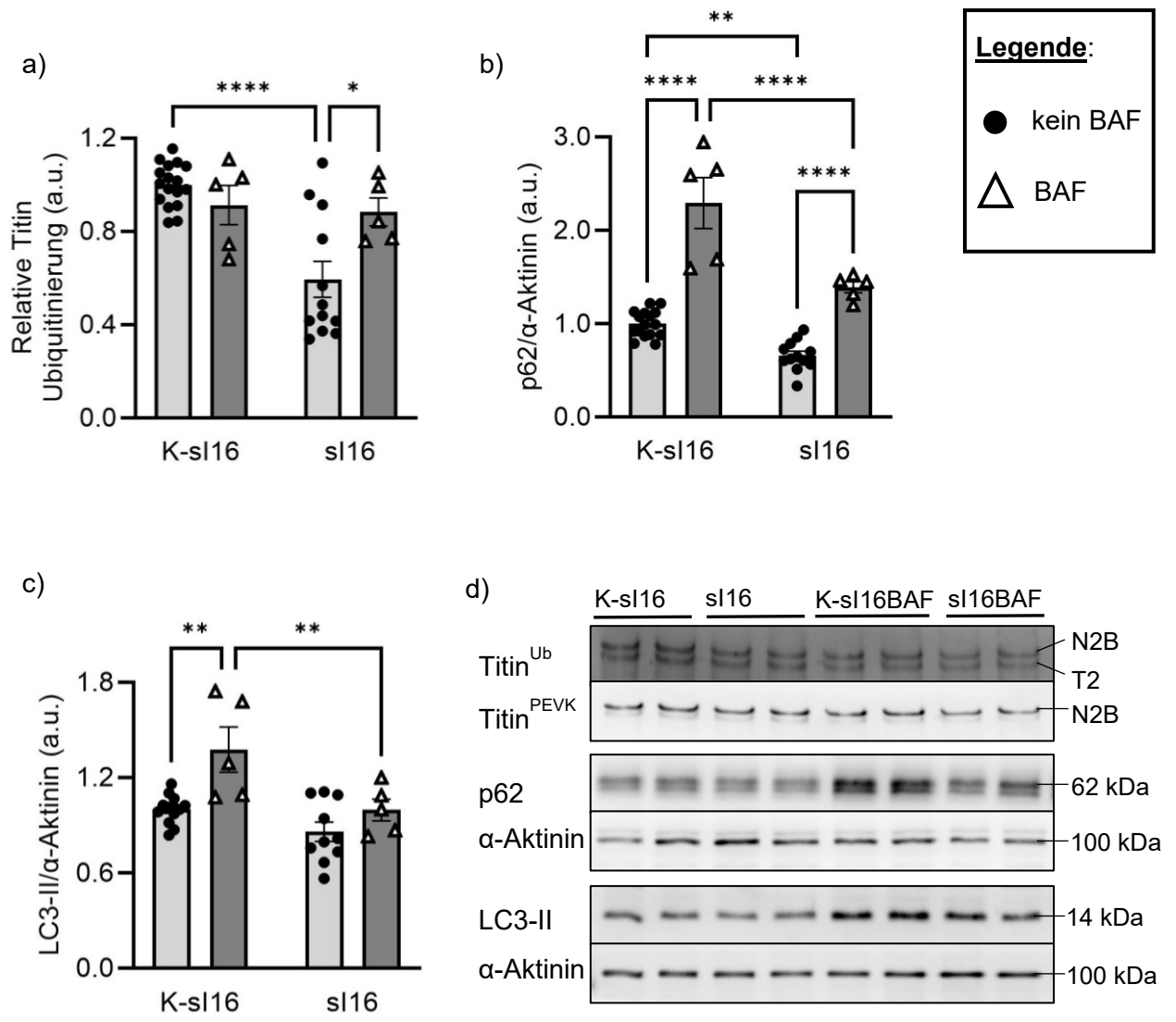


Abb. 26: Vergleich der Veränderungen Autophagie-assoziierten Modifikationen und Proteine unter 16-stündiger Ischämiesimulation mit und ohne Autophagieinhibitor durch BAF

Western-Blot-Analysen Autophagie-assoziierten Proteine und Modifikationen nach 16-stündiger Ischämiesimulation ohne (sl16) und mit Autophagieinhibition mittels BAF (sl16BAF), sowie entsprechende Kontrollen ohne (K-sl16) und mit BAF (K-sl16BAF).

In a) ist die relative Titinubiquitinierung bezogen auf das PEVK-Level nach Ischämiesimulation mit BAF (n = 5 Ansätze aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und ohne BAF (n = 12 aus aRCM aus 5 Versuchstieren) sowie entsprechender Kontrolle mit BAF (n = 5 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und ohne BAF (n = 17 aus aRCM aus 5 Versuchstieren) dargestellt. In b) ist die relative p62-Proteinmenge nach Ischämiesimulation mit BAF (n = 5 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und ohne BAF (n = 12 aus aRCM aus 5 Versuchstieren) sowie entsprechender Kontrollen mit BAF (n = 5 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und ohne BAF (n = 16 aus aRCM aus 5 Versuchstieren) dargestellt. In c) ist die relative LC3-II-Proteinmenge für die Gruppen sl16BAF (n = 5 aus aRCM aus 2 Versuchstieren), sl16 (n = 10 aus aRCM aus 4 Versuchstieren), K-sl16BAF (n = 5 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und K-sl16 (n = 13 aus aRCM aus 4 Versuchstieren) abgebildet. Als Beladungskontrolle wurde in b) und c) α-Aktinin verwendet. Die Daten sind jeweils als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels klassischer *two-way* ANOVA und Šídáks-*post-hoc*-Tests. Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. In d) sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

3.3 Nachweis der Hypoxiewirkung

3.3.1 Analyse der Hypoxie-assoziierten Proteine HIF-1 α und GLUT1

Zur Bestätigung, dass ein hypoxischer Stimulus auf die Kardiomyozyten gewirkt hat, wurde der Nachweis Hypoxie-assoziiierter Proteine mittels *Western-Blot*-Verfahren angestrebt.

Der Hypoxiemarker HIF-1 α sollte dafür in den Kardiomyozyten nach Ischämieexposition mittels *Western-Blot*-Verfahren gemessen werden. Verschiedene HIF-1 α -Antikörper zeigten dabei allerdings kein eindeutig identifizierbares Signal (Abb. 27 a), sodass alternativ die Proteinexpression von GLUT1 nach Ischämie untersucht wurde. Nach 16 Stunden Ischämie lag die relative GLUT1-Expression bei $78,06\% \pm 18,61\%$ und war somit nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100\% \pm 16,77\%$) (Abb. 27 b). Da mithilfe der Hypoxie-assoziierten Proteine kein Hypoxienachweis gelang, wurde zur Validierung der Hypoxie eine alternative Nachweismethode eingesetzt.

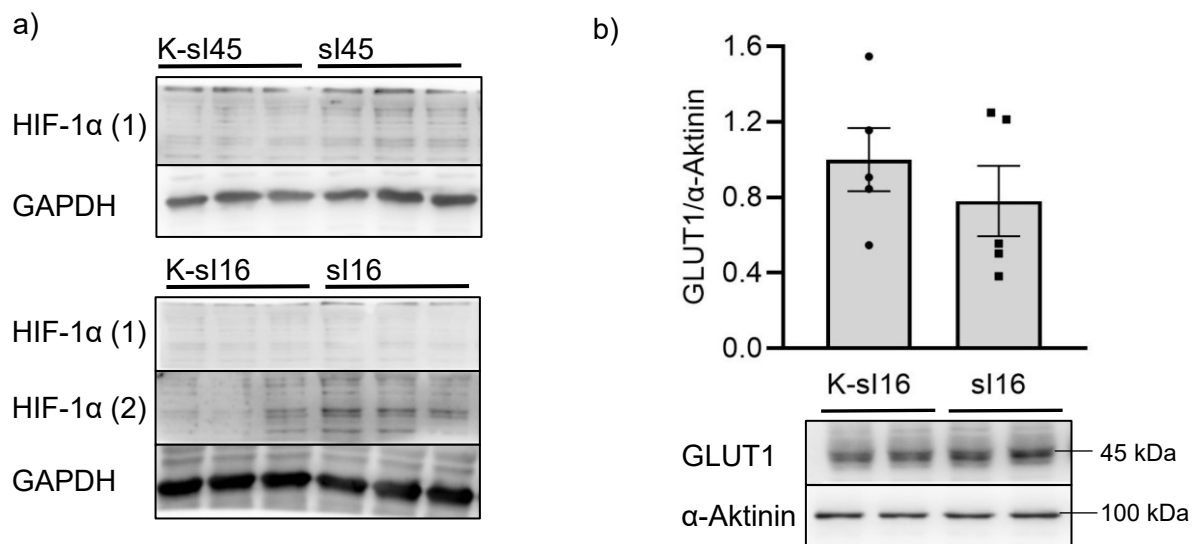


Abb. 27: Versuche des Hypoxienachweises mithilfe der hypoxieassoziierten Proteine HIF-1 α und GLUT1

Dargestellt sind in a) Blots aus verschiedenen Simulationsdurchgängen mit einer Ischämiedauer von 45 Minuten (sl45) und 16 Stunden (sl16) sowie entsprechende Kontrollen (K-sl45, K-sl16). Dabei wurden zwei verschiedene HIF-1 α -Antikörper eingesetzt: (1) = HIF-1 α -Antikörper von der Firma Abcam (ab179483) und (2) = HIF-1 α -Antikörper von der Firma Novus (NB100-105). In allen durchgeführten Analysen zeigte sich ein unspezifisches Signalbild, wie hier beispielhaft abgebildet, sodass eine zuverlässige Identifikation von HIF-1 α als Nachweis für Hypoxie nicht sicher möglich war. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet.

In b) ist die relative GLUT-1-Expression nach 16 Stunden Ischämie (sl16) im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe (K-sl16) dargestellt. Es erfolgte jeweils die Auswertung von $n = 5$ Proben aus aRCM aus insgesamt 3 Versuchstieren. Als Beladungskontrolle wurde α -Aktinin verwendet. Signifikante Unterschiede im Students t-Test sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Ebenfalls dargestellt sind Bilder repräsentativer Blots.

3.3.2 Messung des Einflusses der Hypoxie auf die Autophagie-assoziierten Veränderungen nach 16 h sl

Da die Messung Hypoxie-assoziiierter Proteine keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte, wurde ein alternatives Verfahren zum Nachweis der Hypoxie etabliert. Das Ziel dabei war es die Funktionsfähigkeit der Hypoxiekammer und die Wirkung der Hypoxie auf zellulärer Ebene zu belegen. Zu diesem Zweck wurde gemessen in welcher Ausprägung die zuvor beobachteten Autophagie-assoziierten Veränderungen (siehe Kapitel 3.2.2) auftraten, wenn die hypoxische Komponente des Ischämieereizes aus dem Simulationsmodell entfernt wurde. Dafür wurden drei Gruppe miteinander verglichen. In der Kontrollgruppe (KP16) wurden Zellen für 16 Stunden in Kontrollpuffer kultiviert. Die Kardiomyozyten der zweiten Gruppe (IP16) wurden 16 Stunden in Ischämiepuffer unter sauerstoffreichen Bedingungen kultiviert. Die dritte Gruppe (sl16) wurde 16 Stunden unter hypoxischen Bedingungen in Ischämiepuffer kultiviert. Im Anschluss erfolgte mittels *Western-Blot*-Verfahren die Auswertung der relativen Titinubiquitinierung sowie die Bestimmung der relativen Proteinmenge und der Aktivität Autophagie-assoziiierter Proteine. Die Daten wurden jeweils auf die Kontrollgruppe (KP16) normiert. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine *one-way ANOVA*.

Zur Auswertung der relativen **Ubiquitinierung von Titin** (Abb. 28 a) erfolgte vor der *one-way ANOVA* die Prüfung der Normalverteilung der Daten. Diese wurde mithilfe mehrerer Tests und durch Betrachtung des QQ-Plots geprüft und angenommen. Daraufhin wurde die Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe-Test überprüft. Da sich hierbei Abweichungen zeigten, erfolgte im Anschluss eine Welchs *ANOVA* mit paarweisen Mittelwertsvergleichen durch einen Dunnetts-T3-Test. Wie Abb. 28 a) zeigt, lag die relative Titinubiquitinierung nach Kultivierung in Ischämiepuffer (IP16) bei $90,67 \% \pm 1,64 \%$ und war somit signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100 \% \pm 2,231 \%$) ($p = 0,0123$). Die relative Titinubiquitinierung in IP16 war allerdings signifikant höher als in sl16 ($59,46 \% \pm 7,7 \%$) ($p = 0,0055$). Auch im Vergleich zu KP16 war die relative Titinubiquitinierung in sl16 signifikant geringer ($p = 0,0006$).

Außerdem wurde die relative Proteinmenge von **p62** mit α -Aktinin als Beladungskontrolle analysiert. Eine Normalverteilung der Daten und eine Varianzhomogenität konnten hier angenommen werden, sodass eine klassische *one-way ANOVA* mit darauffolgenden *Post-hoc*-Tests mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde. Die KP16-Gruppe wies eine relative p62-Proteinmenge von $100 \% \pm 3,55 \%$ auf und die relative p62-Proteinmenge der IP16-Gruppe lag bei $93,39 \% \pm 17,62 \%$. Im Bonferroni-*post-hoc*-Test zeigte sich zwischen diesen Gruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 28 b). Die relative Proteinmenge von p62 in sl16 lag, wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 erläutert, bei $65,95 \% \pm 4,61 \%$ und war somit signifikant niedriger als die in KP16 ($p < 0,0001$) und in IP16 ($p = 0,0417$).

Des Weiteren erfolgte die Analyse der relativen Proteinmenge von **LC3-II** mit GAPDH als Beladungskontrolle (Abb. 28 c). Auch in diesem Fall konnte eine Normalverteilung der Daten und eine Varianzhomogenität angenommen werden, sodass eine klassische *one-way ANOVA* mit *Post-hoc*-Tests mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde. Die relative Proteinmenge von LC3-II lag in IP16 bei $134,90 \% \pm 12,16 \%$ und war somit tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100 \% \pm 6,37 \%$) ($p = 0,055$). Die relative LC3-II-Proteinmenge in si16 lag bei $48,01 \% \pm 12,70 \%$ und war somit signifikant niedriger als in der KP-Gruppe ($p = 0,0097$) und in der IP-Gruppe ($p = 0,0004$).

Abschließend wurde die Aktivität von AMPK mittels **relativer AMPK-Phosphorylierung** an der Stelle Thr172 ausgewertet. Eine Normalverteilung der Daten konnte bestätigt werden. Da sich keine Varianzhomogenität zeigte, erfolgte im Anschluss eine Welchs *ANOVA* mit paarweisen Mittelwertsvergleichen durch Dunnetts-T3-Test. Dabei zeigte sich zwischen der AMPK-Phosphorylierung der KP16-Gruppe ($100 \% \pm 3,873 \%$) und der IP16-Gruppe ($41,98\% \pm 2,58 \%$) ein signifikanter Unterschied von $58,02 \% \pm 8,22 \%$ ($p < 0,0001$), sodass von einer geringeren AMPK-Aktivität in IP16 im Vergleich zu KP16 ausgegangen werden kann (Abb. 28 d). Die relative AMPK-Phosphorylierung von si16 lag im Vergleich dazu bei $27,86 \% \pm 1,26 \%$ und war somit signifikant niedriger als die von KP16 ($p < 0,0001$) und von IP16 ($p = 0,0117$).

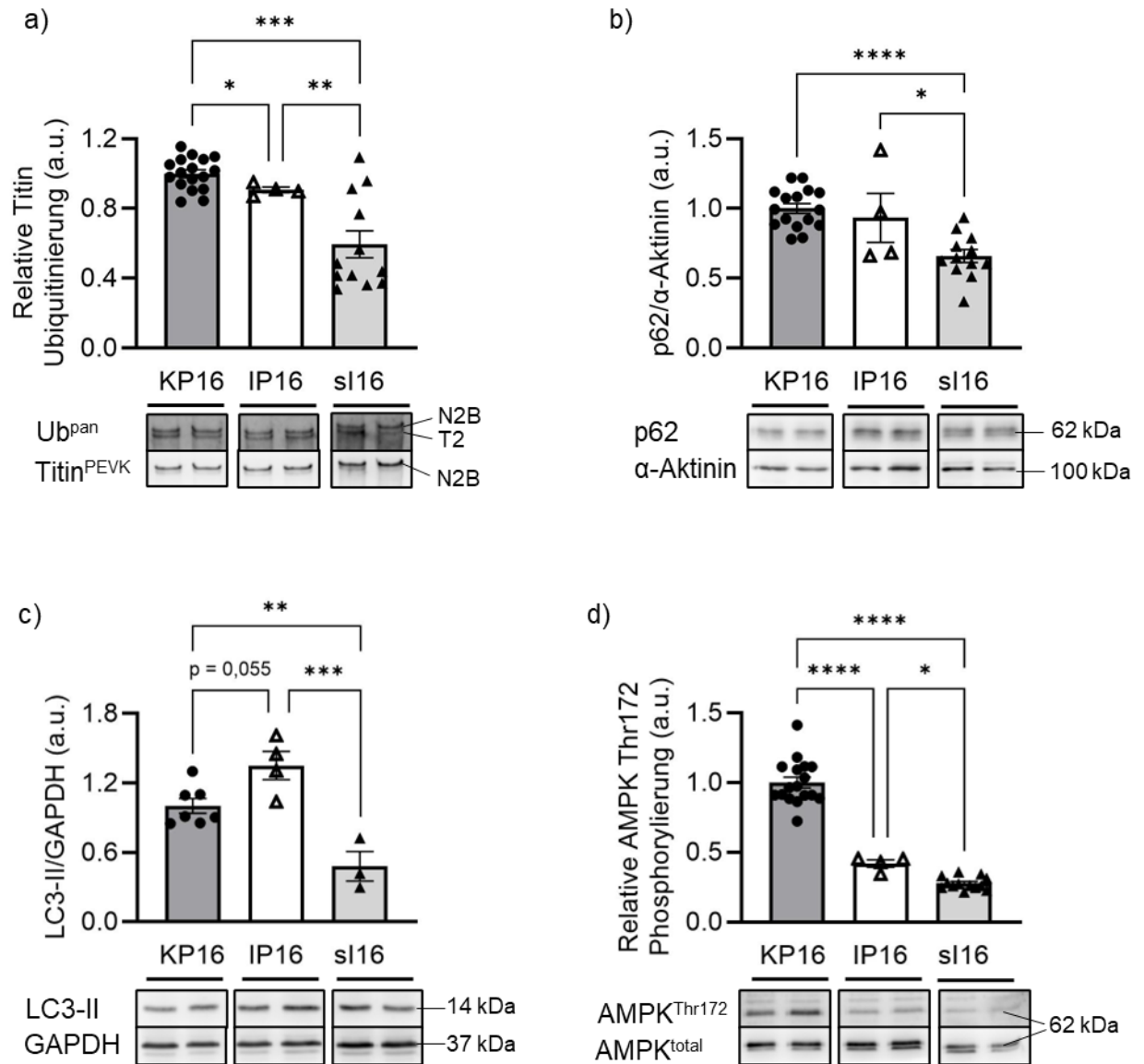


Abb. 28: Autophagie-assoziierte Proteine und Modifikationen nach 16-stündiger Kultivierung in verschiedenen Pufferlösungen mit und ohne Hypoxie

Western-Blot-Analysen Autophagie-assoziiierter Proteine und Modifikationen nach 16-stündiger Kultivierung unter Normoxie in Kontrollpuffer (KP16) und in Ischämiebuffer (IP16) sowie nach Ischämiesimulation mit Hypoxie (sl16). In a) ist die relative Titinubiquitinierung der KP16-Gruppe (n = 17 aus aRCM aus 5 Versuchstieren), der IP16-Gruppe (n = 4 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und der sl16-Gruppe (n = 12 aus aRCM aus 5 Versuchstieren) bezogen auf das Gesamt-titin dargestellt. In b) ist die relative Proteinmenge von p62 in den verschiedenen Gruppen (KP16 (n = 16 aus aRCM aus 5 Versuchstieren), IP16 (n = 4 aus aRCM aus 2 Versuchstieren), sl16 (n = 12 aus aRCM aus 5 Versuchstieren)) mit α-Aktinin als Beladungskontrolle dargestellt. In c) ist die relative Proteinmenge von LC3-II in IP16 (n = 4 aus aRCM aus 2 Versuchstieren), KP16 (n = 7 aus aRCM aus 3 Versuchstieren) und sl16 (n = 3 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) gezeigt. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Aktivität von AMPK wird in d) durch die relative AMPK Thr172 Phosphorylierung dargestellt. Auch hier erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen KP16 (n = 17 aus aRCM aus 5 Versuchstieren), IP16 (n = 4 aus aRCM aus 2 Versuchstieren) und sl16 (n = 13 aus aRCM aus 5 Versuchstieren). Die Daten sind jeweils als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Normierung erfolgte jeweils auf die KP16-Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels klassischem *one-way ANOVA* oder Welchs *ANOVA* und *Post-hoc*-Tests (Bonferroni-Test, Dunnetts T3-Test). Statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Darstellung in a.u. = *arbitrary units*. Unter den Graphen sind jeweils repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin im *in-vitro*-I/R-Modell

Die passive Steifigkeit von Titin kann durch posttranslationale Modifikation der Federelemente kurzfristig an die Umgebungsbedingungen angepasst werden. Eine Möglichkeit der Modifikation stellt dabei die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen in unterschiedlichen Abschnitten des Proteins dar (Linke and Hamdani, 2014). Je nachdem welcher Abschnitt von Titin phosphoryliert wird, kann dies entweder zu einer Steigerung oder einer Abnahme der passiven Steifigkeit führen (Hamdani et al., 2017). Insgesamt sind mehrere hundert potenzielle Phosphorylierungsstellen am Titinmolekül bekannt und ein großes Potential für die Regulation der mechanischen Eigenschaften der Kardiomyozyten wird vermutet. Allerdings sind bisher wenige dieser Stellen weitreichend erforscht und es besteht weiterhin großer Forschungsbedarf (Koser et al., 2019).

In dieser Arbeit stand die Phosphorylierung der PEVK-Region an den Stellen S11878 und S12022 im Vordergrund. Diese beiden Stellen der PEVK-Region von Titin sind über verschiedene Säugetier-Spezies konserviert (Hidalgo et al., 2009), sodass deren Phosphorylierung spezieübergreifend erforscht werden kann. Dabei sind die Phosphorylierungen durch die Serin-Threonin-Kinase PKC α an S12022 und S11878 bisher die einzig bekannten, die zu einer Steigerung der passiven Steifigkeit von Titin führen (Hamdani et al., 2017, Anderson et al., 2010). Auch im Rahmen eines Myokardinfarkts sind Modifikationen dieser Stellen der PEVK-Region beschrieben (Kötter et al., 2016, Jahns, 2021). So konnten Kötter et al. (2016) in einem I/R-Modell an Langendorff-perfundierten Mäuseherzen mit 20 Minuten globaler Ischämie und 60 Minuten Reperfusion eine verstärkte Phosphorylierung der Serinreste S11878 und S12022 feststellen. Damit einhergehend zeigte sich zudem eine signifikant erhöhte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten nach I/R und eine signifikant gesteigerte Aktivität von PKC α . Auch in einem zweiten Modell konnten diese Veränderungen 3 Tage nach permanenter LAD-Ligatur in Mäusen im Remote Areal nachgewiesen werden (Kötter et al., 2016). Insgesamt wurde aus den Ergebnissen abgeleitet, dass PKC α im Rahmen eines Myokardinfarkts aktiviert wird und über eine Hyperphosphorylierung der PEVK-Region zu einer Steigerung der passiven Steifigkeit führt. Es wird angenommen, dass diese Anpassungsprozesse in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt zur Stabilisation, bis zur Ausbildung von Narbengewebe, beitragen (Kötter et al., 2016).

Um zu untersuchen, welche Faktoren und Prozesse an der Stimulation von PKC α und der dadurch hervorgerufenen Hyperphosphorylierung der PEVK-Region beteiligt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zellkulturelles I/R-Simulationsmodell zur isolierten Untersuchung ischämischer Rattenkardiomyozyten etabliert. Das in der Arbeit verwendete zellkulturelle Modell eignete sich dabei besonders, um zu analysieren, ob die Prozesse oder Botenstoffe,

welche zu einer PKC α -bedingten Hyperphosphorylierung der PEVK-Region führen, von den Kardiomyozyten selbst ausgehen, da ausschließlich isolierte Kardiomyozyten untersucht wurden. Dadurch, dass in diesem Modell alle Zellen der Ischämie direkt ausgesetzt waren, simulierte es am ehesten den Kernbereich des Infarkts.

4.1.1 Ischämiesimulation führt in isolierten Kardiomyozyten zu keiner PKC α -Aktivierung und PEVK-Hyperphosphorylierung

In dem ersten entwickelten Simulationsmodell wurde die Beurteilung der Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus und zeitgleich die Analyse der Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin unter I/R-Simulation angestrebt. Die erste Herausforderung bei der Modellentwicklung bestand in der Festlegung einer adäquaten Ischämiedauer. Das Ziel dabei war es einen Stimulus zu erzeugen, der eine ausreichend starke Ausprägung aufwies, um eine I/R-typische Stressreaktion auszulösen, jedoch gleichzeitig nicht so stark war, dass dieser zum Absterben aller Kardiomyozyten führte. Bei der Auswahl der Ischämiedauer wurden daher verschiedene Aspekte berücksichtigt. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, treten bei einem Myokardinfarkt nach etwa 20 Minuten erste irreversible Zellschäden auf (Timmers et al., 2012). Um einen ausreichenden Stressreiz auszulösen, wurde diese Schwelle als untere Grenze für eine sinnvolle Ischämiedauer definiert. Ebenfalls wurden die bereits beschriebenen Ergebnisse in Bezug auf I/R-bedingte Titinmodifikationen aus *in-vivo*- und *ex-vivo*-Tiermodellen berücksichtigt (Kötter et al., 2016). Gleichzeitig ist jedoch zu beachten, dass die Übertragbarkeit von *ex-vivo*- und *in-vivo*-Bedingungen auf Zellkulturmodelle nur eingeschränkt möglich ist. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Daten aus einem *in-vitro*-I/R-Modell einbezogen. In diesem konnte in primären adulten Rattenkardiomyozyten nach 45 Minuten Hypoxie und zwei Stunden Reperfusion eine erhöhte LDH-Freisetzung sowie eine gesteigerte Apoptoseinduktion bei gleichzeitigem Überleben von circa 80% der Kardiomyozyten beobachtet werden (Pang et al., 2016). Diese Ergebnisse deuten auf eine adäquate Stressinduktion nach 45 Minuten Ischämie in einem zellkulturellen Modell hin, sodass die Dauer der Ischämiesimulation im ersten Modell auf 45 Minuten festgelegt wurde.

In diesem ersten Simulationsmodell zeigte sich allerdings keine erkennbare Reaktion auf den ischämischen Stimulus (Abb. 29). Weder eine signifikante Veränderung der Aktivität von PKC α noch eine signifikant veränderte Phosphorylierung der PEVK-Region an den Stellen S11878 und S12022 konnte nach Ischämie-Simulation ohne anschließende Reperfusion beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1.1). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass der ischämische Stimulus von 45 Minuten zu gering ausgeprägt sein könnte, um zu einer messbaren Reaktion der untersuchten Proteine und Modifikationen zu führen. Aus diesem Grund wurde die Ischämiedauer in einem weiteren Simulationsmodell auf 120 Minuten erhöht. Auch nach 120-minütiger Ischämie ohne anschließende Reperfusion führte der ischämische Stimulus zu keiner signifikanten Veränderung der Titinphosphorylierung an den Stellen S11878 und

S12022 (Abb. 29). Damit einhergehend wurde auch die Aktivität der Proteinkinase Ca durch den ischämischen Stimulus nicht beeinflusst (siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit der zuvor beschriebenen Veränderungen im *ex-vivo*- und *in-vivo*-Tiermodell wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsabläufen der Modelle von Kötter et al. (2016) und dem *in-vitro*-Modell dieser Arbeit analysiert. Ein wesentlicher Unterschied des zellkulturellen I/R-Modells dieser Arbeit zu den beschriebenen Modellen von Kötter et al. (2016) ist die fehlende kontraktile Aktivität der Kardiomyozyten in den Simulationen dieser Arbeit. Um das Anheften der Zellen an die Laminin-beschichteten Platten zu erleichtern und so im weiteren Verlauf die für die I/R-Simulation notwendigen Mediumwechsel ohne Zellverluste möglich zu machen, wurde ein Kontraktionsstopp der Kardiomyozyten nach deren Isolation durch Hinzugabe des Myosin-II-Inhibitors Blebbistatin gefördert (Bond et al., 2013). Da die Myokardkontraktion je nach Quelle zwischen 60-85% des Energiebedarfs der Kardiomyozyten beansprucht (Stanley et al., 2005, Challoner, 1968, McDougal and Dewey, 2017), ist davon auszugehen, dass der Bedarf der nicht-kontrahierenden Zellen geringer ist als der von kontrahierenden Kardiomyozyten. Sodass die Hypothese aufgestellt wurde, dass in den Zellen mit reduzierter Stoffwechselaktivität die Ischämiesimulation erst nach längerer Zeit einen vergleichbaren Einfluss haben könnte. Um zu überprüfen, ob in den nicht kontrahierenden Kardiomyozyten ein deutlich längerer ischämischer Stimulus für eine Aktivierung von PKC α notwendig ist, wurde in einem ergänzenden Versuch die Ischämiedauer ein weiteres Mal verlängert (Abb. 29). Dabei erfolgte eine deutliche Steigerung der Ischämiedauer auf 16 Stunden. Es zeigte sich, dass auch ein stärkerer ischämischer Stimulus, durch ausgeprägte Verlängerung der Ischämiedauer, nicht zu einer Aktivierung von PKC α mit Hyperphosphorylierung der PEVK-Region führte (siehe Kapitel 3.1.3).

Aus diesen Ergebnissen kann folglich abgeleitet werden, dass Hypoxie und die weiteren hier simulierten Komponenten einer Ischämie (Azidose, Hyperkaliämie, Nährstoffmangel, Laktatakkumulation) allein nicht ausreichen bzw. nicht die entscheidenden Faktoren sind, um in den Kardiomyozyten zu einer PKC α -Aktivierung mit einhergehender Hyperphosphorylierung der PEVK-Region zu führen (Abb. 29). Diese Ergebnisse sind mit den Erkenntnissen von Kötter et al. (2016) zur Titinphosphorylierung im Rahmen eines Myokardinfarkts vereinbar. Dort konnte eine Hyperphosphorylierung der PEVK-Region mit verstärkter Aktivierung von PKC α im *in-vivo*-Modell in einem bestimmten Infarktareal – dem Remote Areal – festgestellt werden (Kötter et al., 2016). Teilweise konnten diese Ergebnisse auch in einem *in-vivo*-Infarktmodell mit Schweinen beobachtet werden (Jahns, 2021). Hier zeigte sich nach 55 Minuten Ischämie – ebenfalls im Remote-Areal – eine gesteigerte Phosphorylierung von Titin an der Stelle S11878, allerdings ohne signifikante Hyperphosphorylierung von S12022. Zusätzlich konnte eine Tendenz zu einer gesteigerten PKC α -Aktivierung festgestellt werden (Jahns, 2021). Dabei ist das Remote-Areal bei einem Myokardinfarkt nicht unmittelbar von

Hypoxie und Ischämie betroffen, sondern wird indirekt beispielsweise durch humorale oder immunologische Mediatoren aus der Infarktzone oder durch mechanische Stressreize beeinflusst (Ruparelia et al., 2013, French and Kramer, 2007). Aus den Ergebnissen von Kötter et al. (2016) und Jahns (2021) die sich größtenteils auf das Remote-Areal beziehen, kann also ebenfalls abgeleitet werden, dass Hypoxie und Ischämie nicht unmittelbar an der PEVK-Hyperphosphorylierung im Rahmen eines Myokardinfarkts beteiligt sein müssen.

4.1.2 Reperfusionssimulation führt in isolierten Kardiomyozyten zu keiner PKC α -Aktivierung und PEVK-Hyperphosphorylierung

Da nun angenommen werden kann, dass für die PEVK-Hyperphosphorylierung kein räumlicher oder zeitlicher Zusammenhang zu der Hypoxie und Ischämie selbst bestehen muss, ist zu vermuten, dass diese von anderen infarktassoziierten Faktoren abhängig ist.

Da die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung ebenfalls in einem *ex-vivo*-I/R-Modell mit globaler Ischämie von 20 Minuten und anschließender Reperfusion von 60 Minuten aufgetreten ist (Kötter et al., 2016), besteht die Möglichkeit, dass im direkt ischämischen Areal die Wiederherstellung des Blutflusses eine Rolle bei dieser Titinmodifikation spielt. Denn interessanterweise zeigte sich in einem vergleichbaren *ex-vivo*-I/R-Modell an Langendorff-perfundierten Mäuseherzen nach 20 Minuten globaler Ischämie und lediglich kurzzeitiger Reperfusion von 3 Minuten ebenfalls keine Hyperphosphorylierung der PEVK-Region (Hidalgo et al., 2013). Um die Bedeutung der Reperfusion für die I-Band-Phosphorylierungen im Infarktareal näher zu untersuchen, erfolgte nach 45-minütiger und 120-minütiger Ischämie jeweils die Analyse einer Reperusionsreihe mit Messungen nach 2 Stunden, 4 Stunden und 20 Stunden Reperfusion. Auch an die auf 16 Stunden verlängerte Ischämie wurde eine 4-stündige Reperfusion angeschlossen.

Insgesamt konnte die Reperfusion, unabhängig von der Dauer sowohl der Ischämie als auch der Reperfusion, zu keiner gesteigerten Aktivierung von PKC α führen (Abb. 29). Die Phosphorylierung von Titin an der Stelle S12022 wurde durch die Reperfusion nicht signifikant beeinflusst, weder eine Hypo- noch eine Hyperphosphorylierung wurde nach Reperfusion beobachtet. Ebenso trat im Verlauf der Reperfusion keine S11878-Hyperphosphorylierung auf. Allerdings konnte nach 20 Stunden Reperfusion im Anschluss an 45 Minuten Ischämie eine Hypophosphorylierung an S11878 gemessen werden. Diese kann durch die damit einhergehende signifikante Aktivitätsreduktion von PKC α erklärt werden (siehe Kapitel 3.1.1). Die Aktivitätsreduktion von PKC α trat auch nach 20 Stunden Reperfusion im Anschluss an die 120-minütige Ischämie auf. Allerdings zeigte sich hier keine damit einhergehende Hypophosphorylierung von Titin in der PEVK-Region (siehe Kapitel 3.1.2). Insgesamt deutet sich hier ein weiterer Regulationsmechanismus der Titinphosphorylierung durch PKC α unter Reperfusion im Infarktkern an. Dabei könnte eine verringerte PKC α -Aktivität mit Hypophosphorylierung der PEVK-Region an der Stelle S11878 einen gegenteiligen Effekt auf

die passive Steifigkeit von Titin haben und dementsprechend zu einer verringerten passiven Steifigkeit führen. Da sich diese Titinmodifikation bisher allerdings nicht reproduzierbar in allen Simulationen zeigte, sollten vor einer konkreteren Einordnung weitere Daten erhoben werden und zusätzlich Messungen der passiven Steifigkeit erfolgen.

4.1.3 Die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region von Titin scheint durch komplexe Infarktassoziierte Vorgänge ausgelöst zu werden

Insgesamt wurde PKC α weder durch die Simulation einer Ischämie noch durch die Simulation einer Reperfusion aktiviert. Eine damit einhergehende PEVK-Hyperphosphorylierung zeigte sich ebenfalls nicht. Durch diese Ergebnisse können bestimmte Faktoren als alleinige Stimuli für die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung von S11878 und S12022 ausgeschlossen werden. Wie bereits erläutert, scheint die Hypoxie im ischämischen Areal nicht der entscheidende Faktor für die Aktivitätssteigerung der Kinase in den Kardiomyozyten zu sein. Auch bestimmte weitere Komponenten der Ischämie, wie beispielsweise die Azidose, die Laktatakkumulation, die Hyperkaliämie und der Nährstoffmangel können als ausreichende Stimuli zur Aktivitätssteigerung von PKC α ausgeschlossen werden (Abb. 29).

Neben Kardiomyozyten spielen bei einem Myokardinfarkt viele andere Zellpopulationen und Botenstoffe ebenfalls eine entscheidende Rolle (Ong et al., 2018), sodass eine Beteiligung dieser an der PKC α -bedingten PEVK-Hyperphosphorylierung ebenfalls denkbar ist. Daher lohnt sich ein Blick auf weitere Prozesse und Akteure, die im Verlauf des Myokardinfarkts relevant sind. In der Frühphase nach einem Myokardinfarkt stehen proinflammatorische Prozesse im Vordergrund (Ong et al., 2018). Nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch DAMPs, welche von geschädigten Zellen freigesetzt werden, kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Dies führt unter anderem zur Rekrutierung weiterer Immunzellen in den Infarktbereich (Anzai et al., 2022). Ein proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt ausgeschüttet wird, ist Interleukin 6 (IL-6) (George et al., 2021). Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieses Zytokin an der Steigerung der passiven Steifigkeit von Titin im Rahmen eines Myokardinfarkts beteiligt sein könnte. So konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von adulten Rattenkardiomyozyten mit IL-6 zu einer signifikant erhöhten PKC α -Aktivierung und Hyperphosphorylierung der PEVK-Region an der Stelle S11878 führte (Kötter et al., 2016). Zusätzlich konnte in einem *in-vivo*-Modell, 3 Tage nach Gabe eines blockierenden anti-IL6-Antikörpers mit anschließender Ligatur der LAD, eine signifikant geringere passive Steifigkeit der Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Kötter et al., 2016). Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass IL-6 im Rahmen eines Myokardinfarkts entscheidenden Einfluss auf die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region nimmt. Da eine gesteigerte IL6-mRNA-Expression nach Myokardinfarkt sowohl in der Infarktzone als auch im Remote-Areal gemessen werden konnte (Ruparelia et al., 2013), ist diese Hypothese ebenfalls mit den

Ergebnissen von Kötter et al. (2016) und Jahns (2021) vereinbar, weil diese die Titinassozierten Veränderungen vor allem im Remote Areal festgestellt haben. Es ist anzunehmen, dass IL-6 durch die Kardiomyozyten in dem Modell dieser Arbeit nicht ausreichend produziert werden konnte, um zu einer gesteigerten PKC α -Aktivität mit Titinhyperphosphorylierung zu führen. Es ist zwar nachgewiesen, dass auch Kardiomyozyten durch hypoxischen Stress und Botenstoffe wie IL-1 β oder Epinephrin in zellkulturellen Modellen (Yamauchi-Takahara et al., 1995, Gwechenberger et al., 1999) und nach Reperfusion in der Randzone eines Infarkts IL-6 produzieren können (Gwechenberger et al., 1999), allerdings konnten Alter et al. (2023) zeigen, dass IL-6 nach einem Myokardinfarkt hauptsächlich durch Fibroblasten produziert wird. Diese werden vor allem durch Adenosin zur IL-6 Produktion stimuliert, welches durch den Abbau von extrazellulärem ATP bereitgestellt wird. An diesem Abbauprozess sind neben den kardialen Fibroblasten auch T-Zellen beteiligt (Alter et al., 2023). Da im I/R-Modell dieser Arbeit ausschließlich adulte Rattenkardiomyozyten den Simulationsbedingungen ausgesetzt wurden und Fibroblasten sowie T-Zellen nicht vorhanden waren, kann vermutet werden, dass keine ausreichende IL-6-Produktion stattgefunden hat. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen sind zukünftig Analysen der IL-6-Expression nach I/R-Simulation sinnvoll.

Neben diesen inflammatorischen Einflüssen sind noch zahlreiche weitere Faktoren an den Pathomechanismen des Myokardinfarkts beteiligt (Hausenloy and Yellon, 2013, Prabhu and Frangogiannis, 2016). Mechanische Einflüsse, humorale Faktoren oder die Kommunikation der Kardiomyozyten miteinander könnten beispielsweise ebenfalls an der PKC α -bedingten PEVK-Hyperphosphorylierung unter I/R beteiligt sein. Wie bereits in Kapitel 1.1.5.1 beschrieben, erlaubt ein zellkulturelles *in-vitro*-Modell die gezielte Untersuchung einzelner, ausgewählter Komponenten. Dabei schränkt die Reduktion auf wenige, kontrollierte Variablen allerdings die Abbildung der Komplexität eines lebenden Organismus ein (Lindsey et al., 2018). Dementsprechend können die beobachteten Effekte im *in-vitro*-I/R-Modell dieser Arbeit nur einen Ausschnitt der komplexen Prozesse im Myokard während eines Infarkts widerspiegeln. Insgesamt sind daher weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die beteiligten Zellen und Mediatoren eindeutig zu identifizieren. Für den größtmöglichen Erkenntnisgewinn bietet sich dabei besonders die Kombination des *in-vitro*-Modells mit *in-vivo*-Infarktmodellen an.

Kann die PKC α -bedingte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region an S11878 und S12022 aus in-vivo- und ex-vivo-I/R-Modellen auch im in-vitro-I/R-Modell beobachtet werden?

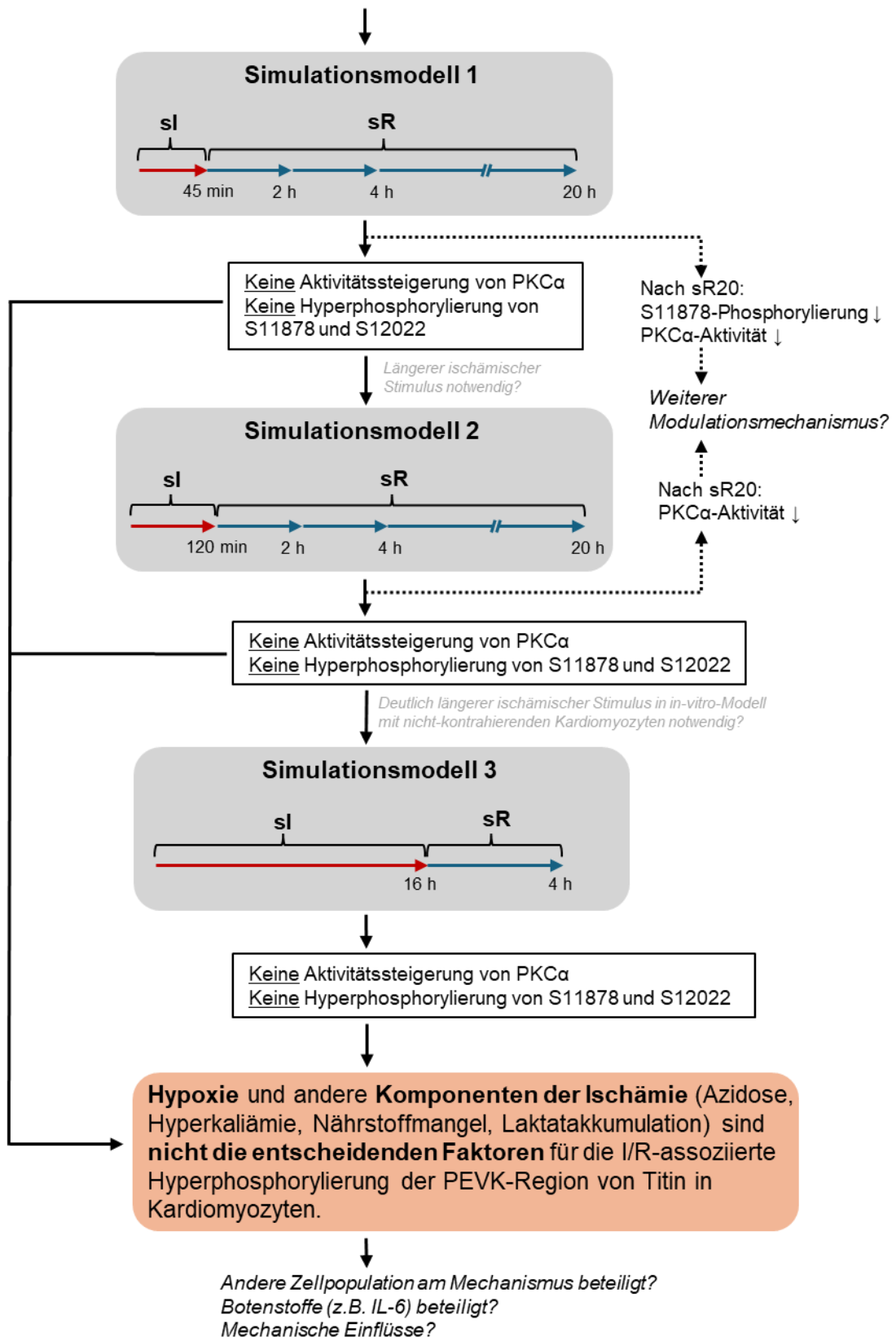


Abb. 29: Entwicklungsprozess der I/R-Simulation zur Analyse von I/R-bedingten Modifikationen der Titinphosphorylierung in der PEVK-Region

4.2 Einfluss von I/R auf den Titinabbau und die Autophagieaktivität

Der Myokardinfarkt stellt für die Kardiomyozyten eine ausgeprägte Stresssituation dar, die zu einer veränderten Aktivität verschiedener Komponenten der Proteinqualitätskontrolle führen kann. Diese Veränderungen können teilweise zum Überleben der Zellen beitragen, sind jedoch teilweise auch maladaptiv (Kötter and Krüger, 2022, Sciarretta et al., 2018, Wang and Hill, 2015). Dass auch das I/R-Modell dieser Arbeit einen Stressstimulus für die Kardiomyozyten darstellte und zu Veränderungen in der Proteinqualitätskontrolle geführt haben könnte, deutete sich nach einer Ischämiedauer von 16 Stunden an. Denn ausschließlich in diesem Modell konnte nach Gelelektrophorese und anschließender Färbung der Proben teilweise eine zusätzliche Bande im Größenbereich von Titin beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.1). Diese Bande befand sich unterhalb der N2B-Bande und der T2-Degradationsbande, sodass von einem geringeren Molekulargewicht dieser ausgegangen werden kann. Hierbei handelte es sich somit wahrscheinlich um einen weiter zerkleinerten Bestandteil von Titin (Linke and Hamdani, 2014, Opitz et al., 2003, Kulke et al., 2001). Dieser Hinweis auf einen gesteigerten Titin-*Turnover* nach 16 Stunden simulierter Ischämie war der Anstoß zur Untersuchung der Proteinqualitätskontrolle und des Titinabbaus in dem *in-vitro*-I/R-Modell. Dabei wurde fokussiert der Abbau über das autophagosomal-lysosomale System analysiert. Dieses System kann unter Stressbedingungen, wie Nährstoff- und Sauerstoffmangel, das Überleben der Zellen gewährleisten, indem selektiv oder unselektiv eigene Zellbestandteile zersetzt werden und dabei entstehende Aminosäuren und Energieträger für die überlebenswichtige Versorgung der Zellen frei werden (Rogov et al., 2014, Sciarretta et al., 2018). Wie in Kapitel 1.4.3 erläutert, konnte in mehreren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass Autophagie im Rahmen eines Myokardinfarkts sowohl während der Ischämiephase (Decker and Wildenthal, 1980, Matsui et al., 2007, Kanamori et al., 2011) als auch nach Reperfusion (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2018) verstärkt aktiviert wird. Daher erschien eine Beteiligung am Titinabbau unter I/R-Bedingungen möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dafür erfolgte die Simulation einer 16-stündigen Ischämie gefolgt von einer 4-stündigen Reperfusion (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.3). Im Anschluss wurden *Western-Blot*-Analysen verschiedener Proteine und Modifikationen durchgeführt. Analysiert wurden dabei die Ubiquitinierung von Titin sowie autophagieassoziierte Proteine und Regulatoren. Durch Zugabe von BAF zur I/R-Simulation wurde der Autophagiefluss weiter charakterisiert (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.4). Abschließend wurde die Bedeutung der hypoxischen Komponente des ischämischen Reizes durch weitere Simulationsexperimente analysiert (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.5).

4.2.1 Proteinqualitätskontrolle und Abbau von Titin im *in-vitro*-I/R-Simulationsmodell

4.2.1.1 I/R führt zu einer reduzierten Titinubiquitinierung

Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitinketten zum nachfolgenden Abbau ist sowohl mit der autophagosomal-lysosomalen als auch mit der proteasomalen Degradation assoziiert (Ji and Kwon, 2017). Eine Veränderung in der Ubiquitinierung aller Proteine oder spezifisch von einzelnen Proteinen kann daher auf eine veränderte Proteindegradation über beide Systeme oder eins der beiden Systeme hindeuten.

Nach Simulation von 16 Stunden Ischämie und 4 Stunden Reperfusion zeigte sich sowohl nach der Ischämie als auch nach anschließender Reperfusion eine deutlich reduzierte relative Titinubiquitinierung (siehe Kapitel 3.2.2.1). Diese Reduktion kann durch unterschiedliche Mechanismen bedingt sein. Einerseits ist es denkbar, dass es im Rahmen der I/R-Simulation zu einer geringeren Titinubiquitinierung und -degradation, zum Beispiel durch eine reduzierte Aktivität der E3-Ligasen, kam. Diese katalysieren im aktiven Zustand die Übertragung von Ubiquitin auf entsprechende abzubauenende Zielproteine und können durch verschiedene Mechanismen in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Vittal et al., 2015). In diesem Zusammenhang konnten Müller et al. (2021) zeigen, dass aus einer siRNA-bedingten Herabregulation der drei E3-Ligasen MuRF-1,-2 und -3 eine signifikant geringere Titinubiquitinierung resultierte. Des Weiteren führte eine siRNA-bedingte kombinierte Herabregulation der E3-Ligasen CHIP und Fbx32 unter Autophagieinhibition ebenfalls zu einer reduzierten Titinubiquitinierung (Müller et al., 2021). Um zu überprüfen, ob die reduzierte Titinubiquitinierung aus der verringerten Expression einer oder mehrerer E3-Ligasen resultierte, wurde die relative Proteinexpression von MuRF1, CHIP und Fbx32 ermittelt. Diese war bei allen drei E3-Ligasen sowohl nach Ischämiesimulation als auch nach anschließender Reperfusion unverändert (siehe Kapitel 3.2.2.2), sodass eine reduzierte Expression dieser E3-Ligasen wahrscheinlich nicht die Ursache der verminderten Titinubiquitinierung ist.

Eine weitere mögliche Erklärung für die veränderte Titinubiquitinierung ist, dass die ubiquitinierte Form unter den Stressbedingungen vermehrt durch proteasomale Mechanismen oder durch Autophagie abgebaut wurde, sodass letztendlich ein verminderter Anteil an ubiquitiniertem Titin nachweisbar ist. Dass gesteigerte Autophagie (Dutta et al., 2013) oder eine erhöhte Proteasom-Aktivität (VerPlank et al., 2019) zu einer Abnahme ubiquitinierten Proteine führen können, wurde bereits experimentell gezeigt. Vor dem Hintergrund, dass eine Aktivierung und Beteiligung der Autophagie an der Stressreaktion der Kardiomyozyten nach I/R auf Grundlage bisheriger Studien wahrscheinlich ist (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2011, Kanamori et al., 2011), konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf die Analyse der Autophagie.

4.2.1.2 Die Gabe von BAF zeigt, dass ubiquitiniertes Titin unter Ischämie vermehrt durch Autophagie abgebaut wird

Zur Überprüfung, ob die reduzierte Titinubiquitinierung auf einen gesteigerten Titinabbau über das Autophagosom zurückzuführen ist, wurde in ergänzenden Experimenten der Autophagieinhibitor BAF eingesetzt (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.4). Bafilomycin A₁ inhibiert den Autophagiefluss, indem es die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom stört und die Ansäuerung der Lysosomen hemmt, wodurch es die Aktivität lysosomaler Hydrolasen reduziert (Yamamoto et al., 1998, Klionsky et al., 2008, Mauvezin et al., 2015). Unter BAF-Exposition akkumulieren folglich jene Proteine, die zur Degradation dem autophagosomal-lysosomalen System zugeführt wurden. Dies konnte durch Müller et al. (2021) auch für Titin gezeigt werden, da es nach BAF-Exposition zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem Titin, einhergehend mit einer gesteigerten Titingesamtmenge sowie gesteigertem T2/T1-Verhältnis kam (Müller et al., 2021). Somit kann eine Akkumulation von ubiquitiniertem Titin unter BAF-Exposition eine Beteiligung der Autophagie an der Titindegradation unter verschiedenen Bedingungen zeigen.

Unter Kontrollbedingungen führte die 16-stündige BAF-Behandlung zu keiner signifikanten Veränderung der Titinubiquitinierung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (siehe Kapitel 3.2.3). Dies lässt vermuten, dass der basale Abbau von ubiquitiniertem Titin über Autophagie in den adulten Kardiomyozyten eher gering ist (Abb. 30). Wie bereits in Kapitel 1.4.4 erläutert, wird von einer Beteiligung verschiedener Akteure am Titinabbau ausgegangen (Kötter and Krüger, 2022, Müller et al., 2021). Da über das Proteasom ebenfalls Ubiquitin-markierte Proteine abgebaut werden können (Wang et al., 2011, Willis and Patterson, 2006) und eine Proteasombeteiligung am Titinabbau bereits gezeigt werden konnte (Müller et al., 2021), ist eine bevorzugte Titindegradation über das Proteasom unter Basalbedingungen möglich. Die proteasomale Komponente des Titinabbaus könnte in Zukunft ebenfalls in dem Simulationsmodell dieser Arbeit, durch gezielte Inhibition des Proteasoms, näher untersucht werden (Lee and Goldberg, 1998).

Die signifikant reduzierte Titinubiquitinierung nach 16-stündiger Ischämie konnte durch eine parallele BAF-Gabe wieder aufgehoben werden (siehe Kapitel 3.2.3). Dies unterstützt die Hypothese, dass es unter Ischämie zu einem verstärkten Abbau von ubiquitiniertem Titin durch Autophagie kommt (Abb. 30). Eine verringerte Titinubiquitinierung durch reduzierte Aktivität der E3-Ligasen oder durch einen gesteigerten Abbau über das Proteasom scheint bei dem Ergebnis eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall nicht mit einem Anstieg der relativen Titinubiquitinierung durch Autophagieinhibition zu rechnen ist. Dass die relative Titinubiquitinierung nach Ischämiesimulation und Autophagieinhibition die relative Titinubiquitinierung unter Kontrollbedingungen nicht überschreitet kann darauf hindeuten, dass ubiquitiniertes Titin auch unter dem ischämischen Reiz nicht ausschließlich durch Autophagie abgebaut wird, sondern ebenfalls andere Systeme wie beispielsweise das Proteasom

unterstützend beteiligt sein könnten. Um die Beteiligung weiterer Abbausysteme zu quantifizieren, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Ebenfalls denkbar wäre, dass bei hoher Autophagieaktivität unter ischämischem Reiz die Menge an BAF nicht ausreichte, um den gesamten Autophagiefluss zu blockieren, sodass ein Teil des ubiquitinierten Titins, welches zum Abbau in das autophagosomal-lysosomale System aufgenommen wurde, trotz BAF degradiert wurde. Auch diesbezüglich sind weitere Analysen mit variierenden BAF-Konzentrationen sinnvoll.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ubiquitiniertes Titin vor allem unter ischämischen Bedingungen vermehrt durch Autophagie abgebaut wird. Unter Basalbedingungen scheint ubiquitiniertes Titin allerdings nicht vorrangig durch Autophagie abgebaut zu werden (Abb. 30). Sowohl unter Basalbedingungen als auch unter ischämischen Bedingungen deutet sich eine Beteiligung weiterer Abbausysteme an der Degradation von ubiquitiniertem Titin an.

4.2.2 I/R nimmt Einfluss auf die Autophagieaktivität

Da sich unter I/R-Simulation ein gesteigerter Abbau von ubiquitiniertem Titin über das Autophagosom zeigte, ist eine Aktivitätsveränderung des autophagosomal-lysosomalen Systems unter den Simulationsbedingungen anzunehmen. Um zu untersuchen, in welcher Weise sich die Autophagieaktivität unter den Simulationsbedingungen verändert, erfolgte die Analyse zentraler Proteine dieses Abbausystems und relevanter Regulatoren.

4.2.2.1 Die I/R-bedingte Reduktion der relativen Proteinmenge von p62 und LC3-II deuten auf eine gesteigerte Autophagieaktivität hin

Das Adapterprotein p62 vermittelt die Interaktion von ubiquitinierten Proteinen mit der Phagophore und stellt daher eine Schnittstelle zwischen dem Ubiquitinierungs-System und dem autophagosomal-lysosomalen Abbauweg dar. Dabei wird im Verlauf der Degradation neben den ubiquitinierten Proteinen ebenfalls p62 abgebaut, sodass die p62-Proteinmenge als Marker für die Autophagieaktivität verwendet werden kann (Klionsky et al., 2021, Pankiv et al., 2007). In der I/R-Simulation dieser Arbeit zeigte sich nach Ischämie und auch nach anschließender Reperfusion eine deutliche Reduktion der relativen p62-Proteinmenge (siehe Kapitel 3.2.2.3). Dies deutet unter Berücksichtigung der in Kapitel 4.2.1 diskutierten Ergebnisse auf einen verstärkten Autophagiefluss hin unter dem auch p62 vermehrt abgebaut wurde (Klionsky et al., 2021, Dutta et al., 2013). Dieser Erklärungsansatz kann ebenfalls mit Ergebnissen aus der aktuellen Literatur in Einklang gebracht werden, denn wie bereits in Kapitel 1.4.3 beschrieben, konnten mehrere Arbeiten eine Steigerung der Autophagieaktivität unter Infarktbedingungen nachweisen (Matsui et al., 2007, Kanamori et al., 2011, Hariharan et al., 2011).

Da die Proteinmenge von p62 durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann (Klionsky et al., 2021), erfolgte zur weiteren Einordnung die Bestimmung der LC3-II-Proteinmenge, welche mit dem Ausmaß der Autophagosomen-Formation beziehungsweise der Menge der Autophagosomen korreliert (Kabeya et al., 2000, Mizushima et al., 2010). LC3-II befindet sich sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran der Phagophore und interagiert mit Ankerproteinen wie p62 zur Aufnahme von ubiquitinierten Proteinen (Kabeya et al., 2000, Pankiv et al., 2007). LC3-II der inneren Membran wird bei der autolysosomalen Degradation abgebaut, während die äußere Membran und das dort befindliche LC3-II intakt bleiben (Sciarretta et al., 2018). Im I/R-Modell dieser Arbeit deutete sich nach Ischämie ein Trend zu einer LC3-II Reduktion an, während nach 4-stündiger Reperfusion ein signifikanter und stärker ausgeprägter Abfall der relativen LC3-II-Proteinmenge beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 3.2.2.3). In Kombination mit der signifikant reduzierten relativen Proteinmenge von p62 deuten die Ergebnisse sowohl für die Ischämiephase als auch für die Reperfusionsphase auf eine gesteigerte Autophagieaktivität mit erhöhtem Abbau der autophagieassoziierten Proteine hin, der die Syntheseleistung dieser Proteine überschreitet (Abb. 30). Diese Hypothese ist ebenfalls vereinbar mit dem beobachteten gesteigerten Abbau von ubiquitiniertem Titin über das Autophagosom unter den Simulationsbedingungen (siehe Kapitel 4.2.1). Eine LC3-II Reduktion ist zwar ebenfalls mit einem verringerten Autophagiefluss vereinbar, allerdings wäre in diesem Fall ein Anstieg der p62-Proteinmenge zu erwarten (Ito et al., 2021, Li et al., 2011). Denn p62 wird hauptsächlich über das autophagosomal-lysosomale System abgebaut, sodass es bei reduziertem oder gehemmten Autophagiefluss zu einer messbaren Akkumulation kommt (Korolchuk et al., 2009, Ito et al., 2021). Eine reduzierte p62-Syntheseleistung in Kombination mit einer verringerten Autophagieaktivität kann als mögliche Erklärung der Ergebnisse allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, sodass in Zukunft eine ergänzende Bestimmung der p62-Syntheseleistung beispielsweise durch p62-mRNA-Messung, sinnvoll ist.

4.2.2.2 I/R nimmt Einfluss auf die Aktivität von Autophagie-Regulatoren

Zur weiteren Einordnung der Autophagieaktivität erfolgte zusätzlich die Analyse der Autophagie-Regulatoren mTORC1 und AMPK. Wie bereits in Kapitel 1.4.3 erläutert, hemmt mTORC1 unter nährstoffreichen Bedingungen Autophagie durch eine inhibierende Phosphorylierung von ULK1 (Kim et al., 2011). In dieser Arbeit wurde zur Aktivitätsbeurteilung von mTORC1 die relative mTOR Ser2448-Phosphorylierung ermittelt, da diese mit der mTORC1-Aktivität korreliert (Chiang and Abraham, 2005, Klionsky et al., 2021). Dabei zeigte sich nach Ischämie eine signifikant reduzierte mTOR-Phosphorylierung und daraus folgend eine verringerte mTORC1-Aktivität (siehe Kapitel 3.2.2.4), die ebenfalls auf eine gesteigerte Autophagie-Tätigkeit während der Ischämie hindeutet. Nach 4 Stunden Reperfusion ist ein Trend zu einer leicht gesteigerten mTOR-Phosphorylierung erkennbar. Dies weist darauf hin,

dass die Aktivität des Autophagie-Inhibitors nach Reperfusion mindestens wieder auf das Kontroll-Niveau ansteigt. Der Autophagie-Regulator scheint somit dynamisch auf Veränderungen der Umweltreize zu reagieren (Abb. 30).

Bei der Interpretation der relativen mTOR-Phosphorylierung sollte allerdings folgende Beobachtung berücksichtigt werden: Bei bloßer Betrachtung der Blots (Abb. 24) ist erkennbar, dass die Phosphorylierung von mTOR im Verhältnis zur Gesamtmenge von mTOR in der Ischämiegruppe (sI16) und dessen Kontrollgruppe (K-sI16) geringer ausfällt als in der Reperfusionsgruppe (sR4) und der entsprechenden Kontrollgruppe (K-sR4). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass mTORC1 in sI16 und K-sI16 deutlich weniger aktiv ist als in sR4 und K-sR4. Da die Normierung der Daten jeweils auf die entsprechende Kontrollgruppe erfolgte, fällt dies bei alleiniger Betrachtung der relativen Phosphorylierungslevel nicht auf. Diese Beobachtung sollte in Zukunft näher untersucht werden und mögliche Einfluss- und Störfaktoren, wie zum Beispiel die Zusammensetzung der Puffer und Kulturmedien, kritisch geprüft werden.

Neben der Aktivität von mTORC1 wurde ebenfalls die Aktivität des Autophagie-Aktivators AMPK durch die Analyse der relativen AMPK-Thr172 Phosphorylierung, untersucht (Hawley et al., 1996, Klionsky et al., 2021). Hier zeigte sich nach 16 Stunden Ischämie eine deutliche Reduktion der AMPK-Phosphorylierung und somit der AMPK-Aktivität. Dies scheint zunächst nicht zu den bisherigen Ergebnissen und der Hypothese einer gesteigerten Autophagieaktivität unter I/R zu passen, da in diesem Fall eher mit einer gesteigerten AMPK-Aktivität zu rechnen gewesen wäre. Die reduzierte AMPK-Phosphorylierung nach 16 Stunden Ischämie kann unter Berücksichtigung der bisher diskutierten Ergebnisse jedoch auf eine über den zeitlichen Verlauf der I/R-Simulation differenzierte Autophagieaktivität hindeuten. So ist es denkbar, dass Autophagie, zu Beginn des 16-stündigen ischämischen Reizes, AMPK-vermittelt aktiviert wurde. Eine AMPK-vermittelte Autophagieaktivierung durch Ischämie konnte in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2011). Infolge einer anfänglich starken Autophagieaktivierung könnte es, im Sinne eines negativen Feedbacks, zu einer Hemmung der Autophagie-aktivierenden Kinase AMPK gekommen sein. Dies könnte eine überschießende Autophagieaktivität verhindern, die wie bereits in Kapitel 1.4.3 erläutert, zum Zelltod – der Autosis – führen kann (Liu et al., 2013). Holczer et al. (2020) wiesen durch periodische Messungen der AMPK-Aktivität über einen Zeitverlauf von 24 Stunden nach, dass unter einem Autophagie-stimulierenden Reiz, wie langanhaltender Glukosedeprivation, ein oszillierendes Muster der Autophagieaktivierung auftrat. Dabei konnte über den Zeitverlauf phasenweise eine gesteigerte beziehungsweise verringerte Phosphorylierung von AMPK an der Stelle Thr172 beobachtet werden. Als Grundlage des oszillierenden Aktivitätsmusters unter Autophagie-stimulierenden Bedingungen wurde ein negativer Feedbackmechanismus zwischen AMPK und ULK1 vermutet (Holczer et al., 2020). Auch im Rahmen anderer Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ULK1 im Sinne eines negativen Feedbacks AMPK in

seiner Aktivität hemmen kann (Löffler et al., 2011). Da es sich bei der I/R-Simulation mit einer Ischämiezeit von 16 Stunden ebenfalls um einen langanhaltenden Stimulus handelte, könnte die AMPK-Aktivität zum Zeitpunkt der Messung bereits durch negative Feedbackmechanismen nach einer anfänglicher Aktivierung reduziert sein oder sich bei oszillierender Aktivität zum Zeitpunkt der Messung in einer Phase mit geringerem Aktivitätsniveau befunden haben (Abb. 30).

Nach Beendigung des ischämischen Reizes im Rahmen der 4-stündigen Reperfusion kam es unter nährstoff- und sauerstoffreichen Bedingungen zu einer raschen Angleichung der AMPK-Aktivität an die Kontrollbedingungen (Kapitel 3.2.2.4.). Dies unterstreicht, dass sich AMPK als Regulator der Autophagieaktivität dynamisch und reversibel an die Umgebungsbedingungen anpasst. Darüber hinaus trägt AMPK nach gegenwärtigem Kenntnisstand in der Reperusionsphase nur begrenzt zur Autophagieaktivierung bei. Eine Beclin-1-vermittelte Autophagieaktivierung scheint in dieser Phase eher vordergründig zu sein (Matsui et al., 2007, Sciarretta et al., 2018).

4.2.2.3 Veränderungen autophagieassoziiierter Proteine unter BAF-Exposition deuten eine komplexe Autophagiereaktion unter Ischämie an

Um den Autophagiefluss unter ischämischen Bedingungen noch detaillierter zu untersuchen, wurden die relativen Proteinmengen von p62 und LC3-II nach Autophagieinhibition mittels BAF analysiert (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.4). Diese können, nach Blockade der Autophagie auf Ebene der Fusion und der lysosomalen Degradation, Rückschlüsse auf den Autophagiefluss zulassen (Klionsky et al., 2021, Bjorkoy et al., 2009).

Unter Kontrollbedingungen führte die zusätzliche BAF-Gabe zu einer signifikanten Akkumulation sowohl von p62 als auch von LC3-II (siehe Kapitel 3.2.3). Die Akkumulation dieser Proteine deutet auf eine erfolgreiche Autophagieinhibition mit BAF und eine vorhandene Autophagieaktivität hin (Klionsky et al., 2021, Tanida et al., 2005, Bjorkoy et al., 2009). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass Autophagie in den Kardiomyozyten dieser Simulation bereits unter Basalbedingungen aktiv ist. In Kombination mit den Ergebnissen in Bezug auf die Titinubiquitinierung (siehe Kapitel 3.2.3) kann somit festgehalten werden, dass Autophagie unter Basalbedingungen in den Kardiomyozyten abläuft, der Titinabbau dabei aber nicht vorrangig durch Autophagie erfolgt (Abb. 30).

Unter ischämischen Bedingungen akkumuliert p62 nach 16-stündiger BAF-Gabe signifikant im Vergleich zur Ischämie-exponierten Gruppe ohne BAF. Dies deutet ebenfalls auf eine vorhandene Autophagieaktivität unter Ischämie hin, die durch BAF unterbrochen wurde (Bjorkoy et al., 2009). Interessanterweise war die relative Proteinmenge von p62 nach Ischämieexposition und BAF-Gabe allerdings signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen und BAF-Gabe. Des Weiteren zeigte sich unter Ischämie und BAF keine signifikante LC3-II-Akkumulation im Vergleich zur Ischämiegruppe ohne BAF. Wie bereits

diskutiert, wird auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse von einer zumindest anfänglich verstärkt aktivierten Autophagie unter Ischämie ausgegangen. Vor diesem Hintergrund wäre eher mit einer stärkeren p62- und LC3-II-Akkumulation unter ischämischen Bedingungen zu rechnen gewesen (Bjorkoy et al., 2009). Möglicherweise kam es durch eine anfänglich starke Autophagieaktivierung bei unzureichender BAF-Menge lediglich zu einer unvollständigen Unterbrechung des Autophagieflusses, sodass LC3-II und p62 nicht vollständig akkumulierten. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollten in Zukunft weitere Untersuchungen unter Autophagieinhibition mit variierenden Konzentrationen von BAF erfolgen.

Insgesamt bedarf es weiterer Analysen, um die komplexe Dynamik der Autophagie unter den Simulationsbedingungen nachvollziehen zu können. Diesbezüglich scheinen insbesondere Messungen im Verlauf der Ischämieexposition sinnvoll, um Prozesse und Zusammenhänge, die sich über den Zeitverlauf von 16 Stunden ereignen, sicher identifizieren zu können.

4.2.3 Hypoxie trägt wesentlich zu den beobachteten Veränderungen bei

Um einordnen zu können, welche Komponenten des ischämischen Reizes für die beobachteten Reaktionen verantwortlich sind, wurde abschließend der Einfluss der Hypoxie genauer untersucht. Wie in Kapitel 3.3.1 gezeigt, stellte sich der sichere Nachweis der Hypoxie mithilfe von Hypoxie-assoziierten Proteinen wie HIF1 α und GLUT1 herausfordernd dar, sodass durch die folgenden Analysen das Vorhandensein von hypoxischen Umgebungsbedingungen nachgewiesen werden sollte. Dafür erfolgte der Vergleich von drei Gruppen (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.5), wobei die Kardiomyozyten der KP16-Gruppe unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, die der IP16-Gruppe in Ischämiepuffer ohne Hypoxie und die der sl16-Gruppe in Ischämiepuffer unter hypoxischen Bedingungen.

In Bezug auf die Titinubiquitinierung fiel beim Vergleich der drei Gruppen auf, dass die relative Ubiquitinierung in der IP16-Gruppe signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe (KP16), sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch der Ischämiepuffer selbst einen Einfluss auf die Titinubiquitinierung hat. Die relative Titinubiquitinierung nach 16-stündiger Ischämiesimulation (sl16) war allerdings deutlich geringer als in der IP16-Gruppe (siehe Kapitel 3.3.2). Demnach scheint die hypoxische Komponente des ischämischen Reizes entscheidend für den gesteigerten Abbau von ubiquitiniertem Titin durch Autophagie zu sein (Abb. 30). In Bezug auf die relative Proteinmenge von p62 zeigte sich zwischen KP16 und IP16 kein signifikanter Unterschied. Nach der Ischämiesimulation (sl16) war die relative p62-Proteinmenge im Vergleich zu beiden anderen Gruppen signifikant reduziert. Auch bei der Analyse der relativen LC3-II-Proteinmenge zeigte sich lediglich nach der Ischämiesimulation mit hypoxischem Reiz (sl16) eine signifikante Reduktion. In der IP16-Gruppe war LC3-II sogar tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (KP16) und zeigte somit eine zur sl16-Gruppe gegensätzliche Entwicklung. Die Beobachtung, dass eine signifikante Reduktion der relativen Proteinmengen von p62 und LC3-II nur unter Ischämiesimulation mit Hypoxie, nicht

jedoch nach Kultivierung in Ischämiepuffer ohne Hypoxie auftrat, legt nahe, dass die veränderte Autophagieaktivität maßgeblich durch die hypoxische Komponente des Reizes ausgelöst wird. Sauerstoffmangel scheint im untersuchten Zellmodell also entscheidend für die aktuell angenommene Stimulation der Autophagie zu sein. Dies kann ebenfalls mit aktueller Literatur in Einklage gebracht werden, da auch in anderen zellkulturellen Modellen gezeigt werden konnte, dass Hypoxie zu einer Aktivierung von Autophagie führt (Gui et al., 2016, Chang et al., 2019). Abschließend wurde die Aktivität von AMPK in den drei Versuchsgruppen verglichen. Interessanterweise zeigte sich dabei bereits in der IP-Gruppe ein signifikanter Rückgang der AMPK-Phosphorylierung. Dies deutet darauf hin, dass die AMPK-Aktivität auch durch Faktoren des Ischämiepuffers, beispielsweise den Nährstoffentzug oder die pH-Veränderungen, beeinflusst wird. Dies spiegelt sich auch in der Arbeit von Holczer et al. (2020) wider, denn die oszillierende AMPK-Phosphorylierung konnte dort bereits durch ein verändertes Nährstoffangebot ausgelöst werden (Holczer et al., 2020). Unter zusätzlichem Sauerstoffmangel (sl16) war die AMPK-Phosphorylierung noch stärker reduziert, sodass von einem verstärkenden oder additiven Effekt der Hypoxie auf die AMPK-Regulation ausgegangen werden kann.

Insgesamt zeigte sich bei allen untersuchten Proteinen und Modifikationen ein signifikanter Unterschied zwischen der IP16-Gruppe und der sl16-Gruppe (siehe Kapitel 3.3.2), sodass das Vorhandensein und die Wirkung der hypoxischen Komponente in der sl16-Gruppe belegt werden konnte. Die Ergebnisse dienen somit im Sinne eines „*proof of principles*“ als Nachweis, dass der gewählte Versuchsaufbau funktional ist und mithilfe der verwendeten Hypoxiekammer zuverlässig hypoxische Umgebungsbedingungen erzeugt werden können.

4.2.4 Ubiquitiniertes Titin wird unter Ischämie verstärkt über Autophagie abgebaut

Zusammenfassend lässt sich aus den Messungen in Bezug auf den Titinabbau unter I/R ableiten, dass die Degradation von ubiquitiniertem Titin in den Kardiomyozyten vor allem unter ischämischen Bedingungen anteilig durch Autophagie erfolgt (Abb. 30). Ähnliches deutet sich auch für die Reperfusionsbedingungen an, allerdings sind hier weitere Messungen notwendig, um die Dynamik der Titindegradation eindeutig beschreiben zu können. Unter Basalbedingungen zeigte sich kein Hinweis auf einen Abbau von ubiquitiniertem Titin über das Autophagosom, sodass unter diesen Umständen im untersuchten Modell vermutlich andere Abbausysteme vorrangig die Proteinqualitätskontrolle von Titin übernehmen. Eine detaillierte Untersuchung dieser Mechanismen in dem zellkulturellen Simulationsmodell bietet sich daher an. Für den autophagosomal-lysosomalen Abbau von ubiquitiniertem Titin unter ischämischen Bedingungen scheint die hypoxische Komponente eine entscheidende Rolle zu spielen, da ohne diese ein deutlich geringerer Effekt auf die Titinubiquitinierung zu beobachten ist (Abb. 30). Eine eindeutige Erklärung für die Ursache des gesteigerten autophagosomal-

lysosomalen Titinabbaus unter Ischämie kann bislang nicht abschließend gegeben werden. Da einige Studien darauf hindeuten, dass Autophagie vor allem in der Ischämiephase kardioprotektiv wirkt (Kanamori et al., 2011, Sciarretta et al., 2018, Matsui et al., 2007), ist es möglich, dass es sich bei dem gesteigerten Titinabbau um eine Überlebensstrategie der Kardiomyozyten handelt, die zu einer raschen Bereitstellung überlebenswichtiger Energieträger führt. Möglicherweise wird dabei nicht zuerst auf zum Zeitpunkt der Ischämie in sarkomerische Strukturen integriertes und somit funktionell relevantes Titin zurückgegriffen, sondern vorrangig auf freies Titin des mobilen Pools (Rudolph et al., 2019). Bei der visuellen Beurteilung der Gesamtubiquitinierung aller Proteine, zeigte sich unter Ischämie und auch nach Reperfusion keine deutlich ausgeprägte Reduktion der Ubiquitinierung aller Proteine (siehe Kapitel 3.2.2.1). Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen des Titinabbaus um einen gezielten Mechanismus handelt. Diesbezüglich bedarf es weiterer Forschung, für die sich das hier etablierte *in-vitro*-Modell anbietet.

In Bezug auf die Autophagie wird auf Grundlage der bisherigen Messungen von einer verstärkten Aktivität zu Beginn des ischämischen Reizes ausgegangen. Im weiteren Verlauf des langanhaltenden ischämischen Reizes ist von einer Reduktion der Aktivität, unter anderem durch eine Hemmung des Autophagieaktivators AMPK, auszugehen (siehe Kapitel 3.2.2.4). Autophagie wird nach dieser Theorie als dynamischer und anpassungsfähiger Prozess betrachtet, der durch Feinabstimmung das Gleichgewicht zwischen dem Selbstabbau zum Selbsterhalt und dem Schutz vor übermäßigem Selbstabbau mit daraus resultierendem Zelltod (Autosis) bewahrt. Auch in Bezug auf die Autophagieprozesse scheint die hypoxische Komponente des ischämischen Reizes entscheidend zu sein, da sich die Veränderungen der Proteine p62 und LC3-II ohne Hypoxie nicht reproduzieren lassen (siehe Kapitel 3.3.2). Lediglich die AMPK-Aktivität war auch ohne Hypoxie nach 16-stündiger Kultivierung in Ischämiepuffer signifikant reduziert.

Da die bisherigen Ergebnisse zur Autophagieaktivität unter Ischämie teilweise nicht eindeutig interpretierbar sind, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die zugrunde liegenden Prozesse in ihrer Gesamtheit zu verstehen. Weil derzeit lediglich Daten nach 16 Stunden Ischämiesimulation vorliegen, kann über die Vorgänge, welche im Verlauf der Ischämie bis zum Messzeitpunkt ablaufen, aktuell nur spekuliert werden. Aus diesem Grund sollten ergänzende Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Ischämie durchgeführt werden. Darüber hinaus sind vergleichbare Analysen auch während der Reperfusion notwendig, vor allem vor dem Hintergrund, dass sich in der Literatur Hinweise auf ein abweichendes Aktivitätsmuster während der Reperfusion finden (Matsui et al., 2007). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit, vor allem in Bezug auf die Autophagie-Regulatoren (siehe Kapitel 3.2.2.4), deuten auf abweichende Abläufe nach Reperfusion hin.

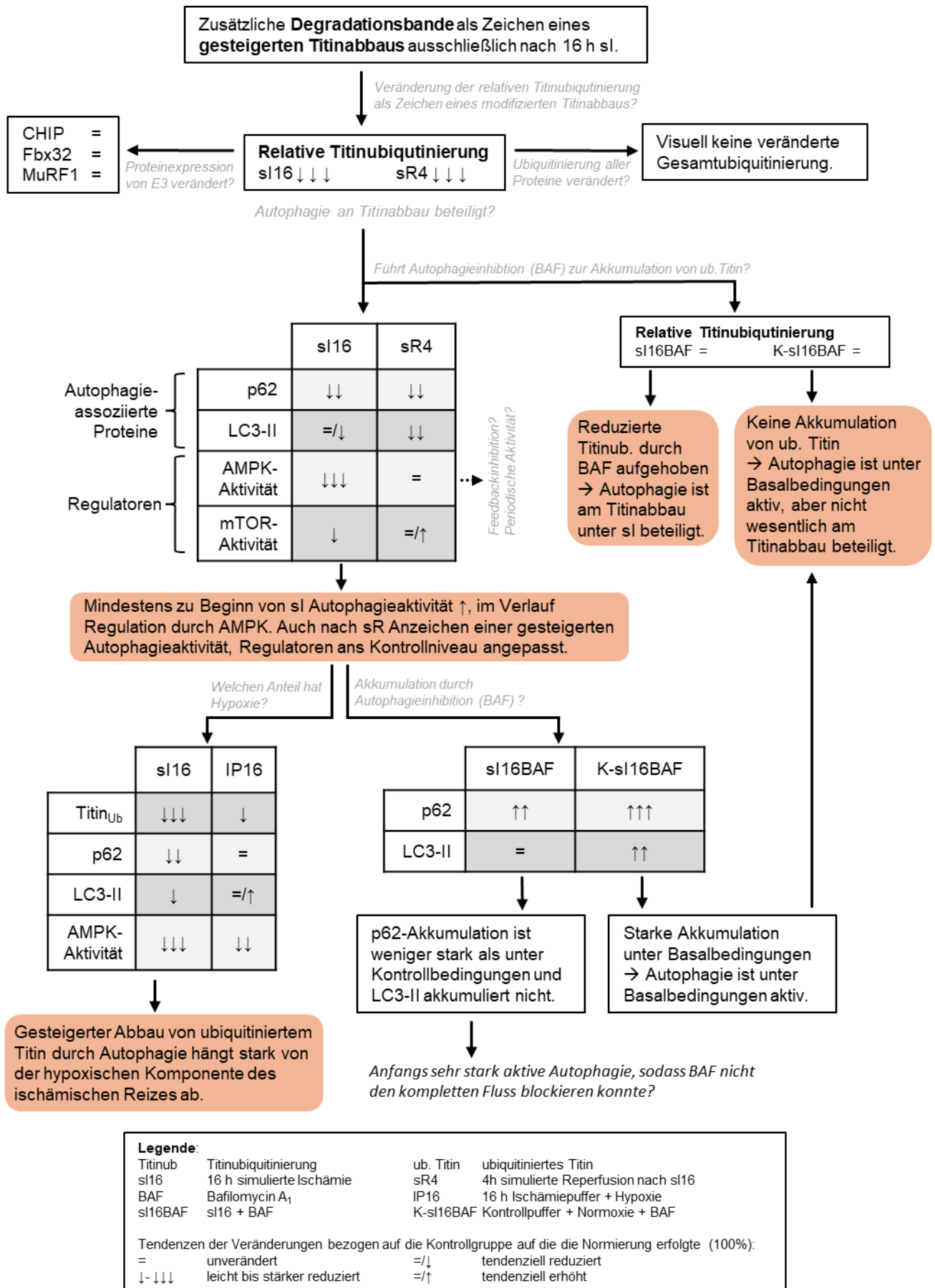


Abb. 30: Zusammenfassende Darstellung der Erkenntnisse und Hypothesen zur Autophagie-assoziierten Titindegradation im I/R-Simulationsmodell

4.3 Analyse des etablierten *in-vitro*-I/R-Simulationsmodells

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in-vitro*-I/R-Simulationsmodell mit dem Ziel etabliert, Modifikationen von Titin unter Ischämie und Reperfusion untersuchen zu können. Abschließend soll die angewandte Vorgehensweise nun kritisch reflektiert und hinsichtlich ihrer Stärken und Schwächen sowie möglicher Alternativen diskutiert werden.

4.3.1 Stärken des Modells

Zu Beginn sei festzuhalten, dass dieses Modell durch den Versuchsaufbau und die Verwendung adulter Kardiomyozyten die bestmögliche Annäherung eines *in-vitro*-Modells an einen Myokardinfarkt im lebenden Organismus darstellt, sodass dieses Verfahren von der ESC als anzustrebendes *in-vitro*-Verfahren empfohlen wurde (Lecour et al., 2014). Trotz der Größe von Titin war dabei eine Auswertung von Titin-assoziierten Modifikationen gut umsetzbar. So konnte bei der biochemischen Analyse von Titin auf etablierte und optimierte Verfahren der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden, sodass eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse von Titin und seinen Modifikationen möglich war. Eine herausragende Stärke des *in-vitro*-Simulationsmodells ist die Möglichkeit bestimmte Parameter zielgenau und präzise einstellen und variieren zu können. So besteht beispielsweise die Möglichkeit den Sauerstoffanteil in der Hypoxiekammer, den pH-Wert, die Zusammensetzung der Pufferlösungen oder auch die Temperatur je nach Fragestellung zu variieren. Ebenfalls kann, wie bereits im Rahmen dieser Arbeit geschehen, die Dauer der Simulation verändert werden, sodass sowohl akute als auch chronisch ischämische Zustände untersucht werden können. Auch in Bezug auf die Wahl der Zellen ist dieses Modell flexibel, sodass neben der Untersuchung adulter Kardiomyozyten auch die Analyse einer anderen Zellpopulation denkbar ist. Beispielsweise könnte die Analyse von Fibroblasten oder auch die Analyse einer Mischpopulation aus Fibroblasten und Kardiomyozyten erfolgen, um weitere Erkenntnisse über die Beziehung dieser Zelllinien zu erhalten. Dies könnte insbesondere in Bezug auf die PKC α -bedingte PEVK-Hyperphosphorylierung und die mögliche Assoziation zu IL-6 von Interesse sein (siehe Kapitel 4.1.3). Ein weiterer Vorteil dieses *in-vitro*-Versuchsmodells besteht darin, dass Prozesse, die im Rahmen von Ischämie und Reperfusion in Kardiomyozyten ablaufen, ohne externe Einflüsse durch andere Zellarten oder humorale Effekte analysiert werden können (Lindsey et al., 2018). Dies bietet, in Ergänzung zu komplexen *in-vivo*-Modellen, die Möglichkeit einzelne spezifische Pathomechanismen und Signalwege zu verstehen. So konnte beispielsweise im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass Hypoxie und weitere Komponenten der Ischämie als alleinige Reize nicht ausreichen, um in adulten Kardiomyozyten zu einer Hyperphosphorylierung der PEVK-Region durch PKC α zu führen (siehe Kapitel 4.1). Diese Information liefert ein wichtiges Puzzleteil zur Entschlüsselung des Gesamtmechanismus. Für den größtmöglichen Erkenntnisgewinn bietet sich eine Kombination dieser zellkulturellen Methode mit *in-vivo*-Modellen sowie klinischen Daten an.

Insgesamt können die hohe Variabilität und Flexibilität sowie die Reduktion potenzieller Einflussfaktoren als Stärken dieses Modells identifiziert werden, die sich bei der Analyse spezifischer Fragestellungen als vorteilhaft erweisen.

4.3.2 Limitationen des Modells

Trotz der Stärken und Vorteile ist dieses in-vitro-Modell auch mit Herausforderungen und Limitationen verbunden. Diese sollen im Folgenden benannt und eingeordnet werden.

Als eine zentrale Limitation dieses Modells sei anzumerken, dass die I/R-Simulationen unter künstlichen und vereinfachten Bedingungen erfolgen, die nicht alle komplexen Wechselwirkungen eines Organismus abbilden können (siehe Kapitel 4.1.3). So fehlen unter anderem immunologische Interaktionen, mechanische Belastungen und humorale Faktoren. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 angemerkt, kontrahieren die Kardiomyozyten in den Simulationen dieser Arbeit außerdem nicht. Ein Großteil des Energiebedarfs der Kardiomyozyten wird für die Kontraktionsprozesse aufgewendet, sodass bei fehlender Kontraktion ein geringerer Energieumsatz anzunehmen ist (McDougal and Dewey, 2017, Challoner, 1968). Um dies zu berücksichtigen, erfolgten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Modelluntersuchungen mit deutlich verlängerten ischämischen Reizen (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.2). Ein Ziel zukünftiger Entwicklungen könnte es sein, die Kontraktion beziehungsweise mechanische Belastung als Teil des I/R-Modells zu integrieren. Des Weiteren wird die Vergleichbarkeit mit Kardiomyozyten eines lebenden Organismus dadurch eingeschränkt, dass nach der Isolation innerhalb kurzer Zeit Dedifferenzierungsprozesse zu Veränderungen der Zellmorphologie führen (Person et al., 2000). Um Einflüsse der Dedifferenzierungsprozesse auf die I/R-Simulation zu minimieren, wurde eine rasch auf die Isolation folgende I/R-Simulation angestrebt (siehe Kapitel 2.2.1.4). Ziel zukünftiger Modelle könnte es sein, den Zeitabstand bis zur I/R-Simulation noch weiter zu verringern. Eine weitere Limitation des in-vitro-Modells dieser Arbeit ist, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich ist, da Kardiomyozyten aus Ratten verwendet wurden. Insgesamt bieten *in-vitro*- und *in-vivo*-Tiermodelle allerdings eine Möglichkeit weitreichende Erkenntnisse in Bezug auf pathophysiologische Prozesse zu erlangen, auf Basis derer spezifisch Analysen und Untersuchungen am Menschen und im klinischen Kontext möglich sind (Fliegner et al., 2016, Mukherjee et al., 2022, van der Velden et al., 2022).

In Bezug auf die Methodik und die verwendeten Materialien kann als kritischer Aspekt die Zeitspanne nach der Ischämiesimulation benannt werden, in der die Ernte der Proben erfolgte. Denn für die Ernte war ein Öffnen der Hypoxiekammer unausweichlich, sodass sich die Ansätze für diesen Zeitraum wieder in einer sauerstoffhaltigen Umgebung befanden. Um Einflüsse auf die Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, erfolgte eine möglichst zeiteffiziente und rasche Ernte. Eine weitere methodische Herausforderung dieser Arbeit war außerdem der direkte Nachweis der Hypoxie durch Messung des Anstiegs von Hypoxie-

assoziierten Proteinen. Aufgrund der erschwerten Nachweisbarkeit von HIF-1 α und fehlender Veränderungen von GLUT1 (siehe Kapitel 3.3.1) wurde ein alternatives Verfahren für den Nachweis von Hypoxie entwickelt (Ablauf siehe Kapitel 2.2.1.5.5). Durch dieses gelang der Beweis für das Vorhandensein der Hypoxie und für die Funktionsfähigkeit der Hypoxiekammer. Darüber hinaus ermöglichte es eine Einschätzung darüber, in welchem Ausmaß Hypoxie, als Teilkomponente der Ischämie, zu Veränderungen des Titinabbaus und der Autophagieaktivität beiträgt (siehe Kapitel 4.2.3). Ein Ziel für die Zukunft ist die Entwicklung einer Methode, mit der ein Nachweis von etablierten Hypoxie-assoziierten Proteinen möglich ist. Denkbar wäre zu diesem Zweck eine PCR-Analyse Hypoxie-assoziiierter Proteine – zum Beispiel von HIF-1 α . Zusätzlich könnte die Hypoxiekammer um einen Sensor ergänzt werden, der den Sauerstoffanteil der Kammerluft bestimmen kann. So könnte während der gesamten Ischämiesimulation eine Kontrolle der Simulationsbedingungen erfolgen.

Eine Limitation, die bei der Interpretation der Ergebnisse ebenfalls berücksichtigt werden muss, ist die geringe Stichprobengröße in einigen Experimenten. Die kleine Stichprobengröße ergibt sich zum einen daraus, dass im Rahmen dieser Arbeit zunächst die zellkulturelle I/R-Simulation etabliert und schrittweise optimiert wurde. Entsprechend war eine Vielzahl experimenteller Durchläufe mit variierenden Parametern notwendig. Dies erschwerte die Standardisierung und Planung größerer Versuchszahlen. Zum anderen wurde die Stichprobengröße bewusst begrenzt, um unter den genannten Umständen im Sinne des 3R-Prinzips die Anzahl an Versuchstieren so gering wie möglich zu halten (Flecknell, 2002). Insbesondere in Konstellationen in denen signifikante Effekte ausblieben – wie es bei den Phosphorylierungen der PEVK-Region der Fall war (siehe Kapitel 3.1) – erschien eine Ausweitung der Stichprobenzahl ethisch nicht gerechtfertigt. Vor allem, da sich diese Beobachtung über die unterschiedlichen Modellkonstellationen hinweg konsistent zeigte.

Als weitere Limitation sei angemerkt, dass lediglich punktuelle Messungen und somit Momentaufnahmen der dynamischen Vorgänge erhoben wurden. Es ist also nicht auszuschließen, dass bestimmte Veränderungen in Bezug auf posttranslationale Modifikationen oder auch in Bezug auf den Titin-*Turnover* und die Autophagieaktivität aufgrund der diskontinuierlichen Messung nicht festgestellt werden konnten. So kann mit den bisher erhobenen Daten beispielsweise nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich bei der signifikanten Reduktion der AMPK-Phosphorylierung nach 16-stündiger Ischämiesimulation um eine Inhibition der Aktivität nach vorheriger Aktivierung oder um eine dauerhaft herabregulierte Aktivität von AMPK handelte (siehe Kapitel 3.2.2.4). Auch hinsichtlich der Analyse der I/R-Simulation in Kombination mit der Autophagieinhibition durch BAF besteht weiterer Forschungsbedarf. Zum einen ist dies erforderlich, um die Veränderungen von p62 und LC3-II unter Ischämie und BAF-Exposition einordnen zu können (siehe Kapitel 4.2.2.3) und zum anderen, um die reperfusionssassoziierten Prozesse detaillierter zu untersuchen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich das *in-vitro*-I/R-Modell in Ergänzung zu *in-vivo*-Modellen und klinischen Daten für die Analyse von Titinmodifikationen unter Ischämie und Reperfusion eignet. Das Modell weist vor allem Stärken bei der Steuerbarkeit der Versuchsbedingungen und der selektiven Betrachtung einzelner Aspekte und Zellgruppen auf. Da es auf der anderen Seite zu einer Vereinfachung der zellulären Realität kommt, ist im weiteren Verlauf zur Auflösung pathophysiologischer Mechanismen die Kombination mit *in-vivo*-Modellen und klinischen Analysen unumgänglich.

4.4 Fazit

Zusammenfassend konnte mit dem etablierten zellkulturellen I/R-Modell eine geeignete Möglichkeit geschaffen werden, um unterschiedliche Titinmodifikationen unter I/R-Simulationsbedingungen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits Ergebnisse zu zwei unterschiedlichen Titinmodifikationen unter I/R gewonnen werden – zum einen zur posttranslationalen Phosphorylierung der elastischen PEVK-Region von Titin und zum anderen zur abbauassoziierten Titinubiquitinierung sowie den damit verbundenen Degradationsprozessen. Die in diesen Bereichen erlangten Erkenntnisse liefern einen Beitrag zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse und zeigen, dass das etablierte zellkulturelle I/R-Modell eine geeignete Grundlage für weiterführende Analysen darstellt. Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen scheinen insbesondere Erweiterungen um zusätzliche Messzeitpunkte sowie die Auswertung weiterer relevanter Parameter sinnvoll, um die komplexen Abläufe der Titinmodifikationen unter I/R noch umfassender zu verstehen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts	2
Abb. 2: Aufbau eines Sarkomers	7
Abb. 3: Schematischer Aufbau der N2BA-Isoform und der N2B-Isoform von Titin	8
Abb. 4: Signalwege zur posttranslationalen Titinphosphorylierung in der I-Band-Region (angelehnt an (Krüger, 2015), (Krüger and Linke, 2011) und (Kötter et al., 2014))	13
Abb. 5: Ubiquitinierung von Proteinen (angelehnt an (Kötter and Krüger, 2022))	15
Abb. 6: Substratabbau über das 26S-Proteasom (angelehnt an (Kötter and Krüger, 2022))	16
Abb. 7: Degradation zellulärer Bestandteile durch Autophagie	18
Abb. 8: Aufbau der Hypoxiekammer	29
Abb. 9: Single-Flow-Meter zur Kontrolle des Gasflusses	30
Abb. 10: Retrograde Perfusion an Langendorff-Anlage	40
Abb. 11: Füllung der Hypoxiekammer mit sauerstoffarmem Mischgas	43
Abb. 12: Ablauf der I/R-Simulation	45
Abb. 13: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin nach 45 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)	55
Abb. 14: Relative PKC α T497 Phosphorylierung nach 45 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)	56
Abb. 15: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin nach 120 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)	58
Abb. 16: Relative Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 nach 120 Minuten simulierter Ischämie und anschließender Reperfusion (I/R)	59
Abb. 17: Relative Phosphorylierung der PEVK-Region nach 16 Stunden simulierter Ischämie und nach anschließender 4-stündiger Reperfusion	61
Abb. 18: Relative Phosphorylierung von PKC α an der Stelle T497 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und simulierter Reperfusion für 4 Stunden	62
Abb. 19: Angefärbte PVDF-Membran von Titin nach 16 Stunden Ischämie	63
Abb. 20: Relative Titinubiquitinierung und Gesamtubiquitinierung nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion	65
Abb. 21: Relative Proteinexpression der E3-Ligasen MuRF1, CHIP und Fbx32 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion	67
Abb. 22: Relative Proteinmenge von p62 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion	68
Abb. 23: Relative Proteinmenge von LC3-II nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion	69
Abb. 24: Relative mTOR Ser2448-Phosphorylierung zur Aktivitätsbestimmung von mTORC1 nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion	70

Abb. 25: Relative AMPK Thr172 Phosphorylierung zur AMPK-Aktivitätsbestimmung nach 16 Stunden simulierter Ischämie und 4 Stunden simulierter Reperfusion.....	71
Abb. 26: Vergleich der Veränderungen Autophagie-assoziiierter Modifikationen und Proteine unter 16-stündiger Ischämiesimulation mit und ohne Autophagieinhibitor durch BAF.....	73
Abb. 27: Versuche des Hypoxienachweises mithilfe der hypoxieassoziierten Proteine HIF-1 α und GLUT1	74
Abb. 28: Autophagie-assoziierte Proteine und Modifikationen nach 16-stündiger Kultivierung in verschiedenen Pufferlösungen mit und ohne Hypoxie.....	77
Abb. 29: Entwicklungsprozess der I/R-Simulation zur Analyse von I/R-bedingten Modifikationen der Titinphosphorylierung in der PEVK-Region	84
Abb. 30: Zusammenfassende Darstellung der Erkenntnisse und Hypothesen zur Autophagie-assoziierten Titindegradation im I/R-Simulationsmodell	95

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien	25
Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Labormaterialien	27
Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Geräte	28
Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper für Titin	31
Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper	32
Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper	32
Tabelle 7: Zusammenstellung der verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren	33
Tabelle 8: Zusammenstellung der verwendeten Kulturmedien	34
Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten Gase	34
Tabelle 10: Zusammenstellung der verwendeten Puffer	37
Tabelle 11: Rezept für die Trenngele (Gesamtvolumen: 15 ml)	48
Tabelle 12: Rezept für das Sammelgel (Gesamtvolumen: 5 ml)	49
Tabelle 13: Rezept für Titingele	50
Tabelle 14: Markierung signifikanter Ergebnisse in Abhängigkeit vom p-Wert	53

7 Literaturverzeichnis

- ALI, M. A., CHO, W. J., HUDSON, B., KASSIRI, Z., GRANZIER, H. & SCHULZ, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- ALTER, C., HENSELER, A. S., OWENIER, C., HESSE, J., DING, Z., LAUTWEIN, T., BAHR, J., HAYAT, S., KRAMANN, R., KOSTENIS, E., SCHELLER, J. & SCHRADER, J. 2023. IL-6 in the infarcted heart is preferentially formed by fibroblasts and modulated by purinergic signaling. *J Clin Invest*, 133.
- ANDERSON, B. R., BOGOMOLOVAS, J., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2010. The effects of PKC α phosphorylation on the extensibility of titin's PEVK element. *J Struct Biol*, 170, 270-7.
- ANZAI, A., KO, S. & FUKUDA, K. 2022. Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and Its Potential Implications for the Clinic. *Int J Mol Sci*, 23.
- ARMSTRONG, S. C., LIU, G. S., DOWNEY, J. M. & GANOTE, C. E. 1995. Potassium channels and preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glyburide and pinacidil. *J Mol Cell Cardiol*, 27, 1765-74.
- BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- BARD, J. A. M., GOODALL, E. A., GREENE, E. R., JONSSON, E., DONG, K. C. & MARTIN, A. 2018. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*, 87, 697-724.
- BARTA, J., TOTH, A., EDES, I., VASZILY, M., PAPP, J. G., VARRO, A. & PAPP, Z. 2005. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem*, 278, 1-8.
- BASHAN, N., BURDETT, E., HUNDAL, H. S. & KLIP, A. 1992. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture. *Am J Physiol*, 262, C682-90.
- BELL, R. M., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2011. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 940-50.
- BERNSEN, C. E. & WOLBERGER, C. 2014. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 301-7.
- BJORKOY, G., LAMARK, T., PANKIV, S., OVERVATN, A., BRECH, A. & JOHANSEN, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- BOGOMOLOVAS, J., FLEMING, J. R., FRANKE, B., MANSO, B., SIMON, B., GASCH, A., MARKOVIC, M., BRUNNER, T., KNOLL, R., CHEN, J., LABEIT, S., SCHEFFNER, M., PETER, C. & MAYANS, O. 2021. Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep*, 22, e48018.
- BOND, L. M., TUMBARELLO, D. A., KENDRICK-JONES, J. & BUSS, F. 2013. Small-molecule inhibitors of myosin proteins. *Future Med Chem*, 5, 41-52.
- BULTEAU, A. L., LUNDBERG, K. C., HUMPHRIES, K. M., SADEK, H. A., SZWEDA, P. A., FRIGUET, B. & SZWEDA, L. I. 2001. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem*, 276, 30057-63.
- BYRNE, R. A., ROSSELLO, X., COUGHLAN, J. J., BARBATO, E., BERRY, C., CHIEFFO, A., CLAEYS, M. J., DAN, G. A., DWECK, M. R., GALBRAITH, M., GILARD, M., HINTERBUCHNER, L., JANKOWSKA, E. A., JUNI, P., KIMURA, T., KUNADIAN, V., LEOSDOTTIR, M., LORUSSO, R., PEDRETTI, R. F. E., RIGOPOULOS, A. G., RUBINI GIMENEZ, M., THIELE, H., VRANCKX, P., WASSMANN, S., WENGER, N. K., IBANEZ, B. & GROUP, E. S. C. S. D. 2023. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*, 44, 3720-3826.

- CAVALHEIRO, R. A., MARIN, R. M., ROCCO, S. A., CERQUEIRA, F. M., DA SILVA, C. C., RITTNER, R., KOWALTOWSKI, A. J., VERCESI, A. E., FRANCHINI, K. G. & CASTILHO, R. F. 2010. Potent cardioprotective effect of the 4-anilinoquinazoline derivative PD153035: involvement of mitochondrial K(ATP) channel activation. *PLoS One*, 5, e10666.
- CAZAUBON, S., BORNANCIN, F. & PARKER, P. J. 1994. Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C α . *Biochem J*, 301 (Pt 2), 443-8.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITAS, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 86, 59-67.
- CHALLONER, D. R. 1968. Respiration in myocardium. *Nature*, 217, 78-9.
- CHANG, J. C., HU, W. F., LEE, W. S., LIN, J. H., TING, P. C., CHANG, H. R., SHIEH, K. R., CHEN, T. I. & YANG, K. T. 2019. Intermittent Hypoxia Induces Autophagy to Protect Cardiomyocytes From Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Front Physiol*, 10, 995.
- CHEN, T. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2018. In vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen Eng Transl Med*, 4, 142-153.
- CHIANG, G. G. & ABRAHAM, R. T. 2005. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*, 280, 25485-90.
- COUCHONNALL, L. F. & ANDERSON, M. E. 2008. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*, 23, 151-9.
- COULIS, G., BECILA, S., HERRERA-MENDEZ, C. H., SENTANDREU, M. A., RAYNAUD, F., RICHARD, I., BENYAMIN, Y. & OUALI, A. 2008. Calpain 1 binding capacities of the N1-line region of titin are significantly enhanced by physiological concentrations of calcium. *Biochemistry*, 47, 9174-83.
- DA SILVA LOPES, K., PIETAS, A., RADKE, M. H. & GOTTHARDT, M. 2011. Titin visualization in real time reveals an unexpected level of mobility within and between sarcomeres. *J Cell Biol*, 193, 785-98.
- DE VILLIERS, C. & RILEY, P. R. 2020. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech*, 13.
- DECKER, R. S. & WILDENTHAL, K. 1980. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol*, 98, 425-44.
- DIAO, J., LIU, R., RONG, Y., ZHAO, M., ZHANG, J., LAI, Y., ZHOU, Q., WILZ, L. M., LI, J., VIVONA, S., PFUETZNER, R. A., BRUNGER, A. T. & ZHONG, Q. 2015. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520, 563-6.
- DIAZ, R. J. & WILSON, G. J. 2006. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovasc Res*, 70, 286-96.
- DUTTA, D., XU, J., KIM, J. S., DUNN, W. A., JR. & LEEUWENBURGH, C. 2013. Upregulated autophagy protects cardiomyocytes from oxidative stress-induced toxicity. *Autophagy*, 9, 328-44.
- EBERT, B. L., FIRTH, J. D. & RATCLIFFE, P. J. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*, 270, 29083-9.
- FLECKNELL, P. 2002. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*, 19, 73-8.
- FLIEGNER, D., GERDES, C., MEDING, J. & STASCH, J. P. 2016. Translational In Vivo Models for Cardiovascular Diseases. *Handb Exp Pharmacol*, 232, 223-34.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, 11, 255-65.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- FRENCH, B. A. & KRAMER, C. M. 2007. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech*, 4, 185-196.
- FUKUDA, N. & GRANZIER, H. L. 2005. Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 319-23.

- FUKUDA, N., WU, Y., NAIR, P. & GRANZIER, H. L. 2005. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*, 125, 257-71.
- FÜRST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. & WEBER, K. 1988. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
- GATICA, D., CHIONG, M., LAVANDERO, S. & KLIONSKY, D. J. 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ Res*, 116, 456-67.
- GAUTEL, M., GOULDING, D., BULLARD, B., WEBER, K. & FURST, D. O. 1996. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, 109 (Pt 11), 2747-54.
- GEORGE, M. J., JASMIN, N. H., CUMMINGS, V. T., RICHARD-LOENDT, A., LAUNCHBURY, F., WOOLLARD, K., TURNER-STOKES, T., GARCIA DIAZ, A. I., LYTHGOE, M., STUCKEY, D. J., HINGORANI, A. D. & GILROY, D. W. 2021. Selective Interleukin-6 Trans-Signaling Blockade Is More Effective Than Panantagonism in Reperfused Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci*, 6, 431-443.
- GHIGO, A., FRANCO, I., MORELLO, F. & HIRSCH, E. 2014. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*, 102, 270-80.
- GRANZIER, H. L. & LABEIT, S. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 94, 284-95.
- GRICE, G. L. & NATHAN, J. A. 2016. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*, 73, 3497-506.
- GRIFFITHS, E. J. & HALESTRAP, A. P. 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 93-8.
- GUI, L., LIU, B. & LV, G. 2016. Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism. *Exp Ther Med*, 11, 2233-2239.
- GWECHENBERGER, M., MENDOZA, L. H., YOUKER, K. A., FRANGOGIANNIS, N. G., SMITH, C. W., MICHAEL, L. H. & ENTMAN, M. L. 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99, 546-51.
- HALESTRAP, A. P., WANG, X., POOLE, R. C., JACKSON, V. N. & PRICE, N. T. 1997. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol*, 80, 17A-25A.
- HAMDANI, N., HERWIG, M. & LINKE, W. A. 2017. Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev*, 9, 225-237.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRUGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
- HARIHARAN, N., ZHAI, P. & SADOSHIMA, J. 2011. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion. *Antioxid Redox Signal*, 14, 2179-90.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2003. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 339-41.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, 123, 92-100.
- HAWLEY, S. A., DAVISON, M., WOODS, A., DAVIES, S. P., BERI, R. K., CARLING, D. & HARDIE, D. G. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271, 27879-87.
- HERSHKO, A., HELLER, H., ELIAS, S. & CIECHANOVER, A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258, 8206-14.
- HIDALGO, C. & GRANZIER, H. 2013. Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*, 23, 165-71.
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a

- novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- HIDALGO, C. G., CHUNG, C. S., SARIPALLI, C., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRILIS, G., LABEIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HILL, J. L. & GETTES, L. S. 1980. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K⁺ activity in swine. *Circulation*, 61, 768-78.
- HOLCZER, M., HAJDU, B., LORINCZ, T., SZARKA, A., BANHEGYI, G. & KAPUY, O. 2020. Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Sci Rep*, 10, 17803.
- HOPF, A. E., ANDRESEN, C., KÖTTER, S., ISIC, M., ULRICH, K., SAHIN, S., BONGARDT, S., ROLL, W., DROVE, F., SCHEERER, N., VANDEKERCKHOVE, L., DE KEULENAER, G. W., HAMDANI, N., LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2018. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*, 123, 342-355.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J. L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-91.
- HUDSON, B. D., HIDALGO, C. G., GOTTHARDT, M. & GRANZIER, H. L. 2010. Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 972-8.
- IBANEZ, B., HEUSCH, G., OVIZE, M. & VAN DE WERF, F. 2015. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, 65, 1454-71.
- IBANEZ, B., JAMES, S., AGEWALL, S., ANTUNES, M. J., BUCCIARELLI-DUCCI, C., BUENO, H., CAFORIO, A. L. P., CREA, F., GOUDEVENOS, J. A., HALVORSEN, S., HINDRICKS, G., KASTRATI, A., LENZEN, M. J., PRESCOTT, E., ROFFI, M., VALGIMIGLI, M., VARENHORST, C., VRANCKX, P., WIDIMSKY, P. & GROUP, E. S. C. S. D. 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 39, 119-177.
- ISAACS, W. B., KIM, I. S., STRUVE, A. & FULTON, A. B. 1989. Biosynthesis of titin in cultured skeletal muscle cells. *J Cell Biol*, 109, 2189-95.
- ITO, H. 2006. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 3, 499-506.
- ITO, H. 2009. No-reflow phenomenon in patients with acute myocardial infarction: its pathophysiology and clinical implications. *Acta Med Okayama*, 63, 161-8.
- ITO, M., YURUBE, T., KANDA, Y., KAKIUCHI, Y., TAKEOKA, Y., TAKADA, T., KURODA, R. & KAKUTANI, K. 2021. Inhibition of Autophagy at Different Stages by ATG5 Knockdown and Chloroquine Supplementation Enhances Consistent Human Disc Cellular Apoptosis and Senescence Induction rather than Extracellular Matrix Catabolism. *Int J Mol Sci*, 22.
- JACKSON, B. M., GORMAN, J. H., MOAINIE, S. L., GUY, T. S., NARULA, N., NARULA, J., JOHN-SUTTON, M. G., EDMUNDS, L. H., JR. & GORMAN, R. C. 2002. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 40, 1160-7; discussion 1168-71.
- JAHNS, C. 2021. *Der Einfluss von Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung auf die Titin-basierte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten im Großtiermodell*. Inauguraldissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- JI, C. H. & KWON, Y. T. 2017. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol Cells*, 40, 441-449.
- JOHANSEN, T. & LAMARK, T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7, 279-96.
- JOHNS, T. N. & OLSON, B. J. 1954. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, 140, 675-82.

- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D. H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20, 1992-2003.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720-8.
- KAHN, B. B., ALQUIER, T., CARLING, D. & HARDIE, D. G. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1, 15-25.
- KANAMORI, H., TAKEMURA, G., GOTO, K., MARUYAMA, R., ONO, K., NAGAO, K., TSUJIMOTO, A., OGINO, A., TAKEYAMA, T., KAWAGUCHI, T., WATANABE, T., KAWASAKI, M., FUJIWARA, T., FUJIWARA, H., SEISHIMA, M. & MINATOOGUCHI, S. 2011. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H2261-71.
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163-75.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIMURA, S., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2008. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*, 33, 109-22.
- KLIONSKY, D. J., ABDEL-AZIZ, A. K., ABDELFATAH, S., ABDELLATIF, M., ABDOLI, A., ABEL, S., ABELIOVICH, H., ABILDGAARD, M. H., ABUDU, Y. P., ACEVEDO-AROZENA, A., ADAMOPOULOS, I. E., ADELI, K., ADOLPH, T. E., ADORNETTO, A., AFLAKI, E., AGAM, G., AGARWAL, A., AGGARWAL, B. B., AGNELLO, M., AGOSTINIS, P., AGREWALA, J. N., AGROTIS, A., AGUILAR, P. V., AHMAD, S. T., AHMED, Z. M., AHUMADA-CASTRO, U., AITS, S., AIZAWA, S., AKKOC, Y., AKOUMIANAKI, T., AKPINAR, H. A., AL-ABD, A. M., AL-AKRA, L., AL-GHARAIBEH, A., ALAOUI-JAMALI, M. A., ALBERTI, S., ALCOCER-GOMEZ, E., ALESSANDRI, C., ALI, M., ALIM AL-BARI, M. A., ALIWAINI, S., ALIZADEH, J., ALMACELLAS, E., ALMASAN, A., ALONSO, A., ALONSO, G. D., ALTAN-BONNET, N., ALTIERI, D. C., ALVAREZ, E. M. C., ALVES, S., ALVES DA COSTA, C., ALZAHARNA, M. M., AMADIO, M., AMANTINI, C., AMARAL, C., AMBROSIO, S., AMER, A. O., AMMANATHAN, V., AN, Z., ANDERSEN, S. U., ANDRABI, S. A., ANDRADE-SILVA, M., ANDRES, A. M., ANGELINI, S., ANN, D., ANOZIE, U. C., ANSARI, M. Y., ANTAS, P., ANTEBI, A., ANTON, Z., ANWAR, T., APETOH, L., APOSTOLOVA, N., ARAKI, T., ARAKI, Y., ARASAKI, K., ARAUJO, W. L., ARAYA, J., ARDEN, C., AREVALO, M. A., ARGUELLES, S., ARIAS, E., ARIKKATH, J., ARIMOTO, H., ARIOSA, A. R., ARMSTRONG-JAMES, D., ARNAUNE-PELLOQUIN, L., AROCA, A., ARROYO, D. S., ARSOV, I., ARTERO, R., ASARO, D. M. L., ASCHNER, M., ASHRAFIZADEH, M., ASHUR-FABIAN, O., ATANASOV, A. G., AU, A. K., AUBERGER, P., AUNER, H. W., AURELIAN, L., et al. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*, 17, 1-382.
- KLIONSKY, D. J., ELAZAR, Z., SEGLEN, P. O. & RUBINSZTEIN, D. C. 2008. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, 4, 849-50.
- KOLK, M. V., MEYBERG, D., DEUSE, T., TANG-QUAN, K. R., ROBBINS, R. C., REICHENSPURNER, H. & SCHREPFER, S. 2009. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*.
- KOROLCHUK, V. I., MANSILLA, A., MENZIES, F. M. & RUBINSZTEIN, D. C. 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell*, 33, 517-27.
- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *FEBS J*, 286, 2240-2260.

- KÖTTER, S., ANDRESEN, C. & KRÜGER, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MULLER, A. E., HELLING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRUGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GODECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRUGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KÖTTER, S. & KRÜGER, M. 2022. Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Frontiers in Physiology*, 13.
- KRUG, A., DU MESNIL DE, R. & KORB, G. 1966. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res*, 19, 57-62.
- KRÜGER, M. 2015. Posttranslational Modification of the Titin Springs: Dynamic Adaptation of Passive Sarcomere Stiffness. In: EHLER, E. (ed.) *Cardiac Cytoarchitecture: How to Maintain a Working Heart*. Cham: Springer International Publishing.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2013. Titin — sensibler Riese der Muskelzellen. *BIOspektrum*, 19, 360-362.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, 7, 76.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRUTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M. M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C. G. & LINKE, W. A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- KULKE, M., FUJITA-BECKER, S., ROSTKOVA, E., NEAGOE, C., LABEIT, D., MANSTEIN, D. J., GAUTEL, M. & LINKE, W. A. 2001. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res*, 89, 874-81.
- LABEIT, S., BARLOW, D. P., GAUTEL, M., GIBSON, T., HOLT, J., HSIEH, C. L., FRANCKE, U., LEONARD, K., WARDALE, J., WHITING, A. & ET AL. 1990. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature*, 345, 273-6.
- LABEIT, S., GAUTEL, M., LAKEY, A. & TRINICK, J. 1992. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J*, 11, 1711-6.
- LABEIT, S. & KOLMERER, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- LABEIT, S., KOLMERER, B. & LINKE, W. A. 1997. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res*, 80, 290-4.
- LABEIT, S., LAHMERS, S., BURKART, C., FONG, C., MCNABB, M., WITT, S., WITT, C., LABEIT, D. & GRANZIER, H. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol*, 362, 664-81.
- LANGE, S., XIANG, F., YAKOVENKO, A., VIHOLA, A., HACKMAN, P., ROSTKOVA, E., KRISTENSEN, J., BRANDMEIER, B., FRANZEN, G., HEDBERG, B., GUNNARSSON, L. G., HUGHES, S. M., MARCHAND, S., SEJERSEN, T., RICHARD, I., EDSTROM, L., EHLER, E., UDD, B. & GAUTEL, M. 2005. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308, 1599-603.
- LEAKE, M. C., GRUTZNER, A., KRUGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Mechanical properties of cardiac titin's N2B-region by single-molecule atomic force spectroscopy. *J Struct Biol*, 155, 263-72.

- LECOUR, S., BOTKER, H. E., CONDORELLI, G., DAVIDSON, S. M., GARCIA-DORADO, D., ENGEL, F. B., FERDINANDY, P., HEUSCH, G., MADONNA, R., OVIZE, M., RUIZ-MEANA, M., SCHULZ, R., SLUIJTER, J. P., VAN LAAKE, L. W., YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2014. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc Res*, 104, 399-411.
- LEE, D. H. & GOLDBERG, A. L. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 8, 397-403.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- LI, H., LINKE, W. A., OBERHAUSER, A. F., CARRION-VAZQUEZ, M., KERKVLIT, J. G., LU, H., MARSZALEK, P. E. & FERNANDEZ, J. M. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418, 998-1002.
- LI, W., BENGTSON, M. H., ULBRICH, A., MATSUDA, A., REDDY, V. A., ORTH, A., CHANDA, S. K., BATALOV, S. & JOAZEIRO, C. A. 2008. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One*, 3, e1487.
- LI, W. R., CHEN, L., CHANG, Z. J., XIN, H., LIU, T., ZHANG, Y. Q., LI, G. Y., ZHOU, F., GONG, Y. Q., GAO, Z. Z. & XIN, Z. C. 2011. Autophagic deficiency is related to steroidogenic decline in aged rat Leydig cells. *Asian J Androl*, 13, 881-8.
- LINDSEY, M. L., BOLLI, R., CANTY, J. M., JR., DU, X. J., FRANGOGIANNIS, N. G., FRANTZ, S., GOURDIE, R. G., HOLMES, J. W., JONES, S. P., KLONER, R. A., LEFER, D. J., LIAO, R., MURPHY, E., PING, P., PRZYKLENK, K., RECCHIA, F. A., SCHWARTZ LONGACRE, L., RIPPLINGER, C. M., VAN EYK, J. E. & HEUSCH, G. 2018. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314, H812-H838.
- LINKE, W. A. 2008. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77, 637-48.
- LINKE, W. A. 2018. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*, 80, 389-411.
- LINKE, W. A. & GRUTZNER, A. 2008. Pulling single molecules of titin by AFM--recent advances and physiological implications. *Pflugers Arch*, 456, 101-15.
- LINKE, W. A. & HAMDANI, N. 2014. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., LABEIT, S., HINSEN, H., RUEGG, J. C. & GAUTEL, M. 1997. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J*, 73, 905-19.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RUEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LINKE, W. A., RUDY, D. E., CENTNER, T., GAUTEL, M., WITT, C., LABEIT, S. & GREGORIO, C. C. 1999. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, 146, 631-44.
- LIU, B., LI, A., QIN, Y., TIAN, X., GAO, M., JIANG, W. & GONG, G. 2019. Comparative study on isolation and mitochondrial function of adult mouse and rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 136, 64-71.
- LIU, Y., SHOJI-KAWATA, S., SUMPTER, R. M., JR., WEI, Y., GINET, V., ZHANG, L., POSNER, B., TRAN, K. A., GREEN, D. R., XAVIER, R. J., SHAW, S. Y., CLARKE, P. G., PUYAL, J. & LEVINE, B. 2013. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20364-71.
- LÖFFLER, A. S., ALERS, S., DIETERLE, A. M., KEPPELER, H., FRANZ-WACHTEL, M., KUNDU, M., CAMPBELL, D. G., WESSELBORG, S., ALESSI, D. R. & STORK, B. 2011. Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy*, 7, 696-706.
- MAJUMDAR, A. J., WONG, W. J. & SIMON, M. C. 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40, 294-309.

- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MALTSEV, A. V., EVDOKIMOVSKII, E. V. & KOKOZ, Y. M. 2021. Protein kinase C-mediated calcium signaling as the basis for cardiomyocyte plasticity. *Arch Biochem Biophys*, 701, 108817.
- MANCIET, L. H., POOLE, D. C., MCDONAGH, P. F., COPELAND, J. G. & MATHIEU-COSTELLO, O. 1994. Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. *Am J Physiol*, 266, H1541-50.
- MARTIN, T. G. & KIRK, J. A. 2020. Under construction: The dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. *J Mol Cell Cardiol*, 148, 89-102.
- MARUYAMA, K. 1994. Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophys Chem*, 50, 73-85.
- MATSUI, Y., TAKAGI, H., QU, X., ABDELLATIF, M., SAKODA, H., ASANO, T., LEVINE, B. & SADOSHIMA, J. 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 100, 914-22.
- MAUVEZIN, C., NAGY, P., JUHASZ, G. & NEUFELD, T. P. 2015. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun*, 6, 7007.
- MCDUGAL, A. D. & DEWEY, C. F., JR. 2017. Modeling oxygen requirements in ischemic cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 292, 11760-11776.
- MILLER, M. K., GRANZIER, H., EHLE, E. & GREGORIO, C. C. 2004. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol*, 14, 119-26.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A. M. & KLIONSKY, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-75.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-26.
- MO, Y., TANG, L., MA, Y. & WU, S. 2016. Pramipexole pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through upregulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 473, 1119-1124.
- MUKHERJEE, P., ROY, S., GHOSH, D. & NANDI, S. K. 2022. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res*, 38, 18.
- MÜLLER, E., SALCAN, S., BONGARDT, S., BARBOSA, D. M., KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2021. E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Sci Rep*, 11, 21134.
- MURPHY, S. & FRISHMAN, W. H. 2005. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev*, 13, 3-12.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204, 3037-47.
- NAKAI, A., YAMAGUCHI, O., TAKEDA, T., HIGUCHI, Y., HIKOSO, S., TANIKE, M., OMIYA, S., MIZOTE, I., MATSUMURA, Y., ASAH, M., NISHIDA, K., HORI, M., MIZUSHIMA, N. & OTSU, K. 2007. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, 13, 619-24.
- NANDI, D., TAHILIANI, P., KUMAR, A. & CHANDU, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 31, 137-55.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- OBERMANN, W. M., GAUTEL, M., STEINER, F., VAN DER VEN, P. F., WEBER, K. & FURST, D. O. 1996. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134, 1441-53.

- ONG, S. B., HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, S., CRESPO-AVILAN, G. E., MUKHAMETSHINA, R. T., KWEK, X. Y., CABRERA-FUENTES, H. A. & HAUSENLOY, D. J. 2018. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, 186, 73-87.
- OPITZ, C. A., KULKE, M., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., HINSSEN, H., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2003. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12688-93.
- OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., MAKARENKO, I., BENES, V. & LINKE, W. A. 2004. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 94, 967-75.
- ORLOWSKI, M. & WILK, S. 2000. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*, 383, 1-16.
- OSTADAL, B., OSTADALOVA, I., KOLAR, F., CHARVATOVA, Z. & NETUKA, I. 2009. Ontogenetic development of cardiac tolerance to oxygen deprivation - possible mechanisms. *Physiol Res*, 58 Suppl 2, S1-12.
- PANG, L., CAI, Y., TANG, E. H., YAN, D., KOSURU, R., LI, H., IRWIN, M. G., MA, H. & XIA, Z. 2016. Cox-2 Inhibition Protects against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Apoptosis via Akt-Dependent Enhancement of iNOS Expression. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3453059.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., OVERVATN, A., BJORKOY, G. & JOHANSEN, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- PERKIN, J., SLATER, R., DEL FAVERO, G., LANZICHER, T., HIDALGO, C., ANDERSON, B., SMITH, J. E., 3RD, SBAIZERO, O., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2015. Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J*, 109, 2592-2601.
- PERSON, V., KOSTIN, S., SUZUKI, K., LABEIT, S. & SCHAPER, J. 2000. Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3851-9.
- PIPER, H. M., GARCIA-DORADO, D. & OVIZE, M. 1998. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 38, 291-300.
- POHL, C. & DIKIC, I. 2019. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 366, 818-822.
- POPOV, S. V., MUKHOMEDZIANOV, A. V., VORONKOV, N. S., DERKACHEV, I. A., BOSHCHENKO, A. A., FU, F., SUFIANOVA, G. Z., KHLESTKINA, M. S. & MASLOV, L. N. 2023. Regulation of autophagy of the heart in ischemia and reperfusion. *Apoptosis*, 28, 55-80.
- PORTBURY, A. L., WILLIS, M. S. & PATTERSON, C. 2011. Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*, 286, 9929-34.
- POWELL, S. R., WANG, P., KATZEFF, H., SHRINGARPURE, R., TEOH, C., KHALIULIN, I., DAS, D. K., DAVIES, K. J. & SCHWALB, H. 2005. Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal*, 7, 538-46.
- PRABHU, S. D. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.
- PUCHNER, E. M., ALEXANDROVICH, A., KHO, A. L., HENSEN, U., SCHAFER, L. V., BRANDMEIER, B., GRATER, F., GRUBMULLER, H., GAUB, H. E. & GAUTEL, M. 2008. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13385-90.
- PYE, J., ARDESHIRPOUR, F., MCCAIN, A., BELLINGER, D. A., MERRICKS, E., ADAMS, J., ELLIOTT, P. J., PIEN, C., FISCHER, T. H., BALDWIN, A. S., JR. & NICHOLS, T. C. 2003. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H919-26.
- RASKIN, A., LANGE, S., BANARES, K., LYON, R. C., ZIESENISS, A., LEE, L. K., YAMAZAKI, K. G., GRANZIER, H. L., GREGORIO, C. C., MCCULLOCH, A. D., OMENS, J. H. & SHEIKH, F. 2012. 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*, 287, 29273-84.
- RAVIKUMAR, B., SARKAR, S., DAVIES, J. E., FUTTER, M., GARCIA-ARENCIBIA, M., GREEN-THOMPSON, Z. W., JIMENEZ-SANCHEZ, M., KOROLCHUK, V. I., LICHTENBERG, M., LUO, S., MASSEY, D. C., MENZIES, F. M., MOREAU, K., NARAYANAN, U., RENNA, M., SIDDIQI, F. H., UNDERWOOD, B. R., WINSLOW, A. R. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90, 1383-435.
- RAYNAUD, F., FERNANDEZ, E., COULIS, G., AUBRY, L., VIGNON, X., BLEIMLING, N., GAUTEL, M., BENYAMIN, Y. & OUALI, A. 2005. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J*, 272, 2578-90.
- REIMER, K. A., LOWE, J. E., RASMUSSEN, M. M. & JENNINGS, R. B. 1977. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56, 786-94.
- REYNOLDS, J. M. & MCDONAGH, P. F. 1989. Early in reperfusion, leukocytes alter perfused coronary capillarity and vascular resistance. *Am J Physiol*, 256, H982-9.
- ROGOV, V., DOTTSCH, V., JOHANSEN, T. & KIRKIN, V. 2014. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 53, 167-78.
- ROSS, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-9.
- RUDOLPH, F., HUTTEMEISTER, J., DA SILVA LOPES, K., JUTTNER, R., YU, L., BERGMANN, N., FRIEDRICH, D., PREIBISCH, S., WAGNER, E., LEHNART, S. E., GREGORIO, C. C. & GOTTHARDT, M. 2019. Resolving titin's lifecycle and the spatial organization of protein turnover in mouse cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 25126-25136.
- RUPARELIA, N., DIGBY, J. E., JEFFERSON, A., MEDWAY, D. J., NEUBAUER, S., LYGATE, C. A. & CHOUDHURY, R. P. 2013. Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflammation Research*, 62, 515-525.
- SCIARRETTA, S., HARIHARAN, N., MONDEN, Y., ZABLOCKI, D. & SADOSHIMA, J. 2011. Is autophagy in response to ischemia and reperfusion protective or detrimental for the heart? *Pediatr Cardiol*, 32, 275-81.
- SCIARRETTA, S., MAEJIMA, Y., ZABLOCKI, D. & SADOSHIMA, J. 2018. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol*, 80, 1-26.
- SCIARRETTA, S., VOLPE, M. & SADOSHIMA, J. 2014. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res*, 114, 549-64.
- SHI, B., MA, M., ZHENG, Y., PAN, Y. & LIN, X. 2019. mTOR and Beclin1: Two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Cell Physiol*, 234, 12562-12568.
- SHINDE, A. V. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2014. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*, 70, 74-82.
- SHIVKUMAR, K., DEUTSCH, N. A., LAMP, S. T., KHUU, K., GOLDHABER, J. I. & WEISS, J. N. 1997. Mechanism of hypoxic K loss in rabbit ventricle. *J Clin Invest*, 100, 1782-8.
- SIVITZ, W. I., LUND, D. D., YOREK, B., GROVER-MCKAY, M. & SCHMID, P. G. 1992. Pretranslational regulation of two cardiac glucose transporters in rats exposed to hypobaric hypoxia. *Am J Physiol*, 263, E562-9.
- STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A. & LOPASCHUK, G. D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85, 1093-129.
- STANSFIELD, W. E., MOSS, N. C., WILLIS, M. S., TANG, R. & SELZMAN, C. H. 2007. Proteasome inhibition attenuates infarct size and preserves cardiac function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 84, 120-5.
- STATISTISCHES BUNDESAMT. 2025a. *Häufigste Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland insgesamt für das Jahr 2024* [Online]. Available: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft->

- STATISTISCHES BUNDESAMT 2025b. Todesursachen in Deutschland 2024. *Statistischer Bericht*. Wiesbaden.
- STEINBERG, G. R. & HARDIE, D. G. 2023. New insights into activation and function of the AMPK. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24, 255-272.
- TAN, J. M., WONG, E. S., KIRKPATRICK, D. S., PLETNIKOVA, O., KO, H. S., TAY, S. P., HO, M. W., TRONCOSO, J., GYGI, S. P., LEE, M. K., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. & LIM, K. L. 2008. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 17, 431-9.
- TANIDA, I., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1, 84-91.
- THYGESEN, K., MAIR, J., KATUS, H., PLEBANI, M., VENGE, P., COLLINSON, P., LINDAHL, B., GIANNITSIS, E., HASIN, Y., GALVANI, M., TUBARO, M., ALPERT, J. S., BIASUCCI, L. M., KOENIG, W., MUELLER, C., HUBER, K., HAMM, C., JAFFE, A. S. & STUDY GROUP ON BIOMARKERS IN CARDIOLOGY OF THE, E. S. C. W. G. O. A. C. C. 2010. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J*, 31, 2197-204.
- TIAN, Z., ZHENG, H., LI, J., LI, Y., SU, H. & WANG, X. 2012. Genetically induced moderate inhibition of the proteasome in cardiomyocytes exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Circ Res*, 111, 532-42.
- TIMMERS, L., PASTERKAMP, G., DE HOOG, V. C., ARSLAN, F., APPELMAN, Y. & DE KLEIJN, D. P. 2012. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*, 94, 276-83.
- TROMBITAS, K. & GRANZIER, H. 1997. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*, 273, C662-70.
- TRULSSON, F., AKIMOV, V., ROBU, M., VAN OVERBEEK, N., BERROCAL, D. A. P., SHAH, R. G., COX, J., SHAH, G. M., BLAGOEV, B. & VERTEGAAL, A. C. O. 2022. Deubiquitinating enzymes and the proteasome regulate preferential sets of ubiquitin substrates. *Nat Commun*, 13, 2736.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2010. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 612482.
- TSKHOVREBOVA, L., WALKER, M. L., GROSSMANN, J. G., KHAN, G. N., BARON, A. & TRINICK, J. 2010. Shape and flexibility in the titin 11-domain super-repeat. *J Mol Biol*, 397, 1092-105.
- TURNER, N. A. & PORTER, K. E. 2013. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 6, 5.
- VAN DER PIJL, R., STROM, J., CONIJN, S., LINDQVIST, J., LABEIT, S., GRANZIER, H. & OTTENHEIJM, C. 2018. Titin-based mechanosensing modulates muscle hypertrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 9, 947-961.
- VAN DER VELDEN, J., ASSELBERGS, F. W., BAKKERS, J., BATKAI, S., BERTRAND, L., BEZZINA, C. R., BOT, I., BRUNDEL, B., CARRIER, L., CHAMULEAU, S., CICCARELLI, M., DAWSON, D., DAVIDSON, S. M., DENDORFER, A., DUNCKER, D. J., ESCHENHAGEN, T., FABRITZ, L., FALCAO-PIRES, I., FERDINANDY, P., GIACCA, M., GIRAO, H., GOLLMANN-TEPEKOYLU, C., GYONGYOSI, M., GUZIK, T. J., HAMDANI, N., HEYMANS, S., HILFIKER, A., HILFIKER-KLEINER, D., HOEKSTRA, A. G., HULOT, J. S., KUSTER, D. W. D., VAN LAAKE, L. W., LECOUR, S., LEINER, T., LINKE, W. A., LUMENS, J., LUTGENS, E., MADONNA, R., MAEGDEFESSEL, L., MAYR, M., VAN DER MEER, P., PASSIER, R., PERBELLINI, F., PERRINO, C., PESCE, M., PRIORI, S., REMME, C. A., ROSENHAHN, B., SCHOTTEN, U., SCHULZ, R., SIPIDO, K. R., SLUIJTER, J. P. G., VAN STEENBEEK, F., STEFFENS, S., TERRACCIANO, C. M., TOCCHETTI, C. G., VLASMAN, P., YEUNG, K. K., ZACCHIGNA, S., ZWAAGMAN, D. & THUM, T. 2022. Animal models

- and animal-free innovations for cardiovascular research: current status and routes to be explored. Consensus document of the ESC Working Group on Myocardial Function and the ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res*, 118, 3016-3051.
- VERPLANK, J. J. S., LOKIREDDY, S., ZHAO, J. & GOLDBERG, A. L. 2019. 26S Proteasomes are rapidly activated by diverse hormones and physiological states that raise cAMP and cause Rpn6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 4228-4237.
- VITTAL, V., STEWART, M. D., BRZOVIC, P. S. & KLEVIT, R. E. 2015. Regulating the Regulators: Recent Revelations in the Control of E3 Ubiquitin Ligases. *J Biol Chem*, 290, 21244-51.
- WANG, K. & WRIGHT, J. 1988. Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line. *J Cell Biol*, 107, 2199-212.
- WANG, X., LI, J., ZHENG, H., SU, H. & POWELL, S. R. 2011. Proteasome functional insufficiency in cardiac pathogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H2207-19.
- WANG, Z. V. & HILL, J. A. 2015. Protein quality control and metabolism: bidirectional control in the heart. *Cell Metab*, 21, 215-226.
- WATERS, S., MARCHBANK, K., SOLOMON, E., WHITEHOUSE, C. & GAUTEL, M. 2009. Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett*, 583, 1846-52.
- WEISS, J. N., QU, Z. & SHIVKUMAR, K. 2017. Electrophysiology of Hypokalemia and Hyperkalemia. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 10.
- WHITING, A., WARDALE, J. & TRINICK, J. 1989. Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J Mol Biol*, 205, 263-8.
- WILLIS, M. S. & PATTERSON, C. 2006. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system. *J Mol Cell Cardiol*, 41, 567-79.
- WILLIS, M. S., SCHISLER, J. C., PORTBURY, A. L. & PATTERSON, C. 2009. Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc Res*, 81, 439-48.
- WITT, C. C., BURKART, C., LABEIT, D., MCNABB, M., WU, Y., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J*, 25, 3843-55.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2024. World health statistics 2024: Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. *World health statistics*. ISBN: 978-92-4-009470-3 ed. Geneva.
- XU, Q., LI, X., LU, Y., SHEN, L., ZHANG, J., CAO, S., HUANG, X., BIN, J. & LIAO, Y. 2015. Pharmacological modulation of autophagy to protect cardiomyocytes according to the time windows of ischaemia/reperfusion. *Br J Pharmacol*, 172, 3072-85.
- YAMAMOTO, A., TAGAWA, Y., YOSHIMORI, T., MORIYAMA, Y., MASAKI, R. & TASHIRO, Y. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 23, 33-42.
- YAMASAKI, R., WU, Y., MCNABB, M., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2002. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 90, 1181-8.
- YAMAUCHI-TAKIHARA, K., IHARA, Y., OGATA, A., YOSHIZAKI, K., AZUMA, J. & KISHIMOTO, T. 1995. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation*, 91, 1520-4.
- YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357, 1121-35.
- ZHENG, J., CHEN, P., ZHONG, J., CHENG, Y., CHEN, H., HE, Y. & CHEN, C. 2021. HIF-1 α in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Molecular Medicine Reports*, 23.
- ZWEIER, J. L. 1988. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*, 263, 1353-7.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger bedanken. Vielen Dank für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für dieses spannende Projekt. Danke für deine umfassende Unterstützung und deine wertschätzende Art. Du hast eine Atmosphäre geschaffen, in der ich mit Freude an und mit meinem Projekt wachsen konnte. Auch Herrn Prof. Dr. Sebastian Kötter möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen. Vielen Dank für die tagtägliche Betreuung, dein offenes Ohr bei jeglichen Fragen oder Ideen und die konstruktive Begleitung des gesamten Etablierungsprozesses. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Schmitt für die Co-Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Ein großer Dank gilt auch der gesamten AG Krüger. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Sabine Bongardt für die geduldige und gewissenhafte Einarbeitung sowie jegliche Unterstützung bedanken. Deine herzliche Art und deine wertvollen Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt. Auch bei Kathi und Pierre möchte ich mich herzlich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor bedanken. Ebenso möchte ich dem gesamten Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie für die Zusammenarbeit danken. Außerdem bin ich sehr dankbar für die wissenschaftliche und finanzielle Förderung im SFB1116. Meiner Familie, allen voran meinen Eltern, möchte ich für den Rückhalt und die Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit danken. Danke, dass ihr mir diesen Weg ermöglicht habt. Meiner Schwester Marie danke ich von ganzem Herzen für die mentale Unterstützung zu jeder Zeit. Danke, dass ich mich immer auf dich verlassen kann. Meinen Freunden danke ich ebenfalls für die Unterstützung und die vielen schönen gemeinsamen Erinnerungen. Ebenso möchte ich mich bei Stefan und Ulrike bedanken. Vielen Dank, dass ihr mir ohne zu zögern euren tollen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt habt. Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Partner Jonas für die bedingungslose Unterstützung bedanken. Ich bin sehr dankbar und glücklich, dass wir unseren Weg gemeinsam gehen.