

Aus dem Institut für Herz -und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Basale Modifikation von Autophagie und Titin in Mäusen mit Expression exklusiver mitochondrial lokalisierter Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)

Dissertation

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

vorgelegt von Helen Zerlin

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Judith Haendeler

Widmung

...must be the last dandelion of the season.

I. Zusammenfassung

Das Sarkomerprotein Titin spielt eine entscheidende Rolle bei der passiven Steifigkeit des Myokards und der diastolischen Herzfunktion. Seine passiv mechanischen Eigenschaften werden durch Änderung der Expression kardialer Titin-Isoformen oder durch posttranslationale Modifikationen, wie der Phosphorylierung der elastischen I-Band-Domänen N2-B und PEVK, beeinflusst. Veränderte Titin-Eigenschaften werden mit chronischen Veränderungen der diastolischen Funktion des linken Ventrikels in Verbindung gebracht, können aber auch als akute Adaptation nach Myokardinfarkt auftreten. Autophagieprozesse sind an der Regulation der Titin-Expression und des Titin-Abbaus beteiligt und tragen zur Aufrechterhaltung der muskulären Integrität und Funktion bei. Der katalytischen Untereinheit der Telomerase, Telomerase Reverse Transkriptase (TERT), werden kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Vorangegangene Studien an Mäusen zeigten, dass diese kardioprotektive Wirkung spezifisch auf die mitochondrial lokalisierte TERT zurückgeführt werden kann, und dass Mäuse mit einer Expression exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT das “Outcome” nach einem akuten Myokardinfarkt erheblich verbessert. Dabei verbessert die mitochondriale TERT die Funktion an Komplex I der Atmungskette und schützt die Zellen vor oxidativem Stress. Zudem schützt sie die Kardiomyozyten vor Apoptose, verbessert die Differenzierung von Myofibroblasten, und fördert Endothelzellmigration und Vaskularisierung. Inwiefern mitochondriale TERT auch eine protektive Wirkung auf die kardialen Sarkomere ausübt wurde bisher nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit sollte daher untersuchen, ob in Mäusen mit Expression exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT bereits unter basalen Bedingungen Modifikationen des Sarkomerproteins Titin auftreten, die möglicherweise zu der beobachteten Kardioprotektion bei Myokardinfarkt beitragen könnten.

Untersucht wurden linksventrikuläre Gewebeproben von Mäusen mit einer Expression von exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT mit gleichzeitiger Defizienz für endogene TERT (mitoTERT-Mäuse). Als Vergleichstiere dienten Wildtyp (WT) und komplett TERT-defiziente (ko) Mäuse. Die Gewebeproben von mitoTERT-Mäusen zeigten eine signifikante Steigerung der relativen AMPK-Phosphorylierung, woraus auf eine verstärkte Induktion der Autophagie geschlossen werden kann. Weitere Autophagie-Marker wie LC3 und ULK zeigten trotz leichter Trends keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Phosphorylierung bzw. Expression.

Bei der biochemischen Analyse von kardialen Titin zeigten sich weder in der I-Banden Phosphorylierung noch in der Titin-Isoformen-Komposition statistisch signifikante Veränderungen. Im Vergleich zu WT-Mäusen wurde jeweils eine tendenzielle Erhöhung der ERK- und PKA/PKG-vermittelte Phosphorylierung an S4010 in den Geweben der ko- und mitoTERT-Mäusen beobachtet. In Summe könnten diese Veränderungen möglicherweise zu einer verminderten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten führen, wodurch die diastolische Funktion des Herzens im Sinne einer erleichterten Füllungsphase verändert sein könnte.

Weiterführende Untersuchungen zur passiven Steifigkeit isolierter Kardiomyozyten sind nötig, um diese Hypothese experimentell zu prüfen. Zudem könnte untersucht werden, ob die geringfügigen basalen Veränderungen von Titin in Kombination mit einer Aktivierung von Autophagieprozessen ausreichen, um im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes eine signifikante Protektion des kontraktilen Apparates der Kardiomyozyten zu bewirken.

II. Abstract

The sarcomere protein titin plays a crucial role in the passive stiffness of the myocardium and diastolic heart function. Its passive mechanical properties are influenced by changes in the expression of cardiac titin isoforms or by post-translational modifications, such as phosphorylation of the elastic I-band domains N2-B and PEVK. Altered titin properties are associated with chronic changes in left ventricular diastolic function but can also occur as acute adaptation following myocardial infarction. Autophagy processes are involved in regulating titin expression and degradation, contributing to maintaining muscular integrity and function.

The catalytic subunit of telomerase, telomerase reverse transcriptase (TERT), is attributed with cardioprotective properties. Previous studies in mice have shown that this cardioprotective effect can be specifically attributed to mitochondria-localized TERT and that mice expressing exclusively localized mitochondrial TERT significantly improved outcomes following acute myocardial infarction. Mitochondrial TERT improves function at complex I of the respiratory chain and protects cells from oxidative stress. Additionally, it protects cardiomyocytes from apoptosis, enhances myofibroblast differentiation, and promotes endothelial cell migration and vascularization. However, whether mitochondrial TERT also exerts a protective effect on cardiac sarcomeres has not been investigated.

This study aimed to investigate whether modifications of the sarcomere protein titin occur in mice expressing exclusively mitochondrial-localized TERT under basal conditions, which might contribute to the observed cardioprotection during myocardial infarction.

Left ventricular tissue samples from mice expressing exclusively mitochondrial-localized TERT with concurrent deficiency for endogenous TERT (mitoTERT mice) were examined. Wild-type (WT) and completely TERT-deficient (ko) mice served as comparison animals. Tissue samples from mitoTERT mice showed a significant increase in relative AMPK phosphorylation, indicating enhanced induction of autophagy. Other autophagy markers such as LC3 and ULK showed no significant changes in phosphorylation or expression despite slight trends.

Biochemical analysis of cardiac titin revealed no statistically significant changes in I-band phosphorylation or titin isoform composition. Compared to WT-mice, a tendency towards increased ERK- and PKA/PKG-mediated phosphorylation at S4010 was observed in the tissues of ko- and mitoTERT-mice. Collectively, these changes could possibly lead to

reduced passive stiffness of cardiomyocytes, potentially altering heart diastolic function towards a facilitated filling phase.

Further investigations into the passive stiffness of isolated cardiomyocytes are necessary to experimentally test this hypothesis. Additionally, it could be explored whether the minor basal changes in titin, combined with activation of autophagy processes, are sufficient to significantly protect the contractile apparatus of cardiomyocytes during acute myocardial infarction.

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AngII	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
Atg	Autophagy related protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CaMK II delta	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II delta
CaMKIIδ	Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II δ
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
cTNI	Kardiales Troponin-I
DNA	Desoxyribonucleinsäure

DTT	Dithiothreitol
E3-Ligase	Ubiquitin-Protein-Ligase der Klasse 3
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär Signal regulierte Kinase
Et al.	Et alii (und andere)
FAD	Flavin-Adenindinukleotid (oxidiert)
FADH²	Flavin-Adenindinukleotid (reduziert)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-A	Guanylatcyclase A Rezeptor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HSP	Hitzeschockprotein
I/R	Ischämie Reperfusion
I-Band	Isotropes Band
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
K63	Lysin
kDA	Kilo Dalton
ko	Knock-out
L	Liter
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LIR	LC3-Interaktionsregion
LV	Linker Ventrikel
M	Molar/Mol
mA	Milliampere
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
M-Band	Mittel-Band
mg	Milligramm
Mito	Mitochondriale
mitoTERT	Mitochondriale Telomerase Reverse Transkriptase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1/2	Muscle RING Finger 1/2
N2-Bus	N2-B unique sequences
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenindinukleotid (reduziert)
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PINK	PTEN-induced kinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Rat Fibrosarcoma Protein
RAS	Rat sarcoma protein
RBM20	RNA-bindendes Protein 20
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleinprotein
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)
sGC	lösliche Guanylzyklase
BAR	β-adrenerger Rezeptor
Tab.	Tabelle
TBST20	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor β
T	Threonin
TOMM	Translocase of outer Mitochondrial Membrane
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane
TTAGGG	Thymin-Thymin-Adenin-Guanin-Guanin-Guanin

TTnTv	Titin truncating variants
Ubi	Ubiquitin
ULK	Uncoordinated-51 like Kinase
Us	Unique sequences
V	Volt
VE Wasser	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen pro Volumen
Wnt-β-Catenin	Wingless und Int-1- β -Catenin
WT	Wildtyp

IV. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	i
II.	Abstract	iii
III.	Abkürzungsverzeichnis	v
IV.	Inhaltsverzeichnis.....	x
1	Einleitung	1
1.1	Akuter Myokardinfarkt.....	1
1.1.1	Kardiale Zelltypen und Vorgänge während und nach AMI	2
1.1.2	Mitochondriale Atmungskette	3
1.2	Telomerase.....	5
1.2.1	Mitochondriale TERT	5
1.3	Titin	7
1.3.1	Sarkomerstruktur und Lokalisation von Titin im Sarkomer.....	7
1.3.2	Das Sarkomerprotein Titin und seine molekularen Eigenschaften	8
1.3.3	Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit durch veränderte Isoformen Zusammensetzung	10
1.3.4	Modulation der passiven Steifigkeit durch Phosphorylierung im I-Band	10
1.4	Autophagie	13
1.4.1	Signaltransduktion der Autophagie	14
1.4.2	Mitophagie.....	17
2	Zielsetzung der Arbeit.....	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Material.....	20
3.1.1	Chemikalien.....	20
3.1.2	Puffer-Zusammensetzungen	21
3.1.3	Laborgeräte.....	22
3.1.4	Antikörper.....	23

3.1.5	Sekundäre Antikörper.....	23
3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Mäuse und Präparation der Herzen	24
3.3	Proteinbiochemie	25
3.3.1.1	Solubilisieren.....	25
3.3.2	SDS-Page und Herstellung der Gele	25
3.3.3	Western-Blot.....	27
3.3.4	Immundetektion mittels Western Blot Analyse.....	28
3.3.5	Imperial Protein Stain.....	29
3.3.6	Auswertung.....	29
3.3.7	Datenanalytik und Statistik.....	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Auswirkungen der mitochondrialen TERT auf Titin	31
4.1.1	Auswirkungen der mitochondrialen TERT auf die Titin-Phosphorylierung... 31	
4.1.2	Titin-Turnover und Isoformen-Verhältnis.....	33
4.2	Auswirkung der mitochondrialen TERT auf die Autophagie	34
4.2.1	Veränderungen der LC3-Aktivitätsformen und des LC3-II/LC3-I Quotienten 35	
4.2.2	p62-Akkumulation und Mitophagie	35
4.2.3	Phosphorylierung der Autophagie Regulatorkinasen mTOR und AMPK und deren Zielprotein ULK.....	37
5	Diskussion	39
5.1	Kritische Reflexion und Limitationen der Studie.....	39
5.2	Durch welche bekannten und möglichen Mechanismen hat die mitochondriale TERT eine kardioprotektive Funktion?	40
5.3	Führt eine Expression von exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT zu Veränderungen am Sarkomerprotein Titin?	41

5.3.1	Wird die Titin-Phosphorylierung durch die mitochondriale TERT verändert?	42
5.4	Hat die mitochondriale TERT basal Auswirkungen auf die Autophagie bzw. Mitophagie?	44
5.4.1	Mitophagie-Induktion durch mitochondriale TERT?.....	47
5.4.1	Zusammenhang zwischen Titin und Autophagie	48
5.4.2	Klinische Bedeutung der Autophagie.....	49
6	Quellenverzeichnis	52
7	Danksagung	67

1 Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob in Mäusen mit TERT lediglich in den Mitochondrien, eine basale Modifikation der Autophagie oder Titin einhergeht, was zu einer verbesserten Kardiomyozytenfunktion und einer Protektion vor ischämiebedingten Schäden führen könnte. Daher sollen im Folgenden zunächst literaturbekannte grundlegenden Aspekte von TERT, des Sarkomerproteins Titins, und des zellulären Abbauprozesses Autophagie erläutert werden.

1.1 Akuter Myokardinfarkt

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und führen im Vergleich zu allen anderen Krankheitsgruppen zu den höchsten Kosten im Gesundheitssystem (Robert Koch-Institut, 2015). Der Herzinfarkt, der seit einigen Jahren unter dem Begriff „akuter Myokardinfarkt“ (AMI) geführt wird, nimmt dabei eine entscheidende Rolle ein. Jedes Jahr werden ca. 200.000 Patienten mit AMI stationär behandelt (Freisinger et al., 2014). Im Jahr 2019 starben in Deutschland 44.282 Menschen an AMI, was 4,7 % aller Sterbefälle entspricht (Deutsche Herzstiftung, 2020). Somit zählt AMI zu den 20 häufigsten Hauptdiagnosen von vollstationär behandelten Patienten in Krankenhäusern (Czerner, 2020).

Bei einem AMI kommt es durch den Verschluss eines Herzkranzgefäßes zu einer abrupten Durchflussstörung der Herzmuskelzellen. Der resultierende Sauerstoffmangel (Hypoxie) in den Kardiomyozyten führt zu einer raschen Schädigung der Zellen und zu Abnahme der kontraktilen Herzfunktion. Durch eine zügige Wiederherstellung der Durchblutung und damit auch Sauerstoffversorgung des Gewebes, kann die Größe des Infarktareals verkleinert und die Mortalität nach AMI erheblich gesenkt werden (Serini & Gabbiani, 1999).

Auch wenn die Überlebensrate sowohl durch pharmakologische Therapien als auch durch den medizintechnischen Fortschritt verbessert werden konnte, sind die langfristigen Folgen eines AMI für viele Betroffene häufig gravierend. Neben psychischen Folgeerkrankungen wie Depressionen, können auch physische Folgeerkrankungen, wie Herzwandaneurysmen, auftreten (Piepoli et al., 2016). 20% der Patienten, die den primären AMI überlebt haben, erleiden darüberhinaus noch im ersten Folgejahr einen zweiten kardiovaskulären Vorfall (Piepoli et al., 2016). Zusammengefasst kann also festgehalten werden, dass die Prophylaxe zur Verhinderung eines AMI, sowie die rasche und effektive Behandlung eines AMI und

damit die Verhinderung von Folgeschäden einen Schwerpunkt in der medizinischen Forschung und Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen sollte (Czerner, 2020).

1.1.1 Kardiiale Zelltypen und Vorgänge während und nach AMI

Nach Betrachtung der klinischen Aspekte des AMI ist eine Vertiefung auf die mikroskopische Ebene unerlässlich, um die fundamentalen zellulären Prozesse im direkten Anschluss an dieses lebensbedrohliche Ereignis zu verständlichen. Das Herzmuskelgewebe besteht hauptsächlich aus Kardiomyozyten, enddifferenzierten nicht-proliferierenden Zellen, Endothelzellen, Gefäßzellen und Fibroblasten (Howard & Baudino, 2014). Fibroblasten sind mesenchymalen Ursprungs und produzieren und erhalten die Integrität und Struktur der Extrazellulärmatrix (Camelliti et al., 2005; Soundararajan & Kannan, 2018; Vrancken Peeters et al., 1999). Durch mechanische Stimuli von außen kann es über Integrine zu einer Differenzierung von ruhenden Fibroblasten in Myofibroblasten kommen. Differenzierte Myofibroblasten sind ein hochaktiver Zelltyp, der die Extrazellulärmatrix sowohl um- als auch aufbauen kann (Eghbali & Weber, 1990).

Bei einem AMI kommt es durch den Verschluss eines Herzkranzgefäßes zu einer abrupten Durchflussstörung der Herzmuskelzellen.

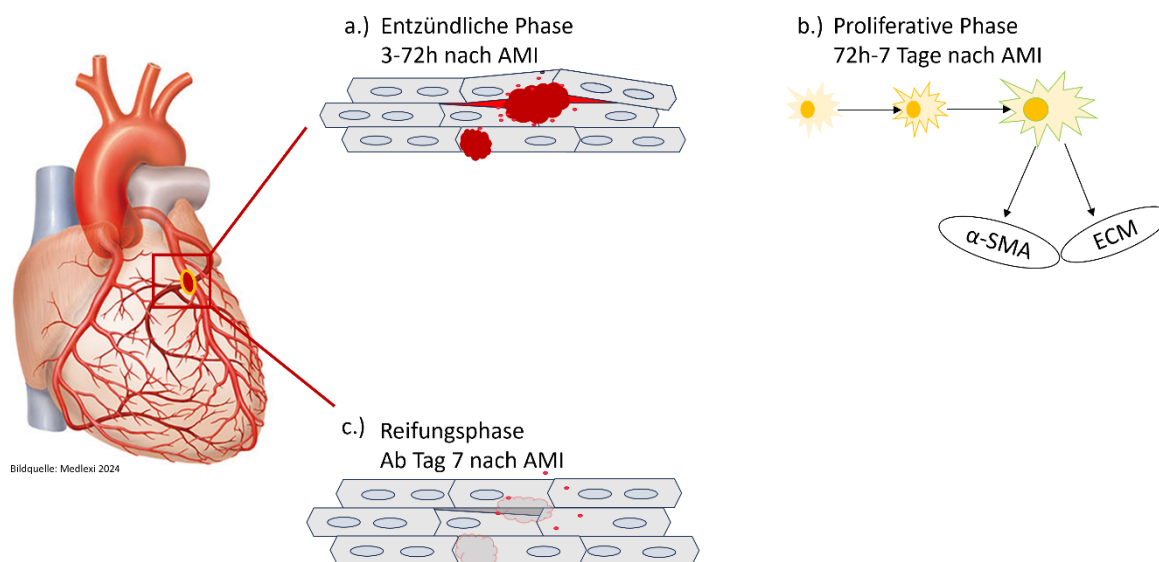


Abb. 1: Darstellung der Narbenbildung nach AMI. a.) Subendokardiale Kardiomyozyten zeigen irreversible Veränderungen bereits 20–30 Minuten nach der Koronarokklusion. Etwa 3-72h nach AMI beginnt die entzündliche Phase. Durch die Schädigung der Kardiomyozyten nehmen Fibroblasten im ischämischen Bereich einen proinflammatorischen Zustand an. Zytokine und Matrix-degradierende Proteasen werden sekretiert. b.) In der folgenden proliferativen Phase infiltrieren Makrophagen in das nekrotische Gewebe und entfernen abgestorbene und nekrotische Zellen. Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten. c.) Nach sieben Tagen synthetisieren und degradieren Myofibroblasten Kollagen, wodurch aufgrund deren Lokalisation am Narbenrand und ihrer kontraktilen Funktion die Narbenränder zusammengeführt werden und eine Infarkt Narbe gebildet wird.

Der resultierende Sauerstoffmangel (Hypoxie) in den Kardiomyozyten induziert eine Reihe von Vorgängen, die in Abbildung 1 dargestellt sind: Bereits wenige Stunden nach AMI kommt es im Infarktgebiet zur Nekrose betroffener Zellen, sowie zur Apoptose von angrenzenden Zellen. Die geschädigten Kardiomyozyten setzen entzündlichen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) frei, die umliegende Fibroblasten aktivieren. Diese Phase des Umbaus nach AMI wird deshalb als entzündliche Phase bezeichnet. Im weiteren Verlauf kommt es zur Infiltration von Makrophagen in das nekrotische Gewebe, die abgestorbene und nekrotische Zellen entfernen (Epelman et al., 2014; Gajarsa & Kloner, 2011). Fibroblasten differenzieren unter Energieverbrauch zu Myofibroblasten, eine spezialisierte Form aktivierter Fibroblasten. Sie zeichnen sich durch die Expression von Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) und eine erhöhte Kontraktilität aus und sind besonders wichtig während der Wundheilung und Gewebereparatur, da sie eine verstärkte Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) ermöglichen. Die ECM schafft eine unterstützende Umgebung für die Zellen, fördert die Zellmigration und -adhäsion, reguliert die Zellproliferation und beeinflusst verschiedene Zellfunktionen (Gogiraju et al., 2019). Die Produktion von ECM ist ein wichtiger Schritt im Heilungsprozess nach Verletzungen und spielt eine wesentliche Rolle bei der Gewebereparatur und -remodellierung.

In der reifenden Phase nach einem AMI geht der Heilungsprozess weiter, um eine stabilere und funktionelle Narbe zu bilden. Die in der Proliferationsphase produzierten Kollagenfasern werden weiter modifiziert und reifen. Es erfolgt eine Quervernetzung der Kollagenfasern, sodass eine Infarktnarbe gebildet wird (Calderone et al., 2006; Gabbiani, 2003; Sun & Weber, 2000). Diese Infarktnarbe verhindert eine Dilatation und Expansion von nekrotischem Gewebe. Allerdings kann es durch die erhöhte Kollagenproduktion langfristig auch zu einer interstitiellen Fibrosierung kommen, die zu ischämischen Kardiomyopathien führen kann (Venugopal et al., 2022).

1.1.2 Mitochondriale Atmungskette

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten erfordert Energie in Form von ATP. Dieses wird durch die in den Mitochondrien ablaufende Atmungskette gebildet. Die mitochondriale Atmungskette, siehe Abbildung 2, besteht aus einer Reihe von Redox-Enzymen (Reduktion und Oxidation), die die Reduktionsäquivalente NADH (Nicotinamid-Adenindinukleotid) und FADH_2 (Flavin-Adenindinukleotid) nutzen, um einen Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufzubauen. Der Komplex I, auch

NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase genannt, ist der größte und effektivste Komplex der Atmungskette. Pro NADH werden hier vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Das Coenzym Q, auch bekannt als Ubichinon, ist ein hydrophobes Molekül, das in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und Elektronen zwischen verschiedenen Enzymkomplexen der Atmungskette transportiert (Kampjut & Sazanov, 2020). An Komplex II wird FADH_2 zu FAD oxidiert und es werden Elektronen auf Ubichinon übertragen, die dann weiter zu Komplex III und IV über Cytochrom c transferiert werden. An Komplex III und IV werden je zwei Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Wikstrom, 1977). Der so aufgebaute Protonengradient erzeugt eine Potenzialdifferenz zwischen der mitochondrialen Membran, sodass beim Potenzialausgleich an Komplex V die freiwerdende Energie genutzt wird, um aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) zu Adenosintriphosphat (ATP) synthetisieren (Mitchell, 1975).

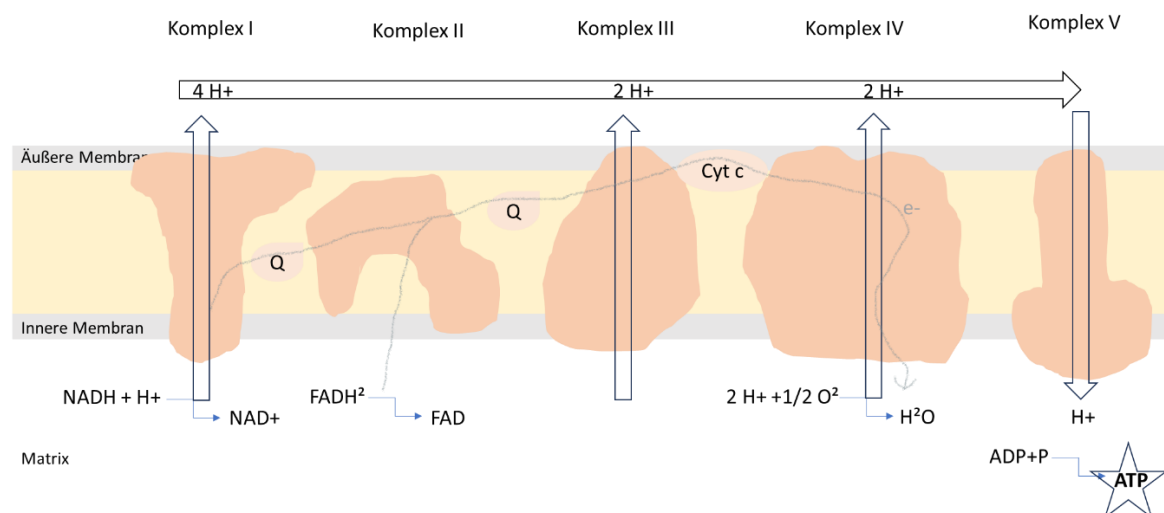


Abb. 2: Schematischer Ablauf der mitochondrialen Atmungskette. Dargestellt sind die vier Komplexe (I-IV) der mitochondrialen Atmungskette, sowie der Komplex V, der auch als Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase bezeichnet wird. NADH steht für Nicotinamid-Adenindinukleotid (reduziert), während NAD für Nicotinamid-Adenindinukleotid (oxidiert) steht. Diese Oxidation findet an Komplex I der Atmungskette statt. Dabei werden Elektronen (e^-), sowie vier Wasserstoff ($4H^+$) gewonnen. An Komplex II wird FADH_2 (reduziert) zu FAD (Flavin-Adenindinukleotid (oxidiert) oxidiert. Coenzym Q (Q) transportiert Elektronen. An Komplex III wird aus $2H^+$ und $1/2 O_2$ Wasser. Durch den aufgebaute Protonengradient kann an Komplex V aus $\text{ADP} + P$ ATP erzeugt werden.

Wie bereits oben erwähnt, spielt die Aktivität der Atmungskette eine entscheidende Rolle in der Zelle und beeinflusst die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Bei Hemmung des Komplex I, wird die Myofibroblasten-Differenzierung unterdrückt (Cai et al., 2023).

1.2 Telomerase

Telomere sind komplexe Desoxyribonukleinproteine mit *Tandem-repeats* aus TTAGGG-Nukleotidsequenzen an den Enden der linearen Chromosomen eukaryotischer Organismen. Sie stabilisieren das Chromosom und schützen die DNA, können jedoch durch die komplexe Telomerstruktur auch die DNA-Replikation behindern und durch das End-Replikationsproblem zu Sequenzverlusten führen. Um einen solchen DNA-Verlust zu verhindern, schützt das Enzym Telomerase die Enden der Chromosomen bei jeder Replikation, indem es anhand von RNA-Vorlagen Nukleotide an die Chromosomenenden anlagert. (Cottage et al., 2012; Wu et al., 2017; Wu et al., 2019).

Das Enzym Telomerase besteht in der Regel aus der RNA-Komponente TERC (*telomerase RNA component*) und dem katalytischen Protein TERT (*telomerase reverse transcriptase*) (Ait-Aissa et al., 2016). TERC ist in vielen Geweben vorhanden. Seine spezifische Regulation erscheint im Vergleich zu TERT weniger stringent und kann in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen beobachtet werden, während die TERT-Expression offenbar spezifisch reguliert wird (Yang et al., 2008). In Geweben mit hoher Zellteilungsrate, wie in Tumorzellen oder Stammzellen, findet sich eine hohe Telomeraseaktivität (Shay & Wright, 2005), da die Telomerase (TERC und TERT) der Telomerverkürzung entgegenwirkt.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TERT in vielen Geweben eine Rolle spielt und nicht nur eine kanonische, d.h. telomerverlängernde, Funktion hat. So kann TERT Einfluss auf die Redox-Homöostase der Zelle nehmen und Überleben und Signalwege beeinflussen (Haendeler et al., 2003; Rosen et al., 2020). Die antiapoptotische sowie die mitochondriale Funktion stehen im Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen und der Herzentwicklung (Anderson et al., 2019; Borges & Liew, 1997). TERT inhibiert zudem Wachstumssignale von TGF- β (*Transforming growth factor β*), Wnt- β -Catenin (Wingless und Int-1), sowie EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Geserick et al., 2006; Park et al., 2009; Smith et al., 2003).

1.2.1 Mitochondriale TERT

Ursprünglich wurde angenommen, dass TERT lediglich in Stammzellen und in stark proliferierenden Zellen vorhanden sei. Jedoch zeigte sich, dass das Enzym auch in gering proliferierenden Geweben existiert und zudem nicht nur im Zellkern, sondern auch in Mitochondrien vorkommt (Ahmed et al., 2008; Haendeler et al., 2009; Santos et al., 2004; Santos et al., 2006; Zurek et al., 2016). Dies kommt durch Translokation zustande: TERT

wird sowohl mit einem N-, als auch einem C-Terminalen Translokationssignal im Zytosol synthetisiert (Beyer & Norwood Toro, 2018; Rosen et al., 2020). Das C-terminale Signal bestimmt die Lokalisation in den Zellkern, während das N-terminale Signal die Lokalisation in Mitochondrien vermittelt. Welche Faktoren die tatsächliche Lokalisation definieren, ist bislang noch unklar. Unter physiologischen Bedingungen sind in Fibroblasten ca. 10-20% der TERT in den Mitochondrien lokalisiert (Gordon & Santos, 2010). Bei steigendem oxidativen Stress und einer Anreicherung von ROS kommt es zu einer Phosphorylierung an Tyrosin 707 der Telomerase, wodurch die TERT vermehrt vom Zellkern in die Mitochondrien translokalisiert wird (Haendeler et al., 2003; Rosen et al., 2020). Die Funktion von TERT in den Mitochondrien ist noch nicht abschließend geklärt. Da die mitochondriale DNA keine Telomere enthält und es sich um ein zirkuläres DNA-Molekül handelt, muss die mitoTERT (TERT in Mitochondrien) auch weitere Funktionen haben. Gezeigt wurde, dass mitoTERT die mitochondriale DNA vor Schäden schützt und mit der DNA interagiert. Durch Bindung an die DNA erhöht mitoTERT die allgemeine Aktivität der Atmungskette, durch Interaktion mit der für die NAD-Ubiquichinon-Reduktase kodierende Sequenz des Komplexes I (Haendeler et al., 2003; Haendeler et al., 2009). Wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben, fördert eine erhöhte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette auch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Weitere nicht-kanonische Funktionen der TERT wurden in Endothelzellen entdeckt. Dort sorgt TERT für eine geringere H₂O₂-induzierte Apoptose (Haendeler et al., 2009).

Die Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppen von Prof. Haendeler und Prof. Altschmied widmeten sich spezifisch der Untersuchung von Funktionen der mitoTERT. Dafür entwickelte die Arbeitsgruppe von Prof. Altschmied zunächst eine Maus, die mitoTERT in allen Zellen auf einem ansonsten TERT-defizienten Hintergrund exprimiert. Die Versuchsmäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen eine reduzierte Infarktgröße nach AMI, sowie eine langfristige Herzfunktionsverbesserung im Vergleich zu den anderen Mäusegruppen. Ebenso zeigte die Arbeitsgruppe an einer Zellkultur, dass mitoTERT eine verringerte Apoptose von Kardiomyozyten und gesteigerte Myofibroblasten-Differenzierung herbeiführt. Die nukleäre Telomerase zeigte keine vergleichbaren Effekte.

mitoTERT verbessert auch die Migration von endothelialen Zellen und bewirkt durch eine erhöhte eNOS-Aktivität (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) eine verbesserte endotheliale Funktion. Ebenso beschreiben Ale-Agha et al., dass mitoTERT-Mäuse über

eine verbesserte mitochondriale Atmung verfügen, insbesondere hinsichtlich der Aktivität an Komplex I (Ale-Agha et al., 2021). Diese Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass nukleäre und mitochondriale TERT unterschiedliche Funktionen und Auswirkungen auf Kardiomyozyten haben.

1.3 Titin

1.3.1 Sarkomerstruktur und Lokalisation von Titin im Sarkomer

In der quergestreiften Muskulatur, wie sie sich in der Herzmuskulatur findet, wird die Kontraktion der Sarkomere durch Ineinandergleiten der dicken Myosin- und dünnen Aktinfilamenten sowie dem elastischem Titinfilament gewährleistet. Die Anordnung der Myofilamente in einem Sarkomer bedingt sein Lichtbrechungsverhalten und ist deshalb namensgebend für die einzelnen Abschnitte (siehe Abbildung 3). Ein Sarkomer erstreckt sich zwischen zwei Z-Scheiben, die als Aufhängung für die dünnen Aktinfilamente und Titinfilamente fungieren. Dieser Teil bricht das Licht isotrop und wird daher als I-Band bezeichnet. Myosin-haltige, sogenannte „dicke Filamente“, brechen das Licht anisotrop und werden daher als A-Band bezeichnet. Innerhalb des A-Bands gibt es im Median eine als M-Linie bezeichnete Verdichtung, die u. a. aus der Quervernetzung von Myosinfilamenten untereinander entsteht (Agarkova & Perriard, 2005; Knappeis & Carlsen, 1968).

Die dünnen Aktinfilamente, die in der Z-Scheibe verankert sind, sowie die dicken Myosinfilamente, die in der M-Linie befestigt sind, arbeiten im Calcium-induzierten Querbrückenzyklus zusammen. Durch die Interaktion der Filamente wird Adenosintriphosphat in Adenosindiphosphat und Phosphat umgewandelt. Dies löst die Freisetzung von Energie aus dem gebundenen ATP aus, die zur Kontraktion der Muskelfasern führt. Die Länge der einzelnen Aktin- und Myosinfilamente verändert sich während des gesamten Ablaufs nicht, lediglich deren Stellung im Sarkomer. Im Bereich des A-Bands sind Titin und Myosin eng miteinander assoziiert. Dadurch bleibt Myosin auch während der Relaxation im Zentrum des Sarkomers (Huxley & Hanson, 1954).

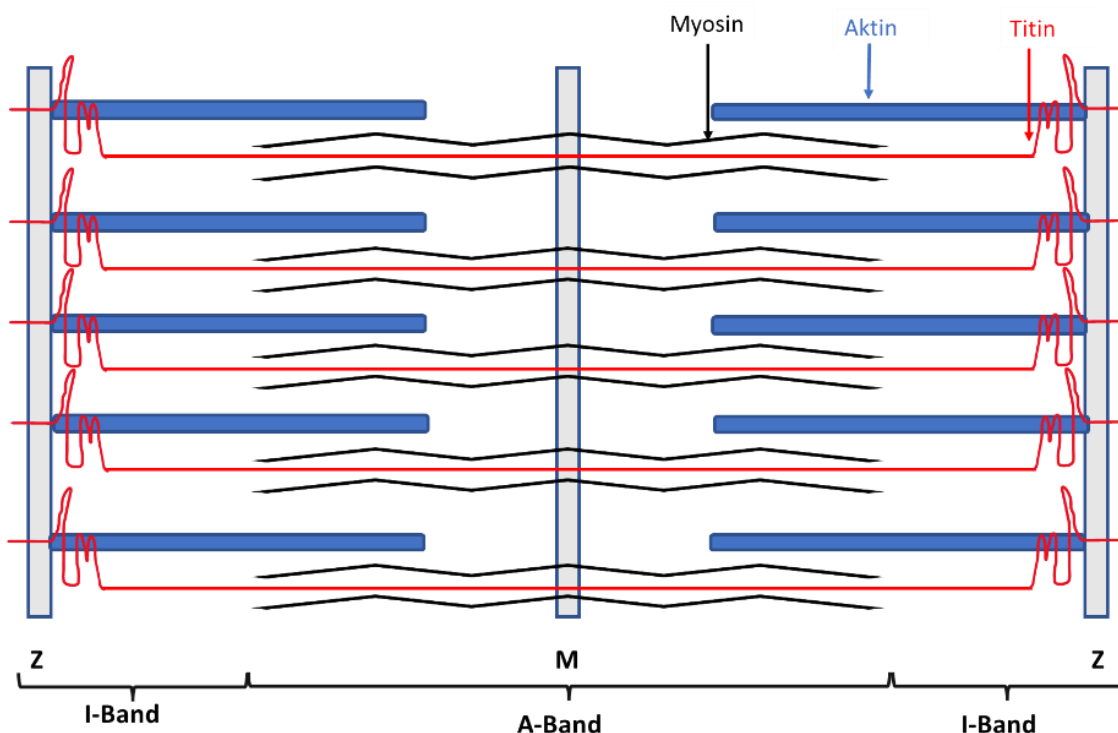


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Sarkomers. A-Band = anisotropes Band; I-Band = isotropes Band; Z = Z-Scheibe, M = M-Linie. Die drei Hauptkomponenten des Sarkomers sind Aktin, Myosin und Titin. Ein Titinmolekül durchspannt ein Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Die Muskelkontraktion wird durch das Ineinandergleiten von Myosin und Aktin gewährleistet. Die spezifische Anordnung geht mit einer unterschiedlichen Lichtbrechung innerhalb eines Sarkomers einher: Das A-Band bricht Licht anisotrop, das I-Band isotrop. Die M-Linie stellt die mediane Verdichtung der Myosinfilamente dar.

1.3.2 Das Sarkomerprotein Titin und seine molekularen Eigenschaften

Titin ist mit einer Molekularmasse von über 3000 kDa das größte bekannte Protein des menschlichen Körpers. Es wird durch ein einzelnes Gen kodiert, welches 364 Exons umfasst. Das Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (Bang et al., 2001; Labeit et al., 1990). Es existieren in Mäusen zwei unterschiedliche Hauptisoform-Typen, die durch alternatives *Spleißen* entstehen: N2BA-Isoformen, mit einer Größe von ~3200-3700 kDa und die N2B-Isoform, die mit 3000 kDa vergleichsweise kürzer und steifer ist (Bang et al., 2001). Das Protein Titin besteht aus Immunglobulinen und Fibronectin Typ-3-ähnlichen Domänen, individuellen Sequenzabschnitten, den sogenannten *unique sequences*, und einer Titinkinase-Domäne, die nah an der M-Linie gelegen ist (Bang et al., 2001; Gautel, 2011; Labeit et al., 1992; Labeit & Kolmerer, 1995). Durch das *Spleißen* und die daraus resultierende unterschiedliche Isoformen-, kann Titin unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften besitzen und so eine wichtige Rolle in der Modulation der myokardialen Steifigkeit spielen (Makarenko et al., 2004; Prado et al., 2005). Das elastische Element im

I-Band Bereich von Titin setzt sich aus einer Immunglobulin-Domäne (Ig), sowie zwei sogenannten „*unique sequences*“ zusammen.

Die PEVK-Domäne (*predominant amino acids: proline (P), glutamic acid (E), valine (V) and lysine (K)*), ist eine *unique sequence*, die besonders reich an den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Valin und Lysin und an beiden Enden durch eine seriell gekoppelte Ig-Domäne flankiert ist (Krüger & Kötter, 2016; Labeit & Kolmerer, 1995). Das N2B-Segment besteht aus Ig-Domänen und kurzen N2B *unique sequences*. Die kardialen Isoformen, die durch Spleißen entstehen, unterscheiden sich insbesondere im elastischen I-Band: Die N2BA-Isoform enthält eine längere PEVK-Domäne mehr Ig-Domänen und eine zusätzliche N2A *unique sequence*. Dies bedingt, dass die größere N2BA-Isoform eine höhere Elastizität gegenüber der kürzeren N2B-Isoform hat (Freiburg et al., 2000; Greaser et al., 2002; Krüger & Linke, 2011; Labeit & Kolmerer, 1995).

Titins zentrale Lokalisation im Sarkomer und seine Aufspannung von der Z-Scheibe bis zur M-Linie ist Grundlage für seine zahlreichen Funktionen. So fungiert Titin als Strukturprotein und dient als eine Art Maßband während der Sarkomerogenese. Oft wird Titin aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften als molekulare Feder bezeichnet (Trombitás, Greaser & Labeit et al., 1998). Dies bezieht sich auf den I-Bandbereich des Proteins, in welchem die Längenänderung erfolgt (Linke et al., 1996; Trombitás et al., 2000). Bei geringer Sarkomerlänge liegt es aufgewickelt in einer zufälligen Anordnung (*random coiled*) vor. Während der Diastole nimmt durch die Ventrikelfüllung die Sarkomerdehnung zu. Dabei werden zuerst die *linker sequences* in den proximalen und distalen Ig-Domänen von Titin verlängert, anschließend werden die PEVK-Region und die N2-Bus-Region extendiert, wodurch die passive Spannung im Sarkomer zunimmt (Linke et al., 1999). Dem entgegen wirken elastische Rückstellkräfte (Linke et al., 1999; Trombitás, Greaser & Labeit et al., 1998), die auch die Zentrierung der dicken Myosinfilamente nach einer Kontraktion gewährleisten und eine optimale Kraftentwicklung des Herzens erlauben (Fürost et al., 1988; Horowitz et al., 1989; Tskhovrebova & Trinick, 2010). Wenn die Zugkraft wieder abnimmt, kehren die zuvor gedehnten Elemente in ihre ursprüngliche, zufällige relaxierte Anordnung zurück (Granzier & Labeit, 2004; Li et al., 2002; Trombitás, Greaser, French & Granzier, 1998). Die Steifigkeit eines Muskels beeinflusst die benötigte Kraft, um ihn zu dehnen, und ist somit ausschlaggebend für die passive Steifigkeit, die bei der Ventrikelfüllung in der Diastole überwunden werden muss. Moduliert kann die Titin-vermittelte Steifigkeit auf

lang- und kurzfristige Weise. Dazu zählt einerseits eine Phosphorylierung der I-Bande an unterschiedlichen Stellen, sowie eine veränderte Isoformenzusammensetzung.

1.3.3 Modulation der Titin-vermittelten passiven Steifigkeit durch veränderte Isoformen Zusammensetzung

Die durch Titin vermittelte passive Steifigkeit der Sarkomere bzw. Kardiomyozyten kann durch unterschiedliche Mechanismen moduliert werden. Dabei ist zwischen kurz- und langfristigen Veränderungen zu unterscheiden. Während posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung kurzfristige Variationen der Titin-Steifigkeit zur Folge haben, bewirkt eine Isoform-Verschiebung längerfristige Veränderungen der Titin-basierten Steifigkeit (Krüger & Kötter, 2016). Somit kann über Modifikation von Titin kurz- und langfristig die Kontraktilität und das Schlagvolumen moduliert werden.

Der N2BA- und N2B-Quotient beschreibt die unterschiedlichen Isoformen von Titin, die für die passive Dehnbarkeit und Elastizität des Herzmuskels verantwortlich sind: Der N2B-Anteil bezieht sich auf die steifere Isoform von Titin, der N2BA-Anteil auf die flexiblere Isoform. Ist der Anteil der längeren und weniger steifen N2BA-Form höher, sinkt die durch Titin-bedingte myokardiale Steifigkeit, da der Anteil der kürzeren und steiferen N2B-Isoform des Titins sinkt. Eine Verschiebung der Isoformen Zusammensetzung zugunsten der längeren N2BA Isoform wurde in Herzen von Patienten mit terminaler hypertropher Herzinsuffizienz beobachtet und stellt vermutlich einen Adaptationsvorgang des Herzens auf pathologische myokardiale Wandsteifigkeitszunahme dar, um der gesteigerten Steifigkeit entgegen zu wirken (Makarenko et al., 2004; Nagueh et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Eine Veränderung der Zusammensetzung der kardialen Isoformen von Titin liegt nicht nur bei Krankheiten vor, sondern erfolgt auch in der pränatalen Herzentwicklung (Lahmers et al. 2004; Opitz et al. 2004). Pränatal existiert in Mäusen ausschließlich die fötale N2BA-Isoform, die N2B, die im adulten Herz dominiert, fehlt gänzlich und wird erst perinatal exprimiert (Lahmers et al. 2004; Opitz und Linke 2005). Daraus ergibt sich, dass fetale Sarkomere eine deutlich höhere Elastizität aufweisen, als es bei adulten der Fall ist. Ebenso sorgt ein höherer N2B-Anteil für eine bessere diastolische Funktion und myokardiale Signaltransduktion (Lahmers et al. 2004; Opitz et al. 2004).

1.3.4 Modulation der passiven Steifigkeit durch Phosphorylierung im I-Band

Neben der Veränderung der Zusammensetzung der kardialen Isoformen, spielen Phosphorylierungen eine wichtige Rolle in der kurzfristigen Modulation der Titin-

vermittelten passiven Steifigkeit. Phosphorylierungen wurden bereits an verschiedenen Stellen im elastischen I-Band des Titins identifiziert. In Abbildung 4, mit freundlicher Genehmigung von Linke & Hamdani, sind einige der über 300 bisher bekannten Phosphorylierungsstellen am Titin aufgezeigt. Die Nummerierung der Phosphorylierungsstellen bezieht sich auf die humane Titinsequenz (UniProtKB *accession number* Q8WZ42-1). Die in dieser Arbeit untersuchten Phosphorylierungsstellen sind S4010, S4099, S11878 und S12022, die jeweils durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden können.

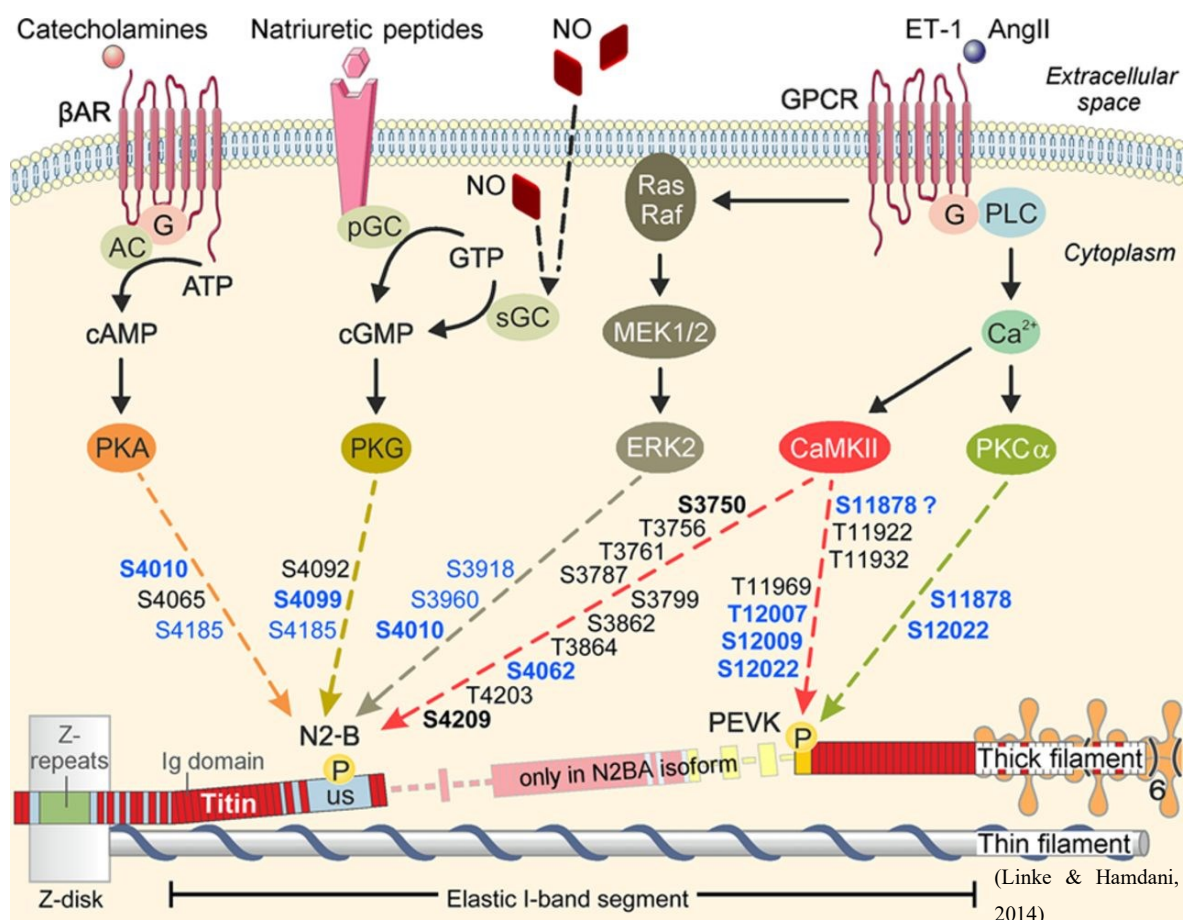


Abb. 4: Ablauf der Titin-Phosphorylierung in der N2-Bus Region und PEVK-Domäne durch verschiedene Kinasen. Die Nummerierung der Phosphorylierungsstellen an Serinresten von Titin wurde anhand der kanonischen humanen Titinsequenzen vorgenommen (UniProtKB identifier Q8WZ42-1). Die durch Antikörper oder andere ortsspezifische Methoden identifizierte Stellen sind in blau zu sehen. Adenylzyklase (AC); Angiotensin II (AngII); β-adrenerger Rezeptor (βAR); Ca²⁺-abhängige Proteinkinase α (PKCα); Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-IIδ (CaMKIIδ); cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA); cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG); ExtrazellulärSignal regulierte Kinase 2 (Erk2); G-Proteingekoppelter Rezeptor (GPCR); lösliche Guanylzyklase (sGC); small G-Protein (G); MAPK/Erk Kinase-1 und -2 (MEK1/2); partikuläre Guanylzyklase (pGC); Phospholipase C (PLC); Rat Fibrosarcoma Protein (Raf); Ratten Sarcoma Protein (Ras); Stickstoffmonoxid (NO); Unique Sequence (us); zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP); zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Linke & Hamdani, 2014).

Durch die Bindung von Katecholaminen an die G-Protein gekoppelten β -adrenergen Rezeptoren (β AR) wird die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, die Adenosintriphosphat in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt; cAMP aktiviert als *second messenger* daraufhin die Proteinkinase A (PKA). Die aktivierte PKA phosphoryliert Titin am Serinrest S4010 im N2B-Segment (Kötter et al., 2013).

Neben der PKA kann auch die Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK) Titin am Serinrest S4010 phosphorylieren. Diese Signalwegkaskade wird durch die Bindung von Angiotensin II (AngII) an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) ausgelöst. Die Bindung führt über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase/ERK (MAPK/ERK)-Signalweg zur Phosphorylierung von Titin (Raskin et al., 2012). Des Weiteren kann Titin im N2-Bus Segment auch durch die Proteinkinase G (PKG) phosphoryliert werden.

Die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) durch die cGMP-abhängige partikuläre Guanylylzyklase (pGC) kann durch zwei Signalkaskaden ausgelöst werden. Zum Ersten aktiviert die Bindung des *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) an den Guanylylzyklase-A Rezeptor (GC-A) die pGC, die daraufhin GTP in cGMP umwandelt, das als *second messenger* die PKG aktiviert. Zum Zweiten kann Stickstoffmonoxid (NO) an die NO-sensitive Guanylylzyklase (GC) binden und diese aktivieren, die ebenfalls GTP in cGMP umwandelt.

Phosphorylierung der kardialen N2-Bus erhöht die Persistenzlänge dieser Region und verringert dadurch die passive Steifigkeit (Hamdani et al., 2013; Krüger & Linke, 2009). PKC-abhängige Phosphoryllierung der PEVK-Region reduziert die sogenannte Persistenzlänge des Titinmoleküls und erhöht so die Titin-vermittelte Steifigkeit (Hidalgo et al. 2009). Die molekularen Grundlagen der gegensätzlichen Effekte der N2-Bus und PEVK-Phosphorylierung sind noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten in die, aus vielen sauren Aminosäuren bestehende und damit schon negativ geladene, N2-Bus eine destabilisierende Wirkung hat (Kötter et al., 2013), wodurch die Steifigkeit vermindert wäre. Im Gegensatz dazu besteht die PEVK-Domäne überwiegend aus basischen Aminosäuren. Hier hätte das Einbringen von negativ geladenen Phosphatresten aufgrund der elektrostatischen Anziehung einen stabilisierenden Effekt, wodurch die Steifigkeit sinkt. Es wird vermutet, dass die passive Steifigkeit von Titin durch Phosphorylierung um bis zu 20 % gesenkt werden kann (Fukuda & Granzier, 2005; Krüger & Linke, 2006, 2009).

Das PEVK-Segment wird durch die Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase Ca ($\text{PKC}\alpha$) und die $\text{CaMKII}\delta$ phosphoryliert. Die PKC phosphoryliert die Serinreste S11878 und S12022 (Hidalgo et al., 2009). S12022 kann zudem auch durch $\text{CaMKII}\delta$ phosphoryliert werden (Hamdani et al., 2013).

Eine direkte, reversible Titinmodifikation wurde auch bei erhöhtem oxidativem Stress beobachtet, bei der es durch die Bildung von Disulfidbrücken in der N2-Bus Region zu erhöhter Titin-vermittelter Steifigkeit der Kardiomyozyten kommt (Beckendorf & Linke, 2015; Grützner et al., 2009).

Als weitere Modifikationsmöglichkeit wurde gezeigt, dass die mechanische Entfaltung von Titin-Ig Domänen Cysteinreste freilegt, die dann S-glutathionyliert werden können. Die S-Glutathionylierung dieser Cysteine verringert die mechanische Stabilität der Ig-Domäne, sowie ihre Faltungsfähigkeit. So begünstigen beide Effekte einen dehnbareren, weniger steifen Zustand von Titin (Alegre-Cebollada et al., 2014).

Das Zusammenspiel der vielfältigen und teils entgegengesetzt wirkenden Modifikationen sowie deren übergeordnete Regulation ist bislang nur unvollständig verstanden.

1.4 Autophagie

Das Titinfilament wird auf verschiedene Wege reguliert und modifiziert. Modifikation der Titin Isoformen Zusammensetzung, aber auch eine hohe mechanische Belastung erfordern ein feinreguliertes Zusammenspiel von Neusynthese und Proteindegradation. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Autophagie bei der Titinhomöostase eine wichtige Rolle spielt. Autophagie ist ein lysosomaler kataboler Prozess, bei dem Zellbestandteile enzymatisch verdaut und recycelt werden, z. B. werden so fehlgefaltete Proteine, sowie Zellorganellen und Aggregate abgebaut und wiederverwertet (Hale et al., 2013; Sandri, 2013). Autophagie spielt eine essenzielle Rolle in der Zelle, um ein Gleichgewicht zwischen Aufbau von neuen und Abbau von alten Zellbestandteilen herzustellen. Es wird zwischen Makro- und Mikroautophagie sowie Chaperon-vermittelter Autophagie unterschieden (Mizushima & Komatsu, 2011). Der Prozess der Chaperon-vermittelten Autophagie beinhaltet die Erkennung des Substrats, die Entfaltung und Translokation und den Abbau des Substrats. Bei der Mikroautophagie wird ein kleiner Teil des Zytoplasmas direkt von den Lysosomen umschlossen und aufgenommen. Bei der Makroautophagie, dem vorherrschenden autophagischen Prozess, werden Proteine, Proteinaggregate, Makromoleküle und Zellorganellen in das Autophagosom aufgenommen. Dafür werden die

ungefalteten Proteine durch Polyubiquitinketten markiert. Ubiquitinierung, eine häufig vorkommende posttranslationale Modifikation, spielt eine wesentliche Rolle in allen zellbiologischen Prozessen. Der zweithäufigste Typ der Polyubiquitinkette ist das K63-verknüpfte Polyubiquitin, dass eng mit einigen Selbstabbaumechanismen in den Zellen verbunden ist. In den Experimenten dieser Arbeit ist mehrheitlich die Makroautophagie wichtig, da sie Einfluss auf Titin hat (Müller et al., 2021; Sandri et al., 2013).

1.4.1 Signaltransduktion der Autophagie

Der Prozess der Autophagie unterteilt sich in verschiedene Phasen. Zunächst wird aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eine C-förmige Doppelmembran abgestülpt, die als Phagopore bezeichnet wird (Shaid et al., 2013). Diese entsteht meist aus dem endoplasmatischen Retikulum, kann aber auch aus Golgi-, Mitochondrien-, oder Plasmamembran bestehen. Die molekularen Mechanismen der Ausstülpung der C-förmigen Doppelmembran beinhalten mehrere Proteine und Prozesse, wie die Ubiquitinierung, *Autophagy related gene* (Atg)-Proteine, ULK (Uncoordinated-51 like Kinase) oder K63 (Ravikumar et al., 2010). Den Atgs liegen über 30 verschiedene Gene zugrunde, die eine Gruppe von Proteinen kodieren, die in den verschiedenen Stadien des Autophagie-Prozesses, einschließlich der Initiation, der Bildung des Autophagosoms, der Erweiterung der Autophagosom-Membran, der Fusion mit Lysosomen und schließlich des Abbaus des Zellmaterials, eine entscheidende Rolle spielen (Suzuki et al., 2001).

Die auszustülpende Membran besteht aus Proteinen und Lipiden, darunter auch das Protein LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) (Hale et al., 2013). Dieses liegt zunächst in der pro-LC3 Form vor, welches durch Atg4 proteolytisch zur größeren, inaktiven Form gespalten wird, dem LC3-I (Tanida et al., 2008). Die aktive 14 kDa kleine LC3-II Form entsteht anschließend mittels Atg3 und -7 durch eine Konjugation mit Phosphatidylethanolamin (Hale et al., 2013; Tanida et al., 2008). Während sich die Phagopore bildet, wird ausschließlich die aktivierte LC3-II Form in die Doppelmembran eingebaut. P62 (Sequestosom-1 /p62 SQSTM1, auch bekannt als Ubiquitin-Bindung Protein p62) fungiert als Adapter-Protein im Inneren des Autophagosoms (siehe Abbildung 5), wodurch es bei einer Inhibition der Autophagie zu einer Akkumulation von p62 kommt (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). Die gebildete Doppelmembran umschließt intrazelluläre Proteine und Zellorganellen bis die beiden Enden der Ausstülpung wieder aufeinandertreffen. So entsteht das Autophagosom, wie in Abbildung 5 gezeigt. Dieses neu gebildete Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zum Autolysosom, in dem

Hydrolasen enthalten sind, die den Inhalt des Autolysosoms verdauen (Hale et al., 2013; Shibutani & Yoshimori, 2014), ehe die einzelnen Bestandteile für neue Synthesen und ATP-Regeneration wiederverwendet werden können (Mizushima et al., 2002).

Die Autophagie unterliegt einer komplexen Regulation, die unter anderem vom Nährstoffangebot, also dem Energie- und Nährstofflevel der Zelle, abhängt. So wird bei Nährstoffüberschuss die nicht direkt benötigte Energie genutzt, um Biosynthesen bereitzustellen (Shibutani & Yoshimori, 2014). Die Autophagie wird inhibiert, weil die Zelle ihre Bestandteile nicht wiederverwerten muss, sondern genügend metabolische Energie und Bausteine verfügbar sind, um Neue herzustellen. Gegenteiliges spielt sich bei Nährstoffmangel ab: Hier wird die Autophagie verstärkt aktiviert, um notwendige Bausteine bereitzustellen. Ebenso beeinflusst wird der Autophagieprozess durch die Aktivität der Proteinkinasen *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) und Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), sowie weitere physiologische Signale (Lamb et al., 2013; Shibutani & Yoshimori, 2014). Hierbei inhibiert mTOR als Energiesensor die Autophagie mittels Phosphorylierung (Hale et al. 2013), während eine durch AMPK-vermittelte Phosphorylierung der Serin-Threonin-Proteinkinase ULK1 (*uncoordinated-51 like kinase1*) die Autophagie induziert (Chan et al. 2012). Beide Regulationsmechanismen wirken über die ULK, allerdings an unterschiedlichen Stellen. So phosphoryliert mTOR unter anderem an S757 und AMPK an S555, sowie S317 und S777 (Chan et al. 2012). Die aktivierte ULK-S555 aktiviert wiederum Beclin-1 und bildet einen ULK-Atg13-FIP200-Komplex und potenziert damit die PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 Kinase), was wiederum die Bildung eines Komplexes zwischen PI3K und Atg14L befördert (Russell et al. 2013). LC3 wird durch Atg3, 4 und 7 in zwei Schritten zu der aktiven LC3-II Form gespalten, die dann an der Doppellipidmembran an das Adapterprotein p62 eingebaut wird. Nach Bildung des Autophagosoms erfolgt eine Verschmelzung mit dem Lysosom, wodurch die innere Doppellipidmembran mit p62 und LC3-II abgebaut wird und das Autolysosom entsteht.

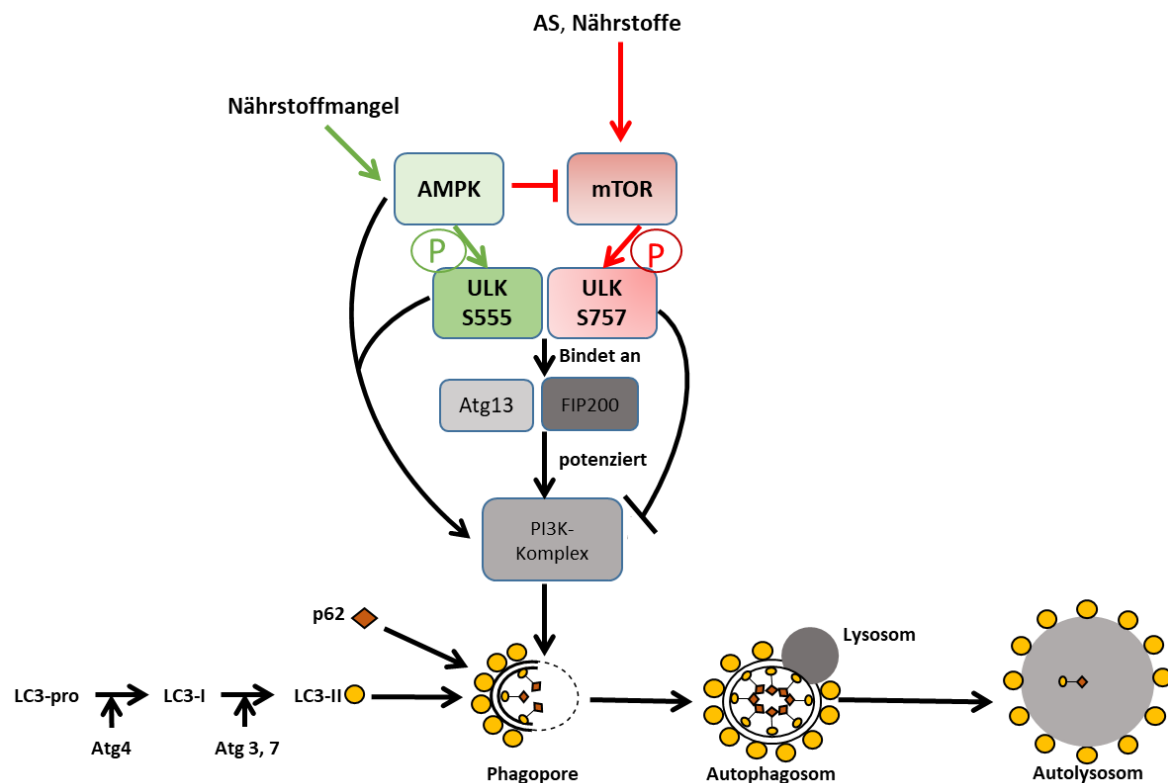


Abb. 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Autophagie. Bei Nährstoffmangel wird die Autophagie über AMPK induziert, die wiederum eine Phosphorylierung an ULK-S555 hervorruft. Über Atgs entsteht ein PI3K-Komplex. LC3 wird in seine aktive LC3-II Form gespalten und mit p62 in die Doppellipidmembran der Phagopore eingebaut. Durch Verschmelzung mit einem Lysosom entsteht schließlich das Autolysosom.

Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Dysregulation oder gar Inhibition der Autophagie zu einer Verstärkung der Seneszenz, wodurch der intrazelluläre Abfall, der nicht abgebaut wird, akkumuliert (Shirakabe et al., 2016). Dadurch ändert sich die Aktivität des Proteasoms, der oxidative Stress steigt, Entzündungsreaktionen im Körper werden getriggert und die physiologischen Funktionen einer Vielzahl von Zelltypen werden gestört (Degenhardt et al., 2006; Mathew et al., 2009; Mizushima & Komatsu, 2011). Trotz der entscheidenden Rolle des Proteasoms bei der Reaktion auf oxidativen Stress ist das derzeitige Verständnis über die komplexe Regulation der Proteolyse von oxidierten Proteinen und die Modulation der Struktur und Funktion des Proteasoms durch oxidativen Stress begrenzt (Aiken et al., 2011). Zusätzlich zur veränderten proteasomalen Funktion kommt es bei fehlerhafter Autophagie zur erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch z. B. in Mitochondrien deren respiratorische Funktion sinkt und mitochondriale DNA verloren geht (Suzuki et al., 2011; Zhang et al., 2007).

1.4.2 Mitophagie

Bei der Mitophagie handelt es sich um eine Sonderform der Autophagie, bei der geschädigte Mitochondrien durch das Autophagosom selektiv eliminiert werden (Lemasters, 2005; Suen et al., 2010). Ausgelöst wird die Mitophagie durch unterschiedliche Mechanismen: Zum Einen kann sie durch fehlgefaltete Proteine in der mitochondrialen Matrix ausgelöst werden (Jin & Youle, 2013). Zum Anderen scheinen die Serin-Threonin-Kinasen PINK (*PTEN-induced kinase*) und Parkin eine essenzielle Bedeutung bei der mitochondrialen „Qualitätskontrolle“ zu haben (Narendra et al., 2008; Ziviani & Whitworth, 2010). Ebenso involviert in die Mitophagie ist das Protein TOMM (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane*). Dieses ist Teil des TOMM-Komplexes und spielt bei der Translokation von Proteinen durch die äußere Membran der Mitochondrien eine entscheidende Rolle. TOMM rekrutiert im PINK-Parkin-Signalweg das Protein Parkin, das für die Markierung beschädigter oder überflüssiger Mitochondrien verantwortlich ist (Chacinska et al., 2009). Durch die Bildung eines Hochmolekularkomplexes von TOMM mit PINK, kann Parkin an die geschädigten Mitochondrien binden, die anschließend für den Abbau markiert werden (Lazarou et al., 2012).

Darüber hinaus ist TOMM wesentlich für den Import von PINK in die Mitochondrien selbst verantwortlich, was darauf hindeutet, dass es eine Schlüsselrolle bei der Modulation der PINK-Aktivität und -Funktion innerhalb der Mitochondrien spielt (Lazarou et al., 2012). Eine reduzierte Expression von TOMM kann darauf hinweisen, dass die Mitophagie tatsächlich aktiviert ist und dass eine gesteigerte Eliminierung von Mitochondrien stattfindet (Bertolin et al., 2013).

Der Ablauf der Mitophagie in Mitochondrien ist in Abbildung 6 dargestellt. PINK wird bei physiologischem Membranpotential automatisch durch eine mitochondriale Protease degradiert beziehungsweise inaktiviert und verhindert so die Mitophagie (Jin et al., 2010; Matsuda et al., 2010). Kommt es allerdings zu einer Depolarisation oder Schädigung der mitochondrialen Membran, wird die Degradation von PINK aufgehoben (Kazlauskaitė et al., 2014). PINK akkumuliert selektiv an der äußeren Membran von geschädigten Mitochondrien und verhindert so die Autophosphorylierung am S228 und S402 (Okatsu et al., 2012). Das akkumulierte PINK besitzt eine mitochondriale Targeting-Transmembrandomäne, die in der äußeren Membran verankert ist. Es aktiviert nach Akkumulation Parkin durch Phosphorylierung an S65 (Kondapalli et al., 2012), wodurch keine Autoinhibition mehr stattfindet. Das aktivierte Parkin induziert wiederum eine

Polyubiquitinierung von Substraten. Gleichzeitig phosphoryliert PINK Ubiquitin, was ebenfalls Parkin aktiviert (Kane et al., 2014; Koyano et al., 2014). P62 bindet durch seine Ubiquitin-bindende Domäne an das polymerisierte Ubiquitin. Durch seine LC3-Interaktionsregion haftet es an LC3-II des Autophagosoms, wodurch der Mitophagieprozess vorangetrieben wird (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2008).

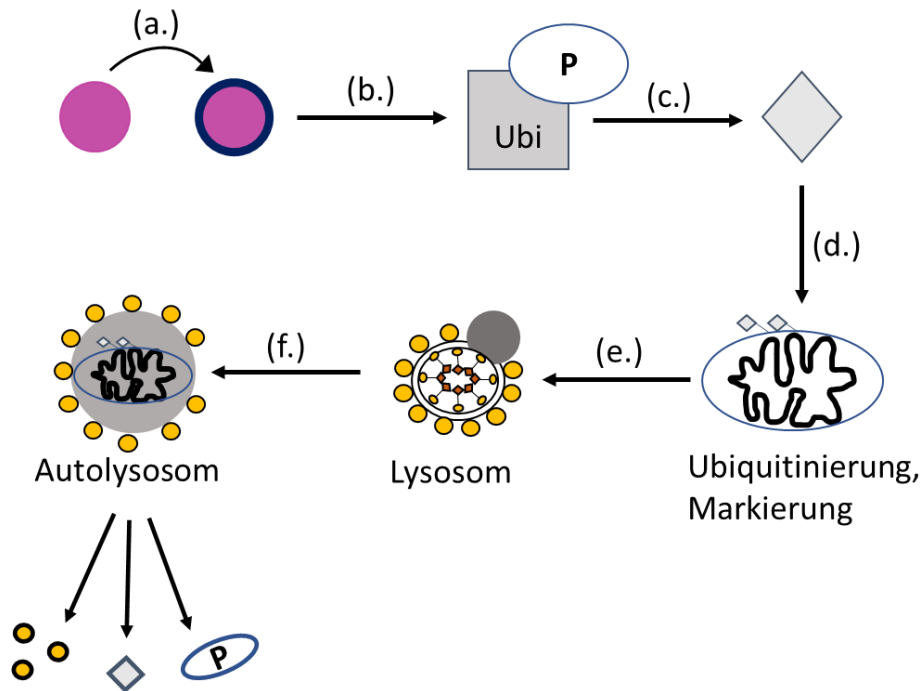


Abb. 6: Schematische Darstellung des Ablaufs der Mitophagie. (a.) PINK aktiviert sich selbst durch Autophosphorylierung (b.) und kann dann Ubiquitin phosphorylieren (c.). Dies führt zur Auslösung einer Aktivierung der E3 Ubiquitin-Ligase E3 Parkin (d.) und Ubiquitinierung von Proteinen der äußeren Membran und damit Markierung für mitophagosomalen Abbau (e.). Rezeptoren des Autophagosoms erkennen ubiquitinierte Membranproteine, sodass Mitochondrien umhüllt und nach Verschmelzung mit Lysosom verdaut werden (f.). Weiterverwendbare Abbauprodukte, wie Phosphatreste, gelangen zurück ins Zytoplasma und werden dann wiederverwertet.

Möglicherweise triggern auch ROS die Mitophagie, da sie natürlich in der Zelle vorkommen und Effekte auf Lipide, Proteine und die DNA haben. Beispielsweise führen durch ROS ausgelöste, mitochondriale DNA-Defekte zu fehlgefalteten Proteinen in der Elektronentransportkette (Wallace, 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, weiterführende Erkenntnisse zum kardioprotektiven Effekt der mitochondrialen TERT zu erlangen. Vorangegangene Studien zeigten, dass mittels posttranslationaler Titin-Phosphorylierung die Titin-vermittelte Steifigkeit moduliert wird (Kötter et al., 2013; Krüger et al., 2006; Krüger et al., 2009; Krüger & Linke, 2006), und dass solch eine Modulation möglicherweise eine protektive Bedeutung bei dem ventrikulären *Remodeling* nach AMI haben könnte (Kötter et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob in Mäusen mit Expression exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT eine basale Modifikation der Autophagieprozesse oder der Titineigenschaften stattfindet, die zu einer verbesserten Kardiomyozytenfunktion führen und im Rahmen eines Myokardgeschehens möglicherweise kardioprotektiv wirken könnte. Zu diesem Zweck soll in Mäusen, die TERT exklusiv mitochondrial lokalisiert besitzen (mitoTERT-Mäuse), die Titin-Isoformen-Zusammensetzung und ausgewählte posttranslationale Titinmodifikationen untersucht werden, die bereits in Zusammenhang mit AMI beschrieben wurden.

Aktuelle Forschungsergebnisse vor Anfertigung dieser Arbeit zeigen zudem, dass Autophagie für die Titindegradation mitverantwortlich ist, und somit Autophagie als kataboler Recyclingprozess ebenfalls ein erfolgsversprechender Ansatzpunkt zur AMI-Prävention darstellen könnte. Es soll daher in dieser Arbeit auch untersucht werden, ob die mitochondriale TERT unter basalen Bedingungen Auswirkungen auf die Autophagie hat. Hierzu sollen biochemische Analysen von Markerproteinen der Autophagie durchgeführt werden, um Hinweise auf mögliche Aktivitätsänderungen zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien für SDS-Page & Western Blot

Chemikalie	Hersteller	Verwendung
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth	Standardgel
Acrylamid /Bisacrylamid 29:1	Biorad	Titingel
Agarose LE	Biozym	Titingel
Aminocaprinsäure	Sigma	
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem	Standard- und Titingel
Bovine Serum Albumine (BSA)	Caprison	Blockierung, AK
Chemiluminescent Western Blot Detection	Thermo Fischer	Western Blot
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem	Solubilisieren
ECL (Western Blotting detection reagent)	Cyanagen	Western blotting detection reagent
Essigsäure	Roth	PVDF stain
Ethanol absolut	VWR	Desinfektion
Ethanol ergällt	VWR	Western Blot
Glycerol	Sigma	AK
Imperial protein stain	Thermo Scientific	Membranfärbung
Isopropanol	Merck	Standardgel
Methanol	Sigma	Stripping
β-Mercaptoethanol	Sigma	Stripping
Natriumchlorid	Roth	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Western Blot
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Appli Chem	Standard-und Titingel
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth	

3.1.2 Puffer-Zusammensetzungen

Tabelle 2: Puffer-Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % (W/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x TBST (pH 7,4)	0,2 M Tris/HCl 1,5 M NaCl 1 % Tween-20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH6,8)	0,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl 0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris/ Hcl 100 mM Tricine
Blockierlösung	2% BSA in 1x TBST
AK-Lösung	3 ml 0,5% BSA in TBST mit AK versetzt
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris/HCl
Phosphate bufferes saline (PBS)	150 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat 3 mM Natriumhydrogenphosphat
PVDF destain	10 % (v/v) Essigsäure 40 % Ethanol
PVDF stain	0,075 % Serva Blue in Methanol
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8 M Urea 2 M Thiourea 3 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035 % (w/v) Serva Blue 10 % (v/v) Glycerol 0,05 M Tris/ Hcl
Stripping Puffer	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Nonident P40 0,1 M β -Mercaptoethanol

3.1.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

Laborgerät	Typus	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
	Standard Power Pack P25	Biometra
Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
PC-Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
PH-Meter	MP220	Mettler Toledo
Vortexer	444-1372	VWR
Rollmischer	RM5-30V	CAT
Rollmischer	ROLLER 10 digital	IKA
Waage	Kern 572	Kern
Waage		Sartorius
Wasseraufbereiter	Milli Q	Millipore
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller	Nummer	Konzentration
mTOR	Anti rabbit	Cell Signaling	2972	1:2.000
mTOR-P	Anti rabbit	Cell Signaling	2971	1:2.000
LC3	Anti rabbit	Cell Signaling	2775	1:2.000
TOMM20	Anti rabbit	Abcam	Ab186735	1:1.000
Parkin	Anti rabbit	Biorbyt/biozol	ORB224532	1:3.000
AMPK-P	Anti rabbit	Cell Signaling	2531	1:2.000
AMPK	Anti rabbit	Abcam	Ab207442	1:1.000
ULK-P (S555)	Anti rabbit	Cell Signaling	5869	1:1.000
ULK	Anti rabbit	Cell Signaling	8054	1:1.000
ULK-P (S757)	Anti rabbit	Cell Signaling	6888	1:1.000
ULK	Anti rabbit	Abcam	Ab128859	1:5.000
Actinin	Anti rabbit	Cell Signaling	3134	1:5.000
GAPDH	Anti mouse	Sigma	G8795	1:5.000
PKC-P (S660)	Anti rabbit	Abcam	Ab75837	1:20.000
PKC (S660)	Anti rabbit	Abcam	Ab32376	1:20.000
Troponin-I-P	Anti rabbit	Cell Signaling	4002	1:1.000
Troponin-I	Anti rabbit	Cell Signaling	4004	1:2.000
ERK-P (p42/44)	Anti rabbit	Cell Signaling	4370	1:2.000
ERK (p42/44)	Anti rabbit	Cell Signaling	9102	1:2.000
p62	Anti rabbit	Cell Signaling	5114	1:2.000

3.1.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Quelle	Hersteller	Nummer	Konzentration
Anti mouse IgG horseradish-peroxidase-linked	Anti mouse	Cell Signaling	7076	1:10000
Anti rabbit IgG horseradish-peroxidase linked	Anti rabbit	Cell Signaling	7074	1:10000

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse und Präparation der Herzen

Die Mäuse wurden von den Arbeitsgruppen Haendeler und Altschmied generiert (Ale-Agha et al., 2021) und haben alle den gleichen genetischen C57BL/6N Hintergrund. Die mitoTERT-Mäuse exprimieren TERT mit einer zusätzlichen N-terminalen Mitochondrien-Lokalisierungssequenz unter der Kontrolle des ROSA26 Promotors. Hierdurch wird das exprimierte TERT-Protein ausschließlich in die Mitochondrien, nicht aber in den Zellkern transportiert. Zugleich sind die Mäuse defizient für endogene TERT, so dass sie in allen Zellen TERT exklusiv in den Mitochondrien enthalten. Als Vergleichstiere wurden Wildtyp (WT) und komplett TERT-defiziente (ko) Geschwister oder Cousins der mitoTERT-Mäuse genutzt, um höchstmögliche genetische Identität zu gewährleisten. Die Genotypen aller Mäuse wurden mittels PCR-Genotypisierung unter Verwendung von DNA aus Ohrstanzproben verifiziert. Weitere Details sind in der Arbeit von Ale-Agha et al. beschrieben (Ale-Agha et al., 2021).

Bei den Mäusen handelte es sich um männliche Mäuse, die alle zwischen 4-6 Monate alt waren. Von jeder dieser drei Maus-Gruppen (WT, mitoTERT, ko) wurden zwischen 4 bis 6 Mäuse verwendet. Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurden die Herzen entnommen, in Atrium, Septum sowie in rechten und linken Ventrikel geteilt, und die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. In den hier beschriebenen Experimenten wurden nur Gewebeproben der linken Ventrikel verwendet.

Die Mäuse wurden von Prof. Dr. Judith Haendeler zur Verfügung gestellt, die Tiertötung und Organentnahme erfolgte durch Prof. Dr. Martina Krüger, PD Dr. Sebastian Kötter und Sabine Bongardt. Alle beteiligten Personen verfügen über die hierzu erforderliche Sachkenntnis im Sinne des TierSchG §11. Die Generierung, Haltung und Zucht der hier verwendeten Mäuse erfolgte unter Aufsicht der Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) und mit Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter dem Aktenzeichen O61/20.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1.1 Solubilisieren

Die in diesen Versuchen bei -80 °C gefrorenen Proben wurden einzeln auf eine auf Eis liegende Uhrglasschale gegeben und stecknadelkopfgroße Stücke abgeschnitten, die anschließend mit ca. 120 Mikroliter Titinprobenpuffer + DTT versetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) und homogenisiert wurden. Danach wurde jede Probe in Eppendorf-*Tubes* gegeben, abzentrifugiert und ca. 30 Minuten auf Eis gelegt. Zum Schluss wurden die Proben drei Minuten in einem Heizblock bei 98°C erhitzt. Das Reduktionsmittel DTT führt durch Aufbrechen der Disulfidbrücken zum Auflösen der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Die anschließende Hitzebehandlung trägt zur vollständigen Denaturierung des Proteingemischs bei.

3.3.2 SDS-Page und Herstellung der Gele

Zur Darstellung von Proteinen verschiedener Molekulargrößen wurde eine denaturierende Gelelektrophorese angewandt. Hierbei gelang die Auftrennung mittels elektrischem Feld durch SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Elektrophoresis) in einer Gelmatrix.

Titin als größtes bekanntes Protein im menschlichen Körper hat ein Molekulargewicht von mehr als 3000 kDa. Daher wurde zur Auftrennung von Titin und dessen Isoformen ein spezifisches Polyacrylamid-Gel verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 5 beschrieben wird. SDS bindet an Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, wodurch ihre Eigenladung vernachlässigt wird. Anschließend wurde die Mischung in einem Wasserbad für ca. zehn Minuten auf 48°C erwärmt. Währenddessen wurde die Agarose in der Mikrowelle ebenfalls erwärmt, bis diese verflüssigt war. Anschließend wurde erst das APS (Ammoniumpersulfat), dann die flüssige Agarose in das Gemisch pipettiert und die gesamte Mischung mehrmals auf und abpipettiert und zwischen zwei Glasplatten gegeben. Hierbei wurden die Mini-Twin-Systeme der Firma Biometra, sowie die Mini-Protean der Firma Biorad verwendet. Die Flüssigkeit wurde mindestens zwei Stunden auspolymerisiert. Nach dieser Zeit wurden die Glasplatten, mit dem auspolymerisierten Gel, in die jeweiligen Kammern gestellt und mit 1x Laufpuffer übergossen. Um die Proteine nach Größe aufzutrennen, wurden 2-4 mA pro Gel als Stromstärke verwendet.

Bei kleineren Proteinen als Titin wurde die Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese verwendet. Das Gel bestand aus zwei Anteilen: Dem Trenngel und dem

Sammelgel. Auf Basis von Acrylamid wurde zunächst das untere Trenngel gegossen. Es wurde gemäß Tabelle 6 hergestellt und hatte je nach Verwendung einen Acrylamidgehalt von 7,5 %, 10 % oder 12,5 %. Das obere Sammelgel wurde ebenfalls gemäß Tabelle 7 hergestellt. Die Proteinauftrennung erfolgte in 1x Laufpuffer bei einer Stromstärke von 15 mA – 30 mA pro Gel. Durch die angelegte elektrische Spannung findet eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel statt. Somit wirkt das Gel wie eine Art Sieb, da kleine Proteine leicht und größere eher langsamer durch die Maschen des Gels wandern. So wurden am Ende der Gelelektrophorese alle in der Probe enthaltenen Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Tabelle 5: Titingel

In Tabelle 5 ist diese Zusammensetzung der Titingele beschrieben.

	2,10%	2,20%
Acrylamid/BIS	1,4 ml	1,46 ml
H₂O deionisiert	6,67 ml	6,61 ml
Trenngel	5 ml	5 ml
SDS	100	100
APS	150	150
Agarose	6,67	6,67

Tabelle 6: Trenngel

Die Zusammensetzung des Standard SDS-PAGEs ist in Tabelle 6 und 7 aufgelistet ist.

	7,50%	10,00%	12,50%	15,00%
30% Acrylamid/ BIS (37,5:1)	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	7,5 ml
H₂O deionisiert	7,5 ml	6,25 ml	5 ml	3,75 ml
Lower Tris Puffer (Trenngelpuffer)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Temed 1:2000	7,5	7,5	7,5	7,5
APS 1:200	75	75	75	75

Tabelle 7: Sammelgel

	2Gele	4Gele
30% Acrylamid/ BIS (37,5:1)	0,667 ml	1,334 ml
H ₂ O deionisiert	3,025 ml	6,05 ml
Sammelgelpuffer 4x	1,25 ml	2,5 ml
Temed 1:2000	15	30
APS 1:200	50	100

Es wurden die Gelelektrophorese-Systeme Mini-Twin des Herstellers Biometra und MiniProtean der Firma Biorad verwendet.

Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt und die Geltaschen ausgespült, sodass sich dort keine Gelreste mehr befanden. Die Geltaschen wurden dann mittels Pipette mit der gewünschten Proteinmenge beladen. Ein Marker für den gesuchten Molekulargößbereich wurde in die erste Geltasche pipettiert.

3.3.3 Western-Blot

Zur weiteren Analyse der Proteine wurde nach der SDS-PAGE ein *Semidry*-Western Blot durchgeführt. Hierbei werden die im Gel aufgetrennten Proteine entlang eines elektrochemischen Gradienten auf eine PVDF Membran übertragen.

Die Gele wurden auf eine durch Ethanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Gemäß dem *SemidryBlot*-Verfahren wurden unter, sowie über dem Gel und der Membran Filterpapiere platziert. Unter der Membran befanden sich vier in Anodenpuffer getränkte *Whatmann* Papiere. Darüber wurden ebenfalls vier in Kathodenpuffer getränkte Papiere gelegt. Um mögliche Luftblasen zu entfernen, wurde vorsichtig über die zwischen den Filterpapieren liegende Membran gerollt. Anschließend wurden die Proteine für 12 Minuten (SDS – Gele) bzw. 20 Minuten (Titin – Gele) bei 1,5 Ampere und maximal 20 Volt in einer Trans Blot Turbo Apparatur auf die PVDF-Membran übertragen.

Zur Überprüfung des Proteintransfers erfolgte anschließend eine reversible Anfärbung aller übertragenen Proteine auf der Membran mittels PVDF-Färbelösung (*Stain*). Danach wurde die Membran wieder für fünf Minuten mit PVDF-Entfärbelösung (*Destain*) entfärbt und anschließend drei Mal für ca. 10 Minuten mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Um die auf der Membran enthaltenen freien Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde TBST + 2% BSA oder TBST +2% Milchpulver verwendet.

3.3.4 Immundetektion mittels Western Blot Analyse

Um anschließend die zu untersuchenden Zielproteine zu ermitteln, wurden spezifische Antikörper verwendet, die an die Proteine binden und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnten. Dazu wurde zwischen Zeilproteinen unterschieden, bei denen die Proteinmenge in Bezug auf die Ladungskontrolle GAPDH oder α -Aktinin ermittelt werden sollten (LC3-I, LC3-II, TOMM, Parkin und p62) oder Zielproteine, deren Phosphorylierungsstatus analysiert werden sollte (mTOR, ULK, ERK, PKC, Troponin und AMPK α). In beiden Fällen wurde auf die Membran nach mehr als einstündiger Blockierung in der BSA (Bovine Serum Albumin)- bzw. Milchpulver, der primäre Antikörper in der angegebenen Konzentration (siehe Tabelle 4) in 3 ml 0,5 % BSA-Lösung pipettiert. Nach anschließender dreistündiger Inkubation auf einem Rollmischer wurde dreimal 10 Minuten mit 1x TBST (Tris-Buffered Saline with Tween 20) gewaschen. Anschließend folgte die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, welcher an den Primärantikörper gebunden hat. Nach weiteren drei Waschschritten mit 1x TBST erfolgte die Chemilumineszenz. Hierzu wurde eine Lösung aus der Tabelle 1 im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert.

Bei den Proteinen LC3-I, LC3-II, TOMM, Parkin und p62 wurde später das Verhältnis zur Beladungskontrolle (GAPDH oder α -Aktinin) mittels Pixelgröße im Image-Lab-Programm gemessen, um die Quantifizierung der Proteinexpression und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Proben zu ermöglichen.

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus der Proteine mTOR, ULK, ERK, PKC, Troponin und AMPK α erfolgte in mehreren Schritten. Hierbei wurden auf dieselbe Membran nacheinander erst der Phospho-Antikörper und dann der Pan-Antikörper aufgetragen. Die Phospho-Antikörper erkennen spezifisch phosphorylierte Aminosäurereste in Proteinen. Nachdem eine Phosphorylierung an einer bestimmten Position nachgewiesen wurde, kann ein Pan-Antikörper verwendet werden, um das gesamte Protein unabhängig von seiner phosphorylierten Form zu erkennen, sodass man den quantitativen Anteil der phosphorylierten Stellen des Proteins im Verhältnis zum Gesamtprotein errechnen konnte. Dies ermöglicht die Validierung der spezifischen phosphorylierten Position und hilft festzustellen, ob das Protein in seiner nicht-phosphorylierten Form vorhanden ist.

Zur Detektion des phosphorylierten und gesamten Verhältnisses wurden erst die Phospho-Antikörper als primäre Antikörper verwendet. Nach der Bildaufnahme wurde auf die

Membran 10 ml Stripping-Puffer gegossen und damit 20 Minuten inkubiert. Dieser diente dazu, den phospho-spezifischen Antikörper von der Membran wieder zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen erneut eine Stunde mit 2 % BSA-Lösung blockiert und nun mit dem jeweiligen total-(pan) Antikörper inkubiert. Der Nachweis der Banden erfolgte dann wie beim phospho-spezifischen Antikörper durch Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und dessen Nachweis über eine Chemolumineszenzreaktion.

3.3.5 Imperial Protein Stain

Um die Degradationsbande und das Isoformverhältnis von Titin zu bestimmen, wurden die Titingele gefärbt. Dazu wurden die Gele nach der Gelelektrophorese in *Imperial-Protein Stain* für etwa eine Stunde auf den Schüttler gelegt und eingefärbt. Anschließend wurden die Gele mit VE (Vollentsalztes Wasser)- Wasser entfärben. Die Gele wurden nun eingescannt und die Pixeldichte der Banden N2B, N2BA quantitativ durch eine densitometrische Analyse mit ImageJ bestimmt. Für jede Probe wurde der relative Anteil der beiden Isoformen N2B und N2BA am Gesamt-Titin bestimmt.

3.3.6 Auswertung

Die quantitative Darstellung der Proteinbanden erfolgte anschließend mittels der Software SigmaPlot. Dabei wurde das jeweilige Phospho-Signal mit dem Pan-Signal ins Verhältnis gesetzt. Analog dazu wurde das Bandensignal der anderen Antikörper mit der Beladungskontrolle α -Aktinin oder GAPDH in Verhältnis gesetzt. Eine Normierung erfolgt mittels einer Division der Werte durch den Mittelwert der Kontrollen des jeweiligen Blots. Es wurden daher relative Werte angegeben.

Zur weiteren Auswertung wurden Microsoft Excel 2016, Microsoft PowerPoint 2016, Microsoft Word 2016, Adobe Photoshop CS6, ImageJ, SigmaPlot verwendet.

3.3.7 Datenanalytik und Statistik

Zur statistischen Verarbeitung der Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes über die jeweils angegebene Anzahl an unabhängigen Experimenten (n) mit Excel bestimmt. Jeder Versuch wurde für die statistische Relevanz mindestens drei Mal wiederholt, um mögliche Abweichungen gering zu halten. Western Blots oder Immunfluoreszenzbilder wurden mit Adobe Photoshop CS6 erstellt und bearbeitet. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Sigma Plot unter Verwendung des Student's t-Tests durchgeführt, um die drei Gruppen separat miteinander zu vergleichen.

Aufgrund der mehrfachen Anwendung des t-Tests war eine Bonferroni-Korrektur notwendig, um der Kumulierung von Alphafehlern entgegenzuwirken und das vorgegebene Signifikanzniveau für die Durchschnittshypothese einzuhalten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde entsprechend angepasst ($p < 0,01666$), um die Nullhypothese abzulehnen, dass keine Unterschiede zwischen den drei Mäusegruppen vorliegen und um statistisch signifikante Unterschiede anzuerkennen. Die Mittelwerte werden mit +/- der Standardabweichung angegeben.

Schema-Abbildungen wurden eigenständig mit Microsoft PowerPoint 2016 entworfen. Dies betrifft alle nicht explizit zitierten und lizenzierten Abbildungen.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden in Bezug auf die in Kap. 2 erläuterten wissenschaftlichen Fragestellungen und Ziele drei Mäusegruppen miteinander verglichen: Wildtyp-Mäuse, (WT-Mäuse), Mäuse ohne jegliche TERT (ko-Mäuse), sowie Mäuse, die TERT exklusiv mitochondrial lokalisiert exprimieren (mitoTERT-Mäuse). Alle Versuche wurden mit $n = 4$ bzw. $n = 6$ Mäusen durchgeführt und mindestens drei Mal pro Antikörper und Maus wiederholt. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der einzelnen Wiederholungsversuche verwendet, auf die Werte der WT-Mäuse normiert und die normierten Werte miteinander verglichen.

4.1 Auswirkungen der mitochondrialen TERT auf Titin

Die elastischen Eigenschaften von Titin können durch Phosphorylierung modifiziert werden. Da sich solche Titinmodifikationen auch auf die Kardiomyozyten-Funktion auswirken können, sollte überprüft werden, ob die beobachteten kardioprotektiven Effekte der mitochondrialen TERT möglicherweise über weitere Pfade der Signaltransduktion eine Veränderung von Titin bewirken. Die Titinmodifikation in den Mäusen aller Versuchsgruppen wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Dabei wurden sowohl einige spezifische Phosphorylierungsstellen, wie auch das Titin-Isoformenverhältnis analysiert.

4.1.1 Auswirkungen der mitochondrialen TERT auf die Titin-Phosphorylierung

Veränderungen in der I-Bande des Titins in der N2B und der PEVK-Region durch unterschiedliche Signalwege können durch die Proteinkinasen A, -G, -C sowie ERK2 und CaMKII δ vermittelt werden. Daher wurden die oben genannten Kinasen sowie Titin selbst auf Phosphorylierungen untersucht. Als indirekter Indikator der PKA-Aktivität wurde die PKA-spezifische Phosphorylierung von kardialem Troponin-I (cTnI S23/S24) untersucht. Die Analyse der PKC α -Aktivität erfolgte durch Bestimmung der relativen Autophosphorylierung eines Threoninrestes (T479) im Aktivierungsloop der Kinase.

Die relative Phosphorylierung von Troponin-I (siehe Abbildung 7a.) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen WT-, mitoTERT- und ko-Mäusen. In den Geweben der mitoTERT- und der ko-Mäuse wurde jedoch eine deutlich höhere Varianz der detektierten Werte beobachtet als in den WT-Mäusen ($1,00 \pm 0,02$). Im Mittel zeigte sich eine leichte, wenn auch statistisch nicht signifikante Erhöhung der relativen Troponin I Phosphorylierung

in den mitoTERT-Mäusen mit Werten von $1,28 \pm 0,66$ ($p = 0,429$) bzw. bei ko-Mäusen $1,27 \pm 0,72$ ($p = 0,481$) im Vergleich zu den WT-Mäusen.

Auch für die relative PKC α -Phosphorylierung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusegruppen, ko-, mitoTERT- und den WT-Mäusen, festgestellt werden. Abbildung 7b. zeigt diese Auswertung: WT-Mäuse hatten Werte von $1,00 \pm 0,24$, im Vergleich dazu hatten mitoTERT-Mäuse $0,91 \pm 0,20$ ($p = 0,586$) und ko-Mäuse $0,92 \pm 0,08$ ($p = 0,550$).

Bei Betrachtung der ERK-Phosphorylierung zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Troponin-I-Phosphorylierung (Abbildung 7c.). Die Gewebe der mitoTERT-Mäuse zeigten eine tendenziell erhöhte relative Phosphorylierung mit Werten von $1,30 \pm 0,47$ ($p = 0,269$) gegenüber den WT-Kontrollen mit Werten von $1,00 \pm 0,15$. Die ko-Mäuse zeigten mit $1,27 \pm 0,65$ ($p = 0,449$) ebenfalls eine leicht erhöhte relative ERK-Phosphorylierung, jedoch ohne statistische Signifikanz im Vergleich zu WT-Mäusen.

Als zusätzlicher Indikator für Veränderungen in der relativen Titin-Phosphorylierung am Serinrest 12022 erfolgte eine Normierung des Antikörper S12022 auf die PVDF-Färbung als Gesamtprotein (siehe Abbildung 7d.). Die mitoTERT-Mäuse wiesen Durchschnittswerte von etwa $0,96 \pm 0,30$ ($p = 0,872$) auf, während die ko-Mäuse Durchschnittswerte von etwa $0,90 \pm 0,31$ ($p = 0,693$) im Vergleich zu den WT-Mäusen mit $1,00 \pm 0,37$ hatten.

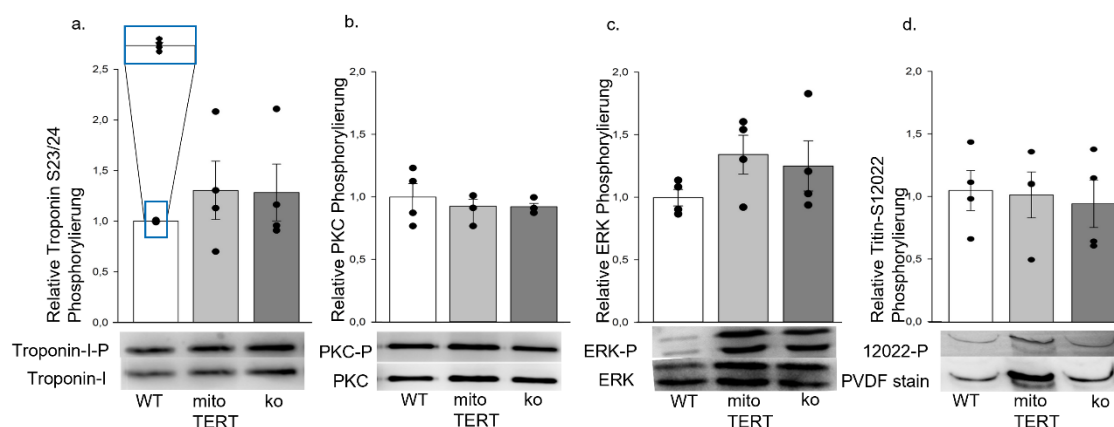


Abb. 7: Bestimmung der Titin-Phosphorylierungs-Veränderungen im Western Blot. Gemessen wurde die Phosphorylierung von Troponin-I (a.), PKC (b.), ERK (c.), sowie die Phosphorylierung von Titin an S12022 (d.) in WT-, mitoTERT- und ko-Mäusen. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 4$ gewählt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung von ERK und Troponin-I zu erkennen ist. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass diese Unterschiede statistisch betrachtet nicht als signifikant gelten und die hohe Variabilität in den Daten weitere Untersuchungen und Analysen erfordern.

4.1.2 Titin-Turnover und Isoformen-Verhältnis

Bei der Analyse des Titin-Isoformenverhältnisses zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den WT-, mitoTERT- und ko-Mäusen. In den mitoTERT-Mäusen belief sich der N2B-Anteil auf durchschnittlich 75,12 % $\pm$ 7 %, während der Anteil in ko-Mäusen bei 77,61 % $\pm$ 4 % im Vergleich zu 78,7% $\pm$ 1,4% bei den WT-Mäusen lag. Allerdings ist in Abbildung 8 zu erkennen, dass es trotz Versuchswiederholungen, zu einer Streuung der Werte kam.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die genetischen Variationen der mitoTERT - Expression in diesem Kontext keinen messbaren Einfluss auf das basale Titin-Isoformenverhältnis haben.

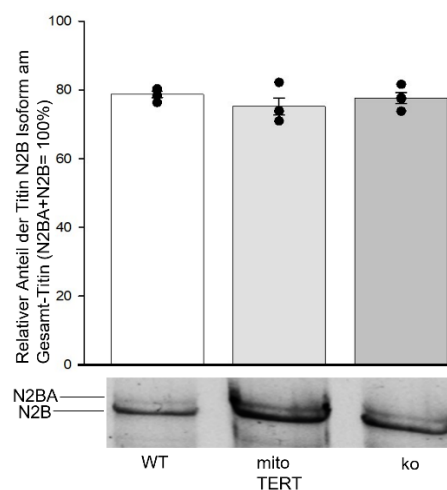


Abb. 8: Analyse der Titin-Isoformen Zusammensetzung (N2BA+ N2B = 100 %) auf Basis von SDS-Coomassie Gelen: Verwendet wurden WT-, mitoTERT- und ko-Mäuse in einer Versuchsreihe von vier unabhängigen Experimenten. N2BA hat eine molekulare Masse von 3,2 MDa, während N2B eine Masse von 3,0 MDa hat. Die Balkendiagramme stellen die densitometrische Auswertung des prozentualen Anteils der Titin-Isoform N2B im Verhältnis zum Gesamt-Titin dar.

Um mögliche Änderungen des Abbaus der beiden *full length* Titin Isoformen N2B und N2BA (N2B+N2BA = T1) zum spezifischen Titin-Abbauprodukt T2 zu untersuchen, wurde das Verhältnis von T2 zu T1 auf Coomassie-gefärbten 2,1 % SDS-PAGE bestimmt (siehe Abbildung 9). Ein erhöhter Anteil des Degradationsproduktes T2 kann auf eine Veränderung

des Ab- bzw. Umbaus von Titin hindeuten. Eine Reduktion des T2/T1-Verhältnisses könnte auf eine stabilere Konzentration von T1 und weniger Abbau hindeuten. Bei den Experimenten hier zeigten sich allerdings keine Unterschiede im Verhältnis von T2 und T1. Die WT-Mäuse hatten Werte von $1,00 \pm 0,18$, mitoTERT $1,09 \pm 0,34$ und ko $1,03 \pm 0,23$ ($p = 0,656$ bei mitoTERT-Mäusen und $p = 0,844$ bei ko-Mäusen).

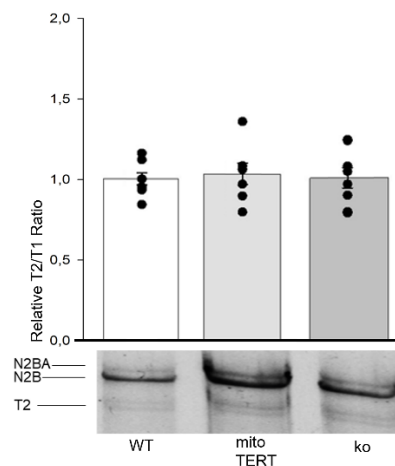


Abb. 9: Analyse der Titin Degradation T2/T1 (N2BA+ N2B = T1) auf Basis von SDS-Coomassie Gelen: Verwendet wurden WT-, mitoTERT- und ko-Mäuse in einer Versuchsreihe von sechs unabhängigen Experimenten. Der Abbau wurde durch das Verhältnis des typischen Titin Abbauprodukts (T2) im Verhältnis zum Gesamt Titin quantifiziert. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 6$ gewählt.

4.2 Auswirkung der mitochondrialen TERT auf die Autophagie

Der zweite Aspekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen der mitochondrialen TERT auf die Proteinkontrolle durch Autophagie bzw. Mitophagie als Sonderform. Es wurden dazu Western Blots von den Autophagiemarkern Mikrotubuli-assoziierte Protein-Leichtkette 3 (LC3-II) und Sequestosom-1 /p62 (SQSTM1, auch bekannt als Ubiquitin-Bindung Protein p62), untersucht.

LC3-I wird zu Beginn der Autophagie zu der lipidierten LC3-II-Form konjugiert. Deshalb wird bei einer erhöhten Aktivierung der Autophagie einerseits mehr LC3-II gebildet, andererseits wird LC3-II aufgrund seiner Lokalisation an der inneren Membran des Autophagosoms während der Autolysosom-Bildung verstärkt degradiert. LC3-II wird häufig zur Untersuchung der Autophagie verwendet, da es in die Membranen reifender Autophagosomen eingebaut wird und eine Bindungsstelle für SQSTM1/p62 enthält. Im weiteren Verlauf wird SQSTM1/p62 als p62 bezeichnet. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 4$ gewählt.

4.2.1 Veränderungen der LC3-Aktivitätsformen und des LC3-II/LC3-I Quotienten

Zur Bestimmung der Autophagie wurde zunächst der relative Anteil von LC3-II (14kDa) zur Vorläuferform LC3-I (16 kDa) per Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert. Ausgewertet wurde es bei $n = 4$ bzw. 6 mittels Student's t-Test.

In den Kardiomyozyten der mitoTERT-Mäuse zeigte sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe der WT-Mäuse, bei LC3 in Bezug auf die Ladungskontrolle GAPDH mit $1,24 \pm 0,64$ ($p = 0,538$) im Vergleich zu den WT-Mäusen mit $1,00 \pm 0,36$ und ko-Mäusen mit $0,97 \pm 0,51$ ($p = 0,927$) eine leichte LC3-Erhöhung. Beim LC3 II/I-Quotienten zeigte sich mit WT- Werten von $1,00 \pm 0,36$ ebenfalls eine leichte Erhöhung des LC3-II/LC3-I-Quotienten in den mitoTERT-Mäusen von $1,56 \pm 1,89$ mit $p = 0,492$ und ko-Mäuse mit $1,16 \pm 0,43$ ($p = 0,229$). Beide Ergebnisse weisen keine statistische Signifikanz (Abbildung 10) auf.

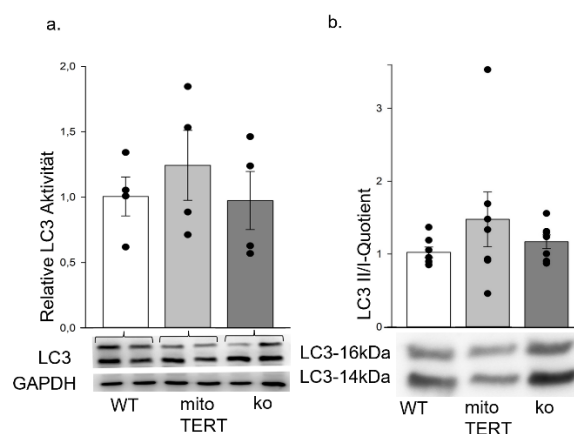


Abb.10: Bestimmung von LC3 im Western Blot. In Abbildung 10a. ist das Verhältnis von LC3 zu GAPDH als Beladungskontrolle dargestellt. Abbildung 10b. zeigt den Quotienten der beiden Aktivitätsformen von LC3 (LC3-I-16kDa und LC3-II-14kDa). Verwendet wurden WT-, mitoTERT- und ko-Mäuse. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 4$ und $n = 6$ gewählt.

4.2.2 p62-Akkumulation und Mitophagie

Neben LC3 ist auch das Ankerprotein p62 ein wichtiger Marker zur Messung der Autophagieaktivität. p62 ist ein Autophagosomen-Protein und fungiert als Adapterprotein, das andere Proteine für eine selektive Autophagie bindet. Dementsprechend wird auch p62 bei Autophagie-Aktivierung degradiert. Ist der Autophagie-Prozess inhibiert, so akkumuliert p62 in der Zelle (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). In einem Western Blot für p62 können aufgrund verschiedener Isoformen durch posttranslationale Modifikationen des Proteins oft zwei Banden beobachtet werden. In den Kardiomyozyten der mitoTERT-Mäuse

(bei $n = 6$) zeigten sich im Vergleich zu den WT-Mäusen mit Werten von $1,00 \pm 0,49$ nur leicht reduzierte p62-Werte von $0,75 \pm 0,23$. Wie auch bei LC3 waren keine statistisch signifikanten Änderungen zu sehen (mit $p = 0,234$). Ebenso in der Gruppe der ko-Mäuse mit $0,84 \pm 0,45$ ergab sich mit einem $p = 0,569$ keine statistische Signifikanz in Bezug auf WT-Mäuse.

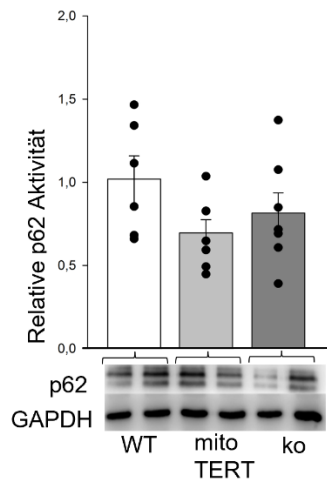


Abb. 11: Bestimmung der relativen p62-Aktivierung im Western Blot. Die relativen p62-Proteinlevel wurden zu GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot mit den verwendeten WT-, mitoTERT- und ko- Mäusegruppen im Vergleich. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 6$ gewählt.

Da sich in diesen Markern lediglich leichte Unterschiede in den Autophagie-Aktivitätsmarkern zeigten (Abbildung 11), die untersuchte TERT aber in Mitochondrien lokalisiert ist, sollte zusätzlich untersucht werden, ob sich Unterschiede in der Mitophagie zeigen, einer Sonder- oder Unterform der Autophagie. Dafür wurde sowohl Parkin als auch TOMM in Relation zur Ladungskontrolle GAPDH gemessen. Für mitoTERT-Mäuse ergab sich bei Parkin ein Wert von $1,03 \pm 0,45$ ($p = 0,904$). Für TOMM lag er bei den mitoTERT-Mäusen bei $1,03 \pm 0,18$ ($p = 0,116$) und bei den ko-Mäusen bei $0,93 \pm 0,3$ ($p = 0,83$) im Vergleich zum WT mit $1,00 \pm 0,18$. Die Abbildung 12 zeigt somit, dass sich die Gewebe der untersuchten Gruppen nicht signifikant hinsichtlich der Parkin- und TOMM-Proteinexpression unterscheiden.

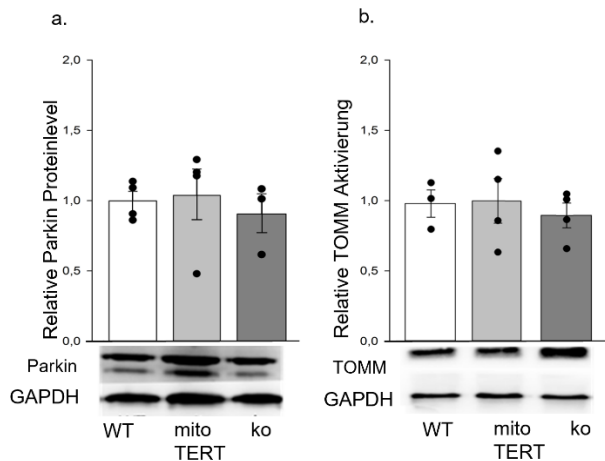


Abb. 12: Bestimmung der relativen Parkin und TOMM-Aktivierung im Western Blot. Darstellung der relativen Parkin- (a.) und TOMM-Proteinaktivierung (b.) in Bezug auf GAPDH mittels eines repräsentativen Western Blots der WT-, mitoTERT- und ko-Mäuse im Vergleich. Für die Auswertung wurde $p < 0,0167$ im Student's t-Test bei $n = 4$ gewählt.

4.2.3 Phosphorylierung der Autophagie Regulatorkinasen mTOR und AMPK und deren Zielprotein ULK

Der Prozess der Autophagie kann durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden (siehe Kap. 1.4.1). Eine zentrale Rolle nehmen dabei die Regulatorkinasen mTOR und AMPK ein, die u. a. durch das Nährstoffangebot reguliert werden und durch eine Signalkaskade über ULKs die Autophagie aktivieren oder inhibieren.

Die Untersuchungen mittels Western Blot zeigte in mitoTERT-Mäusen mit einem Wert von $1,79 \pm 0,59$ im Vergleich zu den WT-Mäusen mit einem Wert von $1,00 \pm 0,48$ eine signifikant erhöhte AMPK-Phosphorylierung ($p = 0,008$). In Abbildung 13 ist diese statistisch signifikante Veränderung dargestellt.

Das AMPK Zielprotein ULK zeigte dagegen mit einer relativen Phosphorylierung (ULK - S555) von $1,22 \pm 0,46$ keine signifikante Phosphorylierungssteigerung gegenüber den WT-Mäusen mit Werten von $1,00 \pm 0,51$ ($p = 0,451$). In ko-Mäusen zeigte sich die AMPK-Phosphorylierung mit $1,44 \pm 0,61$ ebenfalls leicht, wenn auch nicht signifikant erhöht gegenüber den WT-Mäuse mit ($p = 0,195$) und einer ULK-S555 Phosphorylierung von $0,98 \pm 0,23$ ($p = 0,932$).

In der Phosphorylierung von mTOR zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mitoTERT- und den WT-Mäusen mit $1,15 \pm 0,64$ im Vergleich zu

1,00 $\pm$ 0,48 ($p = 0,656$). Bei den ko-Mäusen war ebenfalls keine statistisch signifikante Änderung (0,89 $\pm$ 0,23 mit $p = 0,699$).

Das mTOR Zielprotein ULK zeigte an Position S757 eine leicht reduzierte relative Phosphorylierung in den mitoTERT-Mäusen mit 1,15 $\pm$ 0,74 ($p = 0,682$) gegenüber 1,00 $\pm$ 0,46 in den WT-Mäusen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die relative ULK-S757-Phosphorylierung war auch in den ko-Mäusen tendenziell reduziert mit 0,88 $\pm$ 0,63 ($p = 0,714$) im Vergleich zum WT.

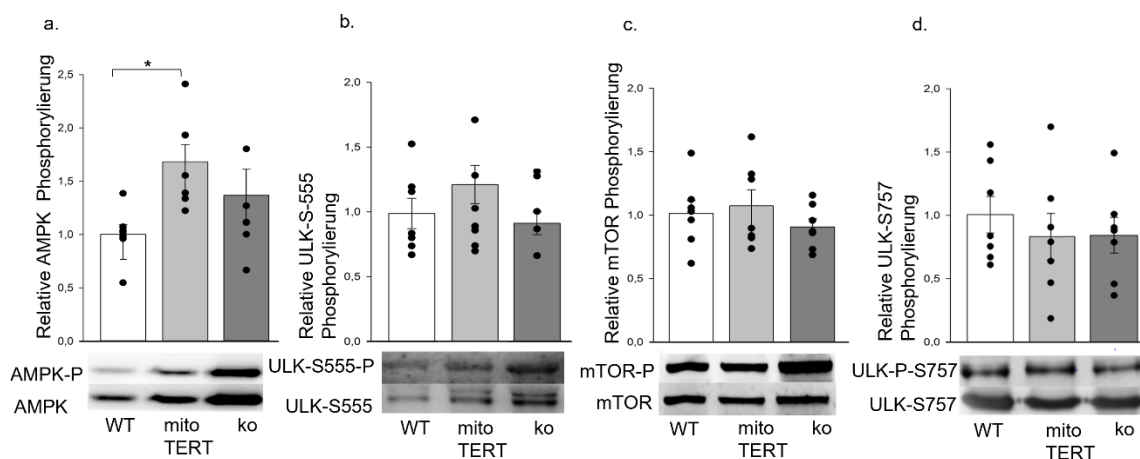


Abb. 13: Bestimmung der relativen AMPK, ULK-S555, mTOR und ULK-S757 Phosphorylierung im Western Blot: (a.) AMPK (b.) dem AMPK Zielprotein ULK an Position S555 (c.) der Proteinkinase mTOR, und (d.) dem mTOR Zielprotein ULK-S757. Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots mit den verwendeten WT-, mitoTERT- und ko- Mäusegruppen mit $n = 6$. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,0167$ im Student's t-Test).

5 Diskussion

Vorangegangene Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppen Haendeler und Altschmied verdeutlichten eine kardioprotektive Wirkung mitochondrial lokalisierter TERT. Die vorliegende Arbeit sollte nun dazu beitragen, aufbauend auf den Ergebnissen von Ale-Agha et al., weitere Untersuchungen zum kardioprotektiven Effekt der mitochondrialen TERT durchzuführen. Hierzu wurden verschiedene Marker der Signaltransduktionskaskaden von Titin und der Autophagie ausgewählt. Dabei standen folgende Forschungsfragen und Hypothesen im Vordergrund:

- Durch welche bekannten Mechanismen hat die mitochondriale TERT eine kardioprotektive Funktion und welche weiteren Mechanismen wären denkbar?
- Führt die exklusive Expression von mitochondrial lokalisierter TERT zu Veränderungen am Sarkomerprotein Titin?
- Hat die mitochondriale TERT basal Auswirkungen auf die Autophagie bzw. Mitophagie?

5.1 Kritische Reflexion und Limitationen der Studie

Bevor die Ergebnisse der Versuche detailliert diskutiert werden, wird im Folgenden auf die Limitationen eingegangen. Die relativ geringen Tierzahlen von $n = 4$ bzw. $n = 6$ pro Versuchsgruppe kann die externe Validität und die Allgemeingültigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen, da kleinere Stichproben anfälliger für Zufallsvariationen sind und die gefundenen Effekte daher auch auf individuellen Unterschieden anstatt auf tatsächlichen Zusammenhängen beruhen könnten. Des Weiteren könnte die spezifische Zusammensetzung der kleinen Gruppen nicht repräsentativ für die breitere Population sein, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Gruppen limitiert. Zudem können externe Einflüsse oder zufällige Ausreißer in kleinen Gruppen einen überproportionalen Einfluss auf die Ergebnisse haben, was die Verlässlichkeit der Schlussfolgerungen einschränkt.

Um diese Auswirkungen trotz geringer Probenzahl entgegenzuwirken, wurden die Versuche in mehrfachen unabhängigen Versuchen wiederholt und die Mittelwerte verwendet, um zufällige Ausreißer und externe Einflüsse so gering wie möglich zu halten. Es ist dennoch zu berücksichtigen, dass die vorliegenden Befunde vorläufig sind und weitere Analysen mit größeren Stichproben notwendig sind, um eine umfassendere und zuverlässigere Interpretation der Daten zu ermöglichen.

Die Studie konzentriert sich auf Untersuchungen des Herzens von Mäusen. Es wurde bei den Mäusen lediglich der linke Ventrikel untersucht, ohne die Wechselwirkungen mit anderen Organen oder Systemen vollständig zu erfassen. Es können somit keine Rückschlüsse auf den Einfluss von mitoTERT auf andere Organe gezogen werden.

Die Verwendung von genetisch modifizierten Mäusen ist in der Wissenschaft fest etabliert. Die Arbeitsgruppe von Prof. Altschmied stellte ein einzigartiges Mausmodell her, das eine Untersuchung der Funktion der mitoTERT ermöglicht. Daher bieten die vorliegenden Ergebnisse interessante Einblicke in die potenzielle kardioprotektive Funktion der mitoTERT, die im Folgenden genannt und diskutiert werden. Eine Übertragbarkeit auf den Menschen bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

5.2 Durch welche bekannten und möglichen Mechanismen hat die mitochondriale TERT eine kardioprotektive Funktion?

Ale-Agha et al. konnten zeigen, dass mitoTERT-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach AMI eine reduzierte Infarktgröße, sowie eine langfristige Herzfunktionsverbesserung aufweisen (Ale-Agha et al., 2021).

Diese kardioprotektive Wirkungsweise kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum Einen bewirkt mitoTERT eine verringerte Apoptose von Kardiomyozyten und eine gesteigerte Myofibroblasten-Differenzierung (Ale-Agha et al., 2021). Da differenzierte Myofibroblasten das Infarktareal stabilisieren und eine kontraktile Funktion besitzen, werden die Narbenränder zusammengeführt und eine stabilisierende Infarktnarbe kann gebildet werden (Calderone et al., 2006; Gabbiani, 2003; Sun & Weber, 2000). Es wird vermutet, dass die Differenzierungsfördernde Wirkung von mitoTERT auf eine verbesserte Funktion der mitochondrialen Elektronentransportkette zurückzuführen ist, insbesondere auf eine erhöhte Aktivität von Komplex I (Ale-Agha et al., 2021).

Zum Anderen verbessert mitoTERT auch die Migration von endothelialen Zellen und bewirkt durch eine erhöhte eNOS-Aktivität eine verbesserte endotheliale Funktion (Ale-Agha et al. 2021). Somit scheint die mitoTERT mit einer verbesserten Funktionalität der Mitochondrien verbunden zu sein, die sich wiederum auf die Vitalität der verschiedenen Zelltypen im Herzen auswirken könnte.

Desweiteren hat mitoTERT Einfluss auf die Prohibitinmenge. Prohibitin ist ein in Mitochondrien vorkommendes Protein, das dort Einfluss auf die Zusammensetzung und

damit die Funktionalität von Komplex I der Atmungskette hat. Störungen in der Funktion von Prohibitin und anderen Proteinen der Atmungskette können zu einer gestörten mitochondrialen Funktion, erhöhter ROS-Produktion und verschiedenen pathologischen Zuständen führen (Du et al., 1998). Daher ist das Verständnis von Prohibitin und seiner Interaktion mit der Atmungskette entscheidend für das Verständnis der mitochondrialen Funktion und ihre Auswirkungen auf die Zellphysiologie (Schleicher et al., 2008). MitoTERT verhindert die Akkumulation von Prohibitin und erhält so das Gleichgewicht zwischen den Matrix- und Membranuntereinheiten an Komplex I der Atmungskette. Durch die verbesserte mitochondriale Atmungsfunktion wird auch die Migration von Endothelzellen gefördert, was wiederum für die Angiogenese im infarzierten Myokard von Bedeutung sein kann. MitoTERT scheint zudem die Regulation von ROS zu beeinflussen. Kommt es zu einer zu hohen ROS-Konzentration, zum Beispiel im Rahmen einer Gewebhypoxie, können ROS die DNA-Stränge in Zellen angreifen oder den apoptotischen Zelltod einleiten. Zudem können ROS die Funktionalität von Mitochondrien beeinträchtigen und Entzündungsreaktionen herbei führen (Scherz-Shouval & Elazar, 2011). Die mitoTERT spielt eine schützende Rolle in den Mitochondrien, indem sie durch ROS ausgelöste oxidative Schädigung von mitochondrialer DNA verhindert und die mitochondriale Funktion aufrechterhält (Rosen et al., 2020).

Weitere nicht-kanonischen Funktionen der mitoTERT könnten basal bereits Einfluss auf die Regeneration nach AMI haben. Ob ein mitoTERT-vermittelter Einfluss auf die Titinphosphorylierung möglich ist, wurde bislang nicht untersucht.

5.3 Führt eine Expression von exklusiv mitochondrial lokalisierter TERT zu Veränderungen am Sarkomerprotein Titin?

In einem pulsierenden Herz sind Sarkomere kontinuierlichen mechanischen Belastungen ausgesetzt, die für eine reibungslose Herzfunktion von großer Bedeutung sind. Die Aufrechterhaltung der Herzfunktion erfordert einen präzisen Umsatz und Erneuerungsprozesse der Sarkomer-Komponenten, sowie eine kontinuierliche Anpassung an sich verändernde mechanische Beanspruchungen. In dieser Hinsicht spielt Titin aufgrund seiner zentralen Position im Sarkomer und seiner passiv elastischen Eigenschaften eine wichtige Rolle in der kardialen Funktion und Anpassungsfähigkeit.

5.3.1 Wird die Titin-Phosphorylierung durch die mitochondriale TERT verändert?

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martina Krüger haben gezeigt, dass es innerhalb weniger Stunden nach AMI zu einem raschen Anstieg der PKC α -vermittelten Phosphorylierung von Titin an Position S11878 und S12022 im nicht-ischämischen Areal des Herzens kommt (Kötter et al., 2016). Der resultierende Anstieg der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten wird als Anpassungsreaktion zur Stabilisierung des kontraktile Apparats und als Schutz vor Überdehnung im mechanisch stark beanspruchten Myokard gedeutet. Eine erhöhte Sarkomersteifigkeit könnte sich auch förderlich auf den Frank-Starling Mechanismus und damit die Anpassung des linken Ventrikels an die nach AMI akut erhöhte Vorlast im Herzen auswirken (Kötter et al., 2016). In der vorgestellten Arbeit sollte daher geprüft werden, ob die kardioprotektiven Effekte in mitoTERT-Mäusen möglicherweise auf basale Änderungen im Titin Phosphorylierungsstatus beruhen.

Titin-Phosphorylierung in der elastischen N2B-Region führen zu einer verminderten Titin-vermittelte Steifigkeit und einer erhöhten passiven Dehnbarkeit der Kardiomyozyten (Neagoe et al. 2002; Makarenko et al. 2004; Nagueh et al. 2004). Bekannt ist, dass S4010 im Titin durch die PKA und ERK phosphoryliert werden kann (Raskin et al. 2012). Eine verminderte Titinsteifigkeit unterstützt prinzipiell die passive Herzfüllung während der diastolischen Entspannungsphase (Koser et al., 2019; Kötter et al., 2013). Ebenfalls bekannt ist, dass die humane Telomerase die Aktivierung des ERK-Signalwegs in Epithelzellen unterdrücken kann (Wang et al. 2005). Somit stellte sich die Frage, ob auch in mitoTERT-Mäusen die ERK-abhängigen Signalwege verändert sind. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der ERK-Phosphorylierung zwischen den drei Mäusegruppen festgestellt werden, und auch die Phosphorylierung des PKA-Zielproteins Troponin I, welches als indirekter Hinweis auf die PKA-Aktivität gewertet wurde, zeigte keine signifikanten Änderungen zwischen den Versuchsgruppen. Zusammengefasst konnten somit in den hier untersuchten Gewebeproben keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden, die einen Rückschluss auf eine veränderte Aktivierung der ERK- oder PKA-abhängigen Signalwege zulassen. Angesichts der oben erwähnten niedrigen Tierzahlen wären jedoch weiterführende Untersuchungen der Veränderungen von S4010 und der Kinaseaktivität der PKA und ERK notwendig, um die ERK- und PKA-vermittelte Phosphorylierung von Titin in den mitoTERT und den ko-Mäuse abschließend zu beurteilen.

Die hier generierten Daten zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Phosphorylierung der untersuchten Phosphorylierungsstellen S12022 und der PKC α in den

ko- und den mitoTERT-Mäusen, im Vergleich zu den WT-Kontrollmäusen. Die hier vorgestellten Daten lassen somit vermuten, dass sowohl die nukleäre TERT als auch die mitochondriale TERT keinen spezifischen Einfluss auf die PKC α und die basale Titin-S12022-Phosphorylierung haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die exklusive Expression mitochondrialer TERT andere Phosphorylierungsstellen am Titin beeinflusst, die hier nicht analysiert wurden. Obwohl in den vorliegenden Experimenten unter basalen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen in der Titinexpression beobachtet werden konnten, lässt sich nicht ausschließen, dass nach einem AMI eine Präkonditionierung eintritt, die Titin schützt und den Turnover unterstützt.

Der Quotient von N2BA- zu N2B von Titin bezieht sich auf die unterschiedlichen Formen von Titin, bzw. den Anteil am Gesamt-Titin, die im Herzen vorkommen und kann weitere Einblicke in die Anpassung des Herzens in Reaktion auf mitoTERT bieten. Diese Isoformen haben verschiedene Elastizitäts- und Steifigkeitseigenschaften, die die passive Dehnbarkeit des Herzmuskels beeinflussen (Krüger & Kötter, 2016).

Ein höherer N2BA/N2B-Quotient führt wegen des vermehrten Vorkommens der dehnbareren N2BA-Isoform zu einer geringeren Steifigkeit des Muskels, während ein niedriger Quotient mit einem größeren Anteil der steiferen N2B-Isoform zu einem steiferen Myokard führt (Krüger & Kötter, 2016). Bei schweren dilatativen Kardiomyopathien oder nach kardialen Ischämien ist der Anteil der dehnbareren N2BA-Isoform erhöht. Ebenso im Endstadium der Herzinsuffizienz, wodurch die durch Titin-vermittelte passive Spannung abnimmt (Makarenko et al., 2004; Nagueh et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Es wäre denkbar gewesen, dass die mitoTERT-Mäuse bereits basal einen höheren Anteil der steiferen N2B-Isoform haben, was eine erhöhte Sarkomerstabilität und damit eine kardioprotektive Wirkung bei AMI bedingen könnte. In den vorliegenden Experimenten konnte jedoch keine Veränderung des N2BA/N2B-Quotienten festgestellt werden. Das Verhältnis der Titin-Isoformen lag im Mittel bei etwa 20% N2BA und 80% N2B Titin, und entsprach damit den bisher in Mäusen beobachteten Werten (Neagoe et al., 2002).

Somit lässt sich ausschließen, dass eine basale Veränderung des N2BA/N2B-Quotient an den kardioprotektiven Mechanismen in den mitoTERT-Mäusen beteiligt ist.

Nach einem AMI kann es zu Veränderungen im Isoformenverhältnis von Titin kommen. Untersuchungen haben gezeigt, dass nach einem AMI Veränderungen im Titin-Isoformenverhältnis auftreten können. Insbesondere kann es zu einer verstärkten Expression

der steiferen N2B-Isoform im Vergleich zur N2BA-Isoform kommen (Kötter et al., 2016). Dieser Wechsel zu einer steiferen Titin-Isoform kann zu einer erhöhten Steifigkeit des Herzmuskels führen. Die verstärkte Expression der N2B-Isoform könnte Teil der Anpassungsmechanismen des Herzens nach einem Infarkt sein, aber sie kann auch mit einer eingeschränkten diastolischen Funktion und einer erhöhten Myokardsteifigkeit in Verbindung gebracht werden. Diese Veränderungen können langfristige Auswirkungen auf die Herzfunktion haben und die Entwicklung von Herzinsuffizienz fördern. Möglich wäre, dass sich das Titin-Isoformenverhältnis nach AMI durch mitoTERT nicht in Richtung N2B verschiebt. Weitere Untersuchungen nach AMI wären hierfür notwendig.

5.4 Hat die mitochondriale TERT basal Auswirkungen auf die Autophagie bzw. Mitophagie?

Die Autophagie, ein zellulärer Prozess, der für den Abbau und die Recycling von zellulären Bestandteilen verantwortlich ist, ermöglicht es der Zelle ihre Funktionen aufrechtzuerhalten und sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass Autophagie für die Titindegradation mitverantwortlich ist (Müller et al., 2021). Somit könnte die Autophagie als kataboler Recyclingprozess ebenfalls einen erfolgsversprechenden Ansatzpunkt in der Verbesserung des „Outcomes“ nach AMI haben.

Bisherige Studienergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl das Proteasom (Higashikuse et al., 2019; Krüger & Kötter, 2016) als auch die Autophagie (Bogomolovas et al., 2021; Lange et al., 2005; Müller et al., 2021), an der Proteinqualitätskontrolle von Titin beteiligt sind. Der Abbau von Titin ist aufgrund seiner enormen Größe für die Zelle eine komplexe Aufgabe und erfordert einen gut regulierten mehrstufigen Prozess. Muskelspezifische E3-Ubiquitin-Ligasen wie MuRF-1 (*Muscle RING Finger*) und MuRF-2 interagieren mit bestimmten Domänen des Titinfilaments im Zuge der Abbauprozesse (Müller et al., 2021). Bei einem akutem Myokardinfarkt wird das überlebende Myokard einem hohen mechanischen Stress ausgesetzt. Die reduzierte Ejektionsfraktion und die damit verbundene erhöhte Vorlast am Herzen kann zu einer erhöhten Dehnung des Myokards führen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die hohe mechanische Beanspruchung auch zu einer gesteigerten Synthese- und Abbaurate betroffener Sarkomerproteine führt. In einem Mausmodell mit Myokardinfarkt konnte 3 Tage nach der Infarktinduktion eine deutliche Aktivierung der Proteinqualitätskontrolle und eine verstärkte Ubiquitinierung von Titin nachgewiesen (Kötter et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob die kardioprotektive Wirkung von mitoTERT möglicherweise auf eine basal erhöhte Aktivität von Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle zurückzuführen sein könnte. Die Analyse der Autophagie-Marker erfolgte entsprechend der Autophagie-Signaltransduktion. Es ist bekannt, dass die Autophagie durch verschiedene Mediatoren sowohl aktiviert als auch gehemmt werden kann. Bei Nährstoffmangel wird die Autophagie über AMPK induziert, was wiederum eine Phosphorylierung von ULK-S555 zur Folge hat. Im Gegensatz dazu wird die Autophagie bei Nährstoffüberschuss über mTOR gehemmt, was zur Phosphorylierung von ULK-S757 führt.

In den vorliegenden Versuchen zeigt sich eine Erhöhung um den Faktor 1,7 der AMPK-Phosphorylierung in den mitoTERT-Mäusen im Vergleich zum WT, mit $p = 0,008$. Diese signifikante Änderung der Phosphorylierung der AMPK lässt auf eine Autophagie-Induktion schließen. Trotz der relativ geringen Anzahl von 6 Mäusen pro Gruppe, lässt sich ableiten, dass es in mitoTERT-Mäusen bereits basal zu einer AMPK-induzierten Autophagie-Aktivierung zu kommen scheint. Die AMPK ist ein empfindlicher Sensor für zelluläre Energie, die durch den verringerten ATP-Spiegel und das hohe Verhältnis von AMP zu ATP unter der Bedingung eines Nährstoffmangels aktiviert wird. Nach Aktivierung reguliert AMPK die Induktion der Autophagie über direkte oder indirekte ULK S555-Modifikationen (siehe Abbildung 5) (Alers et al., 2012; Egan et al., 2011; Khan & Kumar, 2012). Im Einklang mit der Literatur zur AMPK-Signalkaskade war die ULK an S555 in den mitoTERT-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen um den Faktor 1,2 leicht erhöht, was die Vermutung der Autophagie-Induktion in den mitoTERT-Mäusen weiter bestärkt (Chan et al., 2012).

Die Phosphorylierung von mTOR ist der Autophagie-Induktion vorgeschaltet und fungiert als Autophagie-Inhibitor. Jedoch war keine Erniedrigung der Phosphorylierung von mTOR innerhalb der drei Mäusegruppen messbar. Wie in Abbildung 4 ersichtlich, ist ULK S757 in der Autophagie-Inhibition-Signalkaskade mTOR nachgeschaltet (Chan et al., 2012; Hale et al., 2013). In den vorliegenden Western Blots zeigte sich, dass in den ko- und mitoTERT-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen die Phosphorylierung an ULK-S757 leicht erniedrigt war.

Um die weitere Aktivität der Autophagie zu beurteilen, war es erforderlich, den sogenannten "Autophagie-Fluss" zu bestimmen, der die Rate des autophagischen Abbaus darstellt (Loos

et al., 2014; Yoshii & Mizushima, 2017). Hierfür wurden die Expressionsniveaus weiterer autophager Proteine gemessen und analysiert. Da LC3-II mit der Menge der Autophagosombildung korreliert, kann durch relative Expressionsänderungen auf die Autophagieaktivität geschlossen werden (Kuma et al., 2017; Loos et al., 2014). Es wurde eine leichte, wenn auch nicht-signifikante, Zunahme des LC3-II/LC3-I-Quotienten in den mitoTERT-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen beobachtet. Hierbei zeigte sich die Erhöhung sowohl in Bezug auf die Ladungskontrolle GAPDH wie auch im Verhältnis zu dem LC3-II/I-Quotienten. In Anbetracht der zuvor untersuchten Autophagie-Marker würde hier die Erhöhung des Quotienten mit einer Aktivierung der Autophagie einhergehen (Tanida et al., 2008). Entsprechend können die Ergebnisse dieser Arbeit als weitere Hinweise auf eine Zunahme der Autophagie in den mitoTERT-Mäusen gewertet werden.

Da eine direkte Schlussfolgerung aus der alleinigen Messung der LC3-II-Proteinlevel nur bedingt möglich ist, da es im Autophagieprozess sowohl auf – als auch abgebaut wird, wurde es hier durch den weiteren Marker p62 ergänzt. Im Einklang mit dem Autophagieprozess sollte p62 bei Autophagie-Induktion abnehmen (Bjørkøy et al., 2009; Hale et al., 2013). Insgesamt zeigen die vorliegenden p62-Datenauswertungen allerdings nur leicht gesunkene p62-Proteinlevel bei den mitoTERT-Mäusen und somit keine signifikante Veränderung im Vergleich der drei Mäusegruppen.

Inwiefern mitoTERT die Autophagie genau aktiviert, bleibt unklar. Jedoch scheint die nachgewiesene signifikante Aktivierung der AMPK, sowie die nicht-signifikante Zunahme des LC3-II/LC3-I-Verhältnisses und Trends hinsichtlich einer gesteigerten ULK-Phosphorylierung, eine gesteigerte basale Aktivität der Autophagie wahrscheinlich zu machen. Somit weisen die hier erzielten Ergebnisse der mitoTERT, auf einen bisher unbekannten weiteren Regulations- und Induktionsmechanismus der Autophagie, hin. In Abbildung 14 ist dafür eine mögliche Signalkaskade dargestellt: Die mitoTERT aktiviert die AMP-Kinase, die dann die ULK-S555 phosphoryliert. Möglich wäre auch eine zusätzliche direkte Einwirkung von mitoTERT auf die ULK-S555. Über eine fortlaufende Signalkaskade, die diverse Atgs involviert, kommt es schließlich zur PIK3-Komplexbildung. Gleichzeitig bewirkt die mitoTERT eine Erhöhung des LC3-Quotienten. Durch das Zusammenspielen der zwei Komponenten werden vermehrt Phagoporen gebildet, die mit Lysosomen zusammen ein Autolysosom bilden, sodass es zur Autophagie kommt.

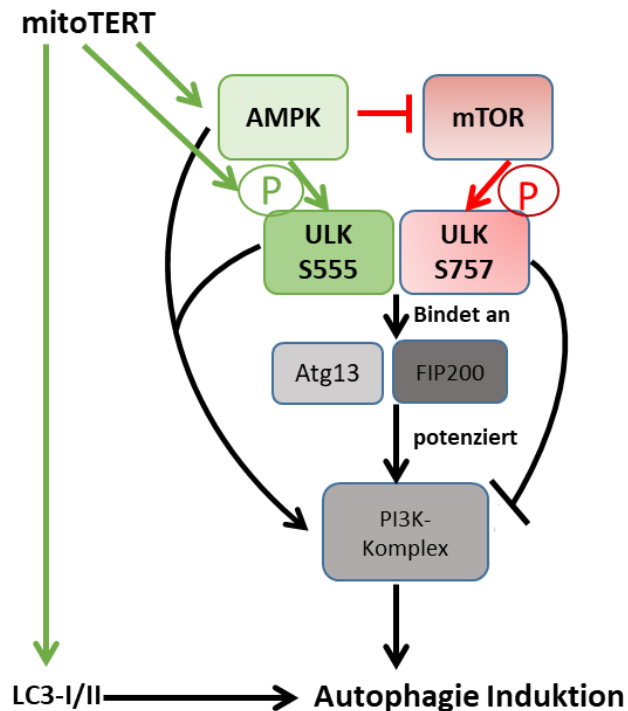


Abb. 14: Möglicher Aktivierungsmechanismus der Autophagie durch die mitochondriale TERT. mitoTERT induziert die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) einerseits inhibiert und gleichzeitig durch Phosphorylierung die Uncoordinated-51 like Kinase (ULK) aktiviert. Ebenso wird die mitoTERT sich induzierend auf die *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) aus. Daraus resultiert insgesamt eine gesteigerte Autophagie-Induktion.

Die Signaltransduktion über AMPK läuft v. a. in der Ischämie-Phase ab. Später, während der Reperfusion, spielt die AMPK-Aktivierung eine untergeordnete Rolle. Hier ist die verstärkte Autophagie AMPK-unabhängig durch eine Hochregulierung von Beclin-1 bedingt, was darauf hindeutet, dass das Beclin-1-Protein eine entscheidende Rolle bei der Autophagie nach einem AMI spielt (Matsui et al., 2007). In dem Projektplan dieser Arbeit war die Untersuchung der Beclin-1 Phosphorylierung nicht vorgesehen. Es wäre für weitergehende Untersuchungen interessant herauszufinden, ob die Autophagie in den mitoTERT-Mäusen durch eine direkte AMPK-vermittelte Beclin-1 Phosphorylierung verstärkt wird (Chan et al., 2012; Hale et al., 2013; Zhang et al., 2016).

5.4.1 Mitophagie-Induktion durch mitochondriale TERT?

Da es eine Sonderform der Autophagie für den gezielten Abbau und die Beseitigung beschädigter oder nicht mehr funktionsfähiger Mitochondrien gibt, sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob die mitoTERT möglicherweise mit einer basalen Änderung der Mitophagie einhergehen.

Bezüglich den hier untersuchten Mitophagie-Marker TOMM und Parkin zeigte sich kein Unterschied zwischen den Mäusegruppen. Veränderungen in TOMM, im Sinne einer sichtbaren Reduktion in Bezug auf GAPDH, könnten zu einer gesteigerten Mitophagie führen, da beschädigte Mitochondrien erkannt und selektiv abgebaut werden (Chacinska et al., 2009). Ein Rückgang von TOMM könnte daher eine Anpassungsreaktion der Zelle sein, um den Abbau von dysfunktionalen Mitochondrien zu verstärken und die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Dies würde letztendlich zu einer Erhöhung der Mitophagie führen (Bertolin et al., 2013). Da in den mitoTERT-Mäusen eher eine Verbesserung und ein Schutz der Mitochondrien beschrieben wurde (Ale-Agha et al., 2021), war eher eine verminderte Mitophagie zu erwarten gewesen, was sich anhand der unveränderten Markerproteine TOMM und Parkin jedoch nicht bestätigen lies.

5.4.1 Zusammenhang zwischen Titin und Autophagie

Aufgrund der enormen Größe von Titin und seiner Halbwertszeit von 3-5 Tagen ist es anfällig für Fragmentierung und Abbau. Die Proteinqualitätskontrolle spielt hierbei eine Rolle, insbesondere das Ubiquitin-Proteasom-System und das Autophagosom-Lysosom-System. Die Ubiquitinierung von Titin, insbesondere die K63-polyubiquitinierte Form, korrelierte mit einer gesteigerten Bildung eines spezifischen Titin-Degradationsprodukts (T2). Verschiedene E3-Ligasen, darunter MuRF-1, MuRF-2, MuRF-3, CHIP und Fbx32, wurden als potenzielle Interaktionspartner von Titin identifiziert (Müller et al., 2021). Die spezifische Deletion dieser Ligasen mittels siRNA zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf die Titin-Ubiquitinierung. Insgesamt liegt nahe, dass sowohl die Autophagie als auch das Proteasom an der Titin-Ubiquitinierung und -degradation beteiligt sind. Die Identifizierung verschiedener E3-Ligasen deutet darauf hin, dass spezifische Titin-Domänen für den gezielten Abbau durch Autophagie oder das Proteasom ubiquitinieren könnten (Müller et al., 2021). Die genauen Mechanismen und die regulatorischen Aspekte dieses Prozesses könnten wichtige Implikationen für die Herzgesundheit und die Anpassung des Myokards an mechanische Belastungen haben.

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich basal eine zum Teil signifikant erhöhte Autophagie-Induktion, jedoch keine signifikant erkennbare Veränderung an Titin. Aufgrund von Literaturdaten wäre denkbar gewesen, dass durch die erhöhte Autophagie in den mitoTERT-Mäusen dort auch ein erhöhter Titin-Abbau stattfindet. Eine basal erhöhte Autophagie könnte bewirken, dass das durch den AMI veränderte Titin verstärkt bzw. effektiver abgebaut werden kann. Müller et al. zeigten, dass Autophagie als Proteinkontrolle

bei der Titindegradation eine bedeutende Rolle spielt. Somit könnte die gesteigerte Autophagie, die hier in mitoTERT-Mäusen unter basalen Bedingungen beobachtet wurde, bereits für eine kontinuierliche Degradation und -Aufbau von Titin sorgen und so durch kontinuierliche Anpassung der notwendigen Titinisoform eine maximale Funktionsfähigkeit des Sarkomers gewährleisten.

5.4.2 Klinische Bedeutung der Autophagie

In den vergangenen Jahren steht eine verbesserte Autophagie-Funktion vermehrt im Fokus von Studien zur Prävention und Therapie von Herzerkrankungen (Galluzzi et al. 2017; Delbridge et al. 2017), da sie bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen, wie dilatative Kardiomyopathien oder auch nach AMI, erhöht ist (Xie et al., 2011). Nakai et al. zeigten, dass Autophagie eine positive Rolle im Herzen als Reaktion auf Drucküberlastung oder β -adrenergen Stress spielt. Insbesondere scheint die Autophagie eine essenzielle Rolle bei posttranslationalen Modifikationen im Proteinumsatz in Kardiomyozyten zu haben. Auf diesem Wege scheint sie wichtig zu sein, um die Ansammlung von abnormalen Proteinen oder beschädigten Organellen zu verhindern, die die Herzfunktion stören könnten. Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, der die kardioprotektiven Effekte von mitoTERT zusätzlich erklären könnte. Durch mitoTERT wird die Autophagie induziert, was eine Ansammlung von geschädigten Proteinen oder Organellen verhindert und so die Herzfunktion bereits basal positiv verbessern könnte.

Wang et al. zeigten, dass eine Autophagie-Induktion die Nekrose nach Ischämie unterdrückt und so ein therapeutisches Potenzial zur Linderung nach AMI haben könnte. In weiteren Studien, zeigte sich, dass eine Autophagie-Induktion zwar während der Ischämie-Phase protektiv schützen könnte, in der Reperfusion jedoch möglicherweise schädlich sein könnte (Matsui et al., 2007), da Zellkomponenten und Proteine abgebaut werden, die den Zelltod hemmen würden, wodurch sich der Schaden verstärkt (Zhai et al., 2011).

Mit Zunahme des Alters sinkt die basale Autophagie-Aktivität und es kommt zur kardialen Alterung. Eine Vielzahl von Studien hat eine verminderte Aktivität bei älteren Menschen gezeigt, die mit der Entwicklung vieler altersbedingter Krankheiten in Verbindung gebracht wird. Mehrere Interventionen zur Stimulierung der Autophagie zeigten, dass diese zu einer verlängerten Lebensspanne, einer langsameren kardialen Alterung und einer erhöhten Stressresistenz führen kann (Eisenberg et al., 2016; Pyo et al., 2013; Shirakabe et al., 2016).

Die Förderung von Autophagie Prozessen kann sowohl auf natürliche Weise durch Prozesse wie Ernährung, Vitamin D und körperliche Aktivität erfolgen, als auch durch bestimmte Medikamente wie Metformin und Rapamycin, welche nachweislich die Autophagie aktivieren. Metformin aktiviert die AMPK, welche dann über das Zielprotein ULK S555 die Autophagie aktiviert. Rapamycin inhibiert die inhibitorische Regulatorkinase mTOR und führt so durch eine Unterdrückung der Hemmung zu einer Aktivierung der Autophagie (Levine et al., 2015; Lu et al., 2021).

Autophagie spielt auch bei der Vorbeugung und der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch eine Ansammlung von Proteinaggregationen gezeichnet sind, eine Rolle. Da Autophagie unter physiologischen Bedingungen fehlgefaltete oder defekte Proteine abbaut, kommt es zu einer geringeren Proteinaggregation. So schützt die Autophagie vor Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington und Parkinson (Mizushima & Komatsu, 2011).

Allerdings scheint eine zu hohe Autophagie-Aktivität auch negative organische Folgen haben zu können. So kann bei einem Gestationsdiabetes eine zu hohe Autophagie zu kardialen Fehlbildungen des Fetus führen (Endo et al., 2015; Nakai et al., 2007). Somit kann die in unseren Mäusen erhöhte Autophagie in den mitoTERT-Mäusen einerseits kardioprotektiv wirken, jedoch auch mit Folgen einer erhöhten Autophagie-Induktion verbunden sein (Sandri et al. 2013; Mizushima und Komatsu 2011), die u. a. durch eine unkontrollierte Zerstörung von Zellbestandteilen hervorgerufen werden könnten.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigten, dass die mitoTERT-Mäuse bereits unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Autophagie aufweisen. Weiterführende Untersuchungen müssten nun die Frage adressieren, ob diese Autophagie-Induktion auch in den mitoTERT Mäuse nach AMI zu beobachten sind. Perspektivisch müsste auch geprüft werden, ob mitoTERT in Menschen einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt wie in Mäusen hat (Ale-Agha et al. 2021). In dem Fall könnte die Entwicklung von pharmakologischen oder anderen therapeutischen Interventionen zur spezifischen Steigerung der mitoTERT eine vielversprechende Option zur Kardioprotektion sein. Dabei könnte der Telomerase-aktivierende Wirkstoff TA-65 eine pharmakologische Therapieoption sein. Ale-Agha et al. konnten bereits zeigen, dass TA-65 in Endothelzellen nur die Menge an mitoTERT steigert, nicht aber die der nukleären TERT.

Abschließend ist festzuhalten, dass es notwendig wäre, den hier herausgefundenen direkten Zusammenhang zwischen der mitoTERT und der Autophagie durch weitere Untersuchungen zu untermauern.

In der Zusammenschau liefert die hier vorgestellte Studie erste Hinweise darauf, dass die in mitoTERT-Mäusen beobachtete Kardioprotektion bei AMI in Zusammenhang mit einer basal gesteigerten Autophagie Induktion stehen könnte. Diese könnte sich positiv auf die Funktion kardialer Zellen auswirken und auch eine verbesserte Homöostase der Sarkomerproteine im Myokard gewährleisten. Damit stellt die Arbeit einen guten Ausgangspunkt für weiterführende Studien dar, in denen die Beteiligung der Proteinhomöostase an der kardioprotektiven Wirkung von mitoTERT eingehender untersucht werden könnte.

6 Quellenverzeichnis

- Agarkova, I. & Perriard, J.-C. (2005) "The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere", *Trends in cell biology*, Vol. 15, No. 9, S. 477–485.
- Ahmed, S., Passos, J. F., Birket, M. J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M. A., Zglinicki, T. von & Saretzki, G. (2008) "Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress", *Journal of cell science*, Vol. 121, Pt 7, S. 1046–1053.
- Aiken, C. T., Kaake, R. M., Wang, X. & Huang, L. (2011) "Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes", *Molecular & cellular proteomics : MCP*, Vol. 10, No. 5, R110.006924.
- Ait-Aissa, K., Ebben, J. D., Kadlec, A. O. & Beyer, A. M. (2016) "Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease", *Pharmacological research*, Vol. 111, S. 422–433.
- Ale-Agha, N., Jakobs, P., Goy, C., Zurek, M., Rosen, J., Dyballa-Rukes, N., Metzger, S., Greulich, J., Ameln, F. von, Eckermann, O., Unfried, K., Brack, F., Grandoch, M., Thielmann, M., Kamler, M., Gedik, N., Kleinbongard, P., Heinen, A., Heusch, G., Gödecke, A., Altschmied, J. & Haendeler, J. (2021) "Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Protects from Myocardial Ischemia/reperfusion Injury by Improving Complex I Composition and Function", *Circulation*.
- Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Giganti, D., Eckels, E., Rivas-Pardo, J. A., Hamdani, N., Warren, C. M., Solaro, R. J., Linke, W. A. & Fernández, J. M. (2014) "S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding", *Cell*, Vol. 156, No. 6, S. 1235–1246.
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S. & Stork, B. (2012) "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks", *Molecular and cellular biology*, Vol. 32, No. 1, S. 2–11.
- Anderson, R., Lagnado, A., Maggiorani, D., Walaszczyk, A., Dookun, E., Chapman, J., Birch, J., Salmonowicz, H., Ogrodnik, M., Jurk, D., Proctor, C., Correia-Melo, C., Victorelli, S., Fielder, E., Berlinguer-Palmini, R., Owens, A., Greaves, L. C., Kolsky, K. L., Parini, A., Douin-Echinard, V., LeBrasseur, N. K., Arthur, H. M., Tual-Chalot, S., Schafer, M. J., Roos, C. M., Miller, J. D., Robertson, N., Mann, J., Adams, P. D., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., Mialet-Perez, J., Richardson, G. D. & Passos, J. F. (2019)

- "Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence", *The EMBO journal*, Vol. 38, No. 5.
- 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", *Circulation research*, Vol. 89, No. 11, S. 1065–1072.
- Beckendorf, L. & Linke, W. A. (2015) "Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity", *Journal of muscle research and cell motility*, Vol. 36, No. 1, S. 25–36.
- Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Jacoupy, M., Traver, S., Grenier, K., Greene, A. W., Dauphin, A., Waharte, F., Bayot, A., Salamero, J., Lombès, A., Bulteau, A.-L., Fon, E. A., Brice, A. & Corti, O. (2013) "The TOMM machinery is a molecular switch in PINK1 and PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial clearance", *Autophagy*, Vol. 9, No. 11, S. 1801–1817.
- Beyer, A. M. & Norwood Toro, L. E. (2018) "Telomerase: Location, Location, Location?", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Vol. 38, No. 6, S. 1247–1249.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A. & Johansen, T. (2009) "Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1", *Methods in enzymology*, Vol. 452, S. 181–197.
- Bogomolovas, J., Fleming, J. R., Franke, B., Manso, B., Simon, B., Gasch, A., Markovic, M., Brunner, T., Knöll, 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 reports*, Vol. 22, No. 10, e48018.
- Borges, A. & Liew, C. C. (1997) "Telomerase activity during cardiac development", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 29, No. 10, S. 2717–2724.
- Cai, S., Zhao, M., Zhou, B., Yoshii, A., Bugg, D., Villet, O., Sahu, A., Olson, G. S., Davis, J. & Tian, R. (2023) "Mitochondrial dysfunction in macrophages promotes inflammation and suppresses repair after myocardial infarction", *The Journal of clinical investigation*, Vol. 133, No. 4.
- Calderone, A., Bel-Hadj, S., Drapeau, J., El-Helou, V., Gosselin, H., Clement, R. & Villeneuve, L. (2006) "Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides", *Journal of cellular physiology*, Vol. 207, No. 1, S. 165–173.

- Camelliti, P., Borg, T. K. & Kohl, P. (2005) "Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts", *Cardiovascular research*, Vol. 65, No. 1, S. 40–51.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009) "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms", *Cell*, Vol. 138, No. 4, S. 628–644.
- Chan, L. L.-Y., Shen, D., Wilkinson, A. R., Patton, W., Lai, N., Chan, E., Kuksin, D., Lin, B. & Qiu, J. (2012) "A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells", *Autophagy*, Vol. 8, No. 9, S. 1371–1382.
- Cottage, C. T., Neidig, L., Sundararaman, B., Din, S., Joyo, A. Y., Bailey, B., Gude, N., Hariharan, N. & Sussman, M. A. (2012) "Increased mitotic rate coincident with transient telomere lengthening resulting from pim-1 overexpression in cardiac progenitor cells", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 30, No. 11, S. 2512–2522.
- Czerner, K. (2020) *Versorgung von Patienten nach Herzinfarkt in Sachsen-Anhalt : Bereitstellung und Inanspruchnahme von medizinischen Leistungen.*
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S. & White, E. (2006) "Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis", *Cancer cell*, Vol. 10, No. 1, S. 51–64.
- (2020) *Deutscher Herzbericht: Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland.*
- Du, G., Mouithys-Mickalad, A. & Sluse, F. E. (1998) "Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro", *Free radical biology & medicine*, Vol. 25, No. 9, S. 1066–1074.
- Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J. & Guan, K.-L. (2011) "The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR", *Autophagy*, Vol. 7, No. 6, S. 643–644.
- Eghbali, M. & Weber, K. T. (1990) "Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression", *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 96, No. 1, S. 1–14.
- Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., Tong, M., Ruckstuhl, C., Dammbrueck, C., Gross, A. S., Herbst, V., Magnes, C., Trausinger, G., Narath, S., Meinitzer, A., Hu, Z., Kirsch, A., Eller, K., Carmona-Gutierrez, D., Büttner, S., Pietrocola, F., Knittelfelder, O., Schrepfer, E., Rockenfeller, P., Simonini, C., Rahn, A.,

- Horsch, M., Moreth, K., Beckers, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Neff, F., Janik, D., Rathkolb, B., Rozman, J., Angelis, M. H. de, Moustafa, T., Haemmerle, G., Mayr, M., Willeit, P., Frieling-Salewsky, M. von, Pieske, B., Scorrano, L., Pieber, T., Pechlaner, R., Willeit, J., Sigrist, S. J., Linke, W. A., Mühlfeld, C., Sadoshima, J., Dengjel, J., Kiechl, S., Kroemer, G., Sedej, S. & Madeo, F. (2016) "Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine", *Nature medicine*, Vol. 22, No. 12, S. 1428–1438.
- Endo, Y., Furuta, A. & Nishino, I. (2015) "Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency", *Acta neuropathologica*, Vol. 129, No. 3, S. 391–398.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E. L., Ivanov, S., Satpathy, A. T., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E. C., Yokoyama, W. M., Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J. & Mann, D. L. (2014) "Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation", *Immunity*, Vol. 40, No. 1, S. 91–104.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereuse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J. S., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. (2000) "Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity", *Circulation research*, Vol. 86, No. 11, S. 1114–1121.
- Freisinger, E., Fuerstenberg, T., Malyar, N. M., Wellmann, J., Keil, U., Breithardt, G. & Reinecke, H. (2014) "German nationwide data on current trends and management of acute myocardial infarction: discrepancies between trials and real-life", *European heart journal*, Vol. 35, No. 15, S. 979–988.
- Fukuda, N. & Granzier, H. L. (2005) "Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart", *Journal of muscle research and cell motility*, Vol. 26, 6-8, S. 319–323.
- 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", *The Journal of cell biology*, Vol. 106, No. 5, S. 1563–1572.
- Gabbiani, G. (2003) "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases", *The Journal of pathology*, Vol. 200, No. 4, S. 500–503.

- Gajarsa, J. J. & Kloner, R. A. (2011) "Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities", *Heart failure reviews*, Vol. 16, No. 1, S. 13–21.
- Gautel, M. (2011) "Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing", *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, Vol. 462, No. 1, S. 119–134.
- Geisler, S., Holmström, K. M., Treis, A., Skujat, D., Weber, S. S., Fiesel, F. C., Kahle, P. J. & Springer, W. (2010) "The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations", *Autophagy*, Vol. 6, No. 7, S. 871–878.
- Geserick, C., Tejera, A., González-Suárez, E., Klatt, P. & Blasco, M. A. (2006) "Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling", *Oncogene*, Vol. 25, No. 31, S. 4310–4319.
- Gogiraju, R., Bochenek, M. L. & Schäfer, K. (2019) "Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure", *Frontiers in cardiovascular medicine*, Vol. 6, S. 20.
- Gordon, D. M. & Santos, J. H. (2010) "The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism", *Journal of nucleic acids*, Vol. 2010.
- Granzier, H. L. & Labeit, S. (2004) "The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease", *Circulation research*, Vol. 94, No. 3, S. 284–295.
- Greaser, M. L., Berri, M., Warren, C. M. & Mozdziak, P. E. (2002) "Species variations in cDNA sequence and exon splicing patterns in the extensible I-band region of cardiac titin: relation to passive tension", *Journal of muscle research and cell motility*, Vol. 23, 5-6, S. 473–482.
- Grützner, A., Garcia-Manyes, S., Kötter, S., Badilla, C. L., Fernandez, J. M. & Linke, W. A. (2009) "Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence", *Biophysical journal*, Vol. 97, No. 3, S. 825–834.
- Haendeler, J., Dröse, S., Büchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., Brandt, U. & Dimmeler, S. (2009) "Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Vol. 29, No. 6, S. 929–935.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2003) "Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation", *FEBS Letters*, Vol. 536, 1-3, S. 180–186.
- Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R. & Rucker, E. B. (2013) "Autophagy: regulation and role in development", *Autophagy*, Vol. 9, No. 7, S. 951–972.

- Hamdani, N., Krysiak, J., Kreusser, M. M., Neef, S., Dos Remedios, C. G., Maier, L. S., Krüger, 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", *Circulation research*, Vol. 112, No. 4, S. 664–674.
- 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", *Circulation research*, Vol. 105, No. 7, 631-8, 17 p following 638.
- Higashikuse, Y., Mittal, N., Arimura, T., Yoon, S. H., Oda, M., Enomoto, H., Kaneda, R., Hattori, F., Suzuki, T., Kawakami, A., Gasch, A., Furukawa, T., Labeit, S., Fukuda, K., Kimura, A. & Makino, S. (2019) "Perturbation of the titin/MURF1 signaling complex is associated with hypertrophic cardiomyopathy in a fish model and in human patients", *Disease models & mechanisms*, Vol. 12, No. 11.
- Horowitz, R., Maruyama, K. & Podolsky, R. J. (1989) "Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle", *The Journal of cell biology*, Vol. 109, No. 5, S. 2169–2176 [Online]. DOI: 10.1083/jcb.109.5.2169.
- Howard, C. M. & Baudino, T. A. (2014) "Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 70, S. 19–26.
- Huxley, H. & Hanson, J. (1954) "Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation", *Nature*, Vol. 173, No. 4412, S. 973–976.
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P. & Youle, R. J. (2010) "Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL", *The Journal of cell biology*, Vol. 191, No. 5, S. 933–942.
- Jin, S. M. & Youle, R. J. (2013) "The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria", *Autophagy*, Vol. 9, No. 11, S. 1750–1757.
- Kampjut, D. & Sazanov, L. A. (2020) "The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 370, No. 6516.
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., Banerjee, S. & Youle, R. J. (2014) "PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity", *The Journal of cell biology*, Vol. 205, No. 2, S. 143–153.
- Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., Alessi, D. R., Knebel, A., Trost, M. & Muqit, M. M. K. (2014) "Parkin is activated

- by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65", *The Biochemical journal*, Vol. 460, No. 1, S. 127–139.
- Khan, S. H. & Kumar, R. (2012) "Role of an intrinsically disordered conformation in AMPK-mediated phosphorylation of ULK1 and regulation of autophagy", *Molecular bioSystems*, Vol. 8, No. 1, S. 91–96.
- Knappeis, G. G. & Carlsen, F. (1968) "The ultrastructure of the M line in skeletal muscle", *The Journal of cell biology*, Vol. 38, No. 1, S. 202–211.
- Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T. J., Deak, M., Knebel, A., Alessi, D. R. & Muqit, M. M. K. (2012) "PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65", *Open biology*, Vol. 2, No. 5, S. 120080.
- Koser, F., Loescher, C. & Linke, W. A. (2019) "Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for?", *The FEBS journal*, Vol. 286, No. 12, S. 2240–2260.
- Kötter, S., Gout, L., Frieling-Salewsky, M. von, Müller, A. E., Helling, S., Marcus, K., Dos Remedios, C., Linke, W. A. & Krüger, M. (2013) "Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts", *Cardiovascular research*, Vol. 99, No. 4, S. 648–656.
- Kötter, S., Kazmierowska, M., Andresen, C., Bottermann, K., Grandoch, M., Gorressen, S., Heinen, A., Moll, J. M., Scheller, J., Gödecke, A., Fischer, J. W., Schmitt, J. P. & Krüger, M. (2016) "Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction", *Circulation research*, Vol. 119, No. 9, S. 1017–1029.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K. & Matsuda, N. (2014) "Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin", *Nature*, Vol. 510, No. 7503, S. 162–166.
- Krüger, M., Kohl, T. & Linke, W. A. (2006) "Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Vol. 291, No. 2, H496-506.

- Krüger, M. & Kötter, S. (2016) "Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling", *Frontiers in physiology*, Vol. 7, S. 76.
- Krüger, M., Kötter, S., Grützner, 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", *Circulation research*, Vol. 104, No. 1, S. 87–94.
- Krüger, M. & Linke, W. A. (2006) "Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension", *Journal of muscle research and cell motility*, Vol. 27, 5-7, S. 435–444.
- Krüger, M. & Linke, W. A. (2009) "Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 46, No. 4, S. 490–498.
- Krüger, M. & Linke, W. A. (2011) "The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 286, No. 12, S. 9905–9912.
- Kuma, A., Komatsu, M. & Mizushima, N. (2017) "Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice", *Autophagy*, Vol. 13, No. 10, S. 1619–1628.
- Labeit, S., Barlow, D. P., Gautel, M., Gibson, T., Holt, J., Hsieh, C. L., Francke, U., Leonard, K., Wardale, J. & Whiting, A. (1990) "A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin", *Nature*, Vol. 345, No. 6272, S. 273–276.
- Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A. & Trinick, J. (1992) "Towards a molecular understanding of titin", *The EMBO journal*, Vol. 11, No. 5, S. 1711–1716.
- Labeit, S. & Kolmerer, B. (1995) "Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 270, No. 5234, S. 293–296.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. (2013) "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex", *Nature reviews. Molecular cell biology*, Vol. 14, No. 12, S. 759–774.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B. & Gautel, M. (2005) "The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 308, No. 5728, S. 1599–1603.

- Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A. & Youle, R. J. (2012) "Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin", *Developmental cell*, Vol. 22, No. 2, S. 320–333.
- Lemasters, J. J. (2005) "Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging", *Rejuvenation research*, Vol. 8, No. 1, S. 3–5.
- Levine, B., Packer, M. & Codogno, P. (2015) "Development of autophagy inducers in clinical medicine", *The Journal of clinical investigation*, Vol. 125, No. 1, S. 14–24.
- Li, H., Linke, W. A., Oberhauser, A. F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J. G., Lu, H., Marszalek, P. E. & Fernandez, J. M. (2002) "Reverse engineering of the giant muscle protein titin", *Nature*, Vol. 418, No. 6901, S. 998–1002.
- Linke, W. A. & Hamdani, N. (2014) "Gigantic business: titin properties and function through thick and thin", *Circulation research*, Vol. 114, No. 6, S. 1052–1068.
- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Rüegg, J. C. & Labeit, S. (1996) "Towards a molecular understanding of the elasticity of titin", *Journal of molecular biology*, Vol. 261, No. 1, S. 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", *The Journal of cell biology*, Vol. 146, No. 3, S. 631–644.
- Loos, B., Du Toit, A. & Hofmeyr, J.-H. S. (2014) "Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality", *Autophagy*, Vol. 10, No. 11, S. 2087–2096.
- Lu, G., Wu, Z., Shang, J., Xie, Z., Chen, C. & Zhang, C. (2021) "The effects of metformin on autophagy", *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, Vol. 137, S. 111286.
- 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", *Circulation research*, Vol. 95, No. 7, S. 708–716.
- Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. (2009) "Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62", *Cell*, Vol. 137, No. 6, S. 1062–1075.

- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N. & Tanaka, K. (2010) "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy", *The Journal of cell biology*, Vol. 189, No. 2, S. 211–221.
- 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", *Circulation research*, Vol. 100, No. 6, S. 914–922.
- Medlexi (Hg.) (2024) *Herzkranzgefäße* [Online]. Verfügbar unter <https://medlexi.de/images/Herzkranzgef%C3%A4%C3%9Fe.jpg> (Abgerufen am 10 Oktober 2024).
- Mitchell, P. (1975) "Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle", *FEBS Letters*, Vol. 56, No. 1, S. 1–6.
- Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) "Autophagy: renovation of cells and tissues", *Cell*, Vol. 147, No. 4, S. 728–741.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. (2002) "Autophagosome formation in mammalian cells", *Cell structure and function*, Vol. 27, No. 6, S. 421–429.
- Müller, E., Salcan, S., Bongardt, S., Barbosa, D. M., Krüger, M. & Kötter, S. (2021) "E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system", *Scientific Reports*, Vol. 11, No. 1, S. 21134.
- Nagueh, S. F., Shah, G., Wu, Y., Torre-Amione, G., King, N. M. P., Lahmers, S., Witt, C. C., Becker, K., Labeit, S. & Granzier, H. L. (2004) "Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy", *Circulation*, Vol. 110, No. 2, S. 155–162.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, 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", *Nature medicine*, Vol. 13, No. 5, S. 619–624.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R. J. (2008) "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy", *The Journal of cell biology*, Vol. 183, No. 5, S. 795–803.

- Neagoe, C., Kulke, M., del Monte, F., Gwathmey, J. K., Tombe, P. P. de, Hajjar, R. J. & Linke, W. A. (2002) "Titin isoform switch in ischemic human heart disease", *Circulation*, Vol. 106, No. 11, S. 1333–1341.
- Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K. & Matsuda, N. (2012) "PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria", *Nature communications*, Vol. 3, S. 1016.
- Park, J.-I., Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., McLaughlin, M., Veenstra, T. D., Nusse, R., McCrea, P. D. & Artandi, S. E. (2009) "Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin", *Nature*, Vol. 460, No. 7251, S. 66–72.
- Piepoli, M. F., Corrà, U., Dendale, P., Frederix, I., Prescott, E., Schmid, J. P., Cupples, M., Deaton, C., Doherty, P., Giannuzzi, P., Graham, I., Hansen, T. B., Jennings, C., Landmesser, U., Marques-Vidal, P., Vrints, C., Walker, D., Bueno, H., Fitzsimons, D. & Pelliccia, A. (2016) "Challenges in secondary prevention after acute myocardial infarction: A call for action", *European journal of preventive cardiology*, Vol. 23, No. 18, S. 1994–2006.
- Prado, L. G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C. A. & Linke, W. A. (2005) "Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles", *The Journal of General Physiology*, Vol. 126, No. 5, S. 461–480.
- Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S. & Jung, Y.-K. (2013) "Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan", *Nature communications*, Vol. 4, S. 2300.
- 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", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 287, No. 35, S. 29273–29284.
- 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. O., 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", *Physiological reviews*, Vol. 90, No. 4, S. 1383–1435.
- Robert Koch-Institut (2015) *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*.
- Rosen, J., Jakobs, P., Ale-Agha, N., Altschmied, J. & Haendeler, J. (2020) "Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase - Impact on redox homeostasis", *Redox biology*, Vol. 34, S. 101543.
- Sandri, M. (2013) "Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome", *The international journal of biochemistry & cell biology*, Vol. 45, No. 10, S. 2121–2129.
- Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P. & Bonaldo, P. (2013) "Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies", *Journal of cell science*, Vol. 126, Pt 23, S. 5325–5333.
- Santos, J. H., Meyer, J. N., Skovvaga, M., Annab, L. A. & van Houten, B. (2004) "Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage", *Aging cell*, Vol. 3, No. 6, S. 399–411.
- Santos, J. H., Meyer, J. N. & van Houten, B. (2006) "Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis", *Human molecular genetics*, Vol. 15, No. 11, S. 1757–1768.
- Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2011) "Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology", *Trends in biochemical sciences*, Vol. 36, No. 1, S. 30–38.
- Schleicher, M., Shepherd, B. R., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Pan, Y., Acevedo, L. M., Shadel, G. S. & Sessa, W. C. (2008) "Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence", *The Journal of cell biology*, Vol. 180, No. 1, S. 101–112.
- Serini, G. & Gabbiani, G. (1999) "Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation", *Experimental cell research*, Vol. 250, No. 2, S. 273–283.
- Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H. & Dikic, I. (2013) "Ubiquitination and selective autophagy", *Cell death and differentiation*, Vol. 20, No. 1, S. 21–30.
- Shay, J. W. & Wright, W. E. (2005) "Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase", *Carcinogenesis*, Vol. 26, No. 5, S. 867–874.
- Shibutani, S. T. & Yoshimori, T. (2014) "A current perspective of autophagosome biogenesis", *Cell research*, Vol. 24, No. 1, S. 58–68.

- Shirakabe, A., Ikeda, Y., Sciarretta, S., Zablocki, D. K. & Sadoshima, J. (2016) "Aging and Autophagy in the Heart", *Circulation research*, Vol. 118, No. 10, S. 1563–1576.
- Smith, L. L., Collier, H. A. & Roberts, J. M. (2003) "Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation", *Nature cell biology*, Vol. 5, No. 5, S. 474–479.
- Soundararajan, M. & Kannan, S. (2018) "Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin?", *Journal of cellular physiology*, Vol. 233, No. 12, S. 9099–9109.
- Suen, D.-F., Narendra, D. P., Tanaka, A., Manfredi, G. & Youle, R. J. (2010) "Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 107, No. 26, S. 11835–11840.
- Sun, Y. & Weber, K. T. (2000) "Infarct scar: a dynamic tissue", *Cardiovascular research*, Vol. 46, No. 2, S. 250–256.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. & Ohsumi, Y. (2001) "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation", *The EMBO journal*, Vol. 20, No. 21, S. 5971–5981.
- Suzuki, S. W., Onodera, J. & Ohsumi, Y. (2011) "Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction", *PloS one*, Vol. 6, No. 2, e17412.
- Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. (2008) "LC3 and Autophagy", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 445, S. 77–88.
- Trombitás, K., Freiburg, A., Greaser, M., Labeit, S. & Granzier, H. (2000) "From connecting filaments to co-expression of titin isoforms", *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 481, S. 405–418.
- Trombitás, K., Greaser, M., French, G. & Granzier, H. (1998) "PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10", *Journal of structural biology*, Vol. 122, 1-2, S. 188–196.
- Trombitás, K., Greaser, M., Labeit, S., Jin, J. P., Kellermayer, M., Helmes, M. & Granzier, H. (1998) "Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments", *The Journal of cell biology*, Vol. 140, No. 4, S. 853–859.
- Tskhovrebova, L. & Trinick, J. (2010) "Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere", *Journal of biomedicine & biotechnology*, Vol. 2010, S. 612482.

- Venugopal, H., Hanna, A., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. (2022) "Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction", *Cells*, Vol. 11, No. 9.
- Vrancken Peeters, M. P., Gittenberger-de Groot, A. C., Mentink, M. M. & Poelmann, R. E. (1999) "Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium", *Anatomy and embryology*, Vol. 199, No. 4, S. 367–378.
- Wallace, D. C. (2010) "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging", *Environmental and molecular mutagenesis*, Vol. 51, No. 5, S. 440–450.
- Wang, G., Huang, W., Cui, S., Li, S., Wang, X., Li, Y., Chuai, M., Cao, L., Li, J., Lu, D. & Yang, X. (2015) "Autophagy is involved in high glucose-induced heart tube malformation", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, Vol. 14, No. 5, S. 772–783.
- Wikstrom, M. K. (1977) "Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria", *Nature*, Vol. 266, No. 5599, S. 271–273.
- Wu, R. A., Semlow, D. R., Kamimae-Lanning, A. N., Kochenova, O. V., Chistol, G., Hodskinson, M. R., Amunugama, R., Sparks, J. L., Wang, M., Deng, L., Mimoso, C. A., Low, E., Patel, K. J. & Walter, J. C. (2019) "TRAIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair", *Nature*, Vol. 567, No. 7747, S. 267–272.
- Wu, R. A., Upton, H. E., Vogan, J. M. & Collins, K. (2017) "Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis", *Annual review of biochemistry*, Vol. 86, S. 439–460.
- Xie, M., Morales, C. R., Lavandero, S. & Hill, J. A. (2011) "Tuning flux: autophagy as a target of heart disease therapy", *Current opinion in cardiology*, Vol. 26, No. 3, S. 216–222.
- Yang, C., Przyborski, S., Cooke, M. J., Zhang, X., Stewart, R., Anyfantis, G., Atkinson, S. P., Saretzki, G., Armstrong, L. & Lako, M. (2008) "A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 26, No. 4, S. 850–863.
- Yoshii, S. R. & Mizushima, N. (2017) "Monitoring and Measuring Autophagy", *International journal of molecular sciences*, Vol. 18, No. 9.
- Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M. & Sadoshima, J. (2011) "Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion", *Circulation research*, Vol. 109, No. 5, S. 502–511.

- Zhang, D., Wang, W., Sun, X., Xu, D., Wang, C., Zhang, Q., Wang, H., Luo, W., Chen, Y., Chen, H. & Liu, Z. (2016) "AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388", *Autophagy*, Vol. 12, No. 9, S. 1447–1459.
- Zhang, Y., Qi, H., Taylor, R., Xu, W., Liu, L. F. & Jin, S. (2007) "The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains", *Autophagy*, Vol. 3, No. 4, S. 337–346.
- Ziviani, E. & Whitworth, A. J. (2010) "How could Parkin-mediated ubiquitination of mitofusin promote mitophagy?", *Autophagy*, Vol. 6, No. 5, S. 660–662.
- Zurek, M., Altschmied, J., Kohlgrüber, S., Ale-Agha, N. & Haendeler, J. (2016) "Role of Telomerase in the Cardiovascular System", *Genes*, Vol. 7, No. 6.

7 Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei meiner geschätzten Professorin, Frau Martina Krüger, für die immer offene Tür, ihre inspirierende Anleitung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Ihre Geduld, die wertvollen Ratschläge und Ihr fachkundiges Feedback haben meine Arbeit wesentlich bereichert und mich auf meinem akademischen Weg vorangebracht.

Ebenso möchte ich meiner Koproffessorin, Frau Judith Haendeler und Herrn Prof. Joachim Altschmied, meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ihre fachliche Expertise und Ihre offene Herangehensweise haben dieses Kooperationsprojekt überhaupt erst möglich gemacht. Ein besonderer Dank gebührt auch meinem Betreuer, Herrn PD Sebastian Kötter, der mich während der gesamten Arbeit mit Geduld und Expertise begleitet hat. Seine fachliche Unterstützung und seine ermutigenden Worte haben dazu beigetragen, dass ich die Herausforderungen dieser Forschungsreise erfolgreich gemeistert habe. Mein Dank gilt auch Sabine Bongardt. Ihre Kenntnisse und praktischen Erfahrungen haben mir die Zeit im Labor unvergesslich gemacht. Ohne das Vertrauen und die Ermutigung dieser Menschen, wäre die Anfertigungen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke Ihnen von Herzen für Ihre Zeit, Ihr Engagement und Ihre Wertschätzung.

Zudem gilt mein Dank Dr. Isabell Sattler und Felix Niemeyer, die diese Arbeit mit viel Liebe und Herz korrigiert und perfektioniert haben!

Zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie – ganz besonders Mummy and Daddy, bedanken, die mich in all meinen Projekten unterstützt und immer ermutigt haben. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin! Danke, dass ihr so viel für mich ermöglicht habt.

Für Biggy:

mischief managed!