

Aus dem Institut der Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

**Altersabhängige Veränderungen der kontraktilen Eigenschaften und
der Proteinqualitätskontrolle in einem Mausmodell mit
hypertropher Kardiomyopathie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patricia Klammer

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Joachim Schmitt

Zusammenfassung

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste hereditäre Herzmuskelerkrankung. Sie zeichnet sich durch eine häufig asymmetrische, ventrikuläre Hypertrophie, eine Hyperkontraktilität und eine verminderte diastolische Dehnbarkeit aus. Jedoch ist wenig über die Pathogenese der Erkrankung bekannt. HCM-auslösenden Mutationen liegen häufig in Sarkomerproteinen und können in der stetig kontrahierenden Herzmuskelzelle mechanischen Stress auslösen, weshalb das Proteinqualitätskontrollsystem (PQC) als Faktor in der Pathogenese der HCM diskutiert wird. Ebenfalls könnte Titin als Hauptdeterminante der passiven Dehnbarkeit der Sarkomere maßgeblich für die verminderte diastolische Dehnbarkeit verantwortlich sein.

In diesem Projekt wurde diesen Fragen mit einem Mausmodell der HCM mit der heterozygot vorliegenden Myosinmutation R453C (RC) nachgegangen. Die Mäuse wurden in eine jüngere-prodromale (11 w) und eine ältere-erkrankte (38 – 43 w) Gruppe mit jeweils gleichaltrigen Kontrolltieren (WT) unterteilt, um eine bessere Einordnung der Ergebnisse in den zeitlichen Verlauf der Pathogenese der HCM zu ermöglichen. An Gewebestreifen der Papillarmuskeln wurden biomechanische Analysen zur Erhebung der passiven und kalziumabhängigen aktiven Kraftentwicklung sowie der Kalziumsensitivität durchgeführt. Außerdem wurden ausgewählte Marker der Proteinqualitätskontrolle, die Troponin I Phosphorylierung, posttranslationale Veränderungen des Titins, die PKC α Aktivität sowie die Zusammensetzung der Titinisoformen durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die biomechanischen Parameter zeigten sich unverändert für die älteren RC-Mäuse. Ebenso war die passive Steifigkeit jeweils nicht zwischen den RC- und gleichaltrigen WT-Mäusen verändert. Jedoch waren die jüngeren RC-Mäuse hyperkontraktil und die Kalziumsensitivität war erhöht. Bei den Parametern der Proteinqualitätskontrolle zeigte sich nur bei den älteren RC-Mäusen eine erhöhte Gesamt- und Titin-Ubiquitinierung. Dies deutet auf einen erhöhten Proteinumsatz hin. Defekte im Proteinabbau konnten durch eine Erhöhung des Autophagie-Adapterprotein p62 sowohl in den jungen als auch älteren RC-Mäusen nachgewiesen werden. Bei der Zusammensetzung der Titinisoformen zeigte sich bei den älteren RC-Mäusen eine erhöhte Expression der elastischeren N2BA-Isoform. Die versteifende Phosphorylierung am Serinrest S11878 im Titin war ebenfalls für die älteren RC-Mäuse tendenziell erhöht.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Hyperkontraktilität und die erhöhte Kalziumsensitivität in Mäusen mit HCM altersabhängig ist und nicht in allen Stadien der HCM vorliegt. Die gesteigerte Kontraktilität könnte im weiteren Krankheitsverlauf den Bedarf für einen kontinuierlichen Proteinumsatz in einem kritischen Maße erhöhen und den Proteinabbau gestört haben. Die unterschiedlichen Veränderungen am Titin scheinen sich funktionell auszugleichen, da die passive Steifigkeit der Muskelpräparate unverändert blieb. Das deutet darauf hin, dass Titin nicht für die verminderte diastolische Dehnbarkeit der Herzen mit der Myosinmutation R453C verantwortlich ist.

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common hereditary heart muscle disease. It is characterized by an often asymmetric ventricular hypertrophy, hypercontractility and reduced diastolic distensibility. However, little is known about the pathogenesis of the disease. HCM-causing mutations are often located in sarcomere proteins and can trigger mechanical stress in the continuously contracting myocardial cell, therefore the protein quality control system (PQC) is currently discussed as a factor in the pathogenesis of HCM. Titin as the main determinant of the passive distensibility of the sarcomeres could be significantly involved in the reduced diastolic distensibility.

In this project, a mouse model of HCM with the heterozygous myosin mutation R453C (RC) was analysed. The mice were divided into a younger-prodromal (11 w) and an older-diseased (38 – 40 w) group, each with littermates of the same age (WT). Analysis of tissue samples from these groups allow a better classification of the temporal course of the pathogenesis of HCM. Biomechanical analyses were performed on tissue strips of the papillary muscles to determine passive and calcium-dependent active force development as well as calcium sensitivity. In addition, markers of protein quality control, troponin I phosphorylation, post-translational modification of titin, PKC α activity and the composition of titin isoforms were analysed by SDS-PAGE and Western blot.

The biomechanical parameters remained unchanged for the older RC mice. Additionally, passive stiffness was not altered between the RC and WT mice of the same age, respectively. However, the younger RC mice were hypercontractile and calcium sensitivity was increased. Protein quality control parameters showed increased total and titin ubiquitination only in the older RC mice. This indicates an increased protein turnover. Defects in protein degradation were detected by an increase in the autophagy adapter protein p62 in both the young and older RC mice. The composition of the titin isoforms showed an increased expression of the more elastic N2BA isoform in the older RC mice. The titin phosphorylation site at S11878, which is associated with a stiffer titin showed a trend towards increased phosphorylation in samples from older RC mice.

The results allow to conclude that the hypercontractility and increased calcium sensitivity in mice with HCM is age-dependent and not present in all stages of HCM. The increased contractility may have increased the need for continuous protein turnover to a critical degree in the further course of the disease and disrupted protein degradation. The different changes in titin appear to be functionally balanced, as the passive stiffness of the muscle preparations remains unchanged. This indicates that titin is not responsible for the reduced diastolic extensibility of hearts with the myosin mutation R453C.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	F _{max}	maximale Kraft
Abb.	Abbildung	g	Gramm
ADP	Adenosindiphosphat	HCl	Salzsäure
AMP	Adenosinmono- phosphat	HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
AMPK	AMP-abhängige Kinase	HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>		
APS	Ammoniumpersulfat	Hsp	Hitzeschockprotein
AS	Aktivierungslösung	I-Band	Isotropes Band
ATG	<i>autophagy related</i>	Ig	<i>immunoglobuline like</i>
ATP	Adenosintriphosphat	l	Liter
BDM	2,3- Butandionmonoxim	LC3	<i>microtubule- associated protein 1 light chain 3</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	mA	Milliampere
CaMKIIδ	Kalzium-Calmodulin- abhängige Proteinkinase II, Isoform δ	M	Molar
		MDa	Megadalton
		mg	Milligramm
		ml	Milliliter
CrP	Kreatinphosphat	mM	Millimol
CSA	<i>cross sectional area</i>	mm ²	Quadratmillimeter
D	Dalton	mN	Millinewton
DCM	dilatative Kardiomyopathie	mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
DRX	<i>disordered relaxed state</i>	MyBP-C	<i>cardiac myosin binding protein C</i>
DTT	Dithiothreitol	MYH7	<i>myosin heavy chain 7</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration	Myh6	<i>myosin heavy chain 6</i>
EGTA	Ethylenglykol- tetraessigsäure	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
ERK2	<i>extracellular signal regulated-kinase-2</i>	PKA	Proteinkinase A
		PKB	Proteinkinase B
		PKC	Proteinkinase C
Et al.	<i>Et alii</i>	PKG	Proteinkinase G

PQC	Proteinqualitäts- kontrolle	WT11	Wildtyp, 11 Wochen alt
PSMA	<i>proteasome subunit alpha</i>	WT38	Wildtyp, 38 - 43 Wochen alt
PVDF	Polyvinylidenflourid	µg	Mikrogramm
RC	R453C	µl	Mikroliter
RC11	R453C/+ Mäuse, 11 Wochen alt		
RC38	R453C/+ Mäuse, 38- 43 Wochen alt		
ROS	<i>reactive oxygen species</i>		
rpm	<i>rounds per minute</i>		
RS	Relaxationslösung		
s	Sekunde		
S	Svedberg		
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>		
SEM	<i>Standard error of the mean</i>		
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>		
SRX	<i>super relaxed state</i>		
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>		
TEMED	Tetramethyl- ethylendiamin		
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan		
ULK	<i>Unc-51-like autophagy-activating kinase</i>		
UPS	Ubiquitin-Proteasom- System		
V	Volt		
W	Wochen		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Muskelmechanik.....	1
1.1.1	Aufbau des Sarkomers.....	1
1.1.2	Kontraktile Eigenschaften.....	3
1.2	Titin.....	5
1.2.1	Grundlagen zu Titin	5
1.2.2	Titin Isoformen	6
1.2.3	Posttranslationale Modifikationen am Titin.....	7
1.3	Die Proteinqualitätskontrolle	9
1.3.1	Bedeutung	9
1.3.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	9
1.3.3	Autophagosom-Lysosom-System	10
1.3.4	Hitzeschockproteine.....	12
1.3.5	Titin im PQC.....	13
1.4	Die hypertrophe Kardiomyopathie	14
1.5	Ziele der Arbeit	18
2	Material.....	20
2.1	Primärantikörper	20
2.2	Sekundärantikörper.....	21
2.3	Chemikalien.....	21
2.4	Puffer und Lösungen.....	22
2.5	Laborgeräte	24
2.6	Verbrauchsmaterialien.....	25
3	Methoden	26
3.1	Probenherkunft	26
3.2	Biomechanische Analyse	27
3.3	Biochemische Analyse.....	30
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis	35
4.2	Kraftmessungen	36

4.3	Isoformen	39
4.4	Posttranslationale Modifikationen des Titins.....	40
4.5	Proteinkinasen.....	43
4.6	Repräsentanten der Proteinqualitätskontrolle	44
5	Diskussion.....	51
5.1	Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis	51
5.2	Passive Steifigkeit.....	52
5.2.1	Zusammensetzung der Titinisoformen	52
5.2.2	Titin-Phosphorylierung und mögliche Gründe	53
5.2.3	Physikalische Messung der passiven Steifigkeit	55
5.3	Kontraktile Eigenschaften.....	57
5.3.1	Maximale Kraft.....	57
5.3.2	Kalziumsensitivität	58
5.3.3	Längenabhängige Aktivierung.....	60
5.4	Proteinqualitätskontrolle	61
5.4.1	Gesamt-Ubiquitinierung	61
5.4.2	Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	62
5.4.3	Autophagosom-Lysosom-System	62
5.4.4	Das Hitzeschockprotein α B-Crystallin.....	64
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	67
	Literatur und Quellenverzeichnis.....	68
	Anhang.....	85
	Abbildungsverzeichnis	85
	Tabellenverzeichnis	85

1 Einleitung

1.1 Muskelmechanik

1.1.1 Aufbau des Sarkomers

Um die Pathophysiologie der hier erforschten hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) verstehen zu können, ist ein grundlegendes Verständnis des physiologischen Sarkomers und der beteiligten Strukturen essenziell. Beim Sarkomer handelt es sich um die kleinste kontraktile Einheit im Muskel. Es wird unterteilt in drei Hauptkomponenten: die dicken Myosinfilamente, die dünneren Aktinfilamente und das elastische Titinfilament. Der Aufbau ist stark strukturiert und repetitiv. Die Z-Scheiben begrenzen jeweils ein Sarkomer. Diese Z-Scheibe besteht hauptsächlich aus α -Aktinin. Sie wird umgeben von einer elektronenmikroskopisch helleren I-Bande (*isotrop*), welche die Aktinfilamente enthält. Daneben liegt die A-Bande (*anisotrop*), in welcher die Myosinmoleküle liegen. Die Aufhängung des Myosins ist zusätzlich als M-Linie zu erkennen (Pape et al., 2023)(Abb. 1).

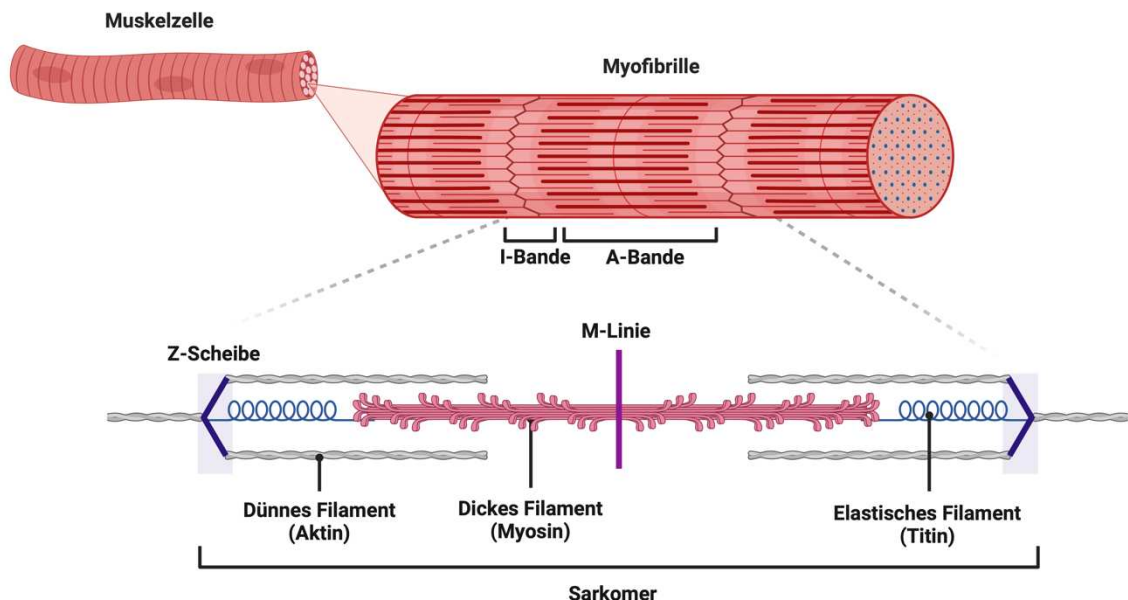


Abb. 1 Schematische Übersicht über ein Sarkomer

Schematische Zeichnung des Aufbaus und der Lage eines Sarkomers. Erstellt mit BioRender.com. I-Bande = isotrope Bande, A-Bande = anisotrope Bande.

Myosin

Das Myosin ist das Kraft generierende Protein des kontraktilen Apparates. Es setzt sich zusammen aus zwei schweren Ketten und vier Leichtketten, je zwei regulatorische und zwei essenzielle Leichtketten (Abb. 2). Es wird in eine Schaft-, Hals- und Kopfregion eingeteilt. Der Schaft, der von der schweren Kette gebildet wird, bindet an weitere Myosine und bildet mit ca. 300 Myosinmolekülen ein Myosinfilament. In seiner Kopfregion verfügt das Myosin über ein ATPase, welche die Energie zum Kraftschlag bereitstellt. Diese ATPase kann in ihrer Aktivität von der regulatorischen Leichtkette beeinflusst werden. In der Kopfregion befindet sich ebenfalls die Aktin Bindungsstelle. Das ATP (Adenosintriphosphat) wird benötigt, um die

Aktin-Myosin-Bindung wieder voneinander zu lösen (Pape et al., 2023). Das Myosinfilament ist außerdem mit 3 - 6 Titinmolekülen assoziiert. Das Titin zentriert das Myosin im Sarkomer und sorgt für eine symmetrische Verkürzung des Sarkomers (Horowitz and Podolsky, 1987, Horowitz et al., 1986). Dem Myosinfilament ist in regelmäßigen Abständen Myosin-bindenden Protein C (MyBP-C) angelagert, das unter anderem die Aktin-Myosin-Bindung reguliert (Pape et al., 2023).

Relaxiertes Myosin kann in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen, im *super relaxed state* (SRX) oder im *disordered relaxed state* (DRX) (Stewart et al., 2010). Um kalziumabhängig aktiviert werden zu können, muss Myosin im DRX vorliegen (Cooke, 2011). Während einer Kontraktion werden demnach nicht alle Myosine rekrutiert (Spudich, 2014). Der SRX stellt eine Art Reserve dar, die dem Myokard bei Stress oder in pathologischen Situationen wie beispielsweise einer Hypoxie dazu geschaltet werden kann (Nag and Trivedi, 2021).

HCM-assoziierte Myosinmutation R453C

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell trägt heterozygot die Myosinmutation R453C (RC). Sie ist eine der vielen genetischen Veränderungen, die eine HCM verursachen kann. Die Mutation befindet sich beim Menschen im *MYH7* Gen, welches für die β -Myosin-Schwerkette codiert (Watkins et al., 1992)(Abb. 2). Da Mäuse anderes als Menschen stärker die α -Myosin Isoform exprimieren, wurde in dem verwendeten Mausmodell die RC-Mutation in das *Myh6* Gen für die α -Isoform eingesetzt (Palmer et al., 2004, Alpert et al., 2002). Der Phänotyp dieses Mausmodells wurde in vorangegangenen Studien charakterisiert (Blankenburg et al., 2014). Es zeigte sich, dass die heterozygoten Mäuse genauso lange lebten wie die Wildtypen, wohingegen die homozygoten Mäuse innerhalb weniger Tage nach der Geburt starben.

Bei der *Missense* Mutation ist an der 453. Aminosäure der schweren Myosinkette Arginin (= R im Buchstabencode der Aminosäuren) gegen Cystein (= C) getauscht, demnach wird eine neutrale Aminosäure statt einer positiv-geladenen exprimiert (Watkins et al., 1992). Generell haben HCM-Patienten mit einer Mutation, die die Ladung der exprimierten Aminosäure verändert, eine schlechtere Prognose als HCM-Patienten, die eine Mutation tragen, bei der die Ladung der exprimierten Aminosäure unverändert bleibt (Anan et al., 1994). Watkins et al. gaben 1992 das mittlere Sterbealter für Patienten mit der RC-Mutation mit 33 Jahren an.

Räumlich befindet sich das Arginin 453 nahe der ATP-Bindungsstelle am Rand der ATP-Bindungstasche im Myosinkopf (Rayment et al., 1995).

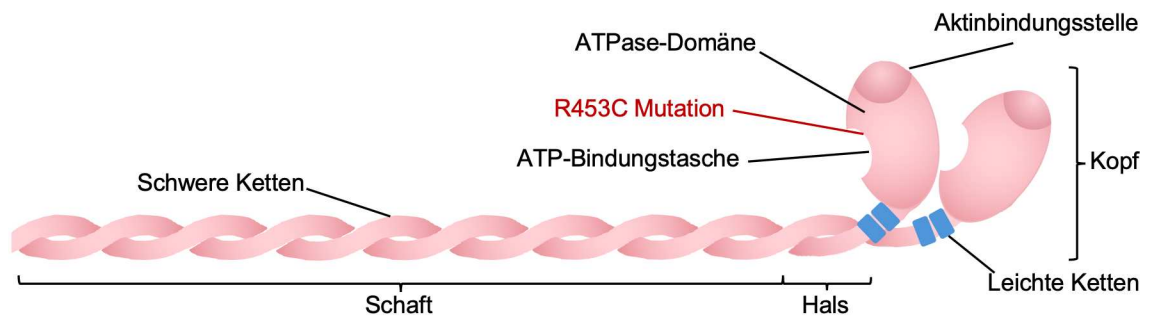


Abb. 2 Schemazeichnung eines Myosinmoleküls

Schematisch dargestellt ist ein Myosinmolekül. Die zentralen, an der Krafterzeugung beteiligten Strukturen sind beschriftet. Zusätzlich ist die Lokation der R453C-Mutation in der Kopfregion des Moleküls angedeutet. ATP = Adenosintriphosphat.

Aktin, Troponin und Tropomyosin

Das Aktinfilament ist ein helikaler Proteinfaden, der aus vielen zusammengelagerten Aktin Monomeren besteht. Daran sind Tropomyosin und der Troponin Komplex angelagert. Der Troponin Komplex hat drei Komponenten: das Troponin-C, welches reversibel Kalziumionen bindet, das Troponin-I, welches bei niedrigen Kalziumkonzentrationen die Aktin-Myosin-Interaktion verhindert, und das Troponin T, das die Bindungsstelle zum Tropomyosin bildet (Ebashi and Endo, 1968, Pape et al., 2023). Steigt intrazellulär die Kalziumkonzentration an, bindet Kalzium an das Troponin C und der Komplex gibt die Aktin-Myosin-Interaktionsstelle frei (Ebashi and Endo, 1968). Diese Moleküle werden nicht nur unmittelbar für die elektromechanische Kopplung benötigt, sie können auch zur Modifikation der Herzkraft verwendet werden. Das Troponin I wird beispielsweise durch die PKA nach β -adrenerge Stimulation phosphoryliert und damit nimmt die Kalziumsensitivität ab (Solaro et al., 1976, Kranias and Solaro, 1982). Diese Phosphorylierung trägt zum positiv lusitropen Effekt des Sympathikus bei (Layland et al., 2005).

1.1.2 Kontraktile Eigenschaften

Passive Steifigkeit

Wird ein Muskel aus dem Organismus herausgenommen, nimmt er eine Gleichgewichtslänge ein. Im Körper ist der Muskel leicht über diese Länge hinaus vorgedehnt. Dehnt man einen Muskel weiter als seine Gleichgewichtslänge, entstehen elastische Rückstellkräfte, die hier auch als passive Steifigkeit bezeichnet werden. Diese Rückstellkräfte steigen bei Dehnung in etwa exponentiell an. Die Rückstellkraft des Ventrikelmyokards speichert während der Füllung beziehungsweise Dehnung des Ventrikels Energie, die in der Systole zur Kontraktion beiträgt (Linke, 2018).

Titin und Kollagen sind die Hauptdeterminanten der passiven Steifigkeit von Herzmuskelgewebe. Titin macht dabei bis zu 70 % der passiven Steifigkeit aus (Granzier and Irving, 1995). In geringerem Maße wird die zelluläre passive Steifigkeit zudem von dem Mikrotubuli Netzwerk, Aktin und dem Intermediärfilament System beeinflusst. Der jeweilige Anteil an der passiven Steifigkeit variiert je nachdem, wie stark der Kardiomyozyt gedehnt

wird. Bei hohen Dehnungskräften sind auch die extrazelluläre Matrix und das Sarkolemm beteiligt (Loescher et al., 2023).

Elektromechanische Kopplung

Die rhythmische Erregung des Herzens ist an die schwankende zytosolische Kalziumkonzentration gebunden. Ausgelöst durch ein Aktionspotential, steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration von 10^{-7} mol/l auf bis zu 10^{-5} mol/l (Pape et al., 2023). Für die Relaxation wird das intrazelluläre Kalzium überwiegend durch die Ca^{2+} -ATPase SERCA (*sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase*) in das sarkoplasmatische Retikulum zurück gepumpt. Ein Teil des Kalziums wird auch über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und Ca^{2+} ATPasen in den Extrazellularraum transportiert. Somit wird ATP nicht nur für den Kraftschlag, sondern auch zur Relaxation benötigt (Pape et al., 2023, Ebashi and Endo, 1968).

Frank Starling Mechanismus und längenabhängige Aktivierung

Der Frank Starling Mechanismus beschreibt, dass die entwickelte Muskelspannung mit erhöhter Vordehnung steigt. Anders gesagt, erhöht sich das Schlagvolumen bei verstärkter Ventrikelfüllung aufgrund der höheren Vorlast beziehungsweise dem höheren enddiastolischen Druck. Dies ist ein wichtiger, sehr kurzfristiger Anpassungsmechanismus für Änderungen der Volumenbelastung des Herzens bei beispielsweise dem Wechsel vom Stehen ins Liegen (Pape et al., 2023).

Die molekularen Ursachen des Frank Starling Mechanismus, der auch als längenabhängige Aktivierung bezeichnet wird, liegen im Sarkomer (Kobirumaki-Shimozawa et al., 2014). Dabei gibt es mehrere Faktoren, die im Zusammenspiel den Mechanismus ermöglichen. Eine Ursache ist die Steigerung der Kalziumpsensitivität der Kardiomyozyten im gedehnten Zustand (Fabiato and Fabiato, 1978). Auch Titin ist beim Frank Starling Mechanismus involviert und es wird vermutet, dass die Myosinköpfe durch die Dehnung am Titin optimaler zum Aktin ausgerichtet werden (Kawai and Jin, 2021). Jedenfalls ist bekannt, dass, wenn Titin ausgeschaltet wird, der Kraftzuwachs bei Dehnung deutlich geringer ausfällt (Fukuda et al., 2001). Ebenfalls trägt zum Frank Starling Mechanismus bei, dass mehr Myosinmoleküle vom SRX in den DRX aktiviert werden (Irving, 2017, Kawai and Jin, 2021). Insgesamt gibt es also mehrere Komponenten, die gemeinsam den Frank Starling Mechanismus erzeugen.

1.2 Titin

1.2.1 Grundlagen zu Titin

Eine verminderte diastolische Dehnbarkeit des Ventrikels gilt als zentraler Aspekt der HCM. Als Hauptdeterminanten der myokardialen Dehnbarkeit werden Titin und Kollagen angesehen, weshalb Veränderungen am Titin möglicherweise für die verminderte Dehnbarkeit verantwortlich sind (Granzier and Irving, 1995). Außerdem wird eine Beteiligung an der Pathogenese dadurch nahegelegt, dass einige hereditäre Fälle der HCM durch eine Titin Mutation ausgelöst wurden (Satoh et al., 1999, Higashikuse et al., 2019).

Die Struktur von Titin

Titin ist im Sarkomer zwischen der Z-Scheibe und der M-Linie aufgespannt und umfasst damit ein halbes Sarkomer (Furst et al., 1988). Durch den weiten Bereich, über den ein Titinmolekül gespannt werden muss, ist Titin mit maximalen 4,2 MDa das größte Protein im menschlichen Körper (Bang et al., 2001). In der Z-Scheibe liegt der N-Terminus und enthält sich wiederholende *Immunoglobuline-like* (Ig) Domänen (Gautel et al., 1996). Hier ist es über eine Bindung zu α -Aktinin in der Z-Scheibe verankert (Sorimachi et al., 1997). Darauf folgt der elastische Abschnitt in der I-Bande. Der I-Band Abschnitt enthält eine proximale, mittlere und distale Ig-Domäne, dazwischen liegen die N2B *unique sequence* Region (N2Bus) und die PEVK-Domäne. Die PEVK-Domäne erhielt ihren Namen, weil sie zu 70 % aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) besteht. Die N2B-Domäne befindet sich nur im kardialen Titin (Kötter and Krüger, 2022). Wird neben der N2B-Region auch das N2A Element exprimiert, liegt die N2BA-Isoform vor (Labeit and Kolmerer, 1995). Der A-Band Anteil des Titins ist eher steif. Er besteht aus weiteren Ig Domänen und Fibronektin TypIII Domänen (FN3). Der A-Band Abschnitt von Titin ist eng mit den Myosinfilamenten assoziiert und sorgt so für einen geordneten Aufbau des Sarkomers. Zuletzt folgt das C-terminale Ende von Titin am M-Band. Hier liegen weitere Ig Domänen und eine Titin Kinase.

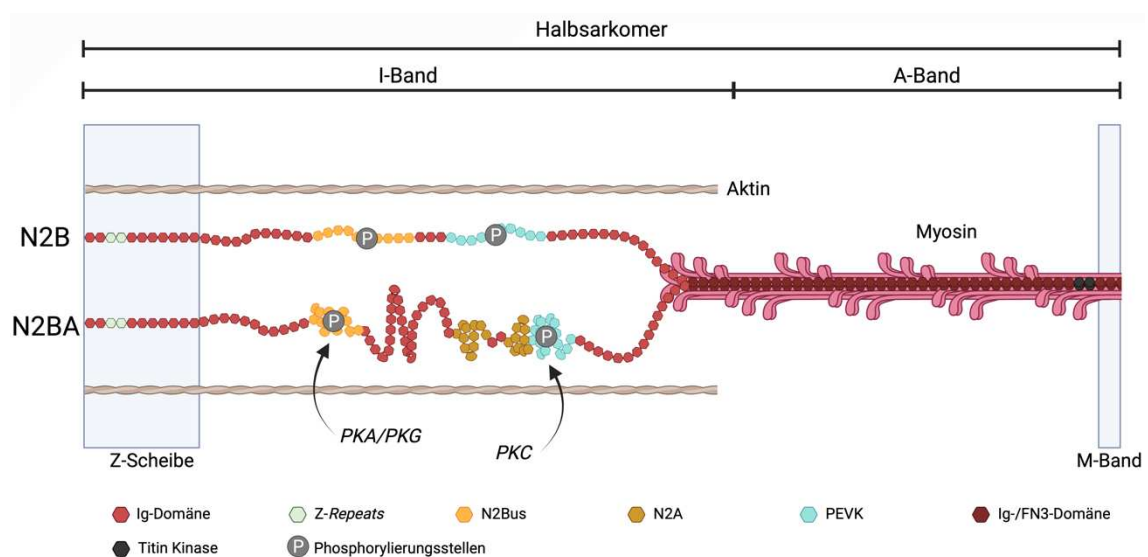


Abb. 3 Schematische Struktur von Titin im Halbsarkomer

Schemazeichnung der Struktur der beiden kardialen Titinisoformen N2B und N2BA in einem Halbsarkomer gemeinsam mit zwei möglichen Phosphorylierungsregionen und den dazugehörigen Kinasen. Erstellt mit BioRender.com. Ig = *Immunoglobulin-like*, FN3 = Fibronektin TypIII, PKA = cAMP-abhängige Proteinkinase A, PKG = cGMP-abhängige Proteinkinase G, PKC = Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C.

Die Rolle von Titin im Sarkomer

Durch die zentrale Lage im Sarkomer erfüllt Titin eine Vielzahl an Aufgaben. Erstens dient es als Leitstruktur für den regelmäßigen Aufbau des Sarkomers und zentriert das Myosin im Sarkomer (Kötter and Krüger, 2022, Tskhovrebova and Trinick, 2004, Lange et al., 2006). Zweitens dient Titin als molekulare Sprungfeder und gilt als Hauptdeterminante der passiv elastischen Rückstellkraft (Loescher et al., 2023, Granzier and Irving, 1995). Molekular gesehen entsteht dies durch Entfaltung bei Zug auf das Molekül und Rückfaltung in die ursprüngliche Konformation, wenn der Zug beendet wird (Minajeva et al., 2001). Die elastischen Anteile in der I-Bande sind jedoch nicht alle gleich elastisch (Linke et al., 1996). Den größten Anteil der Elastizität haben die PEVK-Domäne und die N2B-Region (Linke et al., 1996). Diese I-Band Regionen haben sich auch als Schwerpunktgebiet für sekundäre Modifikationen herausgestellt. Drittens ist Titin Umschlagpunkt verschiedener Signalwege. Ein Beispiel hierfür ist das FHL1/2 (*four-and-a-half-LIM-domain-protein*). Es ist mit der N2B-Region assoziiert (Lange et al., 2002). Der Signalkomplex rund um FHL1/2 kann vermutlich als Reaktion auf mechanischen Stress eine Hypertrophie induzieren (Kruger and Linke, 2011). Im FHL *knock-out* Modell bleibt eine Hypertrophie nach Druckbelastung aus (Sheikh et al., 2008).

1.2.2 Titin Isoformen

Die passive Rückstellkraft der Kardiomyozyten bzw. der Myofilamente kann langfristig über die Zusammensetzung der Titinisoformen modifiziert werden (Neagoe et al., 2003). Erwiesenermaßen hängt die diastolische Dehnbarkeit mit der Zusammensetzung der Titinisoformen zusammen (Nagueh et al., 2004, Nienkamp et al., 2020). Im Herzen liegen die längere, dehnbarere N2BA- (3,2-3,3 MDa) und die kürzere, steifere N2B- (3,0 MDa) Isoform vor (Freiburg et al., 2000, Kötter and Krüger, 2022). Die N2B- hat im Vergleich zur N2BA-Isoform im I-Band eine kürzere PEVK-Region, weniger mittlere Ig-Domänen und kein N2A-Element (Freiburg et al., 2000, Greaser et al., 2002, Koser et al., 2019).

Im gesunden humanen Herzen beträgt die Titinzusammensetzung N2BA:N2B circa 40 : 60 (Kötter et al., 2013). In Nagetieren wiederum ist der N2BA-Anteil mit 5 – 20 % deutlich geringer (Cazorla et al., 2000). Alle Isoformen werden auf einem Gen codiert und die Differenzierung erfolgt erst durch alternatives *Splicing* (Labeit and Kolmerer, 1995, Bang et al., 2001). Veränderungen der Isoformen sind bereits für eine Reihe von Herzmuskelerkrankungen bekannt. Zum Beispiel ist der N2BA-Anteil in der ischämischen Kardiomyopathie erhöht und zeigt sich mit einer messbaren Reduktion der passiven Steifigkeit (Neagoe et al., 2002). Gleiche Beobachtungen wurde auch für die dilatative Kardiomyopathie (DCM) gemacht (Nagueh et al., 2004).

1.2.3 Posttranslationale Modifikationen am Titin

Phosphorylierungen

Kurzfristiger kann die Steifigkeit des Titin durch Phosphorylierung angepasst werden. Die in dieser Arbeit analysierte Phosphorylierungsstelle am Serin 11878 liegt in der PEVK-Domäne und wird hauptsächlich durch die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase $\text{C}\alpha$ ($\text{PKC}\alpha$) phosphoryliert. Liegt eine Phosphorylierung vor, ist das Titin steifer (Hidalgo et al., 2009). Die $\text{PKC}\alpha$ Aktivität kann durch das Phosphorylierungslevel am Threonin 497 bestimmt werden (Cazaubon et al., 1994, Kötter et al., 2016). Eine Überaktivität der $\text{PKC}\alpha$ in der Pathogenese einer Hypertrophie ist bereits bekannt (Dorn and Force, 2005). Weitere Kinasen, die das S11878 phosphorylieren, sind $\text{CaMKII}\delta$ (Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ) und PKD (Proteinkinase D) (Loescher et al., 2022). Eine andere Phosphorylierungsstelle ist das Serin 4010 in der N2B-Region. Wird dieses Serin durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert, ist die passive Steifigkeit reduziert (Kötter et al., 2013). Neben PKA kann die N2B-Region auch durch PKG (Proteinkinase G), PKD, ERK2 (*extracellular signal regulated-kinase-2*) und $\text{CaMKII}\delta$ phosphoryliert werden (Loescher et al., 2022).

Der theoretische Einfluss dieser Phosphorylierungen ist groß. Durch Phosphorylierungen durch die PKA kann die passive Steifigkeit je nach Sarkomerlänge um bis zu 45 % gesenkt und bei der $\text{PKC}\alpha$ um bis zu 40% erhöht werden (Krüger and Linke, 2006, Hidalgo et al., 2009). Im Sarkomer haben jedoch mehrere Kinasen gleichzeitig einen Einfluss auf die elastischen Titinregionen, weshalb sich die physiologischen Effekte je nach phosphorylierter Region addieren oder ausgleichen können.

Doch warum führt eine Phosphorylierung an zwei verschiedenen Stellen zu einem gegensätzlichen Effekt auf die elastischen Eigenschaften von Titin? Die N2B-Region enthält viele saure Aminosäuren, die zu einer negativen Nettoladung dieses Abschnitts führen. Kommt nun die negativ geladene Phosphatgruppe hinzu, wird vermutet, dass sich die intramolekularen Abstoßungskräfte erhöhen und damit eine Entfaltung des Titins bereits bei geringeren Zugkräften möglich ist. Dem entgegen steht die PEVK-Domäne, die viele basische Aminosäuren enthält, und eine positive Nettoladung hat. Wird nun eine negativ geladene Phosphatgruppe angeknüpft, erhöhen sich die intramolekularen ionischen Anziehungskräfte und zur Entfaltung dieser Domäne wird mehr Energie notwendig (Koser et al., 2019, Kötter et al., 2013).

Glutathion

Glutathion ist das wichtigste Antioxidans der Zelle und schützt damit vor oxidativem Stress. Oxidativer Stress beschreibt die Imbalance zwischen ROS (*reactive oxygen species*) und den intrazellulären antioxidativen Abwehrmechanismen. ROS kommen physiologischerweise in der Zelle vor und entstehen beispielsweise bei der Energiegewinnung aus der Atmungskette in den Mitochondrien. In geringen Mengen sind sie an Signalwegen beteiligt und können unter anderem die kontraktile Funktion steigern (Gao et al., 2012). Fallen ROS nun in größeren Mengen an oder sind die zellulären Abwehrmechanismen erschöpft, kann es zur Schädigung

von DNA, Lipiden und Proteinen kommen. Dass Marker des oxidativen Stresses bei der HCM erhöht sind, konnte schon in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (Zusammengefasst in (Wijnker et al., 2019)), sodass in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Glutathion und Titin untersucht wird.

Wie sich ein oxidatives Umfeld auf die Steifigkeit des Titins auswirkt, kann aktuell nicht exakt gesagt werden. Möglich sind die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen oder das Anhängen von Glutathion an ein Cystein. In Studien zeigte sich das Titin nach Anhängen von Glutathion elastischer, vermutlich werden entfaltete Domänen durch das Glutathion an der Rückfaltung gehindert (Loescher et al., 2020, Alegre-Cebollada et al., 2014). Dem entgegen steht eine Untersuchung von Grüntzer et al., in der eine Verkürzung des Titins durch Disulfidbrücken beobachtet und eine Erhöhung der Steifigkeit vermutet wird (Grützner et al., 2009). In einer weiteren Studie korrelierte eine erniedrigte Menge des reduzierend wirkenden Glutathions mit einer Erhöhung der passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten. Die erhöhte Steifigkeit reduzierte sich durch Zugabe von GSH deutlich (Hassoun et al., 2021). Im Einzelfall lässt sich somit nicht vorhersagen, wie sich ein oxidatives Umfeld auf die Steifigkeit des Titins auswirken wird.

1.3 Die Proteinqualitätskontrolle

1.3.1 Bedeutung

Das Proteinqualitätskontrollsystem (PQC) hält die intrazelluläre Proteinhomöostase aufrecht, indem es die Proteinsynthese, die Faltung, den Zusammenbau, den Transport und die Beseitigung fehlgefalteter oder geschädigter Proteine reguliert. Eine mögliche Entgleisung des Proteinqualitätskontrollsystems bei der HCM wird zurzeit diskutiert, weswegen in der vorliegenden Arbeit einige Aspekte des PQC genauer betrachtet werden (Dorsch et al., 2019a, Wijnker et al., 2019, Hassoun et al., 2021, Predmore et al., 2010). An der PQC beteiligt sind vor allem die Hitzeschockproteine (Hsp), das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und das Autophagosom-Lysosom-System. Das UPS und das Autophagosom-Lysosom-System bilden die wichtigsten Abbauwege von Proteinen (Dorsch et al., 2019b). Zur Vollständigkeit sei hier erwähnt, dass auch Calpain (Ca^{2+} -abhängige, non-lysosomale Cystein Proteasen) und die Zink-abhängige Matrix Metalloprotease 2 (MMP2) am Proteinabbau im Sarkomer beteiligt sind (Kötter and Krüger, 2022).

Gerade in den postmitotischen, kontinuierlich kontrahierenden Myokardzellen ist die Proteinhomöostase essenziell und gleichzeitig sehr herausfordernd, denn Sarkomerproteine haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 5 - 10 Tagen (Dorsch et al., 2019b). Die Aktivität des Proteasoms am Herzen ist im Vergleich zu anderen Organen eine der höchsten (Patel and Majetschak, 2007). Das Proteinqualitätskontrollsystem kann durch das Hinzukommen von mutierten Proteinen und dem damit einhergehenden Stress, wie zum Beispiel oxidativem oder mechanischem Stress, weiter strapaziert werden. Ein Entgleiten der Proteinhomöostase führt zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, was enormen Schaden in der Zelle auslösen kann und ist bereits mit einer kardialen Hypertrophie in Verbindung gebracht (Wang and Hill, 2015).

1.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Ubiquitin

Das UPS wird eher für kleine, intrazellulär gelöste Proteine genutzt (Pohl and Dikic, 2019). Der Abbau über das UPS beginnt damit, dass ein Protein mit einer Polyubiquitinkette zum Abbau markiert wird. Ubiquitin ist ein hoch konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren und wird an ein Lysinrest des abzubauenen Proteins angeknüpft. (Heinrich et al., 2022). Das Ubiquitin kann linear oder verzweigt angehängt werden. Je nachdem, welcher Lysinrest des Ubiquitin verwendet wird, ergibt sich ein Verzweigungsmuster, welches Bindungsstellen für Rezeptoren oder weitere beteiligte Proteine erschafft (Pohl and Dikic, 2019). Zwei wichtige Verzweigungsstellen sind das Lysin 48 (K48) oder das Lysin 63 (K63). K48-verknüpfte Polyubiquitinketten dirigieren das abzubauen Protein eher zum Proteasom, das K63-verknüpfte Polyubiquitinketten eher zur Autophagie. Aber es handelt sich um ein dynamisches und interagierendes System. Bei einem Rückstau des einen Systems kann jeweils das Andere zum Abbau verwendet werden (Dorsch et al., 2019b).

Proteasom

Das 26 S Proteasom ist ein Proteinkomplex, der frei in der Zelle vorkommt. Er dient dem Abbau von falsch gefalteten, nicht funktionsfähigen und alten Proteinen. In seiner dreidimensionalen Struktur erinnert es an ein Fass, wobei die 20 S Untereinheit den „Bauch“ und die 19 S Untereinheiten die „Deckel“ bilden. Die beiden regulatorischen 19 S Untereinheiten erkennen die Polyubiquitinierung, spalten diese ab und entfalten die Proteine zum Abbau mit einer ATPase Aktivität. In der 20 S Untereinheit werden die Proteinketten abgebaut. Sie besteht aus vier heptameren Ringen, zwei α -Ringen außen und zwei β -Ringen innen. Die α -Ringe bilden eine enge Eingangspore zum Reaktionsraum. Die Untereinheiten des α -Ringes werden *Proteasome 20S Subunit alpha* (PSMA) genannt (Heinrich et al., 2022).

Die Aktivität des Proteasoms wird über mehrere Wege reguliert. Zum einen über die quantitative Menge der Proteasome, das heißt über die Transkription der entsprechenden Gene und über den Abbau der proteasomalen Untereinheiten. Zum anderen ist die Anpassung über posttranslationale Modifikationen möglich. Darüber hinaus wird die Aktivität durch oxidativen Stress, abnorme Proteine und chemische Inhibitoren beeinflusst (Dikic, 2017).

1.3.3 Autophagosom-Lysosom-System

Durch Autophagie werden eher große Strukturen wie Proteinkomplexe, Aggregate, Organellen oder Pathogene abgebaut. Die Autophagie ist essenziell für die gezielte Beseitigung genannter Makromoleküle aber auch ein wichtiger Energie- und Rohstofflieferant während eines Nährstoffmangels. Die Autophagie wird in drei Unterformen unterteilt: die Mikroautophagie, chaperonvermittelte Autophagozytose und die Makroautophagie (Dikic, 2017). Die Makroautophagie ist die am besten charakterisierte Form und alle folgenden Erläuterungen beziehen sich darauf.

Im ersten Schritt wird ein zum Abbau markierter Zellbestandteil von einer Membranzisterne, die wahrscheinlich vom endoplasmatischen Retikulum (ER) abstammt, umschlossen. Diese reift mit Hilfe von ATG-Proteinen (*autophagy related*) zu einer geschlossenen Doppelmembran, umschließt dabei die Zielstruktur und wird dann Autophagosom genannt. Das Autophagosom verschmilzt mit dem Lysosom zum Autophagolysosom. Die im Lysosom enthaltenen Enzyme bauen nun die innere Lipidmembran und den Inhalt des Autophagolysosoms ab (Heinrich et al., 2022) (Abb. 4). Interessanterweise kann durch Ausschalten der Autophagie eine Hypertrophie im Mausmodell ausgelöst werden (Nakai et al., 2007).

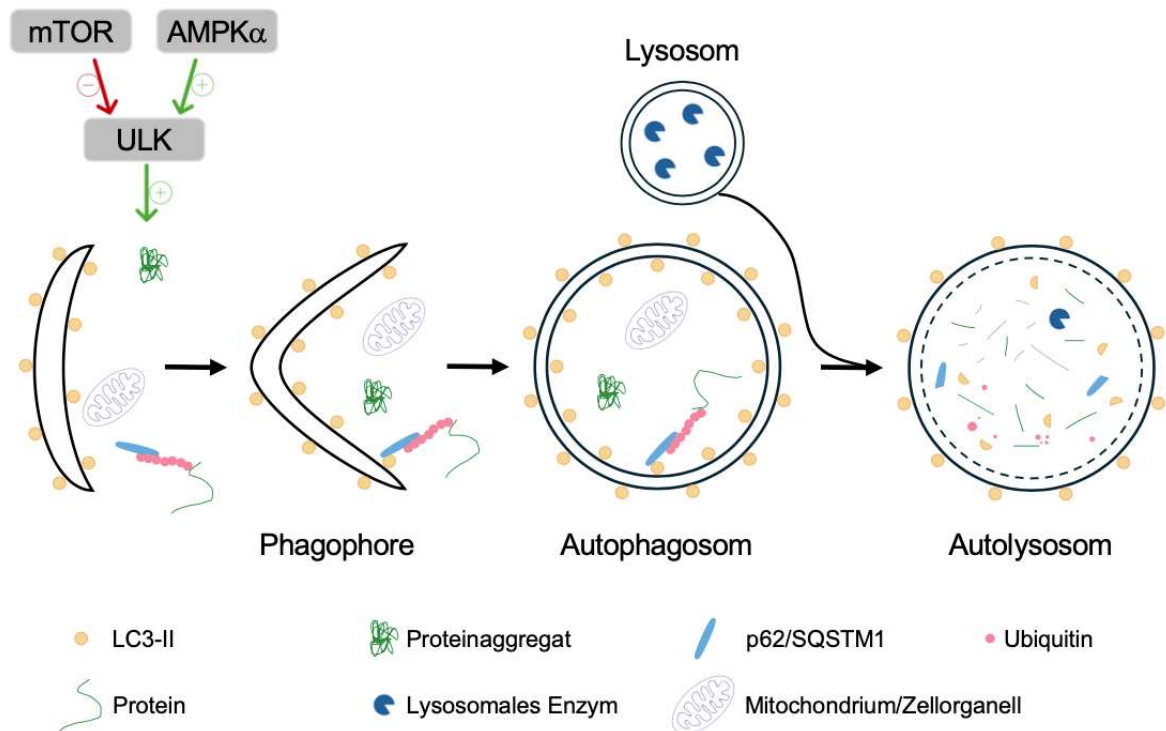


Abb. 4 Schematischer Überblick über die Autophagie

Übersicht über die Bildung, die Reifung und den Abbauprozess eines Autophagosoms. Aktiviert wird der Prozess unter anderem über die ULK, deren Aktivität wiederum von mTOR gesenkt und von AMPK α gesteigert werden kann. Das sich bildende Autophagosom umschließt Organellen, Proteinaggregate und mittels Polyubiquitin zum Abbau markierte Proteine, die über LC3-II und p62 in der Membran verankert sind. Das Autophagosom verschmilzt mit dem Lysosom zum Autolysosom, dessen Inhalt über die lysosomalen Enzyme abgebaut wird. Die Abbildung ist an Figur 1 aus (Kötter and Krüger, 2022) angelehnt. mTOR = *mammalian target of rapamycin*, AMPK α = *AMP activated kinase*, ULK = *unc-51-like autophagy activating kinase*, LC3 = *microtubule-associated protein 1 light chain 3*, SQSTM1 = *Sequestosome 1*.

Im Folgenden wird jeweils die Aufgabe derjenigen an der Autophagie beteiligten Proteine erläutert, die in der vorliegenden Arbeit analysiert worden sind.

Regulation der Autophagie mittels mTOR und AMPK α

Der wichtigste Aktivator der Autophagie ist die Serin-Threonin-Kinase ULK1 (*unc-51-like autophagy activating kinase 1*). Die Regulation der Autophagie ist eng mit dem metabolischen Status der Zelle verbunden (Galluzzi et al., 2014). Diese Verbindung findet über AMPK α (*AMP activated kinase*) und mTOR (*mammalian target of rapamycin*) statt. Sie modifizieren die Aktivität von ULK1 über Phosphorylierungen (Kim et al., 2011).

AMPK α ist ein zentraler Sensor des Energiehaushalts der Zelle. Die Kinase ist sensitiv gegenüber dem AMP:ATP Verhältnis, wird jedoch ebenfalls von Zytokinen wie Leptin oder Ghrelin, die die Energiereserven des gesamten Körpers repräsentieren, reguliert (Hardie, 2007). Demnach ist AMPK α ein Verstärker der Autophagie (Meley et al., 2006).

mTOR ist ein Suppressor der Autophagie und der Gegenspieler zum AMPK α (Noda and Ohsumi, 1998, Kim et al., 2011). Eine Aktivierung von mTOR selbst findet durch die

Phosphorylierung am Serin 2448 durch die PKB (Proteinkinase B) statt (Navé et al., 1999). mTOR wirkt anabol auf das Zellwachstum und vermindert gleichzeitig den Abbau bestehender Zellbestandteile durch die Inhibition der Autophagie. Es wird durch Wachstumshormone aktiviert und bei intrazellulärem Nährstoff- und Energiemangel inhibiert (Wullschleger et al., 2006). mTOR stellt außerdem eine Querverbindung zum UPS dar, denn es erhöht die Aktivität und Expression des Proteasoms (Zhang et al., 2014).

Rund um ULK1 erfolgt die Bildung eines Multiproteinkomplexes, der eine Kaskade von weiteren Multiproteinkomplexen bestehend aus ATG-Proteinen in Gang setzt. In nachgelagerten Schritten wird LC3 in die Membran des entstehenden Autophagosoms eingesetzt (Dikic, 2017).

Die Autophagie Membrananker LC3 und p62/SQSTM1

LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) dient als Membrananker, der die mit Ubiquitin markierten Proteine mit der Autophagosomenmembran verbindet (Dikic, 2017). Es kann in zwei Formen vorliegen, dem zytosolischen LC3-I oder dem membrangebundenen LC3-II, das über ein Phosphatidylethanolamin in der Membran des Autophagosoms verankert ist (Kabeya et al., 2004). Es befindet sich sowohl auf der Außen- als auch auf der Innenseite der Autophagosomenmembran (Kabeya et al., 2000). LC3 eignet sich besonders gut als Marker der Autophagie, da es als einziger Marker mit fertig gereiften Autophagosomen assoziiert ist (Klionsky et al., 2008).

Hinzu kommt p62, oder auch SQSTM1 (*Sequestosome 1*) genannt. Es handelt sich um ein Adaptermolekül zwischen Polyubiquitin (Vadlamudi et al., 1996) und LC3 (Bjørkøy et al., 2005). Hierfür oligomerisiert das p62 mit sich selbst (Wurzer et al., 2015). Es liegt innerhalb des Autophagosoms und wird mit abgebaut. Somit ist ein Anstieg des Proteinabbaus über die Autophagie mit dem Abfall der intrazellulären p62 Menge verbunden und ein reduzierter Abbau *vice versa* (Klionsky et al., 2008). p62 kann auch einen Abbau durch das Proteasom vermitteln (Babu et al., 2005, Bardag-Gorce et al., 2005). Es ist somit nicht spezifisch für die Autophagie, wird jedoch für die Interpretation von LC3 benötigt (Klionsky et al., 2008).

1.3.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine, ebenfalls Chaperone genannt, sind Faltungshelfer neusynthetisierter und denaturierter Proteine. Sie assistieren bei der korrekten Ausbildung von Proteinkomplexen, intrazellulären Transportvorgängen und dem Abbau von Proteinen (Heinrich et al., 2022). Eine Untergruppe stellen die kleinen Hitzeschockproteine dar. Sie sind zwischen 12 - 42 kDa groß und bilden oligomere Strukturen. Diese Oligomere stabilisieren entfaltete Proteine und scheinen eine Art Warteschleife bis zur Rückfaltung oder dem Abbau darzustellen (Jakob et al., 1993). Die Anlagerung an entfaltete Proteine dient als Abschirmung, um eine Aggregatbildung zu verhindern (Heinrich et al., 2022).

α B-Crystallin

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Hitzeschockprotein α B-Crystallin gehört zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine. Es wird auch HSPB5 genannt und funktioniert ATP unabhängig (Arrigo et al., 2007). Im Herzmuskel kommt α B-Crystallin mit bis zu 0,5 - 2 % der flüssigen Proteine gehäuft vor (Christians et al., 2012). Zu den Aufgaben des α B-Crystallin zählt der Schutz der Intermediär- und Aktinfilamente sowie die Stabilisierung des Mikrotubulinetzwerks (Tedesco et al., 2022). Darüber hinaus schützt α B-Crystallin vor Apoptosesignalen (Andley, 2007). Im Herzen ist die Überexpression von α B-Crystallin mit einer besseren kontraktilen Funktion assoziiert (Bullard et al., 2004). Eine weitere spezifischere Aufgabe des α B-Crystallin ist der Schutz von Titin (Golenhofen et al., 1999). Ist das Hitzeschockprotein an Titin gebunden, wird mehr Kraft benötigt, um Titin zu entfalten (Kötter et al., 2014, Bullard et al., 2004). Vermutlich dient diese Anlagerung dem Schutz von Titin vor Denaturierung und Funktionsverlust der passiven Rückstellkraft im gestressten zellulären Umfeld (Boelens, 2014). Mutationen im Hitzeschockprotein α B-Crystallin wurden bislang als krankheitsauslösende Gene für die hypertrophe Kardiomyopathie, restriktive Kardiomyopathien und weitere, unklassifizierte Formen der Kardiomyopathie identifiziert (Vicart et al., 1998, Brodehl et al., 2017, Sacconi et al., 2012).

1.3.5 Titin im PQC

Auch das in der vorliegenden Arbeit näher analysierte Titin unterliegt dem PQC. Durch die enorme Größe des Moleküls und die Lage im dauerhaft kontrahierenden Sarkomer der Herzmuskelzelle ist der Abbau eine große Herausforderung. Titin wird sowohl durch das UPS als auch durch die Autophagie abgebaut (Kötter et al., 2016, Müller et al., 2021). Zuvor wird es genauso wie andere Proteine mittels Ubiquitin zum Abbau markiert (Witt et al., 2005). Auch eine Interaktion zwischen dem oben genannten Autophagieprotein p62/SQSTM1 und dem Titin wurde bereits nachgewiesen (Lange et al., 2005, Bogomolovas et al., 2021). Es wird vermutet, dass Titin aufgrund der Größe vor dem Abbau zerkleinert wird, um es den Strukturen des UPS und der Autophagie verfügbar zu machen. Dieser Vor-Verdau wird durch Calpain und die Matrixmetalloprotease 2 durchgeführt (Raynaud et al., 2005, Coulis et al., 2008, Ali et al., 2010). Der anspruchsvolle Abbau kann durch eine zusätzliche kardiale Erkrankung leicht aus der Balance geraten und zur Pathogenese inklusive der Störung der diastolischen Dehnbarkeit beitragen. So ist beispielsweise die Menge des Titins in DCM-Herzen mit Herzinsuffizienz reduziert, die Sarkomerstruktur ungeordnet und es finden sich kleine, unvollständige Titinreste in defekten Sarkomeren (Hein et al., 1994).

1.4 Die hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste hereditäre Herzmuskelerkrankung. Klinisch wird sie bei einem hypertrophierten, nicht dilatierten linken Ventrikel in Abwesenheit von anderen kardialen, systemischen, metabolischen oder syndromalen Erkrankungen diagnostiziert (Maron, 2018). Sie zeichnet sich vor allem durch eine konzentrische ventrikuläre Hypertrophie und eine verminderte diastolische Dehnbarkeit aus (Herold, 2022). Die Prävalenz wird mit 1:500 angegeben (Marian and Braunwald, 2017). Klinisch führende Probleme sind der plötzliche Herztod bei jungen asymptomatischen Betroffenen, eine progrediente Herzinsuffizienz und embolische Schlaganfälle durch Vorhofflimmern (Maron et al., 2000).

Genetik

Die HCM wird monogenetisch autosomal-dominant vererbt (Greaves et al., 1987). Mittlerweile sind über 2000 Mutationen bekannt, die mit der HCM in Verbindung gebracht werden konnten (Maron, 2018). 60 % der Betroffenen haben eine Mutation in einem der Sarkomerproteine (Elliott et al., 2014). Davon liegt der Hauptteil der Mutationen in der β -Myosin-Schwerkette (MYH7) (42 %) und im Myosin-bindenden Protein C (MyBPC3) (40 %) (Richard et al., 2003).

Klinische Symptome zeigen sich in der Regel nicht von Geburt an (Greber-Platzer et al., 2001). Dies suggeriert, dass sich der Phänotyp erst aus sekundären und tertiären Veränderungen bzw. Anpassungsreaktionen ergibt, die auf die primäre Mutation folgen (Maron et al., 2022). Zudem ist die Penetranz nicht vollständig und je nach zugrunde liegender Mutation unterschiedlich hoch (Marian and Braunwald, 2017). Das Alter bei Manifestation der Erkrankung und die Ausprägung der Symptome variieren stark zwischen den Patienten (Maron et al., 2000). Dies stützt die These, dass die Pathogenese der HCM nicht allein durch die zugrundeliegende Mutation erklärt werden kann.

Klinik und Diagnosestellung

In der Klinik wird die Diagnose der HCM über bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie oder Magnetresonanztomographie (MRT) bei einer Wanddicke der Herzmuskulatur von ≥ 15 mm gestellt (Elliott et al., 2014). Zudem wird bei der HCM eine Variante mit und ohne Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstrakts unterschieden (Herold, 2022). Eine Obstruktion liegt bei ca. 70 % der Patienten vor (Maron, 2018). Bestätigt werden kann die Diagnose durch eine histologische Untersuchung des Myokards. Hier ist eine Triade aus hypertrophen, ungeordneten Myozyten und einer intestinalen Fibrose charakteristisch. Vor allem eine gestörte Anordnung der Myozyten gilt als charakteristisch für die HCM (Hughes and McKenna, 2005). Als früher Parameter für ein Screening wird die verringerte diastolische Dehnbarkeit in der Echokardiographie verwendet. Sie kommt in HCM-Mutationsträgern bereits vor Auftreten der Hypertrophie vor (Michels et al., 2009). Tritt im Laufe der Erkrankung eine Herzinsuffizienz auf, ist die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (*heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF) die dominante Variante (Chen et al., 2024).

Pathophysiologie

Aufgrund der Vielzahl an zugrundeliegenden Mutationen lassen sich keine allgemeingültigen Aussagen zur Pathophysiologie treffen. Wijnker und van der Velden fassen die bis dato bekannten Aspekte der Pathogenese 2020 folgendermaßen zusammen: Erstens lösen Mutationen der HCM meist eine erhöhte Kalziumsensitivität aus. Die Erniedrigung des EC_{50} -Wertes ist am stärksten bei *MYH7*-Mutationen ausgeprägt (Sequeira et al., 2013). Die in dieser Arbeit verwendete Myosinmutation R453C liegt ebenfalls auf dem *MYH7*-Gen. Jedoch sind die Studien zur Kalziumsensitivität nicht einheitlich, manche Mutationen der HCM lösen auch eine Verringerung der Kalziumsensitivität aus (Marian and Braunwald, 2017). Zweitens zeigt sich eine verringerte längenabhängige Aktivierung. Dies bedeutet, dass sich ein HCM-Herz schlechter an eine Erhöhung der Vorlast anpassen kann (Frank Starling Mechanismus). Drittens konnte bei der HCM sowohl im Tiermodell als auch im Patienten ein erhöhter ATP-Verbrauch festgestellt werden (Güçlü et al., 2017). Auch der ATP-Verbrauch ist am höchsten bei *MYH7*-Mutationen (Witjas-Paalberends et al., 2014). Pro Einheit ATP wird bei der HCM allerdings weniger Kraft generiert (Marian and Braunwald, 2017). Diese Veränderung im Energiehaushalt kann bereits bei Mutationsträgern ohne Hypertrophie nachgewiesen werden (Crilley et al., 2003).

Die Veränderung im Energiehaushalt des HCM-Kardiomyozyten hat nun eine Kette von Ereignissen zur Folge. Der Mangel an ATP führt zu veränderten Ionenströmen und einer Verlängerung des Aktionspotentials. Kalziumströme sind zeitlich verlängert und in der Diastole liegt eine erhöhte Kalziumkonzentration vor. Begleitet werden die Veränderungen der Ionenströme von einem vermehrten Auftreten von Arrhythmien (Coppini et al., 2013). Diese Veränderungen der Kalziumhomöostase sind eine mögliche Erklärung für die beobachtete Hyperkontraktilität des kontraktiven Apparats sowie die gestörte diastolische Dehnbarkeit (Toepfer et al., 2020, Wijnker et al., 2019).

Zudem folgt auf die Störung des Energiestoffwechsels eine verstärkte Aktivität der Mitochondrien, was wiederum zu mehr ROS führt. Diese können Proteine, Lipide und die DNA in der Zelle schädigen. Dieser Umstand macht ein funktionierendes System der PQC besonders wichtig (Wijnker et al., 2019).

Eine weitere Hypothese zur Erklärung, warum es erst im Laufe des Lebens zur klinischen Manifestation der HCM kommt, ist die toxische Proteindosis. In der Regel kommt die HCM-Mutation heterozygot vor und wird mit dem gesunden Allel koexprimiert. Das PQC schafft es in jungen Jahren noch, das mutierte Protein abzubauen. Kommt es im Laufe des Lebens aber zu einer Akkumulation der HCM auslösenden Proteine über eine gewisse Schwelle, bricht die Erkrankung aus (Wijnker et al., 2019). Bei einer *Mybpc*-Mutation lag diese Expressionsschwelle beispielsweise bei ≤ 73 % des gesunden *Mybpc* (Wijnker et al., 2016). Diese Hypothese wird bekräftigt durch eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel des mutierten Proteins, der Schwere der Erkrankung und einer Verbesserung der kontraktiven Eigenschaften nach Gabe von intaktem Troponin Komplex bei einer HCM auslösenden

Troponin Mutation (Tripathi et al., 2011, Sequeira et al., 2013). Wird das PQC nun altersbedingt insuffizient, kann die Erkrankung ausbrechen (Wijnker et al., 2019).

Eine sehr aktuell diskutierte Hypothese ist, dass in der HCM weniger Myosine im *super relaxed state* vorliegen und damit mehr Myosine an der aktiven Kraftentwicklung teilnehmen (Nag et al., 2017, Alamo et al., 2017). Dieser Ansatz erklärt die Hyperkontraktilität, die gestörte Relaxation und den erhöhten Energieverbrauch. Diese Hypothese wird durch Studien gestützt, in denen durch ein kleines Molekül, welches selektiv die Myosin ATPase Aktivität (Mavacamten, früher MYK-461) reduziert und den SRX fördert, die maximale Kraft, der fibrotische Umbau und die Hypertrophie deutlich reduziert wird (Green et al., 2016, Nag and Trivedi, 2021). Mavacamten verbessert ebenfalls in der Anwendung am Patienten die klinischen Symptome der obstruktiven HCM (Ullah et al., 2024).

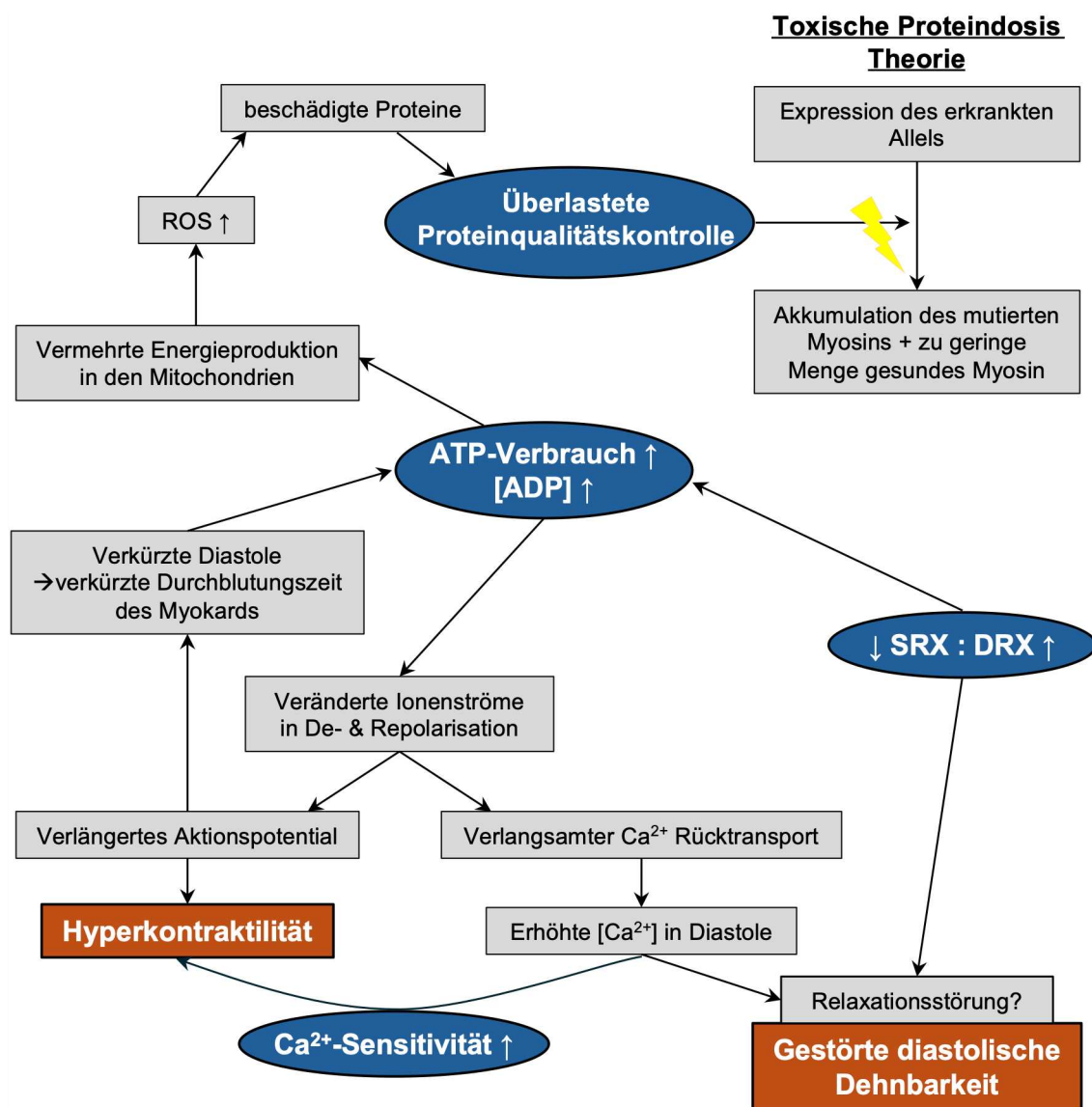


Abb. 5 schematische Übersicht über die genannten Aspekte der HCM-Pathogenese

Vereinfacht dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit eingeführten Aspekte der HCM-Pathogenese. In den orangenen Feldern sind die klinischen Merkmale der Erkrankung dargestellt, in blau zentrale Punkte der Pathogenese und in grau die dazwischen liegenden Vorgänge in der Zelle und erhobenen Forschungsergebnisse. Inhaltlich basierend auf den Reviews (Wijnker et al., 2019) und (Spudich, 2015). ROS = *reactive oxygen species*, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, SRX = *super relaxed state*, DRX = *disordered relaxed state*, [x] = Konzentration von x.

Diastolische Dysfunktion

Die Anforderungen an den linken Ventrikel beinhalten eine hohe Dehnbarkeit, damit die Kammer in der Diastole durch den niedrigen Druck des linken Vorhofs gefüllt werden kann und gleichzeitig eine starke Kontraktionskraft, die das Blut während der Systole auswirft und den systolischen Blutdruck erzeugt. Die diastolische Dehnbarkeit wird von passiven Faktoren wie der Steifigkeit des Myokards, dem Myokardtonus, der Geometrie und Wanddicke des Ventrikels und dem Perikard beeinflusst. Die Relaxation hat ebenfalls einen aktiven Einfluss (Nagueh et al., 2009). Ein Kennzeichen der hypertrophen Kardiomyopathie ist eine diastolische Funktionsstörung mit verminderter Dehnbarkeit (Herold, 2022, Stewart et al., 1968). Ursächlich für die diastolische Dysfunktion sind vermutlich die myokardiale Fibrose, eine verringerte Relaxationsgeschwindigkeit und eine erhöhte Steifigkeit des Myokards (Marian and Braunwald, 2017).

Durch die diastolische Dehnbarkeitsstörung erhöht sich der Druck, mit dem der linke Ventrikel in der Diastole gefüllt werden muss (Brutsaert et al., 1993). Diese Druckerhöhung kann, vor allem wenn eine Mitrainsuffizienz hinzukommt, über einen erhöhten Druck im linken Vorhof zu einem Vorhofflimmern führen (Joglar et al., 2024). Ein weiteres Problem bei der Genese einer HCM ist, dass die Blutversorgung des Myokards hauptsächlich in der Diastole stattfindet (Pape et al., 2023). Ist nun die diastolische Relaxation gestört, kommt es bei HCM-Patienten zur Verringerung der Myokarddurchblutung (Olivotto et al., 2011). Das kann wiederum die von Wijnker diskutierte Störung des Energiehaushaltes aggravieren.

Therapieansätze

Durch die weitestgehend unbekannte Pathogenese ist die Therapie ebenfalls wenig spezifisch. Einigen Patienten wird das Vermeiden schwerer körperlicher Belastung sowie eine ICD-Implantation (*Implantable Cardioverter Defibrillator*) zur Prophylaxe des plötzlichen Herztods empfohlen. Medikamentös kann mit der Gabe von Kalziumantagonisten oder β -Blockern unterstützt werden. Bei der obstruktiven Form werden zudem interventionell Anteile des verdickten Muskels abgetragen (Herold, 2022). Seit 2023 ist in der EU Mavacamten für die symptomatische obstruktive Form der HCM zugelassen (European Medicines Agency, 2023). Der Wirkstoff hemmt selektiv die kardiale Myosin-ATPase und stabilisiert Myosin im SRX (Green et al., 2016, Rohde et al., 2018). Als letzte Möglichkeit gilt die Herztransplantation (Herold, 2022).

Resümee

Die HCM ist die häufigste, erblich bedingte Herzmuskelerkrankung und zeichnet sich durch eine ventrikuläre Hypertrophie, eine Hyperkontraktilität und eine gestörte diastolische Dehnbarkeit aus. Aktuell gibt es keine kausale Therapie, die die Krankheitsentstehung verhindern kann. Um die Therapie der HCM zu verbessern, ist ein genaueres Verständnis der Pathogenese und dem zeitlichen Ablauf der oben geschilderten Veränderungen (Abb. 5) essenziell. Die meisten Studien zur Pathogenese der HCM wurden an Proben von bereits erkrankten Patienten beziehungsweise Tieren durchgeführt und betrachten oft nur einen Zeitpunkt, zu dem die HCM bereits deutlich ausgeprägt war.

1.5 Ziele der Arbeit

Dieses Promotionsprojekt befasst sich näher mit der Pathogenese und den frühen Veränderungen der HCM. Das Projekt arbeitet mit einem murinen Modell mit heterozygoter Expression der Myosinmutation R453C, welches im Alter von 11 Wochen noch keine makroskopisch-nachweisbaren, HCM-bedingten Veränderungen zeigt. Erst nach > 20 Lebenswochen zeigen sich in den heterozygoten Tieren das Vollbild der HCM. Im Allgemeinen soll an den erhobenen Daten abgelesen werden, welche Veränderungen bereits im frühen Stadium der Erkrankung auftreten und damit unmittelbar mit der Krankheitsentstehung und der Mutation zusammenhängen. Davon abgegrenzt werden Veränderungen, die erst in der Altersgruppe > 20 Wochen hinzukommen und eher als pathologische Anpassungsreaktion auf die veränderten kontraktilen Eigenschaften zu verstehen sind. Frühe Veränderungen, die möglicherweise direkt mit der Mutation im Zusammenhang stehen, bilden einen pharmakologischen Angriffspunkt für therapeutische, aber auch präventive Ansätze.

Ein Schwerpunkt des Projekts ist die Erhebung der biomechanischen Veränderungen. Studien zeigen bereits eine erhöhte Kalziumsensitivität, eine Hyperkontraktilität und eine gestörte längenabhängige Aktivierung für die HCM. Für diese vorbekannten Veränderungen wird nun untersucht, ob sie bereits vor Ausbildung der Hypertrophie vorliegen. Konkret wird die passive Steifigkeit, Kalziumsensitivität, maximale Kraft und längenabhängige Aktivierung an Fasern der Papillarmuskulatur des linken Ventrikels für die 11 Wochen und > 38 Wochen alten WT- und RC-Mäuse erhoben. Aus den Messungen an jungen HCM-Mäusen soll gezeigt werden, ob ein direkter Zusammenhang der Veränderung der kontraktilen Eigenschaften mit der RC-Myosinmutation besteht.

Ein weiteres Merkmal der HCM ist eine diastolische Dehnbarkeitsstörung, die bereits in Patienten vor Ausbildung einer Hypertrophie beobachtet werden kann. In dieser Arbeit wird analysiert, ob Titin als Hauptdeterminante der passiven Steifigkeit der Sarkomere für diese Dehnbarkeitsstörung verantwortlich ist und ob mögliche Veränderungen passend zu der klinischen Beobachtung bereits vor Manifestation der Hypertrophie auftreten. Hierzu wird die Zusammensetzung der Titinisoformen und posttranslationale Veränderungen an der Phosphorylierung am Serin 11878 und 4010 sowie die Ubiquitinierung und Glutathionylierung des Titins im Western Blot Verfahren an lysiertem Gewebe des linken Ventrikels der genannten Versuchstiere erhoben. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob das Titin im Herzgewebe mit der RC-

Myosinmutation steifer oder elastischer als bei den gleichaltrigen WT ist. Die funktionelle Bedeutung der Western Blot Ergebnisse vom Titin soll mit Hilfe des Ergebnisses der direkten Messung der passiven Steifigkeit interpretiert werden. Zusätzlich wird die Aktivität der PKC und der PKA, letzteres vertreten durch das Phosphorylierungslevel am Troponin I, als Einflussfaktoren der genannten Titin Phosphorylierung analysiert.

Als dritte Frage soll dieses Projekt beantworten, ob ein erhöhter Stress durch die gesteigerten kontraktilen Eigenschaften zu einer Störung im Proteinqualitätskontrollsystem führt. Der Fokus liegt hierbei auf dem Abbau von intrazellulären Proteinen inklusive Titin. Genauer gesagt, wurde im Western Blot Verfahren aus Lysat des linken Ventrikels die Gesamt-Ubiquitinierung, die Menge der Autophagie-Regulatoren AMPK α und mTOR, der Autophagie-Proteine p62 und LC3, des Hitzeschockprotein α B-Crystallin und des Proteasombestandteils PSMA2 gemessen. Änderungen in der Menge der Proteine der Autophagie oder des Proteasoms können Hinweise auf Störungen im Proteinabbau geben. Eine Störung der Proteinqualitätskontrolle mit dem dazugehörigen Proteinabbau konnte bereits für andere Herzmuskelerkrankungen gezeigt werden.

2 Material

2.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller	Artikelnummer
α B-Crystallin	1:2000	Kaninchen	GeneTex	GTX13497
α -Aktinin	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling	3134
AMPK α	1:1000	Kaninchen	Abcam	Ab207442
Glutathion	1:1000	Maus	Abcam	Ab19534
LC3	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	2775
mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	2972
Phospho-mTOR (Serin 2448)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	2971
Phospho-N2B-S4010	1:300	Kaninchen	ImmunoGlobe GmbH	
Phospho-PEVK-S11878	1:500	Kaninchen	ImmunoGlobe GmbH	
Phospho-PKC α (T497)	1:10000	Kaninchen	Abcam	Ab76016
Phospho-Troponin I (S23/24)	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling	4004
PKC α	1:15000	Kaninchen	Abcam	Ab32376
PSMA2	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	11864
p62/SQSTM1	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	5114
Titin total	1:2000	Kaninchen	ImmunoGlobe GmbH	
Troponin I	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling	4002
Ubiquitin	1:5000 (7,5 %) 1:2000 (2,2 %)	Maus	Cell Signaling	3936

Tabelle 1: Primärantikörper

Verwendete Primärantikörper zur Färbung der PVDF-Membranen; AMPK= AMP-abhängige Kinase, LC = *microtubule-associated protein 1 light chain*, mTOR = *mammalian target of rapamycin*, Phospho = phosphoryliert, PKC = Proteinkinase C, PSMA = *proteasome subunit alpha*, SQSTM1 = *Sequestosome 1*.

2.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Ursprung	Artikelnummer
Anti- <i>mouse</i> IgG	Cell Signaling	Ziege	7076S
Anti- <i>rabbit</i> IgG	Cell Signaling	Ziege	7074S

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Verwendete Sekundärantikörper zur Darstellung der oben genannten Primärantikörper. Verdünnung 1:5000 auf 7,5 - 15 % Gelen, 1:3000 auf 2,2 % Gelen.

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid/Bis 29:1	Biorad
Acrylamid/Bis 30/37,5:1	Roth
Adenosin 5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz (Na ₂ ATP)	AppliChem
Agarose	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Wacker
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific
Bradford <i>Solution</i>	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
ECL Ultra Western HRP <i>Substrate</i> HRP <i>Solution</i> A und B	Merck
Elastosil RT 625 A/B	Wacker
Essigsäure	Roth
Ethanol 96 % vollvergällt	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Glycerol	Sigma
Guanidinhydrochlorid	AppliChem
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
Igepal	Sigma

Imidazol	Sigma
<i>Imperial Protein Stain</i>	Thermo Scientific
Isopropanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumhydroxid	Sigma
Kalziumchlorid	Sigma
Kreatinphosphatdinatrium (Na ₂ CrP)	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific
Phosphatase Inhibitor Cocktail A und B	Bimake
Protease Inhibitor Cocktail	Selleckchem
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific
Salzsäure 32 %	Roth
<i>Serva Blue®</i>	Serva
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Thioharnstoff	Sigma
Tricin	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma

Tabelle 3: Chemikalien

2.4 Puffer und Lösungen

Puffersystem/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % SDS
10x <i>Tris buffered Saline</i> (TBS)	0,2 M Tris

(pH 7,4)	1,5 M NaCl
10x <i>Tris buffered Saline</i> + Tween (TBST) (pH 7,4)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl 0,1 % Tween
4x SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris 0,4 % SDS
4x SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4 % SDS
Aktivierungslösung (pH 6,85)	10 mM Imidazol 3 mM Ca^{2+} -EGTA 10 mM Na_2MgATP 3 mM MgCl_2 47,7 mM Na_2CrP 2 mM DTT
Antikörper Trägerlösung	0,5 % BSA in 1xTBST
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris 100 mM Tricin
Blockierungslösung	2 % BSA in 1x TBST
Ca^{2+} EGTA-Lösung (pH 7,0)	250 mM EGTA 250 mM CaCl_2
EGTA-Lösung (pH 7,0)	250 mM EGTA 500 mM KCl
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris
<i>Low ionic strength buffer</i> (pH 7,1)	75 mM KCl 10 mM Tris 2 mM MgCl_2 2 mM EGTA
Na_2MgATP (pH = 7,0)	50 mM Na_2ATP 50 mM MgCl_2
PVDF <i>destain</i>	10 % Essigsäure 40 % Ethanol
PVDF <i>stain</i>	0,075 % <i>Serva blue</i> in Methanol

Relaxationslösung (pH 6,85)	10 mM Imidazol 3 mM EGTA 10 mM Na ₂ MgATP 3 mM MgCl 47,7 mM Na ₂ CrP 2 mM DTT
Strippingpuffer (pH 7,5)	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2 % Igepal
Titin-Probenpuffer (SDS-Probenpuffer) (pH 6,8)	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3 % SDS 0,035 % <i>Serva Blue</i> 10 % Glycerol 0,05 M Tris

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurde Milli-Q[®] Wasser als Lösungsmittel verwendet, alle pH-Werte sind auf den angegebenen Wert mit HCl oder KOH eingestellt worden; ATP = Adenosintriphosphat, BSA = bovines Serumalbumin CrP = Kreatinphosphat, DTT = Dithiothreitol, EGTA = Ethylenglycoltetraessigsäure, M = Mol, mM = Millimol, SDS = Natriumdodecylsulfat, TBS = *Tris-buffered saline*, TBST = *Tris-buffered saline with Tween* 20

2.5 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Binokular	S8AP0	Leica
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemolumineszenz <i>Imager</i>	Fusion FX	Vilber Lourmat
Fasermessapparatur	Myoscope-Skinned	Myotronic Heidelberg
Feinwaage	ADB 200-4	Kern und Sohn
Gefrierschrank -20 °C	Premium NoFrost	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	UXF40086V	Thermo Scientific
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Basic RCTB	IKA
Mikrowelle	EMWD 2818	Bauknecht

Niederspannungsnetzteil	P25 Standard Power Pack	Biometra
Orbitalschüttler	Shaker Dos 20L	NeoLab
pH Meter	MP220	Mettler Toledo
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech
Reagenzienschüttler (Vortexer)	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Taumel-Rollenmischer	RM5-30V	CAT
Thermomixer/Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf
Waage	Kern572	Kern
Wasserbad	Julabo 20B	Julabo
Wippschüttler	Mini Rocking Platform	Biometra
Zentrifuge	MiniStar blueline	VWR

Tabelle 5: Geräteliste

2.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Produktbezeichnung	Hersteller
Whatman® Papier	Gel-Blottingpapiere Whatman®	Roth
PVDF Membran	Transfermembran ROTI®PVDF 0,45 cm	Roth

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

PVDF = Polyvinylidenfluorid

3 Methoden

3.1 Probenherkunft

Es wurden vier Gruppen von männlichen Mäusen verwendet:

1. 10 bis 12 Wochen alte Mäuse, welche heterozygot für die R453C-Mutation der hypertrophen Kardiomyopathie waren ($n = 7$), genannt RC11
2. 10 bis 12 Wochen alte Kontrolltiere ($n = 4$), genannt WT11
3. 38 bis 43 Wochen alte Mäuse, die ebenfalls die R453C-Mutation heterozygot trugen ($n = 6$), genannt RC38
4. 38 bis 43 Wochen alte Kontrolltiere ($n = 5$), genannt WT38

Typisch für die RC-Myosinmutation ist, dass die Mäuse im Alter von 10 - 12 Wochen kaum oder keinen Phänotyp der HCM zeigen. In der Versuchsgruppe der 38 - 43 Wochen alten Mäuse konnte jedoch eine deutliche Verdickung der ventrikulären Wand nachgewiesen werden (Abb. 12, Abschnitt 5.1). Die Penetranz der Mutation beträgt 100 %, sodass davon auszugehen ist, dass alle mutationstragenden Mäuse auch an einer hypertrophen Kardiomyopathie erkrankt waren (Blankenburg et al., 2014).

Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) unter Standardbedingungen gezüchtet und gehalten. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Standardfutter und Wasser. Da die heterozygoten Mäuse unter diesen Standardbedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen und nach über 18 Monaten Lebenszeit keine Symptome einer Herzinsuffizienz entwickelt haben, gilt diese Mauslinie als unbelastet, weshalb die Zucht und Haltung keiner Tierversuchsgenehmigung bedarf.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Die offizielle Genehmigung zur Tiertötung zwecks Organentnahme liegt vor (ZETT O 95/13). Die Tiertötung und Probengewinnung wurde von Prof. Dr. Martina Krüger durchgeführt, die über die erforderliche Fachkunde gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes verfügt.

Aus den entnommenen Herzen wurden jeweils zwei Papillarmuskelfasern pro Versuchstier herausgetrennt (Abb. 6). Die Fixierung erfolgte in Elastosilschalen und die Lagerung in *low ionic strength buffer*, versetzt mit 50 % Glycerol bei -20 °C. Für die Western Blots wurde ausschließlich das Gewebe des linken Ventrikels benutzt, welches in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C konserviert wurde.

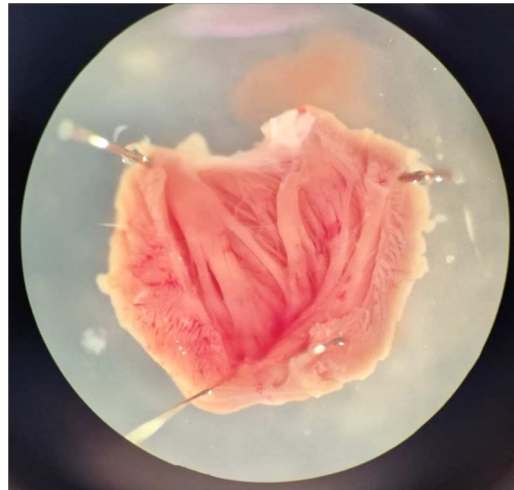


Abb. 6 Linker Ventrikel mit Papillarmuskelfasern

Sicht in den eröffneten linken Ventrikel mit einigen Papillarmuskelfasern.

3.2 Biomechanische Analyse

Die Messung der kontraktile Eigenschaften erfolgte an den isolierten Papillarmuskeln. Am Vortag der Kraftmessung wurden 10 ml der Relaxationslösung mit Phosphatase Inhibitor Cocktail A und B, Protease Inhibitor Cocktail (1:100 Verdünnung nach Hersteller-Angaben) sowie DTT (1 mM) und BDM (30 mM) versetzt. Das BDM verhinderte als nicht-selektiver, reversibler Myosin ATPase-Inhibitor eine Kontraktion während der Permeabilisierung. Zur Permeabilisierung der Zellmembran der Myozyten wurde 2 % Triton X-100 zur Relaxationslösung hinzugefügt und die Faser über Nacht auf Eis auf einem Wippschüttler gelagert. Die Permeabilisierung löste Lipide aus der Zellmembran und erzeugte Poren, durch die die verwendeten Inhibitoren und später das zur Kontraktion notwendige Kalzium in die Zelle hinein diffundieren konnten.

Am Tag der Kraftmessung wurden 10 ml Aktivierungslösung und Relaxationslösung mit jeweils 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail A und B, Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM DTT vermischt.

Die permeabilisierten Papillarmuskelfasern wurden mehrfach in Relaxationslösung ohne BDM und Triton gewaschen. Unter dem Binokular wurden sie anschließend in zwei bis drei Fasern mit einer Breite von maximal 400 µm zerschnitten und von umliegendem Bindegewebe befreit. Eine dieser Fasern wurde nun in der Fasermessapparatur zwischen zwei Pinzettenarmen aufgehängt. Die Distanz, in der die Faser frei hing, betrug hierbei zwischen 1200 bis 5500 µm. Für den Aufbau der Messung siehe Abb. 7. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

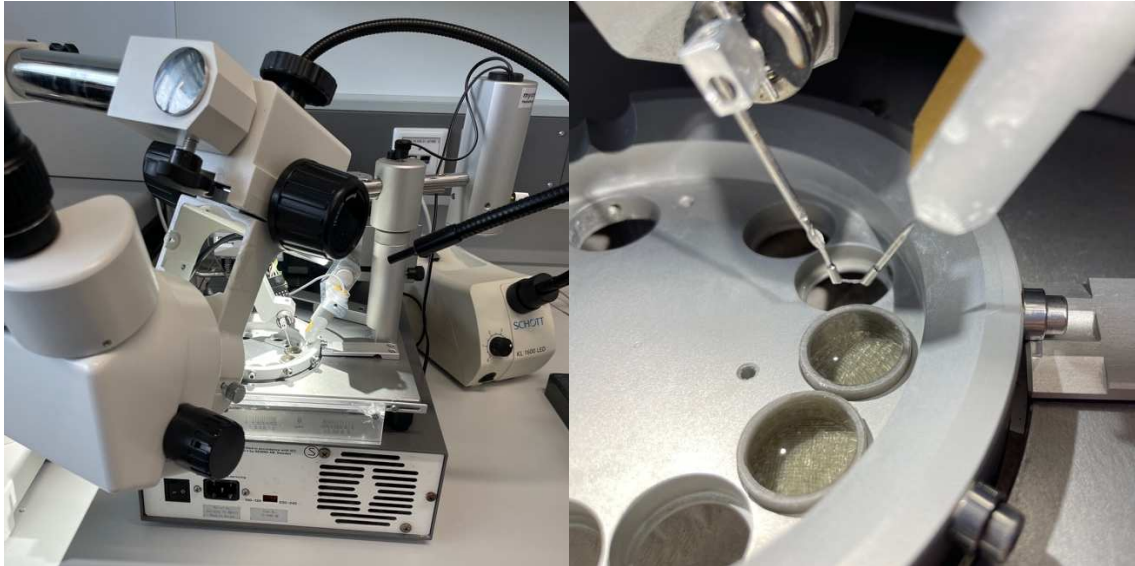


Abb. 7 Fasermessapparatur

Übersichts- und Nahaufnahme des Aufbaus der Fasermessapparatur. Im rechten Bild sind die beiden Pinzettenarmen zu erkennen, zwischen denen eine Papillarmuskelfaser eingespannt ist.

Messung der passiven Steifigkeit

Zur Ermittlung der passiven Steifigkeit wurde die Gleichgewichtslänge der aufgespannten Faser in Relaxationslösung optisch bestimmt. Anschließend wurde die Faser für jeweils 40 Sekunden auf 110 %, 120 %, 130 %, 140 % und 150 % ihrer Gleichgewichtslänge manuell gedehnt. Die entstandene Rückstellkraft wurde mit der Software „MyoDar“ aufgezeichnet und am Ende jeder Dehnungsstufe abgelesen (Abb. 8). Die Messung wurde für jedes Faserpräparat dreimal wiederholt und die Messwerte gemittelt.



Abb. 8 Messung der passiven Rückstellkraft

Exemplarische Darstellung der Aufzeichnung der Messung der passiven Rückstellkraft.

Messung der Kalziumsensitivität

Zur Bestimmung der Kalziumsensitivität wurde eine Verdünnungsreihe von 75 % bis 100 % Aktivierungslösung mit Relaxationslösung vorbereitet. Dies entspricht jeweils einer berechneten, freien Kalziumkonzentration ($[pCa]$) von 75 % (6,0), 80 % (5,87), 85 % (5,72), 90 % (5,52), 95 % (5,21), 97,5 % (4,94) und 100 % (4,50) (Fabiato and Fabiato, 1979).

Auf 120 % der Gleichgewichtslänge vorgedehnt wurde die Faser nun in die verschiedenen konzentrierten Aktivierungslösungen getaucht. Alle drei Minuten wurde in die Lösung mit der

nächsthöheren Kalziumkonzentration gewechselt (Abb. 9). Da durch leichte Unterschiede in der Füllmenge der Gefäße die gemessene Kraft schwanken kann, wurde nur die Differenz der entwickelten Kraft ausgewertet. Zuletzt wurde die Faser in der Relaxationslösung wieder entspannt.

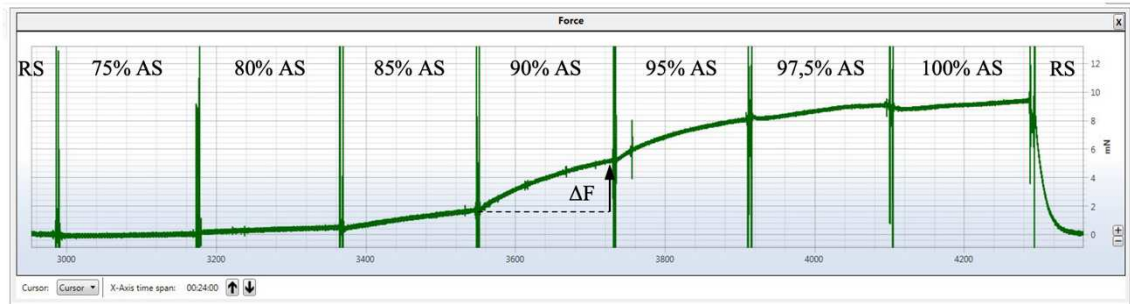


Abb. 9 Messung der Kalziumsensitivität

Exemplarische Darstellung der Aufzeichnung der Messung der Kalziumsensitivität; RS = Relaxationslösung, AS = Aktivierungslösung, F = Kraft.

Messung der längenabhängigen Aktivierung

Zur Messung der längenabhängigen Aktivierung wurde die Faser in die unverdünnte Aktivierungslösung getaucht. Gemessen wurden hierbei jeweils die Zeit bis zum Erreichen eines Plateaus und die entwickelte Kraft. Nach einem Wechsel in die Relaxationslösung wurde ebenfalls die Zeit bis zur Relaxation notiert. Die genannten Arbeitsschritte wurden jeweils bei 110 %, 120 % und 130 % der Gleichgewichtslänge durchgeführt.

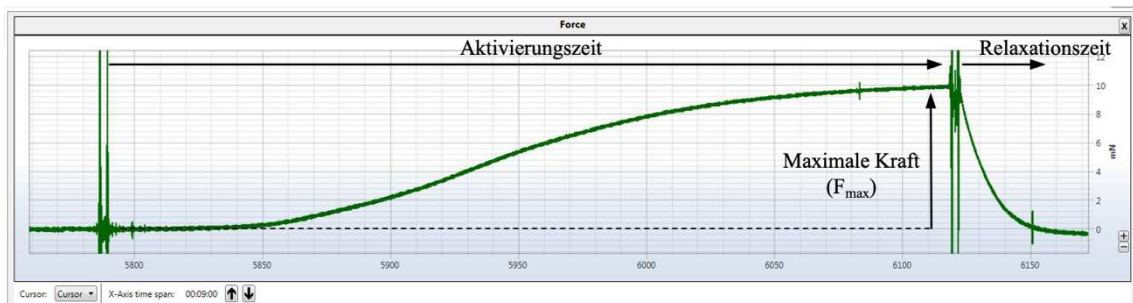


Abb. 10 Messung der längenabhängigen Aktivierung

Exemplarische Darstellung der Aufzeichnung der Messung der längenabhängigen Aktivierung.

3.3 Biochemische Analyse

Solubilisierung des Gewebes

Um die konservierten Gewebestücke für eine Gelelektrophorese vorzubereiten, wurden sie in einen flüssigen Zustand überführt. Zudem wurden die Proteine aus den intrazellulären Strukturen gelöst und denaturiert.

Vorbereitend wurde 800 µl Titin-Probenpuffer mit 40 µl DTT gemischt. Gearbeitet wurde auf Eis. Zu einer geringen Menge des zu untersuchenden Gewebes wurden 150 µl vom Probenpuffer gegeben und anschließend mit Skalpell mechanisch zerkleinert. Daraufhin wurden alle Proben 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur weiteren Denaturierung wurden die Reaktionsgefäße für 3 Minuten auf 96 °C erwärmt. Mögliche Gewebereste wurden für 3 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert.

Bradford Analyse

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der solubilisierten Proben wurde die Bradford Analyse angeschlossen (Bradford, 1976). Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet. Mit 2 µl der Probe und H₂O_{Milli-Q®} wurde eine 1:5 Verdünnung erreicht. Von dieser ersten Verdünnung wurden zwei Extinktionslösungen weiter auf 1:2500 verdünnt. Dafür wurden jeweils 2 µl 1:5 verdünnte Probe, 800 µl H₂O_{Milli-Q®} und 200 µl Bradford Reagenz gemischt. Zudem wurde eine Referenzlösung mit 2 µl 1:5 verdünntem Titin-Probenpuffer, 800 µl H₂O_{Milli-Q®} und 200 µl Bradford vorbereitet. Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der photometrischen Messung mittels Vortex-Schüttler durchmischt.

Nun folgte die Messung der Extinktion im Photometer bei 595 nm Wellenlänge. Nach Erhebung der Extinktion konnte die Proteinkonzentration in µg/µl errechnet werden. Als Referenz diente eine Eichgerade von 0-2mg/ml BSA.

Die solubilisierten Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Vorbereitung der Gele

Zur späteren Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele gegossen. Hierbei wurden verschiedene Acrylamid Konzentrationen verwendet, um eine größere Trennschärfe im jeweiligen Zielbereich der Proteinmasse zu erreichen. Das 7,5 % Gel wurde für mTor (Molekulargewicht 289 kDa) und die Gesamt-Ubiquitinierung, das 10 % Gel für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 60-100 kDa und das 15% Gel für 14-30 kDa verwendet.

Zunächst wurden die unten genannten Reagenzien in angegebener Reihenfolge in einem 50 ml Reaktionsgefäß gemischt, um den Trenngelanteil herzustellen (Tabelle 7). Nachdem die genannten Reagenzien vermengt worden sind, wurden sie zwischen zwei Glasplatten mit 0,75 mm Abstand gegossen.

Reagenz	7,5 % Gel	10 % Gel	15 % Gel	Sammelgel
Acrylamid/Bis 30:1	3,75 ml	5 ml	7,5 ml	1,334 ml
H ₂ O _{Milli-Q®}	7,5 ml	6,25 ml	3,75 ml	6,05 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml			-
4x Sammelgelpuffer	-			2,5 ml
TEMED	7,5 µl			30 µl
APS	75 µl			100 µl

Tabelle 7: Reagenzien Polyacrylamid-Trenngele und -Sammelgel

Inhaltsstoffe zur Herstellung von vier Polyacrylamid-Trenngelen verschiedener Konzentrationen und acht Sammelgelen; TEMED = Tetramethylethylendiamin, APS = Ammoniumpersulfat.

Nach Aushärtung des Trenngels wurden die aufgeführten Reagenzien vermengt, um das Sammelgel herzustellen (Tabelle 7).

Zur Analyse von Titin und seinen Derivaten wurde aufgrund der großen Molekülgröße (bis zu 4,2 MDa) eine andere Gelzusammensetzung verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug hierbei 2,2 % und das Gel wurde einphasig (d.h. ohne Sammelgel) gegossen. Die unten aufgeführten Reagenzien wurden bis auf das APS und die Agarose zusammengefügt und im Wasserbad bei 50 °C erwärmt (Tabelle 8). Die Agarose wurde in einer Mikrowelle erhitzt, bis sie vollständig verflüssigt war. Anschließend wurden APS und Agarose hinzugegeben.

Reagenz	Menge
Acrylamid/Bis 29:1	1,46 ml
H ₂ O _{Milli-Q®}	6,61 ml
4x Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20 %	100 µl
TEMED	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5 %	6,67 ml

Tabelle 8: Reagenzien für 2,2 % Titin Gele

Inhaltsstoffe zur Herstellung von vier Gelen zur Auftrennung von Titin; SDS= Natriumdodecylsulfat, TEMED = Tetramethylethylendiamin, APS = Ammoniumpersulfat.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Vorbereitung wurden die solubilisierten Proben weiter denaturiert, indem DTT zugegeben und die Proben für 3 Minuten auf 50 °C erhitzt wurden. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde nach üblichen Standards aufgebaut. Bei Gelen mit 7,5 - 15 % Polyacrylamidanteil wurde zum Größenvergleich 2,5 µl Molekulargewichtsmarker (*Page Ruler*) in eine der Taschen gegeben.

Zum Einlaufen in den ersten Zentimeter des Gels wurde 20 mA pro Gel, im Anschluss 40 mA angelegt. Bei 2,2 % Gelen wurden 2 mA zum Einlaufen und danach 7 mA angelegt. Nach dem Anlegen der Spannung trennten sich die Proteine nach ihrer Molekülgröße auf.

Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Das Whatman Filterpapier wurde in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde durch Einlegen in Ethanol aktiviert. Auf das Anodenpapier wurde die PVDF-Membran, darauf das Gel und zuoberst das Kathodenpapier gelegt. Geblottet wurden die 7,5 - 15 % Membranen 12 Minuten bei 1,5 A und 20 V, die 2,2 % Membranen bei 1,0 A und 25 V für 40 Minuten. Im Anschluss wurden die Membranen 1 Minute in PVDF-*stain* geschwenkt. Die Hintergrundfärbung wurde durch die PVDF-*destain* Lösung entfernt. Nun waren die Proteinbanden sichtbar und die Zielbereiche konnten herausgeschnitten werden. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten in *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBST) gewaschen.

Verwendete Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt. Eine Besonderheit stellen die Antikörper der Firma ImmunoGlobe GmbH dar. Bei ihnen handelt es sich um „*custom-designed*“ Antikörper, die eigens zur Verwendung in der AG Krüger hergestellt wurden. Sie erkennen spezifische Domänen des Titins bzw. den phosphorylierten Zustand dieser Domäne. Zur Produktion des Antikörpers gegen das phosphorylierte Serin 11878 im Titin wurde einem Kaninchen ein Peptid mit der Sequenz CEVVLK[pS]VLRKR gespritzt. Zur Erkennung eines phosphorylierten Serins an der Position 4010 wurde ein Peptid mit der Sequenz RTEEGK[pS]L[pS]FPC geimpft. Die Immunisierung wurde durch Gabe des Peptids sowie zweimalige Boosterung innerhalb von 14 Tagen erreicht. Zur weiteren Affinitätsreifung wurden weitere 20 Wochen abgewartet. Daran angeschlossen wurde der Antikörper affinitätschromografisch aufgereinigt. Im Herstellungsprozess entstand ebenfalls ein Antikörper, der sich unabhängig vom Phosphorylierungszustand gegen das Serin 11878 richtete und damit an die PEVK-Region des Titins band. Er wurde als Referenzmarker gegenüber der Ubiquitinierung und Glutathionylierung am Titin sowie der Phosphorylierung am S11878 und S4010 verwendet und wird im Folgenden als „Titin Total“ bezeichnet.

Immundetektion

Bei der Immundetektion wurden die untersuchten Proteine mittels Antikörper sichtbar gemacht. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die PVDF-Membranen zunächst für 2 Stunden in 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) geschwenkt. Anschließend wurden die Zielantikörper (siehe Tabelle 1) in 0,5 % BSA verdünnt und inkubierten über Nacht auf der Membran. Danach wurde mit TBST wie oben beschrieben gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper mittels Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Der Sekundärantikörper war mit einem Enzym (HRP, *horseradish peroxidase*) verknüpft. Nach 2 Stunden Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte wieder ein Waschschritt mit TBST. Zuletzt konnten die Proteinbanden, an denen der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper

gebunden war, mittels einer Enzymreaktion mit einem spezifischen ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescence*) in einem Chemolumineszenz Imager (Fusion FX von Vilber Lourmat) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Um den Anteil phosphorylierter Proteine zur Gesamtmenge zu vergleichen, mussten bei einigen Membranen die Antikörperbindungen wieder gelöst werden, um eine Weiterverwendung der Membran mit einem anderen Antikörper zu ermöglichen. Hierzu wurden die Membranen nach dem Fotografieren in *Tris buffered Saline* (TBS) gewaschen. 7,5 - 15 % Membranen sowie 2,2 % Membranen, die den Glutathion Antikörper gebunden hatten, wurden mit 2-Mercaptoethanol versetztem Stripping Puffer für 20 Minuten inkubiert. Alle weiteren 2,2 % Membranen wurden mit dem *Restore Stripping Buffer* für 30 Minuten behandelt. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit TBS. Daran angeschlossen wurden für weitere 2 Stunden unspezifische Bindungen mit 2 % BSA-Lösung blockiert. Nun konnte ein weiterer Zielantikörper auf die Membran gegeben und die oben genannten Schritte wiederholt werden. Die Antikörper, die dabei den phosphorylierten Zustand darstellen wurden als „phospho“ gekennzeichnet. Die Bilder, die die Gesamtmenge des untersuchten Proteins darstellen, wurden als „pan“ beschriftet.

Analyse der Titin Isoformen

In der Herzmuskulatur kann Titin in zwei verschiedenen Haupt-Isoformen vorliegen, N2B (Molekulargewicht ca. 3,0 MDa) oder N2BA (ca. 3,3 MDa) (Freiburg et al., 2000). Das Verhältnis beider koexprimierter Isoformen verändert die passive Steifigkeit des Gewebes. Um diese Isoformen darzustellen, wurde das Gel nach der Gelelektrophorese für eine Stunde in *Imperial-Stain* angefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund durch deionisiertes Wasser über Nacht entfärbt.

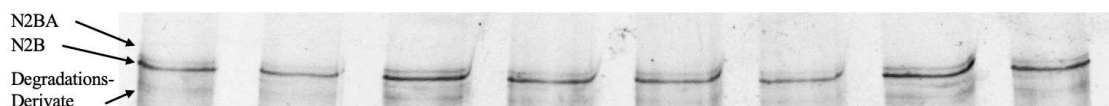


Abb. 11 Titin-Isoformen

Banden der Titin Isoformen N2B (ca. 3,0 MDa) und N2BA (ca. 3,3 MDa) sowie der Degradationsderivate in einer agarosestabilisierten 2,2 % SDS-PAGE.

Auswertung der Western Blots

Bei den mittels Antikörpern gefärbten Banden sowie der Darstellung der Isoformen wurde die farbliche Dichte der Banden mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert. Wenn nicht anders angegeben wurde die Intensität der Bande mit der von α -Aktinin verglichen. Eine Besonderheit ergab sich bei den Antikörpern für AMPK α und p62. AMPK α kann in zwei verschiedenen Isoformen vorliegen (Stapleton et al., 1996). Von p62 sind ebenfalls zwei Isoformen bekannt (Wang et al., 2022, Somlapura et al., 2021). Bei beiden wurde die gesamte Doppelbande, die nach der Antikörperfärbung auf der Membran zu sehen war, ausgewertet. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Bandenintensität aus individuellen Western Blots zu ermöglichen, wurde wie folgt vorgegangen: Für die Banden auf einer Western Blot Membran wurde aus den

Intensitäten der Zielbanden und Vergleichsbande zunächst ein Quotient gebildet. Jeder dieser Quotienten wurde auf den Mittelwert der Wildtypen normiert. Diese relativen Werte wurden von mindestens drei Western Blot Membranen gemittelt.

Bei den Isoformen wurde mit der Software ImageJ die Bandenintensität von N2B mit der von N2BA verglichen. Dabei wurde für jede Isoform der prozentuale Anteil am Gesamttitin ($N2B + N2BA = 100\%$) ermittelt. Auch hier wurde die Auswertung von $n = 2 - 4$ Gelen gemittelt.

Verwendete Computerprogramme

Zur Ausarbeitung dieser Dissertation wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Word 2021, Microsoft Excel 2021, Microsoft Power Point 2021, BioRenders, Adobe Photoshop CS6, Image J, GraphPad Prism 10, EndNote 20.

Statistik

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede wurden der *unpaired student's t-Test* und der *two way ANOVA (analysis of variance)* verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurde als Hinweis auf signifikante Unterschiede gewertet. Diese sind, wenn nicht anders vermerkt, in den Abbildungen durch Sternchen markiert.

4 Ergebnisse

Für die vorliegende Arbeit wurde ein murines Modell der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) verwendet. Untersucht wurden 11 und 38 - 43 Wochen alte Mäuse, die die RC-Myosinmutation heterozygot trugen (RC11, RC38), und gleichaltrige Wildtypen (WT11, WT38). Bei den angegebenen Ergebnissen handelt es sich jeweils um den Mittelwert und den dazugehörigen Standardfehler SEM (*Standard error of the mean*). Zur statistischen Auswertung wurden der *unpaired Student's t-test* und *two-way ANOVA* verwendet. Als Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert von $<0,05$ festgelegt.

4.1 Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis

Erniedrigtes Herz- zu Körpergewichtverhältnis bei den 38 Wochen alten RC-Mäusen

Anhand des Verhältnisses vom Herz- zum Körpergewicht kann die Ausprägung einer Hypertrophie abgeschätzt werden. Deshalb wurden nach der Präparation die Mäuse und die entnommenen Herzen gewogen. Die Herzen waren beim Wiegen mit Blut gefüllt. Das Herz- zu Körpergewicht Verhältnis der WT11 war mit $8,52 \pm 1,48$ mg/g annähernd gleich zu den RC11 mit $8,55 \pm 0,51$ mg/g. Die RC38 wogen $6,61 \pm 0,21$ mg/g und zeigten sich damit im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen mit $7,69 \pm 0,41$ mg/g signifikant erniedrigt ($p = 0,026$). Zudem sank das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht von den RC11 zu den RC38 um 23 % und war damit signifikant erniedrigt ($p < 0,0001$; Abb. 12).

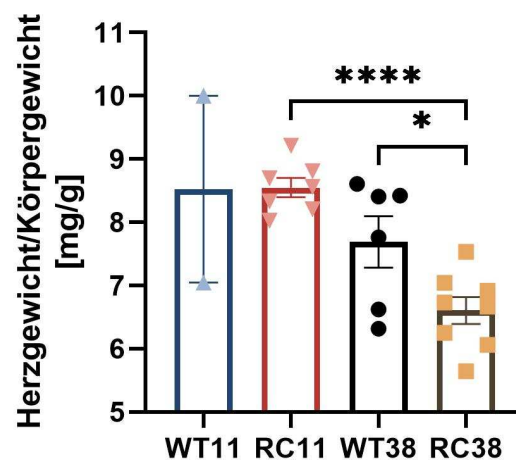


Abb. 12 Herz-Körpergewicht-Verhältnis

Darstellung des Quotienten aus Herzgewicht [mg] und Körpergewicht [g]; das Balkendiagramm zeigt jeweils den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem */**** gekennzeichnet (* = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$ im *unpaired Student's t-test*); verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; mg = Milligramm, g = Gramm, RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

4.2 Kraftmessungen

Zur Ermittlung der aktiven und passiven Kräfte wurden gehäutete und zugeschnittene Fasern der Papillarmuskulatur in eine Fasermessapparatur eingespannt. Zur Aktivierung wurden die Fasern in eine kalziumhaltige Aktivierungslösung eingetaucht. Alle angegebenen Kraftwerte sind entweder prozentuale Angaben der maximalen Kraft oder absolut gemessene Werte, die auf den Querschnitt der Faser normiert wurden.

Erhöhung der passiven Steifigkeit der 11 Wochen alten Mäuse

Zur Messung der passiven Steifigkeit wurden die Papillarmuskelfasern in der Relaxationslösung auf 100 – 150 % der Gleichgewichtslänge gedehnt. Es zeigte sich der Trend, dass sowohl die RC11 als auch die gleichaltigen Wildtypen eine erhöhte passive Steifigkeit, auch passive Rückstellkraft genannt, im Vergleich zu den älteren Tieren aufwiesen. Wobei die gemessenen Kräfte erst ab einer Dehnung von > 130 % auseinanderwichen. Bei einer Dehnung ≤ 130 % verliefen alle vier gemessenen Kurven beinahe übereinanderliegend. Bei 150 % Dehnung betrug die passive Rückstellkraft 225 ± 28 mN/mm² bei den WT11, 201 ± 32 mN/mm² bei den RC11, während die älteren Tiere nur 156 ± 35 mN/mm² für WT38 und 155 ± 28 mN/mm² für RC38 aufbrachten. Der Unterschied zwischen den RC11 und den RC38 war bei 150 % Dehnung statistisch signifikant ($p = 0,003$). Zwischen den RC-Mäusen und den jeweils gleichaltrigen WT konnte für keine Dehnungsstufe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 16).

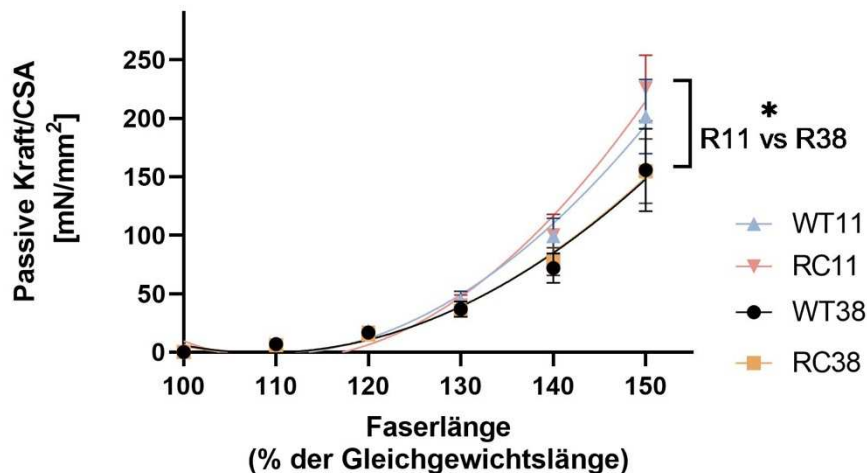


Abb. 13 Passive Steifigkeit

Messung der passiven Steifigkeit bei 110 – 150 % Dehnung der Gleichgewichtslänge; Normierung auf die Querschnittsfläche der Faser; die Diagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$); statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils mit einem * gekennzeichnet (* = $p < 0,05$ im *two way ANOVA*); verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; CSA = *cross sectional area*, mm² = Quadratmillimeter, mN = Millinewton; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

11 Wochen alte RC-Mäuse sind hyperkontraktil

Als nächstes wurde die maximale Kraftentwicklung in der Aktivierungslösung bei 120 % Vordehnung bestimmt. Hierbei zeigten sich die jüngeren RC-Mäusen mit $42,6 \pm 4,7$ mN/mm² im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren hyperkontraktil. Der WT im gleichen Alter erreichte $22,4 \pm 3,5$ mN/mm² und erzeugte damit signifikant weniger Kraft ($p = 0,017$). Zwischen den älteren Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Maximalkraft mit $24,2 \pm 3,9$ mN/mm² für die RC38 und $22,0 \pm 2,3$ mN/mm² für die WT38. Vergleicht man die älteren mit den jüngeren RC-Tieren haben die RC11 eine signifikant höhere Maximalkraft ($p = 0,014$; Abb. 14).

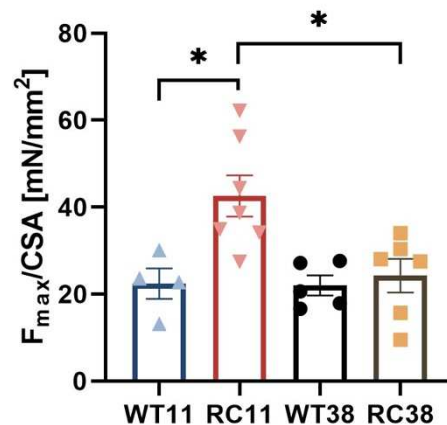


Abb. 14 Maximale Kraft

Maximale Kraft bei 120 % Vordehnung; Normierung auf die Querschnittsfläche der Faser; die Diagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$); statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils mit einem * gekennzeichnet (* = $p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; CSA = *cross sectional area*, $F_{\max}$ = maximale Kraft, mm² = Quadratmillimeter, mN = Millinewton; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Erhöhte Kalziumsensitivität bei den 11 Wochen alten RC-Mäusen

Daraufhin wurde in einer Verdünnungsreihe der Aktivierungslösung mit aufsteigender Kalziumkonzentration die Kalziumsensitivität bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die RC11 Mäuse bereits bei geringeren Kalziumkonzentrationen Kraft erzeugten und ihre Maximalkraft (Plateau) früher erreichten. Deutlich setzte sich davon die Kraftentwicklung der WT11-Vergleichstiere ab. Sie erreichten erst bei höheren Kalziumkonzentrationen die gleiche Maximalkraft als die jüngeren RC-Mäuse. Das Auseinanderweichen der Kurven war bei einer Kalziumkonzentration von $pCa = 5,87$ und $pCa = 5,72$ signifikant ($p = 0,005$ und $p = 0,011$). Die Kraftentwicklung der älteren RC38 und WT38 verlief beinahe identisch. Verglichen mit den jüngeren Mäusen lag die kalziumabhängige Kraftentwicklung mittig dazwischen (Abb. 15 oben).

Genauer kann die Kalziumsensitivität mit dem EC_{50} Wert beschrieben werden. Dabei handelt es sich um eine mathematische Berechnung der Kalziumkonzentration, bei der die Hälfte der maximal möglichen Kraft entwickelt wurde. In den RC11 zeigte sich mit $pCa = 5,63 \pm 0,02$ ein

signifikante erhöhter EC_{50} Wert im Vergleich zu den gleichaltrigen WT mit $pCa = 5,44 \pm 0,05$ und den älteren RC38 ($p = 0,003$ und $p = 0,008$). Die leicht verringerte Kalziumsensitivität der jungen WT11 war im Vergleich zu den älteren WT38 mit $5,54 \pm 0,02$ erreichte mit $p = 0,079$ keine statistische Signifikanz. Der EC_{50} Wert der RC38 berechnete sich bei $5,51 \pm 0,03$ (Abb. 15 unten).

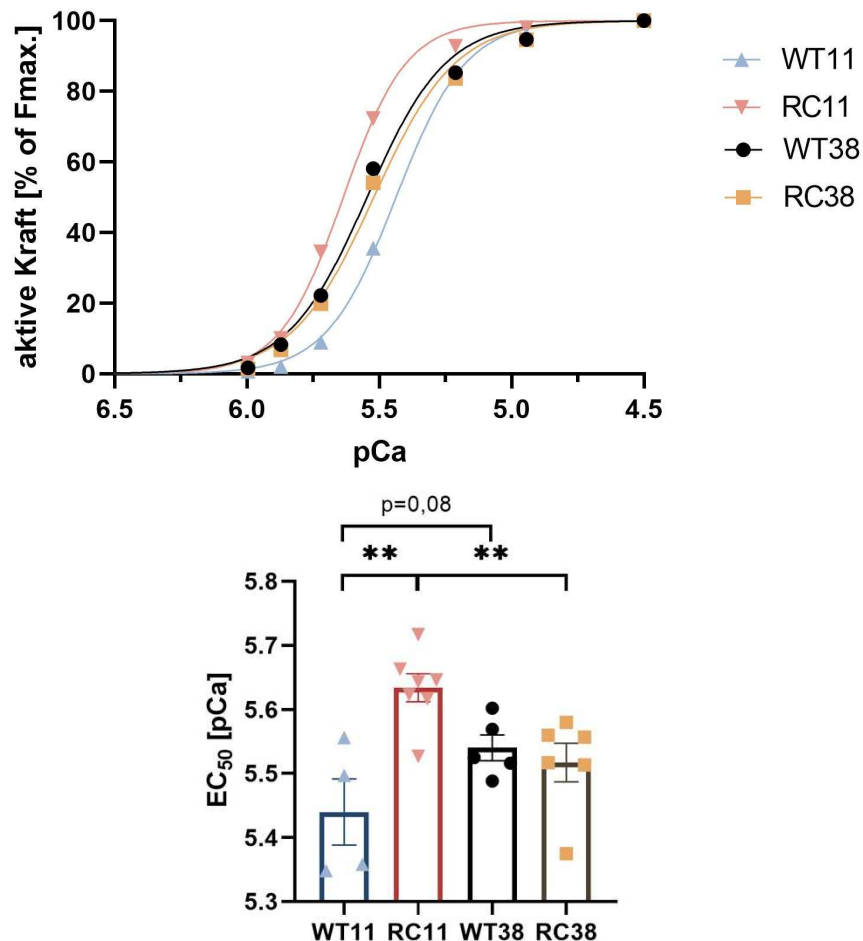


Abb. 15 Kalziumsensitivität

Oben: relative Aktivierung bei 120 % Vordehnung abhängig von der Kalziumkonzentration ($pCa = -\log[M_{Ca}]$); unten: EC_{50} Werte der kalziumabhängigen Aktivierung; die Diagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$); statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils mit */** gekennzeichnet (* = $p < 0,05$ / ** = $p < 0,01$ im *unpaired Student's t-test*); verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; EC_{50} = mittlere effektive Konzentration, F_{max} = maximale Kraft RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Keine Änderung der längenabhängigen Aktivierung

Zuletzt wurde die längenabhängige Aktivierung der Papillarmuskelfaser gemessen. Hierzu wurde die Faser auf 110, 120 und 130 % ihrer Gleichgewichtslänge gedehnt und die maximal erreichbare Ca^{2+} -induzierte Kraft (F_{max}) gemessen. Hierbei ergaben sich bei keiner Dehnungsstufe signifikante Unterschiede zwischen kranken und gesunden Mäusen oder zwischen Jüngeren und Älteren (Abb. 16).

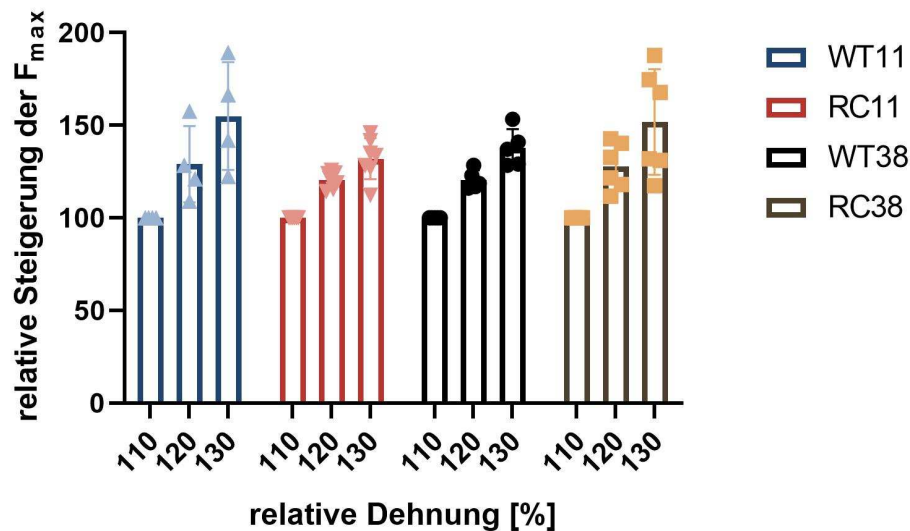


Abb. 16 Längenabhängige Aktivierung

Prozentuale Steigerung der maximalen Kraft abhängig von der Vordehnung; die Diagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$); statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils mit einem * gekennzeichnet (* = $p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; $F_{\max}$ = maximale Kraft, RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

4.3 Isoformen

Mehr N2BA in den 38 Wochen alten RC- verglichen mit den gleichaltrigen WT-Mäusen

Um die Zusammensetzung der beiden koexprimierten kardialen Isoformen N2B und N2BA zu erheben und damit Veränderungen der Steifigkeit des Sarkomers besser beurteilen zu können, wurde das Lysat des linken Ventrikels mittels agarosestabilisierter SDS-PAGE (2,2 % Gel) aufgetrennt, mit dem Farbstoff „Imperial Protein Stain“ gefärbt und die erhaltenen Banden densitometrisch ausgewertet. Die N2BA- und N2B-Bande aufsummiert, ergaben gemeinsam 100 % des vorliegenden Titins.

Der N2B Anteil der circa 38-wöchigen WT war mit $80 \pm 0,8$ % signifikant höher als in der WT11-Vergleichsgruppe mit $76 \pm 1,4$ % ($p = 0,046$). Der N2B-Anteil der älteren Mutationsträger (RC38) war mit $78 \pm 0,4$ % unverändert gegenüber dem N2B-Anteil der RC11 Gewebe mit $77 \pm 0,4$. Vergleicht man beide älteren Gruppen miteinander, war der N2B-Anteil in den RC38-Mäusen mit $p = 0,067$ nur tendenziell gegenüber den WT38-Geweben erniedrigt (Abb. 17).

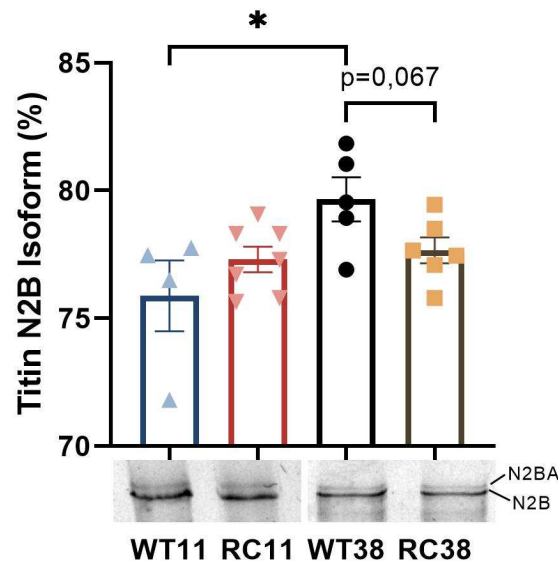


Abb. 17 Zusammensetzung der Isoformen

Darstellung der Zusammensetzung der Isoformen des Titins; $N2B + N2BA = 100\%$; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 3 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung sind zwei repräsentative Gele dargestellt, welche unterhalb der beiden Isoformen N2BA und N2B auch Degradationsderivate des Titins zeigen; verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

4.4 Posttranslationale Modifikationen des Titins

Zur Erhebung der posttranslationalen Modifikationen wurde das Titin mittels Western Blot Verfahren isoliert und mit jeweils spezifischen Antikörpern angefärbt. Die densitrometrisch ausgewerteten Daten wurden dabei auf die Daten des jeweils gleichaltrigen WT normiert und sind somit nur innerhalb der gleichen Altersgruppe vergleichbar.

Keine signifikante Änderung der Phosphorylierung an S4010 und S11878

Um weitere Aussagen über mögliche Veränderungen der Steifigkeit des Titins treffen zu können, wurden die Phosphorylierungslevel an den Phosphorylierungsstellen Serin 4010 in der N2B und am Serin 11878 in der PEVK-Domäne ermittelt.

Es wurde für die Phosphorylierungsstelle S4010 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Die relativen Phosphorylierungslevel zeigten sich mit $115 \pm 14\%$ für die RC11 und $123 \pm 17\%$ bei den RC38 gegenüber den gleichaltrigen WT leicht, aber nicht signifikant erhöht ($100 \pm 11\%$ WT11 und $100 \pm 15\%$ WT38). Bei der Phosphorylierungsstelle S11878 konnte bei den jüngeren RC11 mit $90 \pm 6\%$ im Vergleich zur gleichalten WT-Gruppe mit $100 \pm 7\%$ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein tendenzieller Anstieg der relativen S11878 Phosphorylierung wurde für die älteren RC-Tiere mit $123 \pm 11\%$ im Vergleich zu $100 \pm 5\%$ bei den WT38 beobachtet (Abb. 18).

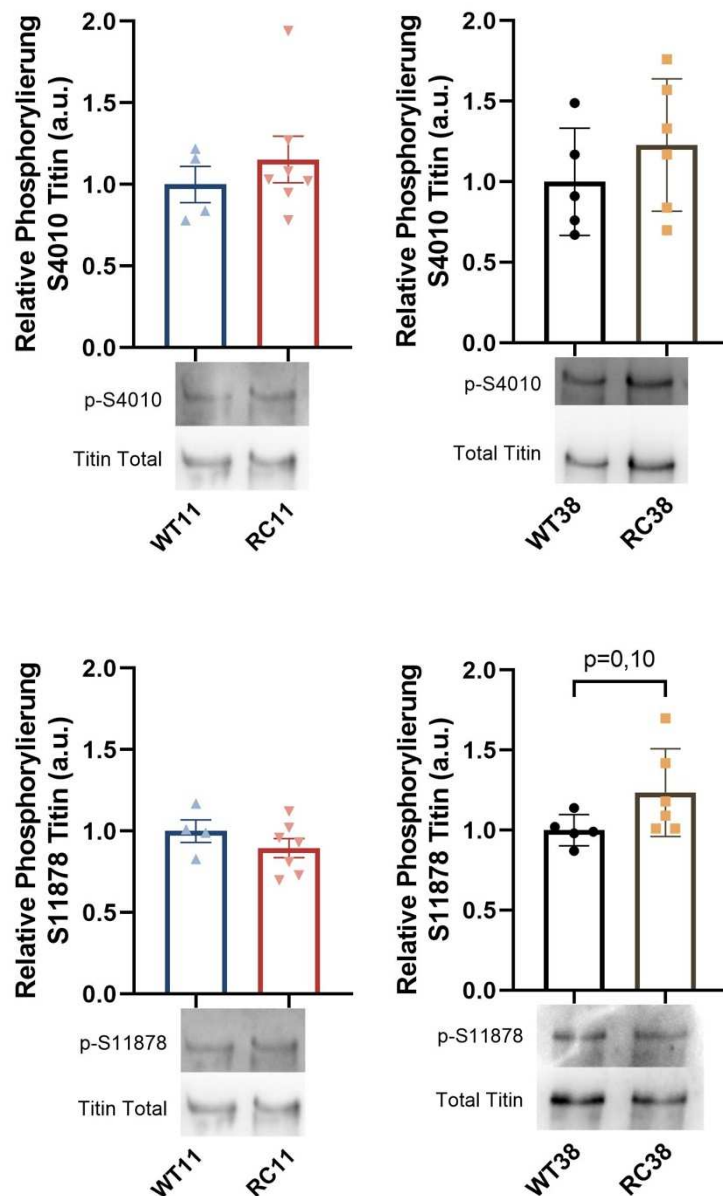


Abb. 18 Relative Titin Phosphorylierung an S4010 und S11878

Darstellung der Phosphorylierungslevel an den Phosphorylierungsstellen Serin 4010 und 11878 jeweils in Relation zum gleichaltrigen WT; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 3 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist jeweils eine repräsentative Membran dargestellt, dort ist die N2B Isoform zu sehen; verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; p = phosphoryliert, RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Erhöhte Titin Ubiquitinierung, dabei unveränderte Glutathionylierung

Eine Ubiquitinierung markiert das Titin zum proteolytischen Abbau. In der jungen RC11-Gruppe war mit $100 \pm 8 \%$ keine vermehrte relative Titin-Ubiquitinierung gegenüber den WT11-Tieren mit $100 \pm 9 \%$ zu beobachten. Jedoch stellte sich eine tendenziell erhöhte Ubiquitinierung am Titin bei den RC38-Mäusen mit $139 \pm 16\%$ im Vergleich zu $100 \pm 3 \%$ für WT38 heraus (Abb. 19).

Die biochemische Analyse der relativen Titin-Glutathionylierung zeigte weder für die jüngeren RC11-Tieren ($82 \pm 11 \%$) noch für die älteren RC38-Tiere ($103 \pm 13 \%$) eine statistisch signifikante Änderung gegenüber den WT11 ($100 \pm 17 \%$) bzw. den WT38 ($100 \pm 14 \%$; Abb. 19).

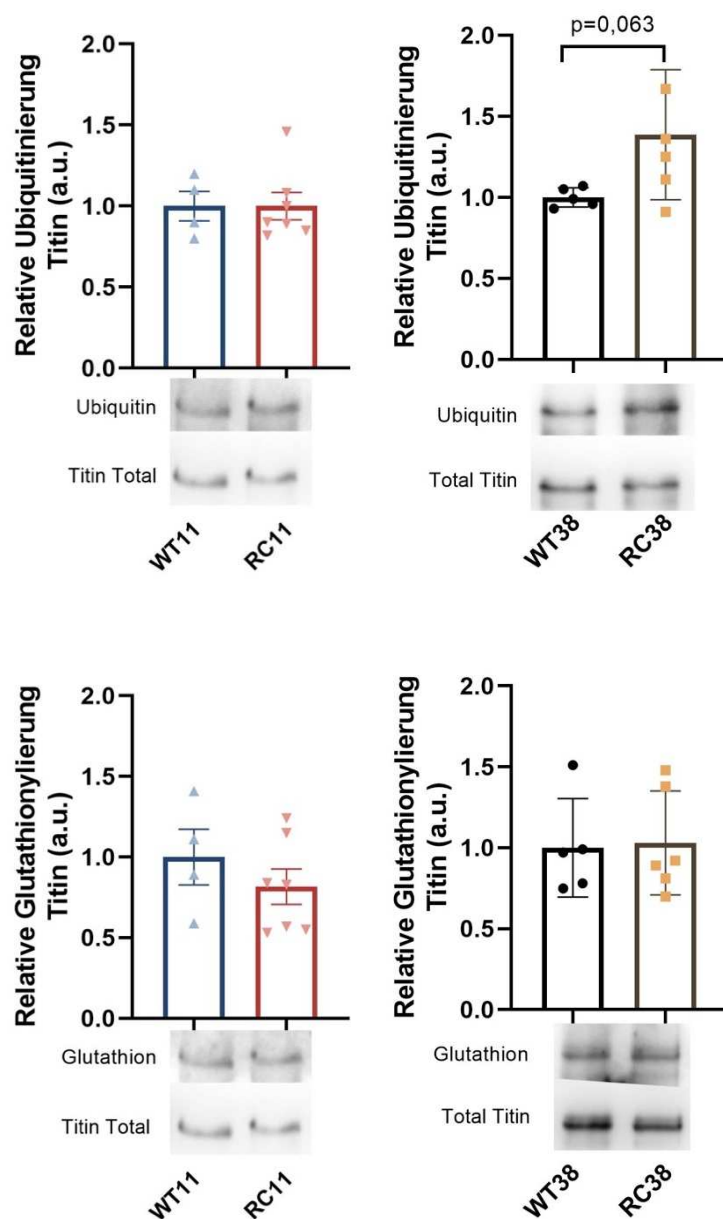


Abb. 19 Relative Titin Ubiquitinierung und Glutathionylierung

Darstellung der relativen Ubiquitinierungs- und Glutathionylierungslevel am Titin jeweils in Relation zum gleichaltrigen WT; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM (n = 4 - 7, pro Gewebe wurden 3 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p < 0,05 im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt, dort ist die N2B-Isoform zu sehen; verwendet wurden murine Herzen, die heterozygot die HCM auslösende Mutation R453C trugen und jeweils gleichaltrige Kontrolltiere; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

4.5 Proteinkinasen

Keine Änderung der Aktivität der PKC α in jungen und alten RC-Mäusen

Um mögliche Änderungen an der Titin Phosphorylierung erklären zu können, wurde die Aktivität der PKC α anhand ihres Aktivierungslevels durch die Phosphorylierung am Threonin 497 im Western Blot Verfahren untersucht. Bei den jungen RC-Mäusen war das Phosphorylierungslevel der PKC α mit 87 ± 5 % gegenüber den gleichaltrigen WT11 mit 100 ± 10 % statistisch nicht verändert. Ebenfalls nicht verändert waren die älteren RC-Mäusen mit 97 ± 4 % und die WT38 mit 100 ± 5 % (Abb. 20).

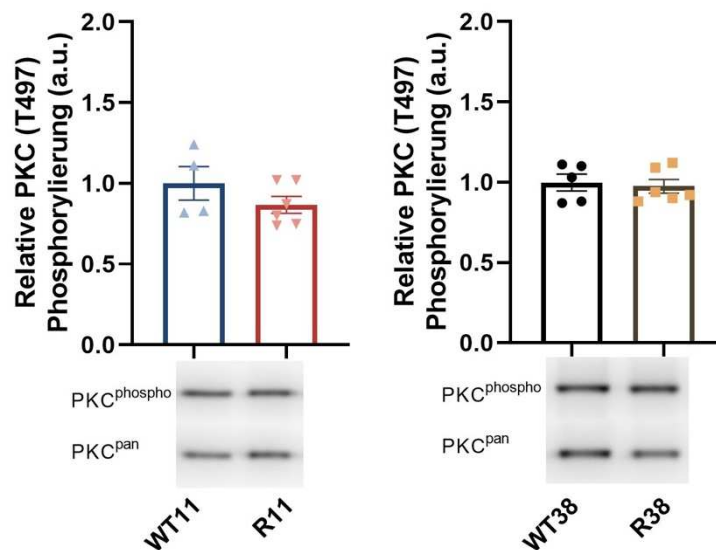


Abb. 20 Relative PKC α Phosphorylierung

Darstellung der PKC α -Phosphorylierungslevel im Verhältnis zur gesamten PKC α Menge („PKC^{pan}“) in heterozygoten R453C Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM (n = 4 - 7 pro Gruppe, pro Gewebe wurden 2 - 7 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet (p < 0,05 im *unpaired student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt. Die Western Blots wurden freundlicherweise durch die medizinisch technische Assistentin Sabine Bongardt durchgeführt und der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt; Phospho = phosphoryliert RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Keine Unterschiede der Troponin I Phosphorylierung in jungen und alten RC-Mäusen

Durch die Phosphorylierung von Troponin I an Position S23/24 kann die Kalziumsensitivität der Kraftentwicklung moduliert werden. Diese Phosphorylierung wird durch die PKA durchgeführt, sodass anhand der relativen Phosphorylierung von Troponin I Rückschlüsse auf die PKA Aktivität gezogen werden können. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den RC11 mit $114 \pm 9 \%$ und den WT11 mit $100 \pm 15 \%$ sowie den RC38 mit $95 \pm 7 \%$ und den WT38 mit $100 \pm 5 \%$ (Abb. 21).

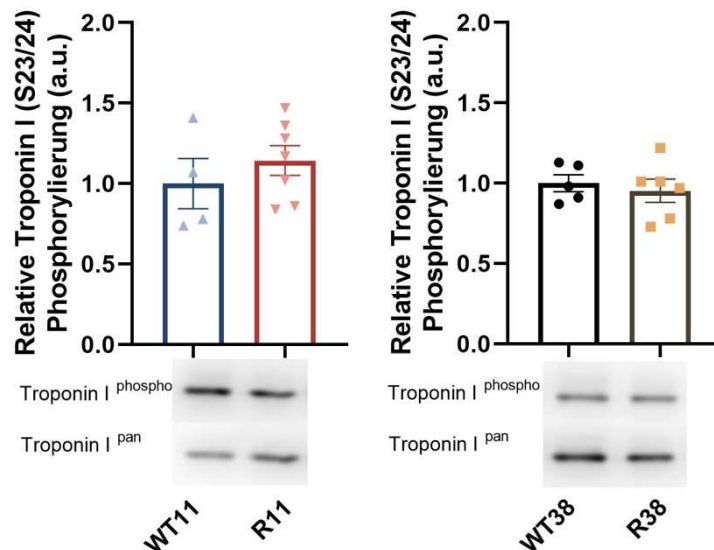


Abb. 21 Relative Troponin I Phosphorylierung

Darstellung der Troponin I Phosphorylierungslevel am Serin 23/24 im Verhältnis zur gesamten Troponin I Menge („Troponin I^{pan66}“) in heterozygoten R453C Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$ pro Gruppe, pro Gewebe wurden 2 - 7 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt. Diese Western Blots wurden freundlicherweise durch die medizinisch technische Assistentin Sabine Bongardt durchgeführt und der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt; Phospho = phosphoryliert, RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

4.6 Repräsentanten der Proteinqualitätskontrolle

Um Veränderungen der Proteinqualitätskontrolle feststellen zu können, wurden eine Reihe von Markern im Western Blot Verfahren (SDS-PAGE, 7,5 – 15 % Gele je nach Zielprotein) quantitativ erhoben. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und, sofern nicht anders angegeben, mit α -Aktinin ins Verhältnis gesetzt. Der erhobene Quotient wurde jeweils auf den Mittelwert der gleichaltrigen WT-Gruppe normiert und ist somit nur innerhalb derselben Altersgruppe vergleichbar.

Erhöhte Gesamt-Ubiquitinierung bei den 38 Wochen alten RC-Mäusen

Zunächst wurde das Ausmaß der Ubiquitinierung im Gewebelysat bestimmt. Verwendet wurden in der SDS-PAGE 7,5 % Polyacrylamid Gele und es wurde die gesamte Lauffront densitometrisch im Verhältnis zur α -Aktinin-Bande ausgewertet.

Bei den jüngeren Mutationsträgern (RC11) zeigte sich noch keine Veränderung der Polyubiquitinierung mit $104 \pm 3 \%$ gegenüber $100 \pm 8 \%$ bei den WT11. In den RC38 war die relative Proteinubiquitinierung dagegen mit $115 \pm 5 \%$ im Vergleich zu den WT38 mit $100 \pm 4 \%$ signifikant erhöht ($p = 0,041$; Abb. 22).

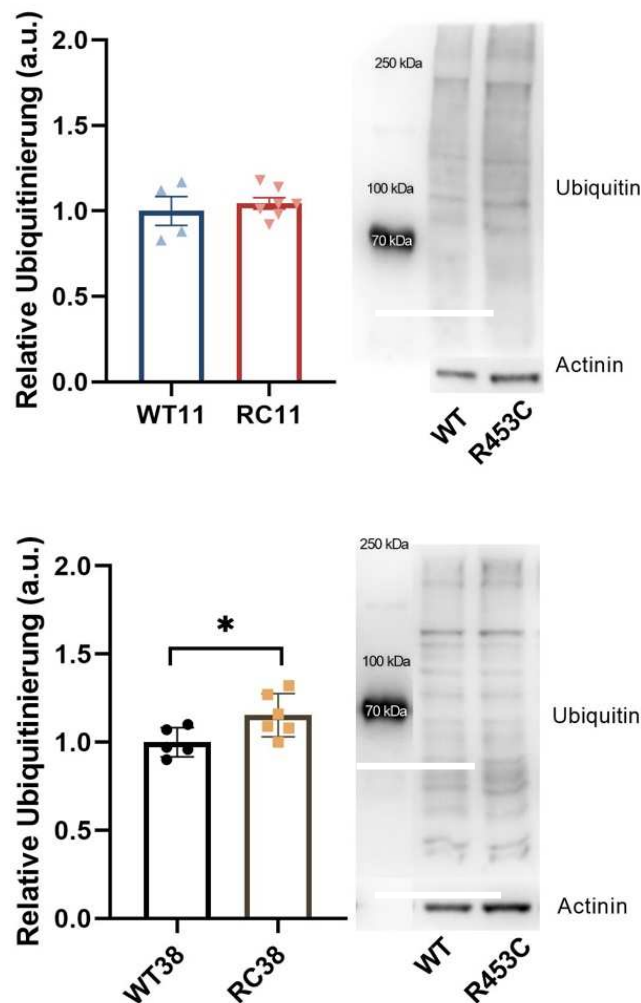


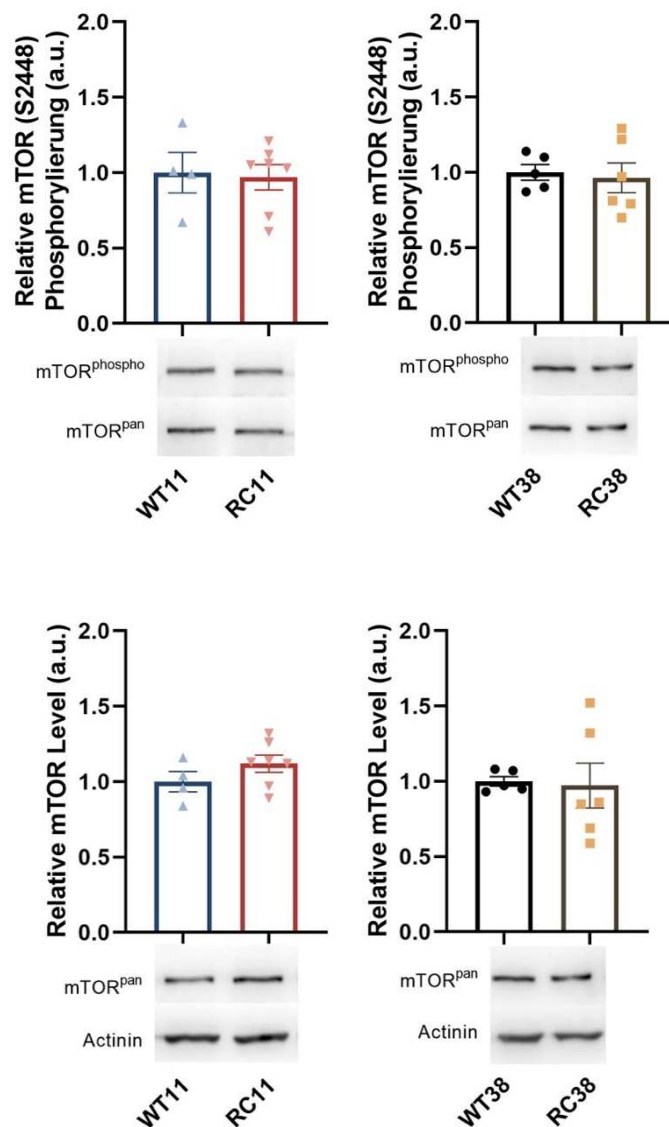
Abb. 22 Gesamt-Ubiquitinierung

Darstellung der Gesamt-Ubiquitinierung im Verhältnis zur α -Aktinin Menge in heterozygoten R453C-Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 2 - 3 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); neben der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt. RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Die Autophagie-Regulatoren waren unverändert

Als Indikatoren für die Autophagie-Regulation wurden AMPK α und mTOR verwendet. Für mTOR wurde sowohl der phosphorylierte Anteil im Vergleich zum Gesamt-mTOR als auch das Gesamt-mTOR im Vergleich zum α -Aktinin untersucht.

Bei den RC-Mäusen zeigte sich in allen Altersgruppen weder für die mTOR Phosphorylierungslevel oder für die mTOR Gesamtmenge noch für die AMPK α Menge ein signifikanter Unterschied. Das mTOR Phosphorylierungslevel der RC11-Mäuse lag bei $97 \pm 8\%$ gegenüber $100 \pm 13\%$ bei den WT11 und das Level der RC38 bei $96 \pm 10\%$ im Vergleich zu $100 \pm 5\%$ bei den WT38. Die mTOR Gesamtmenge der RC11 betrug $112 \pm 6\%$, der WT11 $100 \pm 7\%$, der RC38 $97 \pm 15\%$ und der WT38 $100 \pm 3\%$. Das AMPK α Level bemaß sich bei $105 \pm 5\%$ für die RC11, $100 \pm 7\%$ für die WT11, $107 \pm 9\%$ für die RC38 und bei $100 \pm 6\%$ für die WT38 (Abb. 23).



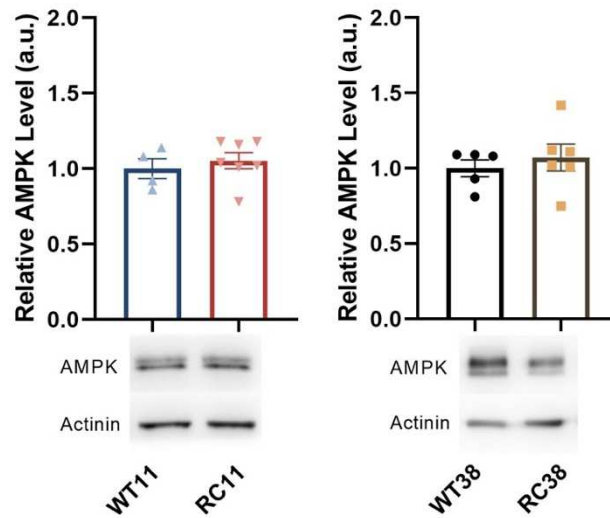


Abb. 23 Relative mTOR Phosphorylierungs-, mTOR Gesamt- und AMPK α Level

Darstellung der mTOR Phosphorylierungslevel, der mTOR Gesamtmenge und der AMPK α Menge im Verhältnis zur α -Aktinin Menge in heterozygoten R453C-Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 2 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Der Autophagie-Membrananker LC3-II war in jungen und alten Mäusen unverändert, das Adapterprotein p62/SQSTM1 war dagegen in beiden Altersgruppen erhöht

LC3-II und p62, auch SQSTM1 genannt, besitzen ebenfalls wichtige Funktionen in der Autophagie. LC3 kann in einer lipidierten Form (LC3-II) und einer nicht lipidierten Form (LC3-I) vorliegen, wobei nur die lipidierte Form seiner Aufgabe als Membrananker in der Autophagosom-Membran nachkommen kann. Als Marker für eine aktivierte Autophagie wurde daher der relative Anteil der lipidierten LC3 Form untersucht.

Der Vergleich der Mengenverhältnisse von LC3-II zu LC3-I sowie LC3-II zu α -Aktinin ergab für beide Altersgruppen keine signifikanten Veränderungen. Der Mittelwert für LC3-II:LC3-I zählte bei den RC11 79 ± 13 %, bei den WT11 100 ± 9 %, RC38 97 ± 8 % und WT38 100 ± 3 %. Der Mittelwert für LC3-II: α -Aktinin maß bei den RC11 105 ± 13 %, WT11 100 ± 13 %, RC38 102 ± 6 % und bei den WT38 100 ± 2 % (Abb. 24).

Die Nebeneinanderstellung von p62 zu α -Aktinin ergab sowohl für die jüngeren RC als auch für die älteren eine Steigerung des p62. In den RC11 zeigte sich mit 138 ± 11 % ein signifikanter Anstieg der relativen p62 Expression im Vergleich zu den WT11 mit 100 ± 9 % ($p = 0,05$). In den RC38 waren die relativen p62 Proteinlevel mit 130 ± 12 % im Vergleich zu den WT38 mit 100 ± 6 % tendenziell erhöht ($p = 0,077$; Abb. 24).

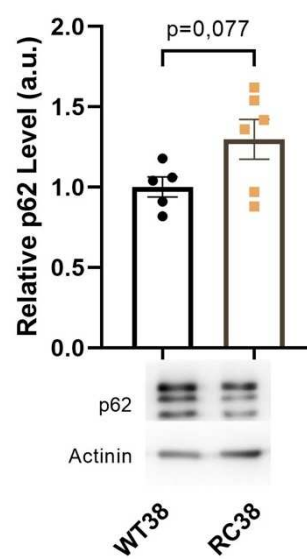
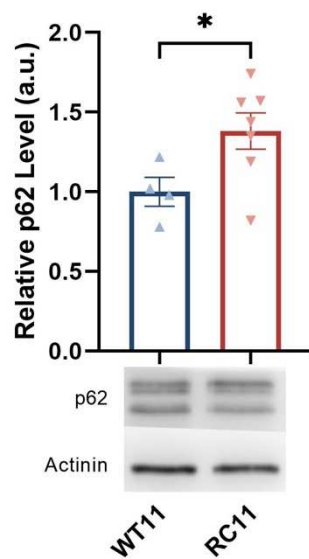
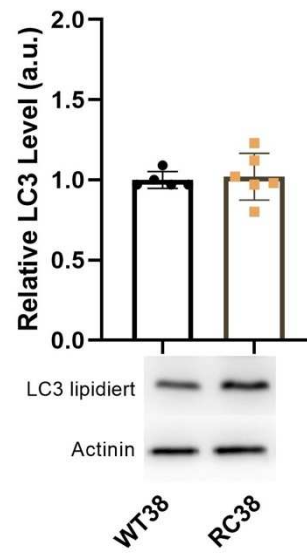
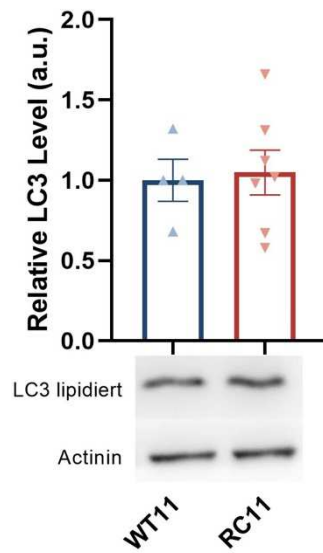
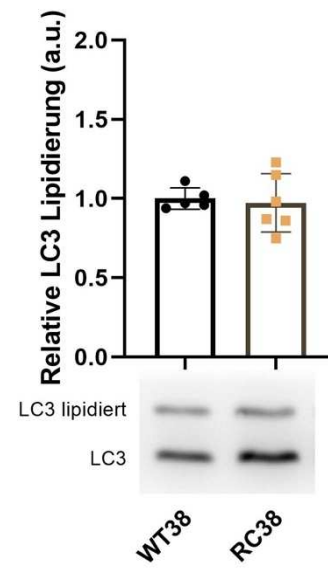
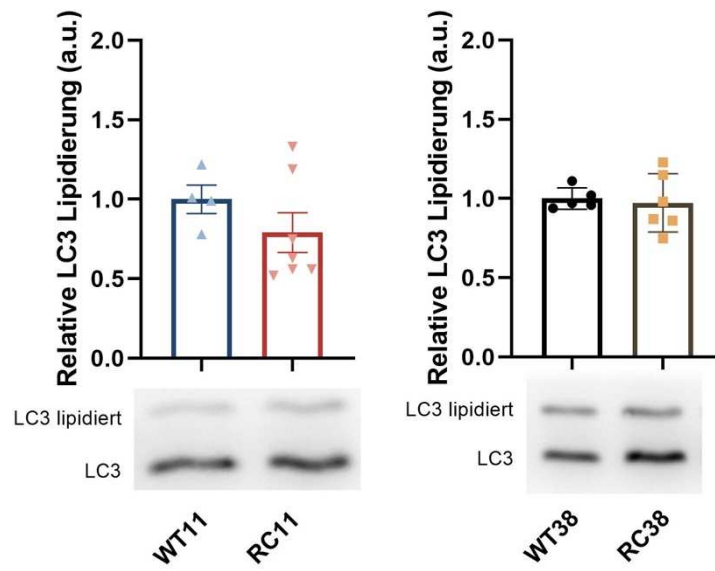


Abb. 24 Relative LC3 Lipidierung, LC3 und p62/SQSTM1 Level

Darstellung der LC3 Lipidierung, der LC3 und p62/SQSTM1 Level im Verhältnis zur α -Aktinin Menge in heterozygoten R453C-Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 2 - 4 Proteinbanden analysiert); Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Kein quantitativer Unterschied in der Proteasom Untereinheit PSMA2

Der Vergleich von PSMA2 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den altersgepaarten Gruppen. RC11 bemaß sich bei $119 \pm 9 \%$, WT11 bei $100 \pm 4 \%$, RC38 bei $112 \pm 15 \%$ und WT38 bei $100 \pm 6 \%$ (Abb. 25).

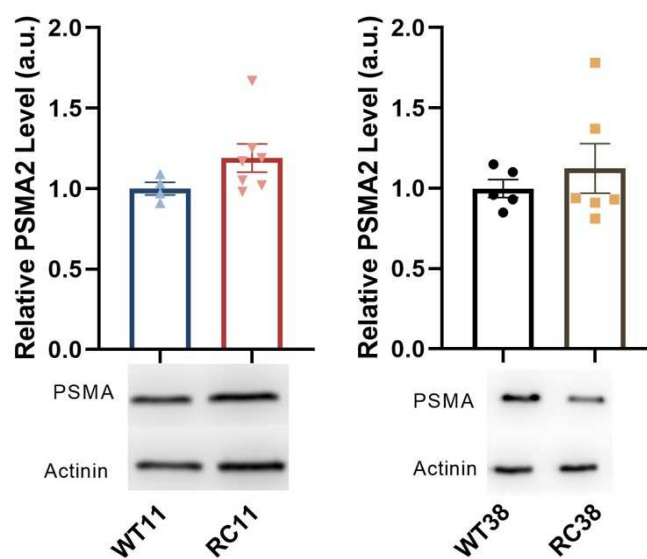


Abb. 25 Relative PSMA2 Level

Darstellung von PSMA2 Level im Verhältnis zur α -Aktinin Menge in heterozygoten R453C-Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 2 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

Das Hitzeschockprotein α B-Crystallin wird weder in jungen noch in alten Tieren verändert exprimiert

In der relativen Proteinexpression von α B-Crystallin im Lysat ließen sich in beiden Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und heterozygoten Mutationsträgern feststellen. In der Gruppe der RC11 lag das Hitzeschockprotein mit $102 \pm 11 \%$, bei den WT11 $100 \pm 8 \%$, in der Gruppe der RC38 mit $116 \pm 8 \%$ und bei den WT38 mit $100 \pm 11 \%$ vor (Abb. 26).

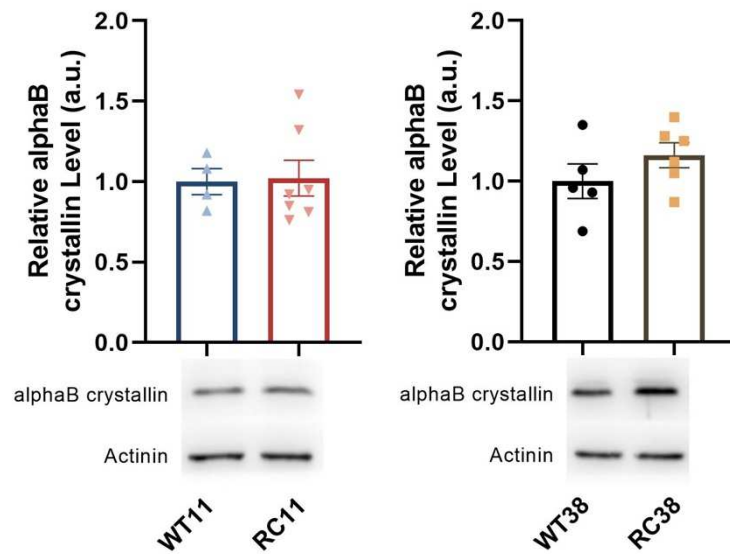


Abb. 26 Relative α B-Crystallin Level

Darstellung von α B-Crystallin Level im Verhältnis zur α -Aktinin Menge in heterozygoten R453C-Mäusen, jeweils in Relation zur gleichaltrigen WT-Gruppe; das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 4 - 7$, pro Gewebe wurden 2 - 4 Proteinbanden analysiert); statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *unpaired Student's t-test*); unter der Abbildung ist eine repräsentative Membran dargestellt; RC11/RC38 = R453C/+ Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt, WT11/WT38 = WT-Mäuse 11 bzw. 38 - 43 Wochen alt.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung früher Veränderungen in der Pathogenese der HCM. Als Grundlage diente ein heterozygoten Mausmodell mit der HCM-auslösenden Myosinmutation R453C, welches im Alter von 10 - 12 Wochen (RC11) noch keine Einschränkung der Herzfunktion im Vergleich zu Mäusen in einem Alter von 38 - 43 Wochen (RC38) aufwies (Blankenburg et al., 2014). Zu den Zielen gehört es, das Muskelprotein Titin als möglichen Auslöser der diastolischen Dehnbarkeitsstörung zu prüfen. Hierbei zeigte die Messung der passiven Steifigkeit keine Unterschiede zwischen den RC-Mäusen und den gleichaltrigen WT, jedoch Unterschiede in der Expression der verschiedenen Isoformen von Titin sowie im Phosphorylierungsmuster des Proteins. Ein weiteres Ziel ist es, die für spätere Krankheitszeitpunkte bereits beschriebene Erhöhung der Kalziumsensitivität und Kontraktilität in einer frühen Phase der Pathogenese einzuordnen. Hierbei zeigte sich, dass die Kalziumsensitivität und die maximale Kraft bei den symptomatisch noch gesunden RC11-Tieren bereits erhöht waren, jedoch nicht bei den HCM-erkrankten RC38-Tieren. Ein drittes Ziel ist es zu prüfen, ob die Steigerung der Kontraktilität zu Störungen im Proteinkontrollsystem führt. Die Ergebnisse zeigten hierbei Veränderungen in der Ubiquitinierung des Zelllysats und in der relativen Expression von Autophagie-Markern.

5.1 Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis

Vorangegangene Studien haben in acht Wochen alten RC-Mäusen keine Einschränkung der Herzfunktion im Vergleich zu WT-Tieren festgestellt. Die Studie vergleicht den linksventrikulären Druck und die Geschwindigkeiten des Druckauf- und abbaus. Auch das linksventrikuläre Volumen und die Herzwanddicke ist in diesem Alter unverändert. Parameter, die die diastolische Dehnbarkeit repräsentieren, sind für die RC-Mutation nicht gemessen worden. Erst im Alter von 26 Wochen kann die konzentrische Hypertrophie als Kennzeichen einer HCM beobachtet werden (Blankenburg et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des Herz- zu Körpergewicht Verhältnisses bestätigt, dass im Alter von 11 Wochen noch keine HCM-charakteristische manifeste, ventrikuläre Hypertrophie vorlag und das Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis zwischen den WT11 und RC11 nahezu identisch war (Abb. 12). Die RC38-Tiere zeigten dagegen ein niedrigeres Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis. Dies erscheint zunächst kontraintuitiv zu einer Verdickung des Herzmuskels, doch fließt durch die konzentrische Hypertrophie aus dem verkleinerten intraventrikulären Raum das Blut beim Präparationsprozess besser heraus. Anders formuliert, verblieb beim Wiegen der Herzen der WT38 vermutlich mehr Blut im Ventrikel, sodass die Herzen bei der hier verwendeten Methode der Gewichtsbestimmung schwerer waren. Bei der Präparation der Papillarmuskeln zeigten die Herzen der RC38-Mäuse außerdem eine deutliche Hypertrophie des linken Ventrikels, die hier jedoch nicht weiter charakterisiert wurde.

Bei einem geringen Teil der HCM-Patienten geht die Erkrankung als Endstadium in eine dilatative-hypokinetische Phase über (Harris et al., 2006, Biagini et al., 2005). Eine solche Entwicklung zeigte sich für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse weder optisch während der Organpräparation noch durch das erhobene Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis.

Somit handelt es sich bei dem verwendeten Tiermodell ausschließlich um eine HCM mit konzentrischer Hypertrophie.

5.2 Passive Steifigkeit

5.2.1 Zusammensetzung der Titinisformen

Ein zentrales Merkmal der HCM ist die verringerte diastolische Dehnbarkeit, die bereits vor Auftreten einer Hypertrophie vorkommt und deshalb als früher Screening-Parameter bei Risikopatienten eingesetzt wird (Stewart et al., 1968, Marian and Braunwald, 2017, Michels et al., 2009). Experimentell wird die diastolische Dehnbarkeit häufig anhand der passiven Steifigkeit des Sarkomers beurteilt. In der vorliegenden Arbeit wurde Titin als Hauptdeterminante der passiven Steifigkeit genauer untersucht (Granzier and Irving, 1995).

Eine Möglichkeit, die Steifigkeit des Titins zu beeinflussen, ist das Verhältnis der beiden unterschiedlich elastischen Isoformen zu verändern. Eine vermehrte Expression der elastischeren N2BA-Isoform wurde bereits häufiger bei Herzerkrankungen beobachtet, beispielsweise bei Patienten mit DCM, ischämischer Herzerkrankung oder HFpEF (Makarenko et al., 2004, Neagoe et al., 2002, Borbély et al., 2009). Oft ist die Verschiebung zur elastischeren Isoform mit einer messbaren Verringerung der passiven Steifigkeit assoziiert. An dieser Stelle ist es wichtig, die Hypertrophie im Rahmen einer HCM von Hypertrophien anderer Ursachen abzugrenzen. Bei beispielsweise der arteriellen Hypertonie wird von einer Erhöhung des steiferen N2B-Anteils berichtet. Dies wird damit erklärt, dass das Herz einen höheren Druck aufbauen bzw. standhalten muss (Warren et al., 2003, Hamdani et al., 2013a, van Heerebeek et al., 2006).

Auch für HCM-Gewebe gibt es Hinweise auf einen erhöhten Anteil der elastischeren N2BA-Isoform. Zwei Studien zur HCM von Nijenkamp et al. (2018 und 2020) zeigen eine höhere Expression der elastischeren N2BA-Isoform. Beide Studien von Nijenkamp sind an Myektomie Gewebe von obstruktiven HCM-Patienten durchgeführt. In einer der Studien ist die N2BA-Expression in einem mittleren und einem späteren Stadium der Erkrankung beurteilt worden (Nijenkamp et al., 2020). Interessanterweise verändert sich das Verhältnis von N2BA zu N2B nicht mit fortschreitender Erkrankung. Darüber hinaus wird in derselben Studie eine Fibrose im HCM-Gewebe beobachtet und die vermehrte Expression der elastischeren Titin-Isoform als möglicher Kompensationsmechanismus für die Fibrose vorgeschlagen (Nijenkamp et al., 2020). Auch für die RC-Mäuse ist eine Fibrose des Myokards bekannt (Blankenburg et al., 2014). Übertragen auf die vorliegende Arbeit und unter der Annahme, dass es sich bei der Veränderung der Titinisform um die Kompensation einer Fibrose handelt, wäre in den älteren RC38-Mäusen ein erhöhter N2BA-Anteil zu erwarten gewesen. Die jungen RC-Mäuse zeigen noch keine Fibrosierung (Blankenburg et al., 2014).

In den durchgeführten Western Blots war das Titin N2BA:N2B-Verhältnis zwischen den noch gesunden RC11- und WT11-Mäusen nicht unterschiedlich. Jedoch wiesen die RC38 wie angenommen mit 22 % einen tendenziell höheren prozentualen Anteil der elastischeren N2BA-

Isoform auf als die gleichaltrigen WT38 mit 20 % (Abb. 17). Das untermauert weiter die Hypothese, dass die Änderung des Expressionsmusters der Titinisoformen die erhöhte Steifigkeit aufgrund einer Fibrose ausgleichen soll (Nijenkamp et al., 2020).

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die älteren WT38-Mäuse einen höheren N2B-Anteil hatten als die jungen WT11-Mäuse. Dies kann möglicherweise eine Nachwirkung des bereits bekannten postnatalen Isoformen-Shift von N2BA auf N2B sein (Opitz et al., 2004). Gleichzeitig zeigte sich zwischen den RC11- und RC38-Mäusen kein altersbedingter Isoformen-Shift, was darauf schließen lässt, dass die RC-Mutation im Laufe der Alterungsprozesse zu einem abweichenden Remodeling des Myokards führt.

Weitestgehend ausgeschlossen werden kann aufgrund der Daten jedoch, dass die Zusammensetzung der Titinisoformen für die gestörte diastolische Dehnbarkeit bei der HCM ursächlich ist. In diesem Fall wäre eine vermehrte Expression der steiferen N2B-Isoform zu erwarten gewesen. Außerdem trat die Veränderung der Isoformen erst nach Manifestation der Erkrankung auf, sodass eine direkte Konsequenz aus der RC-Myosinmutation ebenfalls sehr unwahrscheinlich ist.

5.2.2 Titin-Phosphorylierung und mögliche Gründe

Eine weitere Möglichkeit, die Steifigkeit des Titins zu beeinflussen, ist die Phosphorylierung verschiedener Domänen des Moleküls (Linke and Hamdani, 2014). Zunächst ist es wichtig zu verstehen, wie die untersuchten Kinasen und Phosphorylierungsstellen sich auf die passive Steifigkeit des Titins auswirken. Im Titin sind über 300 theoretisch mögliche Phosphorylierungsstellen bekannt (Koser et al., 2019). Phosphorylierungen in der I-Band-Region des Titins sind besonders wichtig für die Anpassung der passiven Steifigkeit des Titinmoleküls (Kruger and Linke, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei der bisher am besten charakterisierten Phosphorylierungsstellen untersucht: S4010 in der N2B-Region und S11878 in der PEVK-Domäne. Beide liegen in der elastischen I-Band-Region (Abb. 3). Die ausgewählten Phosphorylierungsstellen sind speziesübergreifend konserviert und können stellvertretend für eine Titin-Region und Proteinkinase betrachtet werden (Hidalgo et al., 2009, Kötter et al., 2013). Das Phosphorylierungsniveau der untersuchten Stelle lässt sich auf weitere Phosphorylierungsstellen der gleichen Domäne im Titin extrapolieren (Linke and Hamdani, 2014). Grundsätzlich macht eine Phosphorylierung der N2B-Region das Titin elastischer, während eine Phosphorylierung der PEVK-Domäne das Titin versteift (Kötter et al., 2013). Diese beiden Phosphorylierungszustände können sich gegenseitig verstärken. So ist beispielsweise die N2B-Region in herzinsuffizientem Gewebe hypophosphoryliert und die PEVK-Region hyperphosphoryliert. Beide Veränderungen führen zu einer additiven Versteifung des Titins (Kötter et al., 2013). Doch nicht immer sind die Ergebnisse des Phosphorylierungslevel so eindeutig. Ein Beispiel hierfür ist, dass die Kinase CaMKII sowohl die PEVK-Domäne als auch die N2B-Region phosphoryliert. Theoretisch würden sich diese beiden Effekte gegenseitig aufheben, doch eine direkte Messung der passiven Steifigkeit zeigt eine Reduktion der passiven Steifigkeit, sodass der Einfluss der Kinase auf die N2B-Region zu dominieren scheint (Hamdani et al., 2013b). Daher sollte die Bestimmung des

Phosphorylierungsgrad der beiden Domänen mit einer Messung der passiven Steifigkeit des Gewebes ergänzt werden.

S11878-Phosphorylierung in der PEVK-Domäne

Zunächst wurde die Phosphorylierung am S11878 analysiert. Die Phosphorylierung in der PEVK-Region sorgt für eine Versteifung des Titins und wird durch die PKC α katalysiert (Hidalgo et al., 2009). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu prüfen, ob Titin als Ursache für die gestörte diastolische Dehnbarkeit bei der untersuchten HCM-Mutation in Frage kommt. Demnach wäre eine erhöhte Steifigkeit durch eine verstärkte Phosphorylierung der PEVK-Region zu erwarten.

Genau diese erhöhte Phosphorylierung am S11878 ist bereits in der Literatur von Kötter et al. (2013) an humanen, herzinsuffizienten HCM-Geweben beschrieben. Die von Kötter et al. verwendeten HCM-Proben basierten auf einer klinischen Diagnose, sodass die Proben auch nicht-familiäre, nicht-genetisch bedingte HCM umfassen. Unklar ist bislang, wie sich die veränderte Phosphorylierung im Laufe der HCM-Progression verhält. Denkbar ist durchaus, dass diese versteifende Phosphorylierung sehr früh auftritt, da eine gestörte diastolische Dehnbarkeit ein frühes Merkmal der HCM bereits vor Entwicklung einer Hypertrophie sein kann (Michels et al., 2009).

Laborchemisch konnte in der vorliegenden Arbeit für die älteren RC38-Mäuse eine tendenziell erhöhte S11878-Phosphorylierung gezeigt werden. Die jüngeren, noch nicht HCM-erkrankten Tiere zeigten keine Änderung der S11878-Phosphorylierung im Vergleich zu den gleichaltrigen WT11-Tieren (Abb. 18). Damit ist die von Kötter et al. (2013) an humanen Proben festgestellte erhöhte Phosphorylierung auch für die genetische HCM mit RC-Mutation bestätigt. Zudem befinden sich die humanen HCM-Proben von Kötter et al. (2013) in einem sehr späten Stadium der HCM mit einer schweren, transplantationsbedürftigen Herzinsuffizienz. Die vorliegenden Daten der RC38-Mäuse zeigen ergänzend, dass die erhöhte Phosphorylierung auch bereits vor Auftreten einer schweren Herzinsuffizienz eine Rolle spielt, jedoch noch nicht vor klinischer Manifestation, wie die Daten der RC11-Mäuse zeigen.

Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Phosphorylierung von Titin S11878 in den RC38-Tieren wäre eine erhöhte Aktivität der PKC α . Um diese Aktivität zu messen, wurde das Phosphorylierungslevel der aktivierenden Phosphorylierung am T497 der PKC α im Western Blot Verfahren gemessen. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den jeweils gleichaltrigen WT- und RC-Mäusen festgestellt werden (Abb. 20). Andernfalls könnte für den leichten Anstieg der S11878 Phosphorylierung auch eine andere Kinase verantwortlich sein. Infrage kommen die CaMKII δ und die PKD, die ebenfalls die PEVK-Domäne phosphorylieren (Loescher et al., 2022).

Betrachtet man die festgestellte, vermehrte Phosphorylierung der PEVK-Domäne isoliert, ist eine erhöhte passive Steifigkeit des Titins und damit des Herzmuskelgewebes bei den HCM-erkrankten RC38-Mäusen zu erwarten. Jedoch lässt das Versuchsergebnis der Isoformen eine

erniedrigte Steifigkeit des Herzmuskelgewebes vermuten (siehe Abschnitt 5.1.1). Um nun herauszufinden, ob eine der beiden Änderungen am Titin dominiert oder sie sich gegenseitig ausgleichen, wurde die passive Steifigkeit an Papillarmuskeln der Mäuse gemessen.

5.2.3 Physikalische Messung der passiven Steifigkeit

Die bisherige Datenlage zur passiven Steifigkeit von HCM-Gewebe ist sehr uneinheitlich. In einem Review von Vikhorev und Vikhoreva (2018) ist die passive Steifigkeit aus mehreren Studien an humanen HCM-Proben gemittelt worden. Hierbei zeigt sich die passive Steifigkeit nicht verändert. Je nachdem welche Studie betrachtet wird, zeigt sich das HCM Gewebe steifer, unverändert oder elastischer. Eine erniedrigte Steifigkeit wurde an humanen Kardiomyozyten mit terminaler, HCM-bedingter Herzinsuffizienz und mit einer obstruktiven Form der HCM gemessen (Nijenkamp et al., 2020). In einer früheren Messung derselben Arbeitsgruppe, die ebenfalls an humanen Proben derselben Studiengruppe forschte, zeigt sich keine Veränderung der passiven Steifigkeit (Nijenkamp et al., 2018). Warum sich das Messergebnis der passiven Steifigkeit zwischen den beiden Studien dieser Arbeitsgruppe unterscheidet, obwohl die Probenherkunft nahezu identisch beschrieben wird, blieb von den Autoren unkommentiert. Im Gegensatz dazu ist teilweise eine erhöhte Steifigkeit in humanem Herzgewebe nachgewiesen worden (Kötter et al., 2013, Hassoun et al., 2021). Allerdings stammen diese Proben von explantierten Herzen im Endstadium der HCM-bedingten Herzinsuffizienz und repräsentieren damit einen sehr späten Zeitpunkt in der Pathogenese der HCM. Möglicherweise hängt also die passive Steifigkeit vom Stadium der Erkrankung ab.

Für die verwendeten RC-Mäuse ist bisher eine ausgeprägte kardiale Fibrose im Alter von ≥ 26 Wochen vorbekannt, was auf eine erhöhte Ventrikelsteifigkeit in den älteren RC38-Mäusen hindeutet (Blankenburg et al., 2014). Untersuchungen zur passiven Steifigkeit des Herzgewebes von RC-Mäusen wurden bisher nicht durchgeführt, da die oben zitierten Studien erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien zeigen, ist die Entwicklung der passiven Steifigkeit zwischen den R11- und RC38-Mäusen von besonderem Interesse.

In den durchgeführten Messungen wurde die passive Steifigkeit an Papillarmuskelpräparaten erhoben. Hier zeigte sich weder bei den jungen noch bei den älteren Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen den RC- und den WT-Tieren (Abb. 13). Dies bedeutet, dass die Muskelfasern der RC38-Tiere zwar bereits charakteristische Veränderungen der HCM ausgeprägt haben, jedoch keine erhöhte passive Steifigkeit verglichen mit den gleichaltrigen WT38-Mäusen hatten. Damit konnte die erwartete Steigerung der passiven Steifigkeit, die aufgrund der bei den RC38-Mäusen bekannte Fibrose und die bei der HCM allgemein bekannten Störung der diastolischen Dehnbarkeit erwartet wurde, nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass in den RC38-Tieren Kompensationsmechanismen vorliegen, die den Fibrose-bedingten Anstieg der passiven Steifigkeit ausgleichen. In einem vorherigen Abschnitt wurde bereits ein erhöhter Anteil der elastischeren Titin-Isoform N2BA in den RC38-Mäusen diskutiert. Diese Isoformen-Verschiebung könnte der Ausgleich zu dem Fibrose-bedingte Anstieg der Gewebesteifigkeit sein (siehe Abschnitt 5.2.1).

Zudem wurde in einem vorherigen Abschnitt diskutiert, dass die Ergebnisse der Titinisoformen und der Titinphosphorylierung bei den RC38 gegenläufige Ergebnisse hinsichtlich der erwartbaren passiven Steifigkeit ergaben. Durch den fehlenden Unterschied der passiven Steifigkeit zwischen WT38 und RC38-Mäusen scheinen sich diese Effekte auszugleichen (siehe Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass die passive Steifigkeit der jungen WT-Mäuse höher als die der älteren WT-Mäuse war (Abb. 13). Grundsätzlich ist ein Abfall der passiven Steifigkeit im Laufe der Alterung weder für Mäuse noch für Menschen bekannt (Salcan et al., 2020). Die erhöhte Steifigkeit der jüngeren WT-Mäuse zeigte sich in einem Bereich von $\geq 130\%$ Dehnung. Für diesen Bereich gilt nicht mehr Titin, sondern Kollagen als Hauptdeterminante der passiven Steifigkeit (Granzier and Irving, 1995, Loescher et al., 2023). Damit befindet sich diese Beobachtung außerhalb des fokussierten Bereiches der vorliegenden Arbeit und der Grund für den Abfall der Steifigkeit im Laufe der Alterung der WT-Mäuse bleibt offen.

Schlussfolgerung zur Rolle Titins für die diastolische Dehnbarkeitsstörung bei HCM

Zuletzt sollte berücksichtigt werden, dass neben der Titinphosphorylierung weitere Faktoren existieren, die die passive Steifigkeit des Titins modulieren und potenziell dazu beitragen, dass in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Änderungen der passiven Steifigkeit gemessen werden konnten, obwohl Änderungen der Titinphosphorylierung und der Titinisoformen nachgewiesen wurden. Zwei Beispiele für solche Einflussfaktoren sind oxidative Modifikationen wie die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Bindung von Kalzium ans Titin (Koser et al., 2019, Linke, 2018). Auf Grundlage der in der Einleitung erörterten Aspekte der Pathophysiologie, die eine gestörte Kalziumhomöostase und einen Anstieg von oxidativem Stress aufgrund eines gestörten Energiehaushaltes in HCM-betroffenen Herzwertgewebe umfassen (Siehe Abschnitt 1.4), erscheint es sehr plausibel, dass in vivo weitere Einflussfaktoren der Titinsteifigkeit eine nennenswerte Rolle bei der Pathogenese der HCM spielen.

Die diskutierten Befunde zum Titin bedeuten zusammengefasst, dass weitestgehend ausgeschlossen werden kann, dass Titin allein für die klinisch beobachtete, diastolische Dehnungsstörung verantwortlich ist. In den jungen RC11-Tieren fehlen Veränderungen der Isoformen und der Phosphorylierungsmuster, obwohl klinisch bereits vor Ausbildung einer Hypertrophie eine diastolische Dehnbarkeitsstörung beobachtet werden kann (Michels et al., 2009). Eine andere mögliche Ursache für die veränderte diastolische Dehnbarkeit bei HCM-Patienten ist eine veränderte Relaxation aufgrund einer veränderten Kalziumhomöostase und Kalziumsensitivität. Dieser Ansatz wird im Verlauf weiter diskutiert (siehe Abschnitt 5.3.2).

In den älteren Tieren wurde eine erhöhte Expression der elastischeren N2BA-Isoform gefunden und eine Tendenz zur gesteigerten Phosphorylierung des S11878. Der N2BA-Anstieg verursacht eine Abnahme der passiven Steifigkeit, während die gesteigerte Phosphorylierung an S11878 einen Anstieg der passiven Steifigkeit erwarten lässt. In der direkten Messung der passiven Steifigkeit zeigte sich kein Unterschied zwischen den RC- und WT-Mäusen, sodass

davon ausgegangen wird, dass sich die Effekte gegenseitig ausgleichen. Durch den fehlenden Nachweis einer Änderung der passiven Steifigkeit und die erhobenen, gegenläufigen Titin Modifikationen, zeigen die Versuchsergebnisse, dass Titin nicht hauptverantwortlich für die erhöhte diastolische Dehnbarkeit bei einer HCM ist. So muss auch nach klinischer Manifestation der HCM eine andere Ursache für die gestörte diastolische Dehnbarkeit verantwortlich sein. Auch an dieser Stelle kommt ein veränderter Kalziumhaushalt in Frage, der im Verlauf weiter diskutiert wird (siehe Abschnitt 5.3.2).

5.3 Kontraktile Eigenschaften

5.3.1 Maximale Kraft

Ein weiteres zentrales Merkmal der HCM ist die Hyperkontraktilität (Maron, 2002). Wissenschaftlich wird hierfür oft die maximale Kraft des Herzwebes oder einzelner Kardiomyozyten herangezogen. Die Datenlage zur HCM ist in der Literatur uneinheitlich, es scheint jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der maximalen Kraft und dem Krankheitsstadium der verwendeten Proben zu geben. In einem Review über humane HCM-Proben ist in den meisten Studien die maximale Kraft reduziert (Vikhorev and Vikhoreva, 2018). In einer Studie ist sogar festgestellt worden, dass HCM-Myozyten mit einer Mutation im *MYH7*-Gen die geringste maximale Kraft aufweisen (Witjas-Paalberends et al., 2013). Diese Proben stammen in der Regel von Herztransplantationen oder von Myektomien bei einer symptomatischen, obstruktiven HCM und damit in beiden Fällen aus einem späten Stadium der Erkrankung. Möglicherweise ist diese Verringerung der Kontraktilität dem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Probenentnahme zuzuschreiben (Spudich, 2014). Klinisch zeigt sich in frühen Stadien der Erkrankung jedoch eine Hyperkontraktilität, teilweise bereits vor Manifestation der Hypertrophie (Ho et al., 2002, Rüssel et al., 2011, Captur et al., 2014). Die Hyperkontraktilität scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der HCM zu spielen: Erhielten junge Mäuse das neu zugelassene Medikament „Mavacamten“, das durch eine reversible Inhibition der Myosin ATPase die Kontraktilität senkt, so blieben die Hypertrophie und Fibrosierung aus (Green et al., 2016).

Auch für die hier verwendete RC-Mutation im Myosin ist in Studien an Mäusen eine Hyperkontraktilität beschrieben. Dies gilt sowohl für isolierte Myosinmoleküle mit der RC-Mutation (Sommese et al., 2013, Debold et al., 2007) als auch für heterozygote RC-Mäuse (Blankenburg et al., 2014, Palmer et al., 2004). Daher ist für die durchgeführten Versuche eine Hyperkontraktilität der RC-Mäuse erwartet worden. Außerdem legt die klinisch früh auftretende Hyperkontraktilität nahe, dass diese bereits bei den jüngeren RC11-Mäusen vorhanden sein sollte.

Genau dies zeigte sich in der Messung der maximalen Kraft der Papillarmuskeln. Die jungen, noch nicht an einer HCM-erkrankten RC11-Mäuse wiesen gegenüber den Papillarmuskeln der WT11- und RC38-Tiere eine signifikant erhöhte Kraftentwicklung auf. In den älteren RC38- und WT38-Tiere fanden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Kraft (Abb. 14). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die für die RC-Mutation beschriebene

Hyperkontraktilität altersabhängig ist, vor allem bei jüngeren Tieren vor klinischer Manifestation der HCM auftritt und bei älteren Tieren nicht mehr nachweisbar ist. Die gesteigerte maximale Kraft scheint sich im Laufe der Krankheitsprogression zu mindern. Dieses Ergebnis unterstützt die von Spudich (2014) aufgestellte Hypothese, dass die Verringerung der Kontraktilität in vielen Studien an humanem HCM-Gewebe dem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Probenentnahme zuzuschreiben ist (Spudich, 2014). Doch welche Ursachen führen zur Reduktion der Kontraktilität nach der Manifestation der HCM? Eine in dieser Arbeit untersuchte Möglichkeit ist eine Dekompensation der Proteinqualitätskontrolle, die in Abschnitt 5.4 eingehender diskutiert wird.

5.3.2 Kalziumsensitivität

Zu Beginn der vorliegenden Diskussion wurde eine Veränderung der passiven Steifigkeit des Herzgewebes und des Proteins Titin als Hauptdeterminante der passiven Steifigkeit als mögliche Ursache für die gestörte Dehnbarkeit erörtert. Die vorliegenden Versuchsergebnisse legen jedoch nahe, dass Veränderungen von Titin und der passiven Steifigkeit nicht die Hauptursache für die gestörte diastolische Dehnbarkeit darstellen. Eine andere Theorie zur Erklärung der diastolischen Dehnbarkeitsstörung besagt, dass eine erhöhte Kalziumsensitivität gepaart mit einer erhöhten diastolischen Kalziumkonzentration infolge des gestörten Energiestoffwechsels im HCM-Kardiomyozyt zu einer gestörten Relaxation führt (Coppini et al., 2013, Wijnker et al., 2019, Spudich, 2014).

Bisherige Daten zu HCM-Gewebe zeigen eine erhöhte Kalziumsensitivität. Dies gilt sowohl für Mäuse als auch für Menschen (Baudenbacher et al., 2008, Fraysse et al., 2012, Vikhorev and Vikhoreva, 2018, Sequeira et al., 2013). In einer Studie an humanen HCM-Proben, die zwischen verschiedenen HCM-auslösenden Mutationen unterschied, wiesen die *MYH7*-Mutationen gemessen am EC_{50} -Wert die höchsten Kalziumsensitivität auf (Sequeira et al., 2013). Darüber hinaus untersuchten Nagueh et al. (2004a) die Kalziumsensitivität in Kaninchen mit einer *Myh7*-Mutation. Hier war sie bereits erhöht, bevor sich ein HCM-Phänotyp entwickelte.

In der vorangegangenen Diskussion zur maximalen Kraft wurde gezeigt, dass sich die maximale Kraft im Laufe der Krankheitsprogression der HCM reduziert. Daher wurde an den RC-Mäusen untersucht, ob sich auch die Kalziumsensitivität im Verlauf der Krankheitsentstehung verändert. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Kalziumsensitivität bereits bei den jungen, prodromalen HCM-Mäusen erhöht war. Bei den älteren, an HCM erkrankten RC38-Mäusen zeigte sich jedoch kein Unterschied der Kalziumsensitivität im Vergleich zu den gleichaltrigen WT38-Mäusen (Abb. 15).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kalziumsensitivität bereits in einem sehr frühen Stadium der HCM-Pathogenese erhöht ist. Dies deutet darauf hin, dass die veränderte Kalziumsensitivität unmittelbar mit der Mutation zusammenhängt und nicht als späte Anpassungsreaktion auf die nach der klinischen Manifestation der HCM veränderten Herzfunktionsparameter zu verstehen ist (für Details zu Herzfunktionsparametern siehe (Blankenburg et al., 2014)). Allerdings sollte

berücksichtigt werden, dass HCM-assoziierte Mutationen an verschiedenen Stellen des Sarkomers liegen und dass für viele dieser Mutationen eine erhöhte Kalziumsensitivität nachgewiesen wurde, auch für Mutationen außerhalb des Sarkomers (Elliott et al., 2014, Vikhorev and Vikhoreva, 2018, Sequeira et al., 2013, van Dijk et al., 2012). Die hier untersuchte RC-Mutation befindet sich im Myosinkopf (Rayment et al., 1995). Über welchen molekularen Mechanismus eine Mutation im Myosinkopf eine veränderte Kalziumsensitivität verursacht, ist bislang noch nicht geklärt.

Zudem konnte durch die vorliegenden Daten gezeigt werden, dass die RC-Mutation bedingten Veränderungen der Kalziumsensitivität ebenso wie die maximale Kraft altersabhängig ist. Die Tatsache, dass die erhöhte Kalziumsensitivität bei den 38 Wochen alten RC-Mäusen nicht mehr nachweisbar war, deutet auf weitere Anpassungsprozesse hin, die mit zunehmendem Alter und fortschreitender Erkrankung auf die Kalziumsensitivität wirken. Zu den möglichen Einflussfaktoren gehören die altersabhängigen Veränderungen der Proteinqualitätskontrolle, wie sie in Abschnitt 5.4 diskutiert werden.

Troponin I Phosphorylierung als möglicher Auslöser der veränderten Kalziumsensitivität

Die Kalziumsensitivität der Kraftentwicklung kann durch PKA-vermittelte Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit des Troponin I modifiziert werden (Zabrouskov et al., 2008). Vorangegangene Studien diskutieren bereits, dass bei einer HCM eine verringerte Phosphorylierung am Troponin I an S23/24 für den deutlichen Anstieg der Kalziumsensitivität verantwortlich sein kann (Vikhorev and Vikhoreva, 2018, Hilderink et al., 2023, Najafi et al., 2015). Ein Review bestätigte, dass viele Studien an humanem HCM-Gewebe eine verringerte Phosphorylierung am Troponin I nachweisen (Vikhorev and Vikhoreva, 2018). Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass sich in mehreren Studien der EC_{50} -Wert nach externer PKA-Behandlung normalisiert (Sequeira et al., 2013, Vikhorev and Vikhoreva, 2018, Nijenkamp et al., 2018). Da sich die Kalziumsensitivität vor allem im frühen Krankheitsstadium erhöht zeigt, wäre eine reduzierte Phosphorylierung des Troponin I in der Gruppe der RC11 zu erwarten.

In den durchgeführten Western Blots zeigte sich jedoch die Troponin I Phosphorylierung am S23/24 weder für die jüngeren RC11- noch für die älteren RC38-Mäuse verändert (Abb. 21). Demnach ist die Troponin I Phosphorylierung nicht für die gesteigerte Kalziumsensitivität der RC11-Mäuse ursächlich. Die Differenz zu den Daten aus dem Review kann sich dadurch erklären, dass es sich bei den vorliegenden Gewebeproben um Mausgewebe handelt und im Review nur humane Proben berücksichtigt wurden. Außerdem stammen die humanen Proben aus Herztransplantationen und Myektomie-Operationen und demnach von einem sehr späten Stadium der HCM. Dadurch können die Daten im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen der RC11-Mäuse, die sich noch vor einer Manifestation der HCM befinden, verzerrt sein. Des Weiteren gibt es neben dem S23/24 weitere Phosphorylierungsstellen am Troponin I, die die Kalziumsensitivität beeinflussen und hier nicht weiter untersucht wurden (Solaro and van der Velden, 2010, Haworth et al., 2004, Kooij et al., 2010).

5.3.3 Längenabhängige Aktivierung

Eine weitere biomechanische Veränderung, die in der Diskussion um die Pathogenese einer HCM häufig thematisiert wird, ist eine verringerte längenabhängige Aktivierung beziehungsweise eine Beeinträchtigung des Frank-Starling-Mechanismus (Wijnker and van der Velden, 2020, Vikhorev and Vikhoreva, 2018). Der Frank-Starling-Mechanismus stellt einen essenziellen, automatischen Kompensationsmechanismus bei kurzfristigen Druck- und Volumenschwankungen dar, wie sie beispielsweise beim Lagewechsel des Körpers oder zu Beginn einer körperlichen Aktivität auftreten (Pape et al., 2023). Molekular beruht dieser Mechanismus auf der längenabhängigen Aktivierung des Sarkomers (Kobirumaki-Shimozawa et al., 2014). Im Zusammenhang mit der Pathogenese der HCM wird diskutiert, dass ein gestörter Frank-Starling-Mechanismus und die daraus resultierende intermittierende Entleerungsstörung des Ventrikels über den gesteigerten Wandstress ein Hypertrophie-Genprogramm aktivieren kann (Huke and Knollmann, 2013). Um die Muskelprobe des HCM- und WT-Gewebes vergleichen zu können, wird in wissenschaftlichen Arbeiten der reduzierte Anstieg der Kalziumsensitivität und die verringerte Steigerung der maximalen Kraft bei Dehnung des Muskelgewebes als Parameter gemessen.

In vorangegangenen Studien wird für humane HCM-Proben sowohl eine verringerte längenabhängige Steigerung der maximalen Kraft als auch eine Reduktion des EC_{50} -Wertes der Kalziumsensitivität beobachtet. Zudem weisen HCM-Proben mit Mutationen in den Troponin-Genen keinerlei längenabhängige Änderung der Kraft auf (Vikhorev and Vikhoreva, 2018). Auch an Mäusen mit einer HCM durch eine Mutation im *Mybpc3*-Gen ist der gestörte Anstieg der Kalziumsensitivität beschrieben (Frayssé et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die längenabhängige Aktivierung durch Messung der maximalen Kraftentwicklung bei steigenden Dehnungszuständen erhoben. Hierbei wurde eine Minderung der längenabhängigen maximalen Kraft gemäß der genannten Änderung an HCM-Proben der RC38-Tiere im Vergleich zu den gleichaltrigen WT erwartet. Jedoch konnte weder zwischen den RC- und den WT-Mäusen noch zwischen den Altersgruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 16).

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Studien, die eine gestörte längenabhängige Aktivierung als charakteristisches Merkmal der HCM beschreiben (Vikhorev and Vikhoreva, 2018, Frayssé et al., 2012). In dieser Arbeit konnte für die untersuchte RC-Mutation im Myosin keine signifikante Veränderung der längenabhängigen Steigerung der maximalen Kraft nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Beeinträchtigung des Frank-Starling-Mechanismus möglicherweise nicht universell für alle HCM-assoziierten Mutationen gilt, sondern mutationsspezifisch sein kann. Eine genauere Analyse der Daten aus dem Review von Vikhorev und Vikhoreva (2018) zeigt, dass in weniger als der Hälfte der einbezogenen Studien zur längenabhängigen Aktivierung tatsächlich eine Störung in der längenabhängigen Aktivierung vorliegt. Dies stützt die Hypothese, dass eine gestörte, längenabhängige Aktivierung nicht zwingend ein allgemeines Merkmal aller HCM-Mutationen ist.

5.4 Proteinqualitätskontrolle

Bei der HCM handelt es sich um eine genetische Erkrankung, bei der sich klinische Symptome in der Regel nicht von Geburt an zeigen (Greber-Platzer et al., 2001). Dies suggeriert, dass sekundäre und tertiäre Anpassungsreaktionen erst im Laufe des Lebens zur klinischen Manifestation der HCM führen (Maron et al., 2022). Hierbei sind Defekte der Proteinqualitätskontrolle (PQC) in den letzten Jahren zunehmend als Faktor in der Pathogenese der HCM diskutiert worden (Predmore et al., 2010, Hassoun et al., 2021, Dorsch et al., 2019a, Wijnker et al., 2019). Die PQC im Herzgewebe ist von entscheidender Bedeutung, da das Herzgewebe und vor allem der kontraktile Apparat der Kardiomyozyten dauerhaftem mechanischen Stress ausgesetzt ist. Die Synthese, der Einbau und der Abbau defekter Proteine muss im kontinuierlich schlagenden Herzen erfolgen. Aus anderen Mausmodellen mit Herzerkrankungen gibt es zunehmende Hinweise, dass die PQC bereits eine Rolle in sehr frühen Stadien der Erkrankungen spielt (Taneike et al., 2010, Chen et al., 2005).

Um die Rolle des PQC in frühen Phasen der HCM näher zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit einige Marker der PQC mittels Western Blot Verfahren sowohl bei jüngeren, noch nicht an der HCM erkrankten Mäusen und älteren Mäusen, die bereits klinische Zeichen der HCM ausgebildet haben, untersucht.

5.4.1 Gesamt-Ubiquitinierung

Als Zeichen einer Störung der PQC konnte eine Erhöhung der Gesamt-Ubiquitinierung bereits in einer Reihe von Herzerkrankungen nachgewiesen werden (Weekes et al., 2003, Tsukamoto et al., 2006, Kostin et al., 2003). Die Akkumulation der mit Ubiquitin zum Abbau markierten Proteine kann auf eine Störung der Proteinabbaumechanismen hinweisen (Day, 2013, Klionsky et al., 2008).

Für ein Mausmodell mit einer HCM aufgrund eines Defektes im Mybpc3 und Troponin T konnte bereits ein Anstieg der Gesamtabubiquitinierung festgestellt werden (Schlossarek et al., 2012, Gilda et al., 2016). Auch am Titin zeigte sich eine Erhöhung der Ubiquitinierung in menschlichen HCM-Proben einer Herztransplantationsoperation (Hassoun et al., 2021). Zwar ist eine Erhöhung der Ubiquitinierung nicht in allen humanen Studien zu beobachten, jedoch zeigten sich andere Parameter verändert, die auf eine Störung der PQC hinweisen und im Verlauf weiter diskutiert werden (Eto et al., 2023, Predmore et al., 2010, Dorsch et al., 2019a, Hassoun et al., 2021). So ist trotz der teilweise fehlenden Erhöhung der Ubiquitinierung von einer Störung der Proteinabbaumechanismen auszugehen.

Darüber hinaus wurde durch Schlossarek et al. (2012) in murinen Proben mit einem Defekt im Mybpc3 der zeitliche Verlauf der Gesamt-Ubiquitinierung untersucht. Hier zeigte sich eine vorübergehende Spitze der Gesamt-Ubiquitinierung postnatal sowie ein erneuter Anstieg mit steigendem Alter der Mäuse. Daher lautete zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass aufgrund der vermuteten Störung der PQC die Gesamt-Ubiquitinierung ansteigt und der Anstieg altersabhängig ist.

In den Versuchsergebnissen bestätigte sich die altersabhängige Störung der Ubiquitinierung. Für die RC38-Mäuse wurde ein Anstieg der Gesamt-Ubiquitinierung beobachtet, während diese Veränderung in der Gruppe der jungen RC-Mäuse noch nicht nachweisbar war (Abb. 22). Ein ähnliches Muster zeigte sich bei der Titin-Ubiquitinierung. Auch diese war für die älteren RC38-Mäuse tendenziell erhöht, während bei den jüngeren RC11-Mäusen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (Abb. 19). Demnach war sowohl die Titin- als auch die Gesamt-Ubiquitinierung erst in den älteren Tieren nach klinischer Manifestation der HCM erhöht. Dies spricht dafür, dass das PQC-System erst mit der Progression der Erkrankung Defekte aufweist.

Die Erhöhung der Gesamt-Ubiquitinierung repräsentiert eine Störung der Proteinabbaumechanismen. Sie kann auf einen erhöhten Proteinumsatz zurückzuführen sein, aber auch auf eine Akkumulation von fehlerhaften Proteinen bei unzureichendem Abbau (Day, 2013). Um dies genauer herauszufinden, wurden einige Marker der Autophagie und des UPS als mögliche Proteinabbauwege bestimmt und im Folgenden diskutiert.

5.4.2 Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Gesamt-Ubiquitinierung bei den älteren HCM-Mäusen ist eine veränderte Aktivität des UPS. In der Literatur zur HCM deuten mehrere Studien auf eine verringerte Proteasom-Aktivität hin. Untersucht wurden hierzu menschliches Myektomie-Gewebe bei obstruktiver HCM (Predmore et al., 2010) sowie Mäuse mit einer Troponin T Mutation (Gilda et al., 2016) und *Mybpc3*-Mutation (Schlossarek et al., 2012). Bisher ist unklar, ob die Störung der Proteasom-Aktivität bereits vor klinischem Beginn der HCM auftritt.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu die proteasomale Untereinheit PSMA2 genauer untersucht. Die relative Expression von PSMA2 war für die jungen RC11- und alten RC38-Mäuse im Vergleich zur gleichaltrigen WT-Gruppe unverändert (Abb. 25). Damit konnte mithilfe des Western Blot Verfahren kein Hinweis auf eine Störung der Proteasom-Aktivität gezeigt werden.

Nichtsdestotrotz kann eine UPS-Dysfunktion für die hier untersuchte RC-Mutation im Myosin nicht ausgeschlossen werden. Eine direkte Messung der Proteasom-Aktivität wäre eine geeignete Ergänzung zu den vorliegenden Daten, da die Aktivität des Proteasoms neben der quantitativen Menge der Untereinheiten auch über posttranslationale Modifikationen angepasst werden kann (Dikic, 2017). Auch schon in den eingangs genannten Studien zu UPS-Funktionen waren teilweise trotz direktem Nachweis einer verringerten Proteasomaktivität die Menge der Proteasombestandteile unverändert (Schlossarek et al., 2012, Predmore et al., 2010).

5.4.3 Autophagosom-Lysosom-System

Autophagie Mediatoren mTOR und AMPK

Eine andere mögliche Ursache für den Anstieg der Gesamt-Ubiquitinierung der Proteine ist, dass der Proteinabbau im Autophagosom-Lysosom-System gestört ist. In der vorliegenden

Arbeit wurde die Aktivität der Autophagie anhand der Mediatoren AMPK α und mTOR untersucht, die das Aktivitätsniveau der Autophagie über den Phosphorylierungsstatus der ULK1 regulieren. Eine Phosphorylierung durch AMPK α steigert die Autophagie, während eine Phosphorylierung durch mTOR sie mindert. Dabei fungiert AMPK α als Mediator, der niedrige Energiereserven in der Zelle anzeigt (Kim et al., 2011). Da bereits eine Verringerung der ATP-Konzentration im Energiehaushalt eines Kardiomyozyt mit einer HCM-Mutation nachgewiesen wurde, erscheinen Veränderungen am Aktivierungslevel der AMPK α plausibel (Wijnker et al., 2019, Crilley et al., 2003). Konkretere Hinweise auf eine Störung der Autophagie lieferte die Studie von Hassoun et al. (2021), in der sowohl eine gesteigerte mTOR-Phosphorylierung als auch eine gesteigerte AMPK-Phosphorylierung gezeigt wurde. Am ehesten führt dieses initial gegensätzliche Ergebnis zu einer verminderten Aktivität der Autophagie durch die gesteigerte Aktivität des inhibitorisch wirkenden mTOR (Singh et al., 2017, Predmore et al., 2010, Bu et al., 2021).

Der Einfluss dieser veränderten Autophagie Aktivität in der präklinischen Phase der HCM ist bislang ungeklärt. Darüber hinaus wurden bisherige Mausstudien ausschließlich an Mäusen mit einer *Myhpc3*-Mutation durchgeführt (Schlossarek et al., 2012, Singh et al., 2017). Ob eine Veränderung der Autophagie ebenfalls bei anderen HCM-Mutationen, wie der in dieser Arbeit untersuchten Mutation der schweren Myosin-Kette im *Myh6* Gen, auftritt, war bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die vorab beschriebene Inhibition der Autophagie durch eine Hyperphosphorylierung von mTOR bei den *Myh6*-HCM-Mäusen nicht bestätigt werden. Weder in den jüngeren RC11- noch in den älteren RC38-Mäusen zeigte sich eine Veränderung der mTOR-Phosphorylierung, mTOR-Gesamtmenge und AMPK α (Abb. 23). Somit zeigten sich für die RC-Mutation keine basalen Unterschiede in der Aktivierung der Autophagie.

Autophagie Membrananker LC3 und Adapterprotein p62

Um die Aktivität der Autophagie genauer beurteilen zu können, wurden zusätzlich die Marker p62 und LC3 analysiert. LC3 bildet in seiner lipidierten Form, auch LC3-II genannt, einen Membrananker im Autophagosom (Kabeya et al., 2000). Daran bindet p62 als Adaptermolekül zwischen LC3-II und Polyubiquitin und verknüpft das abzubauende Substrat mit dem sich bildenden Autophagosom-Vesikel (Bjørkøy et al., 2005). Bei der Interpretation muss beachtet werden, dass sich LC3-II sowohl auf der Membranaußenseite als auch auf der -innenseite befindet (Kabeya et al., 2000). Beim Abbau durch das Autophagolysosom wird daher der Teil, der sich innerhalb des Lysosoms befunden hat, abgebaut, während der an der Außenmembran gebundene Teil erhalten bleibt (Abb. 4). Eine Erhöhung von LC3-II kann sowohl eine verstärkte Autophagie durch Aktivierung bzw. Lipidierung von LC3-I bedeuten als auch Konsequenz einer Inhibition der Autophagie und dadurch verminderten Abbau des LC3-II sein. Um eine genauere Aussage treffen zu können, muss daher ein weiterer Autophagie-Marker wie p62 hinzugenommen werden. P62 ist ausschließlich auf der Innenseite der Autophagosom-Membran lokalisiert und wird daher im Autophagolysosom abgebaut. Ist p62 ebenfalls erhöht, spricht dies für eine Inhibition der Autophagie (Bjørkøy et al., 2005).

Wird die oben genannte Literaturrecherche zur Autophagie-Störung bei einer HCM um die Marker p62 und LC3 ergänzt, verdichten sich die Hinweise auf eine Dysregulation der Autophagie (bezugnehmend auf 5.4.3 „Autophagie Mediatoren mTOR und AMPK“). Beispielsweise wurden in HCM-Mausmodellen mit einer *Mybpc3*-Mutation erhöhte Konzentrationen von LC3-II, der LC3-Gesamtmenge und p62 nachgewiesen (Singh et al., 2017, Schlossarek et al., 2012). Auch in menschlichem HCM-Gewebe konnte eine Autophagie-Dysfunktion durch erhöhte LC3-II-Werte gezeigt werden (Singh et al., 2017). Die mRNA für LC3 und p62 war jedoch nicht erhöht, sodass der Anstieg der Proteinmarker als eine Störung im Abbau durch die Autophagie und nicht als verstärkte Expression der genannten Autophagie Marker interpretiert wurde (Schlossarek et al., 2012). Dies deckt sich mit den im vorherigen Unterkapitel genannten Hinweisen auf eine gehemmte Autophagie durch eine gesteigerte mTOR-Aktivität (Singh et al., 2017, Predmore et al., 2010, Bu et al., 2021). Unklar war bislang, ob die Inhibition der Autophagie auch bei HCM-Mäusen mit einer Mutation in der schweren Myosinkette im *Myh6* Gen vorliegt. Zudem ist über die zeitliche Entwicklung der Autophagie-Dysfunktion bislang wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass p62 bereits in den Geweben der RC11-Tiere vor Krankheitsmanifestation signifikant erhöht war und auch bei den Geweben der RC38-Tiere nach Manifestation der Krankheitscharakteristika weiterhin tendenziell gesteigert blieb (Abb. 24). Zusammengefasst stützen die erhobenen Daten die These vorangegangener Studien, dass eine verminderte Autophagie-Aktivität sowohl in HCM-Mäusen mit einer *Mybpc3*- als auch mit *Myh6*-Mutation vorliegt (Schlossarek et al., 2012, Singh et al., 2017).

Eine zentrale Fragestellung war zudem, ob eine Störung der Autophagie bereits früh in der Krankheitsentstehung der HCM auftritt. In der Studie von Singh et al. (2017) wurden, ähnlich zum Aufbau der vorliegenden Arbeit, 10 und 60 Wochen alte Mäuse mit einer HCM auslösenden *Mybpc3*-Mutation verglichen. Hierbei zeigte sich im Alter von 10 Wochen zunächst ein erhöhter LC3-I Spiegel, während später eine Erhöhung von p62 und LC3-II vorlag. Bei den circa 11 Wochen alten RC11-Mäusen der vorliegenden Arbeit war p62 bereits erhöht, jedoch zeigte sich noch keine Veränderung der Gesamt-Ubiquitinierung. Bei den RC38-Mäusen konnte durch die tendenziell fortbestehende p62 Erhöhung ein Fortbestehen der Störung der Autophagie gezeigt werden. Hinzukommt bei den RC38 der Nachweis einer erhöhten Gesamt-Ubiquitinierung als Zeichen eines gestörten Proteinabbaus. Die Daten der RC11 deuten darauf hin, dass eine Störung der Autophagie bereits früh in der Pathogenese der HCM auftritt. Da bei den RC11-Mäusen keine Veränderung der Gesamt-Ubiquitinierung vorliegt und diese erst bei den RC38-Mäusen hinzukommt, liegt in den jungen Tieren möglicherweise ein Kompensationsmechanismus der Störung der Autophagie vor.

5.4.4 Das Hitzeschockprotein α B-Crystallin

Neben den Proteinabbaumechanismen spielen Hitzeschockproteine eine zentrale Rolle im Proteinqualitätskontrollsystem. Das kleine Hitzeschockprotein α B-Crystallin, auch HSPB5 genannt, schützt insbesondere Strukturproteine und Bestandteile des Sarkomers vor

Denaturierung und verhindert deren Aggregation im entfalteten Zustand (Tedesco et al., 2022). Dass das α B-Crystallin in einem frühen Stadium der Hypertrophie-Ausbildung eine Rolle spielt und sogar den Hypertrophie-Signalweg unterdrücken kann wurde in einer Studie von Kumarapeli et al. (2008) gezeigt. Eine Reduktion der Hypertrophie-Ausbildung konnte in einer Mausstudie mit genetischer α B-Crystallin-Überexpression an hypertrophem Myokard aufgrund einer ventrikulären Druckerhöhung durch Teileinschnürung der Aorta gezeigt werden (Kumarapeli et al., 2008). In einer Studie von Dorsch et al. (2019) an humanem HCM-Gewebe aus einer Myektomie-Operation konnte keine signifikante quantitative α B-Crystallin Änderung gezeigt werden, jedoch wurde aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums der HCM die Hypothese aufgestellt, dass α B-Crystallin eher in frühen Stadien der HCM eine Rolle spiele (Dorsch et al., 2019a). Nun war es Ziel der vorliegenden Arbeit anhand der noch asymptomatischen RC11-Mäuse eine frühe Rolle des α B-Crystallin zu untersuchen.

Es konnte jedoch weder für einen frühen noch einen späteren Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung ein eindeutiger Einfluss des Hitzeschockproteins α B-Crystallin auf die Pathogenese der HCM für die RC-Myosin-Mutation nachgewiesen werden (Abb. 26).

Damit konnte gezeigt werden, dass α B-Crystallin in der Pathogenese der genetischen durch die *Myh6*-Mutation ausgelösten HCM keine Rolle spielt. Die vorliegende Arbeit konnte keine unterstützenden Hinweise für die oben genannte Hypothese von Dorsch et al. (2019) erbringen. Ebenso wie bei der Autophagie thematisiert, kann die Rolle der Hitzeschockproteine in der Pathogenese der HCM hohen inter-individuellen Unterschieden zwischen den Mutationen und Krankheitsstadien unterliegen.

Zusammengefasste Bedeutung der PQC im Myosin R453C-Mausmodell

Die diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass im verwendeten HCM-Mausmodell eine Dysfunktion im PQC vorliegt. Erste Veränderungen im Proteinabbau durch die Autophagie zeichneten sich bereits im Alter von 11 Wochen durch eine p62-Erhöhung ab. Eine Dekompensation der Autophagie scheint erst zu einem späteren Zeitpunkt der Pathogenese aufzutreten, gezeigt durch einen Anstieg der Gesamt-Ubiquitinierung und eine anhaltende Erhöhung von p62. Interessanterweise konnte kein Nachweis einer Dysfunktion in anderen Bereichen der PQC gezeigt werden, genauer für das UPS vertreten durch das PSMA2 und für die Hitzeschockproteine vertreten durch α B-Crystallin. In der Zusammenschau der hier präsentierten Daten und der verfügbaren Literatur zum Thema lässt sich jedoch eine zentrale Rolle einer gestörten PQC in der Pathogenese der HCM generell und bereits in einer asymptomatischen Phase ablesen.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der initial erhöhten Kalziumsensitivität sowie der maximalen Kraft von den jungen, asymptomatischen hin zu den älteren, HCM-erkrankten Mäusen festgestellt. Die Dekompensation des Proteinabbaus, gezeigt durch den Anstieg der Gesamt-Ubiquitinierung, stellt eine mögliche Erklärung für diese altersbedingte Veränderung dar.

Einschränkungen

Einschränkend ist zum vorliegenden Projekt zu erwähnen, dass mit murinem Gewebe gearbeitet und nur eine HCM-Mutation verwendet wurde. Außerdem handelt es sich mit $n = 4-7$ pro Gruppe um eine eher kleine Stichprobe, in der sich geringe Unterschiede als nicht-signifikant gezeigt haben könnten. Zudem wurde die Arbeit auf zwei Zeitpunkte während der Pathogenese der HCM beschränkt, sodass keine Aussage für andere Zeitpunkte wie ein sehr vorangeschrittenes Erkrankungsstadium oder den unmittelbaren Symptombeginn der HCM getroffen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sind immer wieder Veränderungen im Energiehaushalt der HCM-Kardiomyozyten und ein dazugehöriger Anstieg in ROS-Produktion zitiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des oxidativen Stresses nicht näher untersucht. Nichtsdestotrotz ist die Analyse von oxidativem Stress und dessen Auswirkungen im zeitlichen Verlauf eine gute Ausgangshypothese für ein weiteres Projekt am R453C-Mausmodell.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Titin und die passive Steifigkeit nicht die Hauptursache für die gestörte diastolische Dehnbarkeit in der durch die Myosinmutation R453C verursachte HCM sind, denn experimentell konnte kein Unterschied der passiven Kraft zwischen den RC- und den jeweils gleichaltrigen WT-Mäusen festgestellt werden. Zudem zeigten die untersuchten posttranslationalen Veränderungen am Titin und die Zusammensetzung der Isoformen nicht einheitlich eine Versteifung des Titins, die zur Erklärung der gestörten diastolischen Dehnbarkeit dienen könnte. Um sicherer ausschließen zu können, dass ein Anstieg der passiven Steifigkeit nicht die diastolische Dehnbarkeitsstörung verursacht, könnten noch andere Determinanten der passiven Steifigkeit wie Kollagen oder das Mikrotubulinetzwerk untersucht werden. Aufgrund der fehlenden Veränderungen der passiven Steifigkeit wurde eine aktive Störung der Relaxation diskutiert. Die Erhöhung der maximalen Kraft und der Kalziumsensitivität, die nur in den Mäusen vor HCM-Manifestation zu beobachten war, und die Tatsache, dass die diastolische Dehnbarkeitsstörung zu den frühesten klinischen Veränderungen bei HCM-Manifestation gehören, stützen diese Hypothese. Zudem kann anhand der Daten der Kraftmessungen abgelesen werden, dass Veränderungen der kontraktile Eigenschaften stadienabhängig sind und nicht zu jedem Zeitpunkt der HCM-Pathogenese vorliegen.

Des Weiteren wurden Veränderungen der Proteinqualitätskontrolle in dieser Arbeit näher beleuchtet. Initial wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Fehlen eines HCM-Phänotyps zum Zeitpunkt der Geburt auf sekundäre und tertiäre Anpassungsreaktionen deutet, die schlussendlich zur Manifestation klinischer Symptome beitragen. Diesbezüglich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der ubiquitinierten Proteine inklusive Titin in den älteren, HCM-erkrankten Mäusen festgestellt. Begleitet wurde dieser Befund von einem p62-Anstieg in beiden Altersgruppen. Dies deutet auf eine Störung im Proteinabbau hin. Zur besseren Interpretation des Pathomechanismus ist weitere Forschung notwendig, die sich auch mit posttranslationalen Modifikationen und Aktivitätsmessungen des UPS und Autophagosom-Lysosom-System beschäftigt.

Literatur und Quellenverzeichnis

- ALAMO, L., WARE, J. S., PINTO, A., GILLILAN, R. E., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E. & PADRÓN, R. 2017. Effects of myosin variants on interacting-heads motif explain distinct hypertrophic and dilated cardiomyopathy phenotypes. *Elife*, 6.
- 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*, 156, 1235-1246.
- ALI, M. A., CHO, W. J., HUDSON, B., KASSIRI, Z., GRANZIER, H. & SCHULZ, R. 2010. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122, 2039-47.
- ALPERT, N. R., BROSSÉAU, C., FEDERICO, A., KRENZ, M., ROBBINS, J. & WARSHAW, D. M. 2002. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H1446-54.
- ANAN, R., GREVE, G., THIERFELDER, L., WATKINS, H., MCKENNA, W. J., SOLOMON, S., VECCHIO, C., SHONO, H., NAKAO, S., TANAKA, H. & ET AL. 1994. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 93, 280-5.
- ANDLEY, U. P. 2007. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res*, 26, 78-98.
- ARRIGO, A. P., SIMON, S., GIBERT, B., KRETZ-REMY, C., NIVON, M., CZEKALLA, A., GUILLET, D., MOULIN, M., DIAZ-LATOUD, C. & VICART, P. 2007. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett*, 581, 3665-74.
- BABU, J. R., GEETHA, T. & WOOTEN, M. W. 2005. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem*, 94, 192-203.
- BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2001. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- BARDAG-GORCE, F., FRANCIS, T., NAN, L., LI, J., HE LUE, Y., FRENCH, B. A. & FRENCH, S. W. 2005. Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci*, 77, 2594-602.
- BAUDENBACHER, F., SCHÖBER, T., PINTO, J. R., SIDOROV, V. Y., HILLIARD, F., SOLARO, R. J., POTTER, J. D. & KNOLLMANN, B. C. 2008. Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest*, 118, 3893-903.
- BIAGINI, E., COCCOLO, F., FERLITO, M., PERUGINI, E., ROCCHI, G., BACCHI-REGGIANI, L., LOFIEGO, C., BORIANI, G., PRANDSTRALLER, D., PICCHIO, F. M., BRANZI, A. & RAPEZZI, C. 2005. Dilated-hypokinetic evolution of

- hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, incidence, risk factors, and prognostic implications in pediatric and adult patients. *J Am Coll Cardiol*, 46, 1543-50.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BLANKENBURG, R., HACKERT, K., WURSTER, S., DEENEN, R., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E., LOHSE, M. J. & SCHMITT, J. P. 2014. β -Myosin heavy chain variant Val606Met causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exacerbates HCM phenotypes in mice carrying other HCM mutations. *Circ Res*, 115, 227-37.
- BOELEN, W. C. 2014. Cell biological roles of α B-crystallin. *Prog Biophys Mol Biol*, 115, 3-10.
- 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 Rep*, 22, e48018.
- BORBÉLY, A., FALCAO-PIRES, I., VAN HEEREBEEK, L., HAMDANI, N., EDES, I., GAVINA, C., LEITE-MOREIRA, A. F., BRONZWAER, J. G., PAPP, Z., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J. & PAULUS, W. J. 2009. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*, 104, 780-6.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRODEHL, A., GAERTNER-ROMMEL, A., KLAUKE, B., GREWE, S. A., SCHIRMER, I., PETERSCHRODER, A., FABER, L., VORGERD, M., GUMMERT, J., ANSELMETTI, D., SCHULZ, U., PALUSZKIEWICZ, L. & MILTING, H. 2017. The novel α B-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy. *Hum Mutat*, 38, 947-952.
- BRUTSAERT, D. L., SYS, S. U. & GILLEBERT, T. C. 1993. Diastolic failure: pathophysiology and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol*, 22, 318-25.
- BU, H., DING, Y., LI, J., ZHU, P., SHIH, Y. H., WANG, M., ZHANG, Y., LIN, X. & XU, X. 2021. Inhibition of mTOR or MAPK ameliorates vmhcl/myh7 cardiomyopathy in zebrafish. *JCI Insight*, 6.
- BULLARD, B., FERGUSON, C., MINAJEVA, A., LEAKE, M. C., GAUTEL, M., LABEIT, D., DING, L., LABEIT, S., HORWITZ, J., LEONARD, K. R. & LINKE, W. A. 2004. Association of the chaperone α B-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem*, 279, 7917-24.
- CAPTUR, G., LOPES, L. R., MOHUN, T. J., PATEL, V., LI, C., BASSETT, P., FINOCCHIARO, G., FERREIRA, V. M., ESTEBAN, M. T., MUTHURANGU, V., SHERRID, M. V., DAY, S. M., CANTER, C. E., MCKENNA, W. J., SEIDMAN, C.

- E., BLUEMKE, D. A., ELLIOTT, P. M., HO, C. Y. & MOON, J. C. 2014. Prediction of sarcomere mutations in subclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging*, 7, 863-71.
- CAZAUBON, S., BORNANCIN, F. & PARKER, P. J. 1994. Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha. *Biochem J*, 301 (Pt 2), 443-8.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITÁS, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 86, 59-67.
- CHEN, Q., LIU, J. B., HORAK, K. M., ZHENG, H., KUMARAPALI, A. R., LI, J., LI, F., GERDES, A. M., WAWROUSEK, E. F. & WANG, X. 2005. Intracellular amyloidosis impairs proteolytic function of proteasomes in cardiomyocytes by compromising substrate uptake. *Circ Res*, 97, 1018-26.
- CHEN, Q. F., HU, J., HU, J., NIJJAR, P. S., XU, J., SHI, S., LIANG, D., LIAO, H., GAO, J., LIN, W. H., YOU, S. & ZHOU, X. D. 2024. Clinical characteristics and prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy and heart failure with preserved ejection fraction. *Clin Res Cardiol*, 113, 761-769.
- CHRISTIANS, E. S., ISHIWATA, T. & BENJAMIN, I. J. 2012. Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1632-45.
- COOKE, R. 2011. The role of the myosin ATPase activity in adaptive thermogenesis by skeletal muscle. *Biophys Rev*, 3, 33-45.
- COPPINI, R., FERRANTINI, C., YAO, L., FAN, P., DEL LUNGO, M., STILLITANO, F., SARTIANI, L., TOSI, B., SUFFREDINI, S., TESI, C., YACIOUB, M., OLIVOTTO, I., BELARDINELLI, L., POGGESI, C., CERBAI, E. & MUGELLI, A. 2013. Late sodium current inhibition reverses electromechanical dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 127, 575-84.
- COULIS, G., BECILA, S., HERRERA-MENDEZ, C. H., SENTANDREU, M. A., RAYNAUD, F., RICHARD, I., BENYAMIN, Y. & OUALI, A. 2008. Calpain 1 binding capacities of the N1-line region of titin are significantly enhanced by physiological concentrations of calcium. *Biochemistry*, 47, 9174-83.
- CRILLEY, J. G., BOEHM, E. A., BLAIR, E., RAJAGOPALAN, B., BLAMIRE, A. M., STYLES, P., MCKENNA, W. J., OSTMAN-SMITH, I., CLARKE, K. & WATKINS, H. 2003. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 41, 1776-82.
- DAY, S. M. 2013. The ubiquitin proteasome system in human cardiomyopathies and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304, H1283-93.
- DEBOLD, E. P., SCHMITT, J. P., PATLAK, J. B., BECK, S. E., MOORE, J. R., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. & WARSHAW, D. M. 2007. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse alpha-cardiac myosin in the laser trap assay. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H284-91.

- DIKIC, I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*, 86, 193-224.
- DORN, G. W., 2ND & FORCE, T. 2005. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 115, 527-37.
- DORSCH, L. M., SCHULDT, M., DOS REMEDIOS, C. G., SCHINKEL, A. F. L., DE JONG, P. L., MICHELS, M., KUSTER, D. W. D., BRUNDEL, B. & VAN DER VELDEN, J. 2019a. Protein Quality Control Activation and Microtubule Remodeling in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cells*, 8.
- DORSCH, L. M., SCHULDT, M., KNEŽEVIĆ, D., WIERSMA, M., KUSTER, D. W. D., VAN DER VELDEN, J. & BRUNDEL, B. 2019b. Untying the knot: protein quality control in inherited cardiomyopathies. *Pflugers Arch*, 471, 795-806.
- EBASHI, S. & ENDO, M. 1968. Calcium and muscle contraction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 18, 123-183.
- ELLIOTT, P. M., ANASTASAKIS, A., BORGER, M. A., BORGGREFE, M., CECCHI, F., CHARRON, P., HAGEGE, A. A., LAFONT, A., LIMONGELLI, G., MAHRHOLDT, H., MCKENNA, W. J., MOGENSEN, J., NIHOYANNOPOULOS, P., NISTRI, S., PIEPER, P. G., PIESKE, B., RAPEZZI, C., RUTTEN, F. H., TILLMANN, C. & WATKINS, H. 2014. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 35, 2733-79.
- ETO, R., KAWANO, H., MATSUYAMA-MATSUU, M., MATSUDA, K., UEKI, N., NAKASHIMA, M., OKANO, S., ISHIJIMA, M., KAWAKATSU, M., WATANABE, J., YOSHIMUTA, T., IKEDA, S. & MAEMURA, K. 2023. Ubiquitin, p62, and Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 in Cardiomyopathy. *Circ Rep*, 5, 323-330.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2023. *Camzyos* [Online]. EMA. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/camzyos> [Accessed 20.08.24].
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1978. Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J Gen Physiol*, 72, 667-99.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)*, 75, 463-505.
- FRAYSSE, B., WEINBERGER, F., BARDSWELL, S. C., CUELLO, F., VIGNIER, N., GEERTZ, B., STARBATTY, J., KRÄMER, E., COIRAULT, C., ESCHENHAGEN, T., KENTISH, J. C., AVKIRAN, M. & CARRIER, L. 2012. Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 1299-307.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & LABEIT, S. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic

- spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- FUKUDA, N., SASAKI, D., ISHIWATA, S. & KURIHARA, S. 2001. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*, 104, 1639-45.
- FURST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. & WEBER, K. 1988. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
- GALLUZZI, L., PIETROCOLA, F., LEVINE, B. & KROEMER, G. 2014. Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159, 1263-76.
- GAO, W. D., MURRAY, C. I., TIAN, Y., ZHONG, X., DUMOND, J. F., SHEN, X., STANLEY, B. A., FOSTER, D. B., WINK, D. A., KING, S. B., VAN EYK, J. E. & PAOLOCCI, N. 2012. Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function. *Circ Res*, 111, 1002-11.
- GAUTEL, M., GOULDING, D., BULLARD, B., WEBER, K. & FÜRST, D. O. 1996. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, 109 (Pt 11), 2747-54.
- GILDA, J. E., LAI, X., WITZMANN, F. A. & GOMES, A. V. 2016. Delineation of Molecular Pathways Involved in Cardiomyopathies Caused by Troponin T Mutations. *Mol Cell Proteomics*, 15, 1962-81.
- GOLENHOFEN, N., HTUN, P., NESS, W., KOOB, R., SCHAPER, W. & DRENCKHAHN, D. 1999. Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 569-80.
- GRANZIER, H. L. & IRVING, T. C. 1995. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, 68, 1027-44.
- 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. *J Muscle Res Cell Motil*, 23, 473-82.
- GREAVES, S. C., ROCHE, A. H., NEUTZE, J. M., WHITLOCK, R. M. & VEALE, A. M. 1987. Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *Br Heart J*, 58, 259-66.
- GREBER-PLATZER, S., MARX, M., FLEISCHMANN, C., SUPPAN, C., DOBNER, M. & WIMMER, M. 2001. Beta-myosin heavy chain gene mutations and hypertrophic cardiomyopathy in Austrian children. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 141-8.
- GREEN, E. M., WAKIMOTO, H., ANDERSON, R. L., EVANCHIK, M. J., GORHAM, J. M., HARRISON, B. C., HENZE, M., KAWAS, R., OSLOB, J. D., RODRIGUEZ, H. M., SONG, Y., WAN, W., LEINWAND, L. A., SPUDICH, J. A., MCDOWELL, R. S., SEIDMAN, J. G. & SEIDMAN, C. E. 2016. A small-molecule inhibitor of sarcomere contractility suppresses hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Science*, 351, 617-21.

- 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. *Biophys J*, 97, 825-34.
- GÜÇLÜ, A., KNAAPEN, P., HARMS, H. J., PARBHUDAYAL, R. Y., MICHELS, M., LAMMERTSMA, A. A., VAN ROSSUM, A. C., GERMANS, T. & VAN DER VELDEN, J. 2017. Disease Stage-Dependent Changes in Cardiac Contractile Performance and Oxygen Utilization Underlie Reduced Myocardial Efficiency in Human Inherited Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging*, 10.
- HAMDANI, N., BISHU, K. G., VON FRIELING-SALEWSKY, M., REDFIELD, M. M. & LINKE, W. A. 2013a. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res*, 97, 464-71.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRÜGER, M., BACKS, J. & LINKE, W. A. 2013b. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
- HARDIE, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 774-85.
- HARRIS, K. M., SPIRITO, P., MARON, M. S., ZENOVICH, A. G., FORMISANO, F., LESSER, J. R., MACKEY-BOJACK, S., MANNING, W. J., UDELSON, J. E. & MARON, B. J. 2006. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 114, 216-25.
- HASSOUN, R., BUDDE, H., ZHAZYKBAYEVA, S., HERWIG, M., SIEME, M., DELALAT, S., MOSTAFI, N., GOMORI, K., TANGOS, M., JARKAS, M., PABEL, S., BRUCKMULLER, S., SKRYGAN, M., LODI, M., JAQUET, K., SEQUEIRA, V., GAMBICHLER, T., REMEDIOS, C. D., KOVACS, A., MANNHERZ, H. G., MUGGE, A., SOSSALLA, S. & HAMDANI, N. 2021. Stress activated signalling impaired protein quality control pathways in human hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 344, 160-169.
- HAWORTH, R. S., CUELLO, F., HERRON, T. J., FRANZEN, G., KENTISH, J. C., GAUTEL, M. & AVKIRAN, M. 2004. Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res*, 95, 1091-9.
- HEIN, S., SCHOLZ, D., FUJITANI, N., RENNOLLET, H., BRAND, T., FRIEDL, A. & SCHAPER, J. 1994. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 26, 1291-306.
- HEINRICH, P. C., MÜLLER, M., GRAEVE, L. & KOCH, H.-G. 2022. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer Berlin.
- HEROLD, G. 2022. *Innere Medizin 2023*, Dr. Gerd Herold (Verlag).
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.

- 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. *Dis Model Mech*, 12.
- HILDERINK, S., SCHULDT, M., GOEBEL, M., JANSEN, V. J., MANDERS, E., MOORMAN, S., DORSCH, L. M., VAN STEENBEEK, F. G., VAN DER VELDEN, J. & KUSTER, D. W. D. 2023. Characterization of heterozygous and homozygous mouse models with the most common hypertrophic cardiomyopathy mutation MYBPC3(c.2373InsG) in the Netherlands. *J Mol Cell Cardiol*, 185, 65-76.
- HO, C. Y., SWEITZER, N. K., MCDONOUGH, B., MARON, B. J., CASEY, S. A., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E. & SOLOMON, S. D. 2002. Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 105, 2992-7.
- HOROWITS, R., KEMPNER, E. S., BISHOP, M. E. & PODOLSKY, R. J. 1986. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323, 160-4.
- HOROWITS, R. & PODOLSKY, R. J. 1987. The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J Cell Biol*, 105, 2217-23.
- HUGHES, S. E. & MCKENNA, W. J. 2005. New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy. *Heart*, 91, 257-64.
- HUKE, S. & KNOLLMANN, B. C. 2013. Familial hypertrophic cardiomyopathy: is the Frank-Starling law kaput? *Circ Res*, 112, 1409-11.
- IRVING, M. 2017. Regulation of Contraction by the Thick Filaments in Skeletal Muscle. *Biophys J*, 113, 2579-2594.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K. & BUCHNER, J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 1517-20.
- JOGLAR, J. A., CHUNG, M. K., ARMBRUSTER, A. L., BENJAMIN, E. J., CHYOU, J. Y., CRONIN, E. M., DESWAL, A., ECKHARDT, L. L., GOLDBERGER, Z. D., GOPINATHANNAIR, R., GORENEK, B., HESS, P. L., HLATKY, M., HOGAN, G., IBEH, C., INDIK, J. H., KIDO, K., KUSUMOTO, F., LINK, M. S., LINTA, K. T., MARCUS, G. M., MCCARTHY, P. M., PATEL, N., PATTON, K. K., PEREZ, M. V., PICCINI, J. P., RUSSO, A. M., SANDERS, P., STREUR, M. M., THOMAS, K. L., TIMES, S., TISDALE, J. E., VALENTE, A. M., VAN WAGONER, D. R. & PEER REVIEW COMMITTEE, M. 2024. 2023 ACC/AHA/ACCP/HRS Guideline for the Diagnosis and Management of Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 149, e1-e156.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19, 5720-8.

- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., OSHITANI-OKAMOTO, S., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2004. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117, 2805-12.
- KAWAI, M. & JIN, J. P. 2021. Mechanisms of Frank-Starling law of the heart and stretch activation in striated muscles may have a common molecular origin. *J Muscle Res Cell Motil*, 42, 355-366.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, D. K., ALIEV, G., ASKEW, D. S., BABA, M., BAEHRECKE, E. H., BAHR, B. A., BALLABIO, A., BAMBER, B. A., BASSHAM, D. C., BERGAMINI, E., BI, X., BIARD-PIECHACZYK, M., BLUM, J. S., BREDESEN, D. E., BRODSKY, J. L., BRUMELL, J. H., BRUNK, U. T., BURSCH, W., CAMOUGRAND, N., CEBOLLERO, E., CECCONI, F., CHEN, Y., CHIN, L. S., CHOI, A., CHU, C. T., CHUNG, J., CLARKE, P. G., CLARK, R. S., CLARKE, S. G., CLAVÉ, C., CLEVELAND, J. L., CODOGNO, P., COLOMBO, M. I., COTO-MONTES, A., CREGG, J. M., CUERVO, A. M., DEBNATH, J., DEMARCHI, F., DENNIS, P. B., DENNIS, P. A., DERETIC, V., DEVENISH, R. J., DI SANO, F., DICE, J. F., DIFIGLIA, M., DINESH-KUMAR, S., DISTELHORST, C. W., DJAVAHERI-MERGNY, M., DORSEY, F. C., DRÖGE, W., DRON, M., DUNN, W. A., JR., DUSZENKO, M., EISSA, N. T., ELAZAR, Z., ESCLATINE, A., ESKELINEN, E. L., FÉSÜS, L., FINLEY, K. D., FUENTES, J. M., FUEYO, J., FUJISAKI, K., GALLIOT, B., GAO, F. B., GEWIRTZ, D. A., GIBSON, S. B., GOHLA, A., GOLDBERG, A. L., GONZALEZ, R., GONZÁLEZ-ESTÉVEZ, C., GORSKI, S., GOTTLIEB, R. A., HÄUSSINGER, D., HE, Y. W., HEIDENREICH, K., HILL, J. A., HØYER-HANSEN, M., HU, X., HUANG, W. P., IWASAKI, A., JÄÄTTELÄ, M., JACKSON, W. T., JIANG, X., JIN, S., JOHANSEN, T., JUNG, J. U., KADOWAKI, M., KANG, C., KELEKAR, A., KESSEL, D. H., KIEL, J. A., KIM, H. P., KIMCHI, A., KINSELLA, T. J., KISELYOV, K., KITAMOTO, K., KNECHT, E., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-75.
- KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA, F., INOUE, T., SHINTANI, S. A., OYAMA, K., TERUI, T., MINAMISAWA, S., ISHIWATA, S. & FUKUDA, N. 2014. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J Physiol Sci*, 64, 221-32.
- KOOIJ, V., BOONTJE, N., ZAREMBA, R., JAQUET, K., DOS REMEDIOS, C., STIENEN, G. J. & VAN DER VELDEN, J. 2010. Protein kinase C alpha and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca²⁺ sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol*, 105, 289-300.
- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *Febs j*, 286, 2240-2260.
- KOSTIN, S., POOL, L., ELSASSER, A., HEIN, S., DREXLER, H. C., ARNON, E., HAYAKAWA, Y., ZIMMERMANN, R., BAUER, E., KLOVEKORN, W. P. & SCHAPER, J. 2003. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res*, 92, 715-24.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., 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. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.

- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GÖDECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRÜGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KÖTTER, S. & KRÜGER, M. 2022. Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Front Physiol*, 13, 914296.
- KÖTTER, S., UNGER, A., HAMDANI, N., LANG, P., VORGERD, M., NAGEL-STEGER, L. & LINKE, W. A. 2014. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol*, 204, 187-202.
- KRANIAS, E. G. & SOLARO, R. J. 1982. Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature*, 298, 182-4.
- KRUGER, M. & LINKE, W. A. 2011. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- KRÜGER, M. & LINKE, W. A. 2006. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*, 27, 435-44.
- KUMARAPALI, A. R., SU, H., HUANG, W., TANG, M., ZHENG, H., HORAK, K. M., LI, M. & WANG, X. 2008. Alpha B-crystallin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 103, 1473-82.
- LABEIT, S. & KOLMERER, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- LANGE, S., AUERBACH, D., MCLOUGHLIN, P., PERRIARD, E., SCHÄFER, B. W., PERRIARD, J. C. & EHLER, E. 2002. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci*, 115, 4925-36.
- LANGE, S., EHLER, E. & GAUTEL, M. 2006. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 16, 11-8.
- 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*, 308, 1599-603.
- LAYLAND, J., SOLARO, R. J. & SHAH, A. M. 2005. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 66, 12-21.
- LINKE, W. A. 2018. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*, 80, 389-411.

- LINKE, W. A. & HAMDANI, N. 2014. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., OLIVIERI, N., KOLMERER, B., RÜEGG, J. C. & LABEIT, S. 1996. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- LOESCHER, C. M., BREITKREUZ, M., LI, Y., NICKEL, A., UNGER, A., DIETL, A., SCHMIDT, A., MOHAMED, B. A., KÖTTER, S., SCHMITT, J. P., KRÜGER, M., KRÜGER, M., TOISCHER, K., MAACK, C., LEICHERT, L. I., HAMDANI, N. & LINKE, W. A. 2020. Regulation of titin-based cardiac stiffness by unfolded domain oxidation (UnDOx). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 24545-24556.
- LOESCHER, C. M., FREUNDT, J. K., UNGER, A., HESSEL, A. L., KÜHN, M., KOSER, F. & LINKE, W. A. 2023. Titin governs myocardial passive stiffness with major support from microtubules and actin and the extracellular matrix. *Nature Cardiovascular Research*, 2, 991-1002.
- LOESCHER, C. M., HOBACH, A. J. & LINKE, W. A. 2022. Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance. *Cardiovasc Res*, 118, 2903-2918.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MARIAN, A. J. & BRAUNWALD, E. 2017. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*, 121, 749-770.
- MARON, B. A., WANG, R. S., CARNETHON, M. R., ROWIN, E. J., LOSCALZO, J., MARON, B. J. & MARON, M. S. 2022. What Causes Hypertrophic Cardiomyopathy? *Am J Cardiol*, 179, 74-82.
- MARON, B. J. 2002. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*, 287, 1308-20.
- MARON, B. J. 2018. Clinical Course and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 379, 1977.
- MARON, B. J., OLIVOTTO, I., SPIRITO, P., CASEY, S. A., BELLONE, P., GOHMAN, T. E., GRAHAM, K. J., BURTON, D. A. & CECCHI, F. 2000. Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy-related death: revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation*, 102, 858-64.
- MELEY, D., BAUVY, C., HOUBEN-WEERTS, J. H., DUBBELHUIS, P. F., HELMOND, M. T., CODOGNO, P. & MEIJER, A. J. 2006. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem*, 281, 34870-9.
- MICHELS, M., SOLIMAN, O. I., KOFFLARD, M. J., HOEDEMAEKERS, Y. M., DOOIJES, D., MAJOOR-KRAKAUER, D. & TEN CATE, F. J. 2009. Diastolic abnormalities as the first feature of hypertrophic cardiomyopathy in Dutch myosin-binding protein C founder mutations. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2, 58-64.

- MINAJEVA, A., KULKE, M., FERNANDEZ, J. M. & LINKE, W. A. 2001. Unfolding of Titin Domains Explains the Viscoelastic Behavior of Skeletal Myofibrils. *Biophysical Journal*, 80, 1442-1451.
- MÜLLER, E., SALCAN, S., BONGARDT, S., BARBOSA, D. M., KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2021. E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Sci Rep*, 11, 21134.
- NAG, S. & TRIVEDI, D. V. 2021. To lie or not to lie: Super-relaxing with myosins. *Elife*, 10.
- NAG, S., TRIVEDI, D. V., SARKAR, S. S., ADHIKARI, A. S., SUNITHA, M. S., SUTTON, S., RUPPEL, K. M. & SPUDICH, J. A. 2017. The myosin mesa and the basis of hypercontractility caused by hypertrophic cardiomyopathy mutations. *Nat Struct Mol Biol*, 24, 525-533.
- NAGUEH, S. F., APPLETON, C. P., GILLEBERT, T. C., MARINO, P. N., OH, J. K., SMISETH, O. A., WAGGONER, A. D., FLACHSKAMPF, F. A., PELLIKKA, P. A. & EVANGELISA, A. 2009. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr*, 10, 165-93.
- NAGUEH, S. F., SHAH, G., WU, Y., TORRE-AMIONE, G., KING, N. M., LAHMERS, S., WITT, C. C., BECKER, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 155-62.
- NAJAFI, A., SCHLOSSAREK, S., VAN DEEL, E. D., VAN DEN HEUVEL, N., GÜÇLÜ, A., GOEBEL, M., KUSTER, D. W., CARRIER, L. & VAN DER VELDEN, J. 2015. Sexual dimorphic response to exercise in hypertrophic cardiomyopathy-associated MYBPC3-targeted knock-in mice. *Pflugers Arch*, 467, 1303-17.
- NAKAI, A., YAMAGUCHI, O., TAKEDA, T., HIGUCHI, Y., HIKOSO, S., TANIKE, M., OMIYA, S., MIZOTE, I., MATSUMURA, Y., ASAH, M., NISHIDA, K., HORI, M., MIZUSHIMA, N. & OTSU, K. 2007. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, 13, 619-24.
- NAVÉ, B. T., OUWENS, M., WITHERS, D. J., ALESSI, D. R. & SHEPHERD, P. R. 1999. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*, 344 Pt 2, 427-31.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- NEAGOE, C., OPITZ, C. A., MAKARENKO, I. & LINKE, W. A. 2003. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*, 24, 175-89.
- NIJENKAMP, L., BOLLEN, I. A. E., NIESSEN, H. W. M., DOS REMEDIOS, C. G., MICHELS, M., POGGESI, C., HO, C. Y., KUSTER, D. W. D. & VAN DER VELDEN, J. 2020. Sex-specific cardiac remodeling in early and advanced stages of hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*, 15, e0232427.

- NIJENKAMP, L., BOLLEN, I. A. E., VAN VELZEN, H. G., REGAN, J. A., VAN SLEGTENHORST, M., NIESSEN, H. W. M., SCHINKEL, A. F. L., KRÜGER, M., POGGESI, C., HO, C. Y., KUSTER, D. W. D., MICHELS, M. & VAN DER VELDEN, J. 2018. Sex Differences at the Time of Myectomy in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*, 11, e004133.
- NODA, T. & OHSUMI, Y. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273, 3963-6.
- OLIVOTTO, I., GIROLAMI, F., SCIAGRÀ, R., ACKERMAN, M. J., SOTGIA, B., BOS, J. M., NISTRI, S., SGALAMBRO, A., GRIFONI, C., TORRICELLI, F., CAMICI, P. G. & CECCHI, F. 2011. Microvascular function is selectively impaired in patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomere myofilament gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 58, 839-48.
- OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., MAKARENKO, I., BENES, V. & LINKE, W. A. 2004. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res*, 94, 967-75.
- PALMER, B. M., FISHBAUGHER, D. E., SCHMITT, J. P., WANG, Y., ALPERT, N. R., SEIDMAN, C. E., SEIDMAN, J. G., VANBUREN, P. & MAUGHAN, D. W. 2004. Differential cross-bridge kinetics of FHC myosin mutations R403Q and R453C in heterozygous mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H91-9.
- PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2023. Physiologie. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Thieme.
- PATEL, M. B. & MAJETSCHAK, M. 2007. Distribution and interrelationship of ubiquitin proteasome pathway component activities and ubiquitin pools in various porcine tissues. *Physiol Res*, 56, 341-350.
- POHL, C. & DIKIC, I. 2019. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 366, 818-822.
- PREDMORE, J. M., WANG, P., DAVIS, F., BARTOLONE, S., WESTFALL, M. V., DYKE, D. B., PAGANI, F., POWELL, S. R. & DAY, S. M. 2010. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation*, 121, 997-1004.
- RAYMENT, I., HOLDEN, H. M., SELLERS, J. R., FANANAPAZIR, L. & EPSTEIN, N. D. 1995. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3864-8.
- RAYNAUD, F., FERNANDEZ, E., COULIS, G., AUBRY, L., VIGNON, X., BLEIMLING, N., GAUTEL, M., BENYAMIN, Y. & OUALI, A. 2005. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *Febs j*, 272, 2578-90.
- RICHARD, P., CHARRON, P., CARRIER, L., LEDEUIL, C., CHEAV, T., PICHEREAU, C., BENAICHE, A., ISNARD, R., DUBOURG, O., BURBAN, M., GUEFFET, J. P., MILLAIRE, A., DESNOS, M., SCHWARTZ, K., HAINQUE, B. & KOMAJDA, M. 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of

- mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*, 107, 2227-32.
- ROHDE, J. A., ROOPNARINE, O., THOMAS, D. D. & MURETTA, J. M. 2018. Mavacamten stabilizes an autoinhibited state of two-headed cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E7486-e7494.
- RÜSSEL, I. K., BROUWER, W. P., GERMANS, T., KNAAPEN, P., MARCUS, J. T., VAN DER VELDEN, J., GÖTTE, M. J. & VAN ROSSUM, A. C. 2011. Increased left ventricular torsion in hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers with normal wall thickness. *J Cardiovasc Magn Reson*, 13, 3.
- SACCONI, S., FÉASSON, L., ANTOINE, J. C., PÉCHEUX, C., BERNARD, R., COBO, A. M., CASARIN, A., SALVIATI, L., DESNUELLE, C. & URTIZBEREA, A. 2012. A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease. *Neuromuscul Disord*, 22, 66-72.
- SALCAN, S., BONGARDT, S., MONTEIRO BARBOSA, D., EFIMOV, I. R., RASSAF, T., KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2020. Elastic titin properties and protein quality control in the aging heart. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867, 118532.
- SATOH, M., TAKAHASHI, M., SAKAMOTO, T., HIROE, M., MARUMO, F. & KIMURA, A. 1999. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 411-7.
- SCHLOSSAREK, S., ENGLMANN, D. R., SULTAN, K. R., SAUER, M., ESCHENHAGEN, T. & CARRIER, L. 2012. Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol*, 107, 235.
- SEQUEIRA, V., WIJNKER, P. J., NIJENKAMP, L. L., KUSTER, D. W., NAJAFI, A., WITJAS-PAALBERENDS, E. R., REGAN, J. A., BOONTJE, N., TEN CATE, F. J., GERMANS, T., CARRIER, L., SADAYAPPAN, S., VAN SLEGTENHORST, M. A., ZAREMBA, R., FOSTER, D. B., MURPHY, A. M., POGGESI, C., DOS REMEDIOS, C., STIENEN, G. J., HO, C. Y., MICHELS, M. & VAN DER VELDEN, J. 2013. Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations. *Circ Res*, 112, 1491-505.
- SHEIKH, F., RASKIN, A., CHU, P. H., LANGE, S., DOMENIGHETTI, A. A., ZHENG, M., LIANG, X., ZHANG, T., YAJIMA, T., GU, Y., DALTON, N. D., MAHATA, S. K., DORN, G. W., 2ND, BROWN, J. H., PETERSON, K. L., OMENS, J. H., MCCULLOCH, A. D. & CHEN, J. 2008. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest*, 118, 3870-80.
- SINGH, S. R., ZECH, A. T. L., GEERTZ, B., REISCHMANN-DÜSENER, S., OSINSKA, H., PRONDZYNSKI, M., KRÄMER, E., MENG, Q., REDWOOD, C., VAN DER VELDEN, J., ROBBINS, J., SCHLOSSAREK, S. & CARRIER, L. 2017. Activation of Autophagy Ameliorates Cardiomyopathy in Mybpc3-Targeted Knockin Mice. *Circ Heart Fail*, 10.
- SOLARO, R. J., MOIR, A. J. & PERRY, S. V. 1976. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature*, 262, 615-7.

- SOLARO, R. J. & VAN DER VELDEN, J. 2010. Why does troponin I have so many phosphorylation sites? Fact and fancy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 810-6.
- SOMLAPURA, M., GOTTSCHALK, B., LAHIRI, P., KUFFERATH, I., PABST, D., RÜLICHE, T., GRAIER, W. F., DENK, H. & ZATLOUKAL, K. 2021. Different Roles of p62 (SQSTM1) Isoforms in Keratin-Related Protein Aggregation. *Int J Mol Sci*, 22.
- SOMMESE, R. F., SUNG, J., NAG, S., SUTTON, S., DEACON, J. C., CHOE, E., LEINWAND, L. A., RUPPEL, K. & SPUDICH, J. A. 2013. Molecular consequences of the R453C hypertrophic cardiomyopathy mutation on human β -cardiac myosin motor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 12607-12.
- SORIMACHI, H., FREIBURG, A., KOLMERER, B., ISHIURA, S., STIER, G., GREGORIO, C. C., LABEIT, D., LINKE, W. A., SUZUKI, K. & LABEIT, S. 1997. Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol*, 270, 688-95.
- SPUDICH, J. A. 2014. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases. *Biophys J*, 106, 1236-49.
- SPUDICH, J. A. 2015. The myosin mesa and a possible unifying hypothesis for the molecular basis of human hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Soc Trans*, 43, 64-72.
- STAPLETON, D., MITCHELHILL, K. I., GAO, G., WIDMER, J., MICHELL, B. J., TEH, T., HOUSE, C. M., FERNANDEZ, C. S., COX, T., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, 271, 611-4.
- STEWART, M. A., FRANKS-SKIBA, K., CHEN, S. & COOKE, R. 2010. Myosin ATP turnover rate is a mechanism involved in thermogenesis in resting skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 430-5.
- STEWART, S., MASON, D. T. & BRAUNWALD, E. 1968. Impaired rate of left ventricular filling in idiopathic hypertrophic subaortic stenosis and valvular aortic stenosis. *Circulation*, 37, 8-14.
- TANEIKE, M., YAMAGUCHI, O., NAKAI, A., HIKOSO, S., TAKEDA, T., MIZOTE, I., OKA, T., TAMAI, T., OYABU, J., MURAKAWA, T., NISHIDA, K., SHIMIZU, T., HORI, M., KOMURO, I., TAKUJI SHIRASAWA, T. S., MIZUSHIMA, N. & OTSU, K. 2010. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*, 6, 600-6.
- TEDESCO, B., CRISTOFANI, R., FERRARI, V., COZZI, M., RUSMINI, P., CASAROTTO, E., CHIERICHETTI, M., MINA, F., GALBIATI, M., PICCOLELLA, M., CRIPPA, V. & POLETTI, A. 2022. Insights on Human Small Heat Shock Proteins and Their Alterations in Diseases. *Front Mol Biosci*, 9, 842149.
- TOEPFER, C. N., GARFINKEL, A. C., VENTURINI, G., WAKIMOTO, H., REPETTI, G., ALAMO, L., SHARMA, A., AGARWAL, R., EWOLDT, J. K., CLOONAN, P., LETENDRE, J., LUN, M., OLIVOTTO, I., COLAN, S., ASHLEY, E., JACOBY, D., MICHELS, M., REDWOOD, C. S., WATKINS, H. C., DAY, S. M., STAPLES, J. F., PADRÓN, R., CHOPRA, A., HO, C. Y., CHEN, C. S., PEREIRA, A. C., SEIDMAN, J. G. & SEIDMAN, C. E. 2020. Myosin Sequestration Regulates Sarcomere Function,

Cardiomyocyte Energetics, and Metabolism, Informing the Pathogenesis of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, 141, 828-842.

- TRIPATHI, S., SCHULTZ, I., BECKER, E., MONTAG, J., BORCHERT, B., FRANCINO, A., NAVARRO-LOPEZ, F., PERROT, A., ÖZCELIK, C., OSTERZIEL, K. J., MCKENNA, W. J., BRENNER, B. & KRAFT, T. 2011. Unequal allelic expression of wild-type and mutated β -myosin in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 106, 1041-55.
- TSKHOVREBOVA, L. & TRINICK, J. 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- TSUKAMOTO, O., MINAMINO, T., OKADA, K., SHINTANI, Y., TAKASHIMA, S., KATO, H., LIAO, Y., OKAZAKI, H., ASAI, M., HIRATA, A., FUJITA, M., ASANO, Y., YAMAZAKI, S., ASANUMA, H., HORI, M. & KITAKAZE, M. 2006. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 1125-33.
- ULLAH, I., TAYYABA REHAN, S., KHAN, Z., HASAN SHUJA, S., HAMZA SHUJA, M., IRFAN, M., GONUGUNTLA, K., CHADI ALRAIES, M., AGGARWAL, P., RAINA, S., SATTAR, Y. & SOHAIB ASGHAR, M. 2024. Efficacy and safety of Mavacamten for symptomatic Hypertrophic cardiomyopathy - an updated Meta-Analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 53, 101467.
- VADLAMUDI, R. K., JOUNG, I., STROMINGER, J. L. & SHIN, J. 1996. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*, 271, 20235-7.
- VAN DIJK, S. J., PAALBERENDS, E. R., NAJAFI, A., MICHELS, M., SADAYAPPAN, S., CARRIER, L., BOONTJE, N. M., KUSTER, D. W., VAN SLEGTENHORST, M., DOOIJES, D., DOS REMEDIOS, C., TEN CATE, F. J., STIENEN, G. J. & VAN DER VELDEN, J. 2012. Contractile dysfunction irrespective of the mutant protein in human hypertrophic cardiomyopathy with normal systolic function. *Circ Heart Fail*, 5, 36-46.
- VAN HEEREBEEK, L., BORBÉLY, A., NIESSEN, H. W., BRONZWAER, J. G., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J., LINKE, W. A., LAARMAN, G. J. & PAULUS, W. J. 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*, 113, 1966-73.
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PRÉVOST, M. C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOMÉ, F., DUPRET, J. M., PAULIN, D. & FARDEAU, M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20, 92-5.
- VIKHOREV, P. G. & VIKHOREVA, N. N. 2018. Cardiomyopathies and Related Changes in Contractility of Human Heart Muscle. *Int J Mol Sci*, 19.
- WANG, C. C., PENG, H., WANG, Z., YANG, J., HU, R. G., LI, C. Y. & GENG, W. J. 2022. TRIM72-mediated degradation of the short form of p62/SQSTM1 rheostatically controls selective autophagy in human cells. *Mil Med Res*, 9, 35.
- WANG, Z. V. & HILL, J. A. 2015. Protein quality control and metabolism: bidirectional control in the heart. *Cell Metab*, 21, 215-226.

- WARREN, C. M., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., KRZESINSKI, P. R. & GREASER, M. L. 2003. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res*, 59, 86-94.
- WATKINS, H., ROSENZWEIG, A., HWANG, D. S., LEVI, T., MCKENNA, W., SEIDMAN, C. E. & SEIDMAN, J. G. 1992. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 326, 1108-14.
- WEEKES, J., MORRISON, K., MULLEN, A., WAIT, R., BARTON, P. & DUNN, M. J. 2003. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics*, 3, 208-16.
- WIJNKER, P. J., FRIEDRICH, F. W., DUTSCH, A., REISCHMANN, S., EDER, A., MANNHARDT, I., MEARINI, G., ESCHENHAGEN, T., VAN DER VELDEN, J. & CARRIER, L. 2016. Comparison of the effects of a truncating and a missense MYBPC3 mutation on contractile parameters of engineered heart tissue. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 82-92.
- WIJNKER, P. J., SEQUEIRA, V., FOSTER, D. B., LI, Y., DOS REMEDIOS, C. G., MURPHY, A. M., STIENEN, G. J. & VAN DER VELDEN, J. 2014. Length-dependent activation is modulated by cardiac troponin I bisphosphorylation at Ser23 and Ser24 but not by Thr143 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306, H1171-81.
- WIJNKER, P. J. M., SEQUEIRA, V., KUSTER, D. W. D. & VELDEN, J. V. 2019. Hypertrophic Cardiomyopathy: A Vicious Cycle Triggered by Sarcomere Mutations and Secondary Disease Hits. *Antioxid Redox Signal*, 31, 318-358.
- WIJNKER, P. J. M. & VAN DER VELDEN, J. 2020. Mutation-specific pathology and treatment of hypertrophic cardiomyopathy in patients, mouse models and human engineered heart tissue. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866, 165774.
- WITJAS-PAALBERENDS, E. R., GÜÇLÜ, A., GERMANS, T., KNAAPEN, P., HARMS, H. J., VERMEER, A. M., CHRISTIAANS, I., WILDE, A. A., DOS REMEDIOS, C., LAMMERTSMA, A. A., VAN ROSSUM, A. C., STIENEN, G. J., VAN SLEGTENHORST, M., SCHINKEL, A. F., MICHELS, M., HO, C. Y., POGGESI, C. & VAN DER VELDEN, J. 2014. Gene-specific increase in the energetic cost of contraction in hypertrophic cardiomyopathy caused by thick filament mutations. *Cardiovasc Res*, 103, 248-57.
- WITJAS-PAALBERENDS, E. R., PIRODDI, N., STAM, K., VAN DIJK, S. J., OLIVIERA, V. S., FERRARA, C., SCELLINI, B., HAZEBROEK, M., TEN CATE, F. J., VAN SLEGTENHORST, M., DOS REMEDIOS, C., NIESSEN, H. W., TESI, C., STIENEN, G. J., HEYMANS, S., MICHELS, M., POGGESI, C. & VAN DER VELDEN, J. 2013. Mutations in MYH7 reduce the force generating capacity of sarcomeres in human familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 99, 432-41.
- WITT, S. H., GRANZIER, H., WITT, C. C. & LABEIT, S. 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 350, 713-22.

- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R. & HALL, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471-84.
- WURZER, B., ZAFFAGNINI, G., FRACCHIOLLA, D., TURCO, E., ABERT, C., ROMANOV, J. & MARTENS, S. 2015. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife*, 4, e08941.
- ZABROUSKOV, V., GE, Y., SCHWARTZ, J. & WALKER, J. W. 2008. Unraveling molecular complexity of phosphorylated human cardiac troponin I by top down electron capture dissociation/electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 7, 1838-49.
- ZHANG, Y., NICHOLATOS, J., DREIER, J. R., RICOULT, S. J., WIDENMAIER, S. B., HOTAMISLIGIL, G. S., KWIATKOWSKI, D. J. & MANNING, B. D. 2014. Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature*, 513, 440-3.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Übersicht über ein Sarkomer	1
Abb. 2 Schemazeichnung eines Myosinmoleküls	3
Abb. 3 Schematische Struktur von Titin im Halbsarkomer	6
Abb. 4 Schematischer Überblick über die Autophagie	11
Abb. 5 schematische Übersicht über die genannten Aspekte der HCM-Pathogenese	17
Abb. 6 Linker Ventrikel mit Papillarmuskelfasern	27
Abb. 7 Fasermessapparatur	28
Abb. 8 Messung der passiven Rückstellkraft	28
Abb. 9 Messung der Kalziumsensitivität	29
Abb. 10 Messung der längenabhängigen Aktivierung	29
Abb. 11 Titin-Isoformen	33
Abb. 12 Herz-Körpergewicht-Verhältnis	35
Abb. 13 Passive Steifigkeit	36
Abb. 14 Maximale Kraft	37
Abb. 15 Kalziumsensitivität	38
Abb. 16 Längenabhängige Aktivierung	39
Abb. 17 Zusammensetzung der Isoformen	40
Abb. 18 Relative Titin Phosphorylierung an S4010 und S11878	41
Abb. 19 Relative Titin Ubiquitinierung und Glutathionylierung	43
Abb. 20 Relative PKC α Phosphorylierung	43
Abb. 21 Relative Troponin I Phosphorylierung	44
Abb. 22 Gesamt-Ubiquitinierung	45
Abb. 23 Relative mTOR Phosphorylierungs-, mTOR Gesamt- und AMPK α Level	47
Abb. 24 Relative LC3 Lipidierung, LC3 und p62/SQSTM1 Level	49
Abb. 25 Relative PSMA2 Level	49
Abb. 26 Relative α B-Crystallin Level	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper	20
Tabelle 2: Sekundärantikörper	21
Tabelle 3: Chemikalien	22
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen	24
Tabelle 5: Geräteliste	25
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 7: Reagenzien Polyacrylamid-Trenngele und -Sammelgel	31
Tabelle 8: Reagenzien für 2,2 % Titin Gele	31

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein tiefster Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter Frau Prof. Dr. Martina Krüger. Von der ersten Idee des Projekts über die stets offene Tür bei großen und kleinen Problemen bis hin zu den aufwendigen Korrekturen hat sie diese Arbeit in jeder Phase entscheidend geprägt. Mit ihrer herzlichen und vor allem engagierten Art hat sie diese Arbeit ermöglicht. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin vorstellen können.

Herrn Prof. Dr. Joachim Schmitt danke ich für die Bereitstellung der HCM-Mäuse, der Co-Betreuung sowie seine inhaltlichen Beiträge zu dieser Arbeit. Herrn Dr. Sebastian Kötter danke ich ebenfalls dafür, dass er mit seinem umfangreichen Wissen zu Titin und der Proteinqualitätskontrolle die Planung dieser Arbeit enorm bereichert hat sowie die Bereitstellung seiner Titin-Gele.

Ein besonderer Dank richtet sich an Sabine Bongardt, die nach Abschluss meiner Laborarbeiten noch weitere Western Blots dieser Arbeit hinzugefügt hat. Darüber hinaus hat sie mit ihrer warmherzigen, lebenswürdigen Art meine Laborzeit sehr bereichert.

Mein Dank richtet sich außerdem an die anderen Doktorrandinnen und Doktoranden. Besonders Sophia Kiemann, die mit einem ähnlichen Projekt zur dilatativen Kardiomyopathie vorangegangen ist und einige Grundlagen für meine Arbeit geschaffen hat. Ebenso will ich Julian, Lucas, Nicole und Kathi nennen, mit denen ich zwei Freisemester verbringen durfte und die mir immer wieder ausgeholfen haben. Dies war vor allem mit Bänderriss und Krücken enorm hilfreich. Die Erinnerung an unsere gemeinsame Zeit im Labor wird mich immer wieder zum Lachen bringen.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für das Promotionsstipendium bedanken sowie der Heine Research Academies und der deutschen physiologischen Gesellschaft für die Reisekostenzuschüsse, die mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Tagungen ermöglichten und diese Arbeit wesentlich bereichert haben.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich von Beginn an unterstützt, motiviert und bis zum letzten Korrekturdurchgang begleitet haben. Ohne euren Rückhalt, eure aufbauenden Worte und eure Liebe wäre diese Promotion niemals entstanden.