

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. MED. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KARDIALES ROS-SIGNALING BEI AKUTER VORLASTERHÖHUNG AM WORKING
HEART MODEL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin Johannes Schmidtke

2021

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. MED. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

KARDIALES ROS-SIGNALING BEI AKUTER VORLASTERHÖHUNG AM WORKING
HEART MODEL

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin Johannes Schmidtke

2021

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Maier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Stark
Tag der mündlichen Prüfung:	21.10.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Herzinsuffizienz – Definition und Epidemiologie	4
1.2	Grundlagen	4
1.2.1	Frank-Starling-Mechanismus	4
1.2.2	Elektromechanische Kopplung.....	5
1.3	Metabolismus im Herzen.....	6
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies.....	7
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Working Heart Model	11
2.3	Die OxICAT-Methode	12
2.4	Massenspektrometrische Analyse	14
2.5	Auswertung der Massenspektren.....	15
2.5.1	Identifizierung der Peptide	15
2.5.2	Prüfkriterien.....	16
2.5.3	Validierung der Quantifizierung mittels Massenspektren.....	17
2.6	Auswertung der Einzelproben	19
2.7	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Validierung der Methodik	21
3.2	Deskription des Datensatzes.....	27
3.3	Ergebnisse der Spektrenanalyse	31
4	Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus	35
5	Zusammenfassung	42
6	Abkürzungsverzeichnis	43
7	Abbildungsverzeichnis	44
8	Literaturverzeichnis.....	47
9	Danksagung	54

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz – Definition und Epidemiologie

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, das durch jegliche strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung verursacht werden kann und das Herz daran hindert, sich adäquat mit Blut zu füllen oder das Blut ausreichend auszuwerfen (1, 2).

Des Weiteren gehen mit einer Herzinsuffizienz Veränderungen im neurohumoralen System einher. Sowohl der Sympathikus, als auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) werden aktiviert, um über eine Erhöhung der Herzfrequenz, eine Steigerung der Kontraktilität, einer peripheren Vasokonstriktion und einer vermehrten Retention von Natrium und Wasser die Auswurfleistung des Herzens zu verbessern (3).

Die Guidelines der European Society of Cardiology (ESC) aus dem Jahre 2016 teilen die Herzinsuffizienz in drei Subkategorien anhand der Symptome und der Ejektionsfraktion (EF) ein. Bei einer EF von $<40\%$ liegt eine Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), bei einer EF von $\geq 50\%$ eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) vor. Von einer Herzinsuffizienz mit mittelgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion (HFmrEF) spricht man bei einer EF von 40 bis 49%. Des Weiteren kann die Herzinsuffizienz anhand des Schweregrades der Symptome in die NYHA-Stadien I bis IV eingeteilt werden (4).

In Deutschland ist die Herzinsuffizienz der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz liegt in Deutschland bei 3,9 Prozent, jährlich kommen etwa 500.000 Neudiagnosen dazu. Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz steigen mit dem Alter kontinuierlich an (5).

Ursachen für ein chronisches Herzversagen sind weiterhin die koronare Herzkrankheit, chronische arterielle Hypertonie, Kardiomyopathien, Erkrankungen der Herzklappen und des Perikards, Myokarditis, pulmonale Hypertonie und kardiotoxische Substanzen (6).

1.2 Grundlagen

1.2.1 Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die Anpassung des Herzens auf kurzfristige Schwankungen von Volumen und Druck. Bei erhöhter Vorlast (*preload*), zum Beispiel durch gesteigerten venösen Rückstrom, pumpt das Herz bei unverändertem Aortendruck ein erhöhtes Schlagvolumen. Bei erhöhter Nachlast (*afterload*), beispielsweise ein erhöhter

1 Einleitung

Aortendruck, pumpt das Herz zunächst ein reduziertes Schlagvolumen, da die Aortenklappe verspätet öffnen kann. In der nächsten Systole addieren sich das Füllungsvolumen und das erhöhte enddiastolische Volumen allerdings und es kommt wie bei der erhöhten Volumenbelastung zum Auswurf eines konstanten Schlagvolumens gegen einen erhöhten Aortendruck. Die Grundlage dieses Mechanismus ist, dass die Myofilamente im Herzen bei erhöhter Vordehnung eine größere Spannung entwickeln und sensitiver für Ca^{2+} im Zytosol werden. Physiologisch gesehen dient der Frank-Starling-Mechanismus der präzisen Abstimmung zwischen linkem und rechtem Ventrikel und verhindert damit langfristige Druck- und Volumenschwankungen im Kreislauf (7).

1.2.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung ist die Verknüpfung zwischen der Membrandepolarisation durch ein eintreffendes Aktionspotential und der Kontraktion der Myofilamente. Zentrale Rolle spielt hier die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, die in einer ruhenden Herzmuskelzelle mit etwa 10^{-7} mol/l sehr niedrig liegt (7).

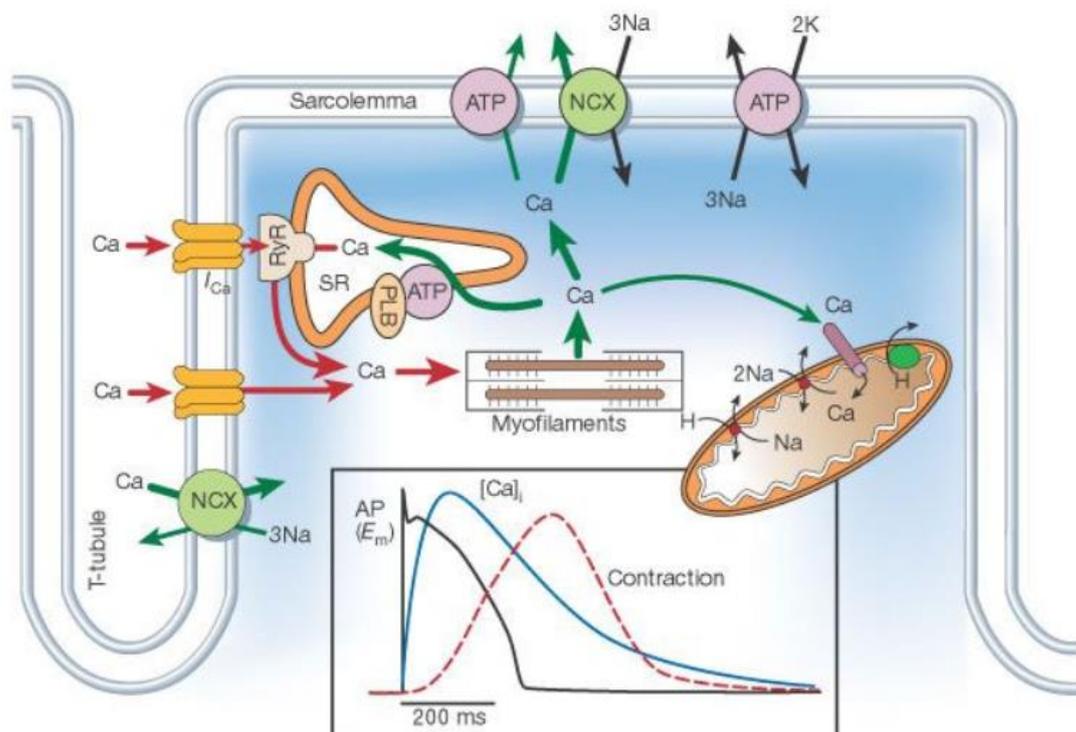


Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung Aktionspotentiale öffnen sarkolemme Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer quantitativ höheren Ca^{2+} -Freisetzung führt. Durch Bindung des Ca^{2+} an Troponin C kommt es zum Kontraktionszyklus. $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und ATPasen (ATP) transportieren Ca^{2+} aus dem Zytosol. *RyR*, Ryanodinrezeptor; *PLB*, Phospholamban (8). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages.

1 Einleitung

Eintreffende Aktionspotentiale öffnen spannungs-abhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die sogenannten Dihydropyridinrezeptoren (DHPR). Calcium strömt entlang seines elektrochemischen Gradienten ein und triggert durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulums, sogenannten Ryanodin-Rezeptoren (RyR2), eine quantitativ noch höhere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Durch die Bindung des Ca^{2+} an Troponin C kommt es zum Kontraktionszyklus. Der Herzmuskel relaxiert, wenn die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration absinkt. Dafür sind vorwiegend die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und der zellmembranständige $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher verantwortlich (8).

1.3 Metabolismus im Herzen

Der Anteil von Mitochondrien in den Kardiomyozyten beträgt 36% (7). Hauptsächlich werden im Herzen Fettsäuren, Glucose und Laktat verstoffwechselt. 50 bis 60% der Energie wird aus freien Fettsäuren gewonnen, die im Herzen direkt zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) verwertet werden. Etwa 30% der Energie stammt aus der Glucose, die über die Glykolyse zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-CoA verstoffwechselt wird. Auch Laktat kann vom Herzen metabolisiert werden, meist zu etwa 20%. Dieses wird erst zu Pyruvat und dann weiter zu Acetyl-CoA verstoffwechselt. Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien in den Citrat-Zyklus eingeschleust, wo es unter der Gewinnung von Reduktionsäquivalenten zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut wird. Die dabei entstandenen Reduktionsäquivalente dienen der oxidativen Phosphorylierung und damit der Produktion von ATP, welches im Zytosol als Energielieferant für die Kontraktion dient (9).

Bei erhöhtem Energiebedarf kommt es durch β -adrenerge Stimulierung zur sogenannten „parallelen Aktivierung“: die Stimulation führt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Freisetzung von Ca^{2+} . Dieses Ca^{2+} steigert am Herzen Chronotropie, Inotropie, Dromotropie und Lusitropie und damit den ATP-Verbrauch. Das anfallende ADP wiederum stimuliert die Atmungskettenaktivität. Mitochondrial akkumulierendes Ca^{2+} stimuliert den Citratzyklus, um mehr Reduktionsäquivalente für die Atmungskette bereitzustellen (10) (siehe auch **Abbildung 2**).

An der Atmungskette entstehen kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies (ROS), deren Quantität reguliert werden muss, um Zellschäden zu verhindern (9).

1 Einleitung

wird. Das für diese Reaktion nötige NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) stammt aus dem Krebszyklus. Die Reaktionsrichtung der NNT kann sich bei pathologischem Arbeitslastanstieg auch umdrehen. Dementsprechend stehen der Atmungskette mehr Reduktionsäquivalente zur Verfügung, allerdings auf Kosten erhöhter ROS-Werte durch verringerten Abbau (14).

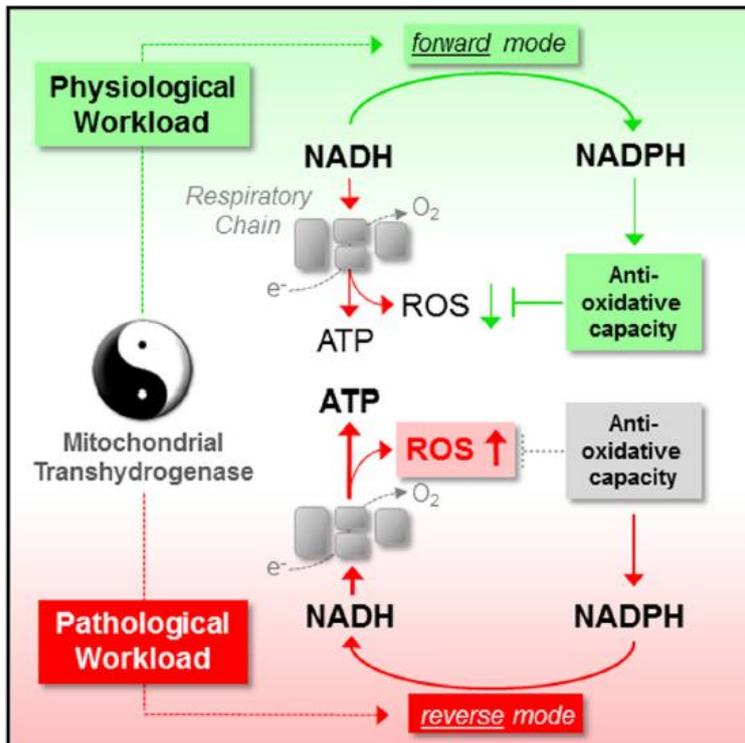


Abbildung 3: Die Rolle der NNT bei physiologischer und pathologischer Arbeitslast (14) Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.

ROS spielen auch in physiologischen Prozessen, wie Zellmigration und -adhäsion, Proliferation und Hypertrophie, Angiogenese, Apoptose und Signaltransduktion eine Rolle (12). Dies geschieht über posttranslationale Modifikationen, genauer gesagt über posttranslationale Redox-Modifikationen. Besonders die Oxidation von Thiol-Gruppen scheint eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zu spielen (16).

Vor allem H₂O₂ kommt als Signal-Molekül in Frage, da es deutlich stabiler ist als andere Sauerstoff-Radikale (12). Dennoch war lange Zeit unklar, wie eine solche Signaltransduktion zustande kommt, denn redox-sensitive Proteine zeigen meist eine niedrige intrinsische Reaktivität gegenüber H₂O₂. Außerdem müssten Peroxiredoxine in der Lage sein, nahezu das gesamte H₂O₂ unschädlich zu machen (17). Man fand heraus, dass Peroxiredoxine nicht nur als Radikalfänger fungieren, sondern auch an der H₂O₂-vermittelten Signaltransduktion mitwirken. H₂O₂ oxidiert Peroxiredoxin-2, das wiederum Reduktionsäquivalente auf den Transkriptionsfaktor STAT3 überträgt. STAT3 ist ein redox-

1 Einleitung

regulierter Transkriptionsfaktor. Dies unterstützt die Existenz eines Modells, in dem Peroxiredoxine zusätzlich zu ihrer Funktion als Radikalfänger auch als Amplifikatoren eines ROS-Signals dienen (18).

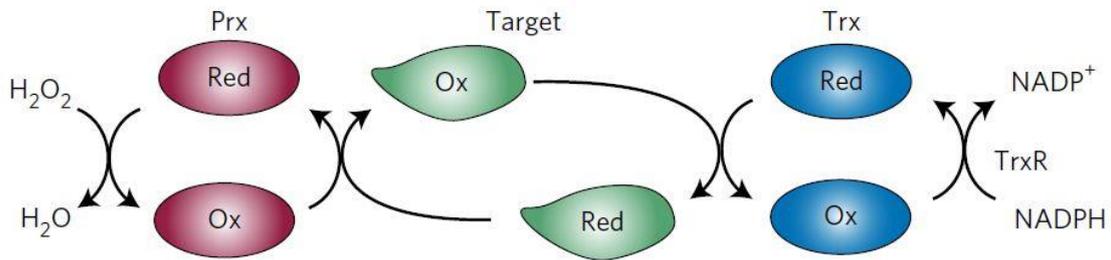


Abbildung 4: Modell des Redox-Signaling durch Peroxiredoxine H₂O₂ greift nicht direkt an den redox-sensitiven Proteinen an, sondern über ein Peroxiredoxin (18). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages.

ROS-Signale haben eine hohe zeitliche und örtliche Auflösung, was eine hohe Kompartimentalisierung ermöglicht (12). Ein Mechanismus, über den redox-sensitive Proteine aktiviert und deaktiviert werden, sind sogenannte „Thiol-Switches“. Das sind Cysteine, die Thiol-Gruppen tragen. Diese Thiol-Gruppen können wie Lichtschalter durch Oxidation und Reduktion an- und ausgeschaltet werden (19).

Es sind bereits Versuche unternommen worden, besagte Cysteine im Kardiomyozyten zu identifizieren. Allerdings konnten bisher nur wenige regulatorische Cysteine ausfindig gemacht werden (20–26).

1 Einleitung

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel war ein Screening auf regulatorische Thiol-Switche, welche die rasche Adaptation von Kardiomyozyten auf Vor- respektive Nachlasterhöhung beeinflussen.

2 Material und Methoden

Die mir zur weiteren in silico Bearbeitung zur Verfügung gestellten Daten sind das Ergebnis eines Working Heart Models mit standardisierter Vor- und Nachlasterhöhung und einer massenspektrometrie-basierten OxICAT-Analyse, welche bei Kooperationspartnern am Universitätsklinikum des Saarlandes und der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt worden sind. Die Kooperationspartner publizierten beide Methoden bereits (14, 27). Um meine darauf aufbauenden Analysen einordnen zu können, stelle ich die Eckpunkte im Folgenden kurz dar.

2.1 Versuchstiere

Für das Experiment wurden insgesamt 91 Versuchstiere aus vier unterschiedlichen Genotypen verwendet. C57BL/6N-Mäuse (Charles River) besitzen das NNT-codierende Gen, während bei C57BL/6J-Mäusen dieses Gen fehlt. Die Aktivität der NNT ist bei N-Mäusen im kardialen Gewebe am höchsten, während sie bei J-Mäusen in allen Geweben fehlt. Auf Grundlage der J-Mäuse wurde ein echter Knockout der NNT geschaffen (NNT(-/-)) und dieser im letzten Genotyp reexprimiert (NNT (+/+)). Die Zustimmung der zuständigen Tierschutzkommission lag vor.

2.2 Working Heart Model

Die Untersuchungen am isolierten Herzen wurden wie bereits früher beschrieben durchgeführt (14, 28). Murine Herzen wurden über die Aorta und den linken Vorhof kanüliert. Bei konstant 37°C wurde mit 400 Schlägen/Minute stimuliert (28).

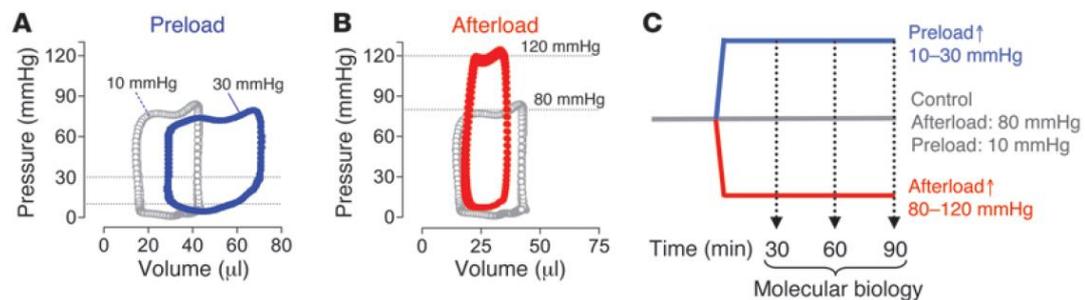


Abbildung 5: Darstellung der Vor- und Nachlasterhöhung im Working Heart Model (29) Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Clinical Investigation.

Bei den Vorlast-Versuchstieren wurde die Vorlast von 10 mmHg auf bis zu 30 mmHg erhöht, während die Nachlast konstant bei 80 mmHg gehalten wurde. In der Gruppe der Nachlast-Versuchstiere wurde die Nachlast von 80 mmHg auf 120 mmHg erhöht, während

2 Material und Methoden

die Vorlast konstant gehalten wurde. In den Kontroll-Gruppen blieben Vorlast und Nachlast für die Untersuchungszeit konstant. Nach 15 Minuten Versuchszeit wurde das Gewebe eingefroren (28). Insgesamt wurden 91 Tiere analysiert.

Genotyp	Kontrolle	Vorlast- Erhöhung	Nachlast- Erhöhung
C57BL/6N	9	8	10
C57BL/6J	11	7	10
NNT(-/-)	7	7	7
NNT(+/+)	5	5	5

Tabelle 1: Genotypen und experimentelle Behandlung der analysierten Tiere

2.3 Die OxICAT-Methode

Die OxICAT-Methode dient dazu, das Verhältnis von reduzierten zu oxidierten Thiol-Gruppen in Proteinen zu bestimmen. Dazu nutzt man einen Marker, den *isotope coded affinity tag (ICAT)*. Das Reagens des leichten ICAT enthält neun ^{12}C -Atome, während das Reagens des schweren ICAT neun ^{13}C -Atome enthält. Somit haben beide Formen des Tags die gleichen chemischen Eigenschaften und unterscheiden sich nur in der Masse von 9 Dalton. Mit dieser Methode ist es möglich, reduzierte Thiol-Gruppen mit der leichten Form des ICAT (light-ICAT) zu versehen, während oxidierte Thiol-Gruppen die schwere Form des ICAT (heavy-ICAT) erhalten (27).

Nach dem Auftauen des gefrorenen (linksventrikulären) Gewebes erfolgte die Denaturierung der Proteine. Nun wurden die Zellen mit der leichten Form des ICAT behandelt und damit alle reduzierten Thiol-Gruppen markiert (Schritt 3 in **Abbildung 6**). Alle übrig gebliebenen oxidierten Thiol-Gruppen wurden nun mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert (Schritt 4). Somit konnten die zu Beginn oxidierten Thiol-Gruppen nun mit der schweren Form des ICAT behandelt und markiert werden (Schritt 5). Nach erfolgtem Trypsin-Verdau und Aufreinigung der markierten Peptide, konnte die massenspektrometrische Analyse erfolgen (Schritt 6-8) (27).

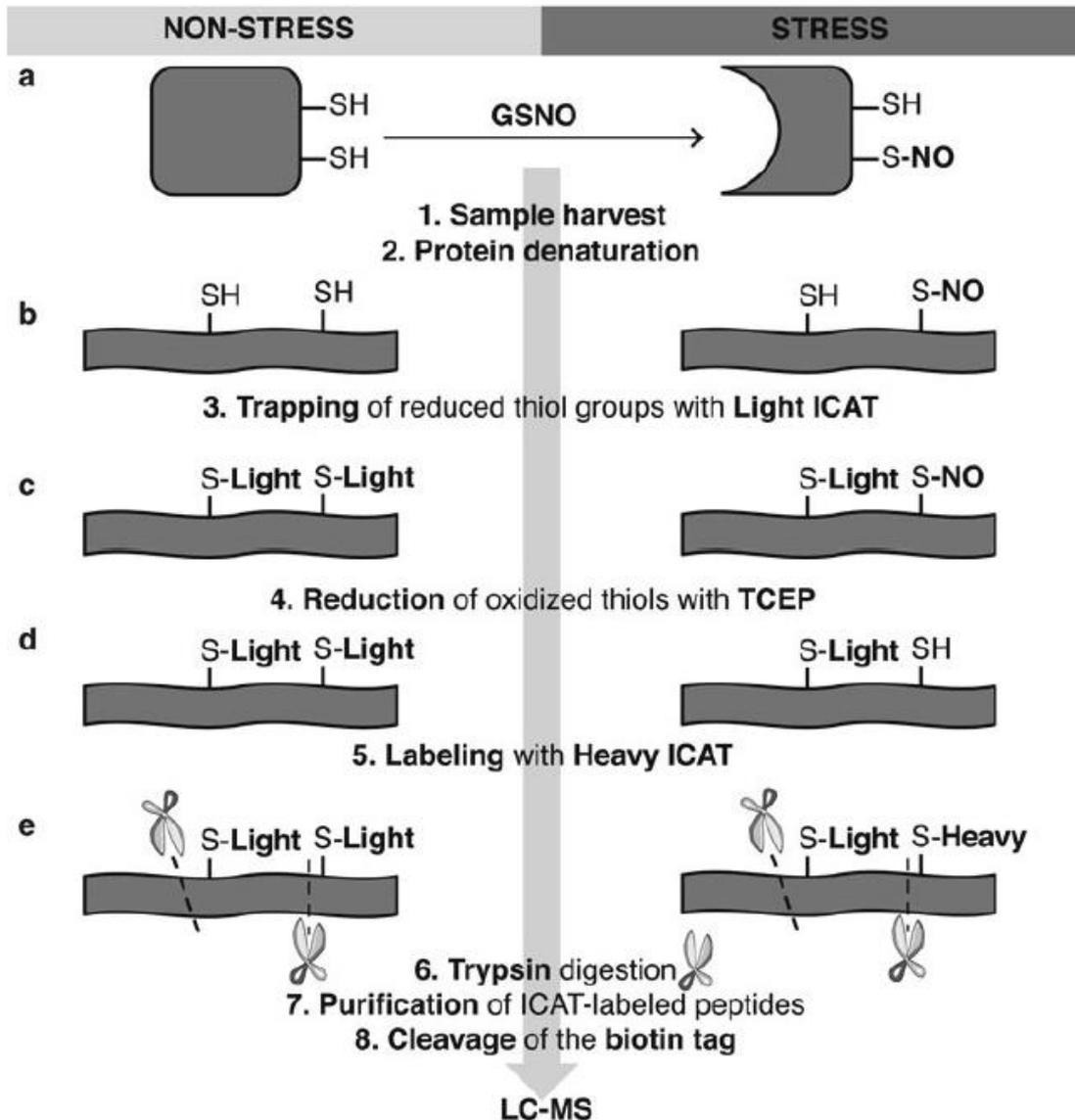


Abbildung 6: Prinzip der OxICAT-Methode a) Links ein Protein mit reduzierten Thiolgruppen; rechts ein Protein mit einer oxidierten und einer reduzierten Thiol-Gruppe. Nach Denaturierung folgt das Labeling der reduzierten Thiol-Gruppen mit dem light-ICAT (b). Durch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) werden oxidierte Thiol-Gruppen reduziert (c) und anschließend durch Zugabe des heavy-ICAT gelabelt. Vorher reduzierte Thiol-Gruppen sind nun mit dem light-ICAT, während zuvor oxidierte Gruppen mit dem heavy-ICAT gelabelt sind. Die Proteine sind unabhängig ihres vorherigen Oxidationsniveaus chemisch identisch. In der nachfolgenden Massenspektrometrie (MS) zeigen zuvor oxidierte Thiol-Gruppen eine Verschiebung von 9 Dalton im Massenspektrum. *GSNO*, *S-Nitrosoglutathion* (27). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages.

2.4 Massenspektrometrische Analyse

Massenspektrometer bestehen grundsätzlich aus drei Bestandteilen: die Ionenquelle bringt die zu untersuchenden Moleküle in eine ionisierte Form. Die Ionen gelangen dann in den Analysator, der die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufteilt. Der dritte Bestandteil ist der Detektor, der die separierten Ionen erfasst. Es gibt unterschiedliche Methoden zur Ionisierung und Analyse der Ionen. Im vorliegenden Versuch wurde eine sogenannte MALDI-TOF-TOF-Analyse durchgeführt. Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) werden die Moleküle in eine Matrix eingebracht, mit einem Laser beschossen und dadurch ionisiert. Die Time-of-flight(TOF)-Analyse der Ionen berechnet das Verhältnis von Masse zu Ladung anhand der Zeit, die die Ionen zum Durchlauf durch die Röhre benötigen (30).

Die Tandem-Massenspektrometrie, bei der zwei Massenspektrometrien hintereinander geschaltet werden (in diesem Falle TOF-TOF), dient sowohl der Identifizierung, als auch der Quantifizierung der Proteine (31).

2.5 Auswertung der Massenspektren

Anhand der **Abbildung 7** soll schematisch gezeigt werden, wie die Massenspektren ausgewertet wurden.



Abbildung 7: Prozess der Auswertung am Beispiel der N-Vorlast-gegen-Kontroll-Tiere

2.5.1 Identifizierung der Peptide

Die Identifizierung der Peptide erfolgte mittels des Programmes MaxQuant (Version 1.6.1.0, Max-Planck-Institut, München, Deutschland). Hierbei wurden die Massenspektren aller Individuen zweier Behandlungs-Gruppen innerhalb eines Genotyps in das Programm eingepflegt, am Beispiel der **Abbildung 7** die Massenspektren der 9 Kontroll- und der 8 Vorlast-Tiere (siehe auch **Tabelle 1**). Die Software erstellte bei jedem der vier Genotypen eine Liste derer Peptide, die im Vergleich von Vorlast- gegen Kontrolle, beziehungsweise Vorlast- gegen Nachlast identifiziert wurden (im Beispiel 5749 Peptide). Als Vorlage diente ein FASTA-File, das alle bisher bekannten Proteine der Spezies *Mus Musculus* aus der Datenbank Uniprot.org (32) beinhaltetete (Download der Datei am 18.04.2018).

2.5.2 Prüfkriterien

Bei allen identifizierten Peptiden habe ich mittels Excel 2016 (Microsoft, Redmond, USA) den Anteil an oxidierten Thiol-Gruppen zur Gesamtanzahl der Thiolgruppen ermittelt. Anhand dieser Anteile berechnete ich in beiden Versuchsgruppen sowohl den Mittelwert als auch die Standardabweichung. Als technisch invalide betrachteten wir in den Individuen die Ergebnisse, bei denen weder reduzierte noch oxidierte Thiol-Gruppen erfasst wurden, da bei der Berechnung des Verhältnisses von oxidierten Thiol-Gruppen zur Gesamtzahl ($\text{Oxidiert} / (\text{Oxidiert} + \text{Reduziert})$) keine 0 im Nenner stehen kann. Für die weitere Analyse kamen nur Peptide infrage, bei denen in jeder Behandlungs-Gruppe maximal zwei solcher technisch invaliden Individuen vorkamen. Bei Genotypen, die pro Behandlungs-Gruppe sechs oder mehr Individuen aufwiesen, schlossen wir auch Peptide ein, die in jeder Gruppe bei maximal drei Tieren solche technisch invaliden Ergebnisse aufwiesen. Ebenso wurde mit den Genotypen verfahren, die pro Gruppe acht oder mehr Individuen aufwiesen – hier konnten wir die Peptide einschließen, die jeweils bei maximal vier Individuen eine ungültige Division zeigten.

Bei allen nun eingeschlossenen Peptiden habe ich mittels t-Test den Unterschied der Mittelwerte auf Signifikanz getestet. Hierbei wurde ein zweiseitiges Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$ akzeptiert. Alle Peptide, die ein solches Signifikanz-Niveau erzielten, wurden in die weitere Überprüfung aufgenommen. Des Weiteren wurden auch die Peptide mit in die Überprüfung eingeschlossen, bei denen der Unterschied der Mittelwerte zwischen beiden verglichenen Behandlungs-Gruppen größer als 0,2 (also 20 Prozent) war.

Im Beispiel haben 35 Peptide den Einschlusskriterien entsprochen (vgl. **Abbildung 7**). Im Verlauf des Projekts entschieden wir uns dafür, engere Prüfkriterien anzuwenden. Wir reduzierten die zu überprüfenden Peptide, indem wir nur diejenigen in die Überprüfung einschlossen, die sowohl ein Signifikanz-Niveau $p < 0,05$, als auch einen Unterschied der Mittelwerte größer 20 Prozent zeigten.

Die Software MaxQuant identifiziert die Peptide nicht nur, sondern quantifiziert auch die jeweils light oder heavy ICAT-gelabelten Peptide. Diese Quantifizierung zeigt allerdings eine Fehlerquote von etwa 50% falsch-positiven Treffern. Deshalb war es notwendig, die quantitativen Ergebnisse der eingeschlossenen Peptide händisch zu validieren.

2.5.3 Validierung der Quantifizierung mittels Massenspektren

Um zu überprüfen, ob die Quantifizierung von MaxQuant richtig stattgefunden hat, habe ich bei jedem eingeschlossenen Peptid das für dieses Peptid spezifische Massenspektrum in jedem der Versuchstiere aufgesucht.

2.5.3.1 Monoisotopischer Peak und isotopische Peaks

Die Ionen mehratomiger Moleküle stellen sich meist nicht als einzelne Linien im Massenspektrum dar, sondern als Gruppe von Peaks, die die einzelnen Isotope abbilden („isotopic envelope“). Isotope von Elementen unterscheiden sich von diesen nicht in der Ordnungszahl, sondern nur in der Anzahl an Neutronen und demzufolge in der Massenzahl. Der monoisotopische Peak beinhaltet die Peptide, deren Elemente ausschließlich aus den jeweiligen in der Natur häufigsten Isotopen bestehen. Alle dem monoisotopischen Peak vorangehenden oder folgenden Peaks sind isotopische Peaks. Sie beinhalten zwar das gleiche Peptid, allerdings befindet sich ein selteneres Isotop im Molekül. So sind die isotopischen Peaks im Massenabstand eines oder mehrerer Neutronen vom monoisotopischen Peak entfernt zu finden (33).

2.5.3.2 Aufsuchen der Massenspektren

Zur Quantifizierung der Proteine habe ich die Massenspektren der Versuchstiere verwendet. Die Darstellung dieser Massenspektren erfolgte mittels der Software Thermo XCalibur (Version 2.2 SP1.48, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zur Überprüfung auf falsch-positive Treffer musste ich zu jedem Protein in allen Individuen des jeweiligen Genotyps das passende Massenspektrum aufsuchen.

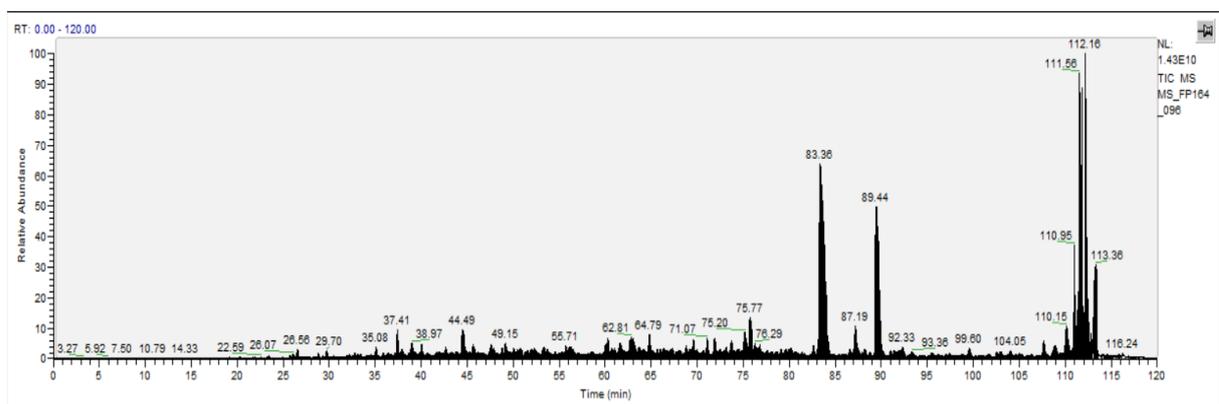


Abbildung 8: Beispielhaftes vollständiges Massenspektrum eines Tieres

Durch die Tandem-Massenspektrometrie wurden in jedem Massenspektrum zwei Arten von Spektren erstellt. Die eine Art von Spektren diente der Identifizierung der Proteine (sogenannte Full ms²-Spektren), die andere der Quantifizierung (sogenannte Full ms oder

2 Material und Methoden

Full lock ms-Spektren). MaxQuant erstellt ebenfalls eine Tabelle, die angibt, an welcher Position im Massenspektrum das Protein vom Programm identifiziert wurde. Ein solches Spektrum ist in der **Abbildung 9** gezeigt.

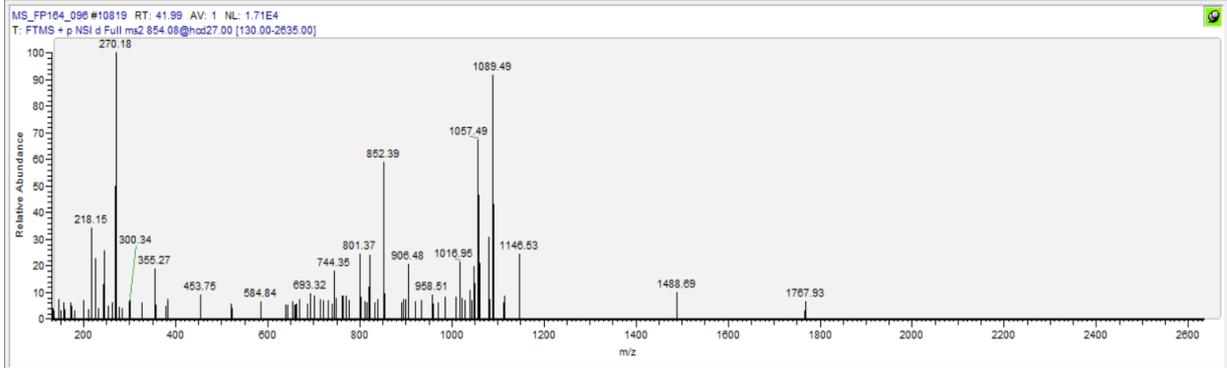


Abbildung 9: Spektrum für die Identifizierung eines Proteins

Zur Quantifizierung musste allerdings das Full ms oder Full lock ms-Spektrum aufgesucht werden, das sich im Massenspektrum immer an benachbarter Position befand.

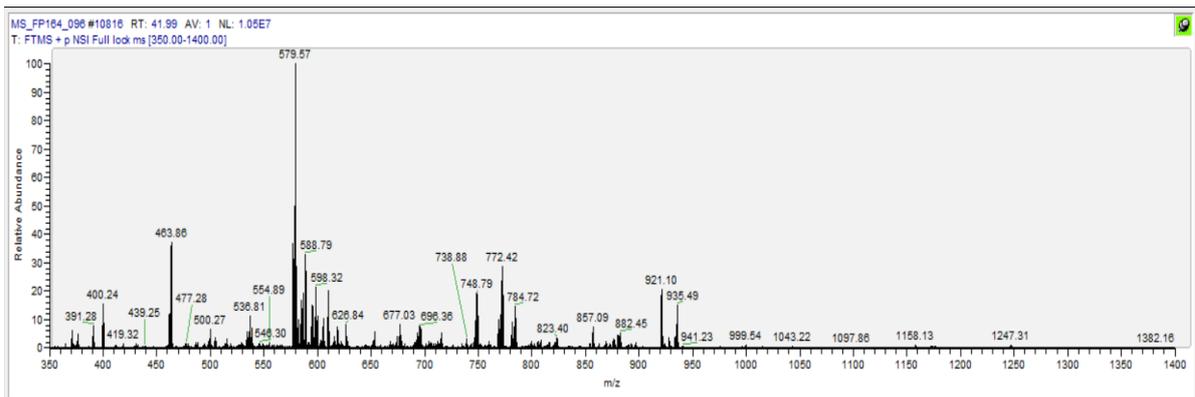


Abbildung 10: Full lock ms-Spektrum zur Quantifizierung eines Proteins

Nun habe ich mittels einer Datenbank, die von der University of California, San Francisco bereitgestellt wurde (34) (Version 5.22.1, Zugriff 04/18 – 07/18), für das zu untersuchende Protein den monoisotopischen Peak herausgesucht. Über diesen ließ sich der monoisotopische Peak errechnen und dann finden, wie es in **Abbildung 11** exemplarisch dargestellt ist.

2 Material und Methoden

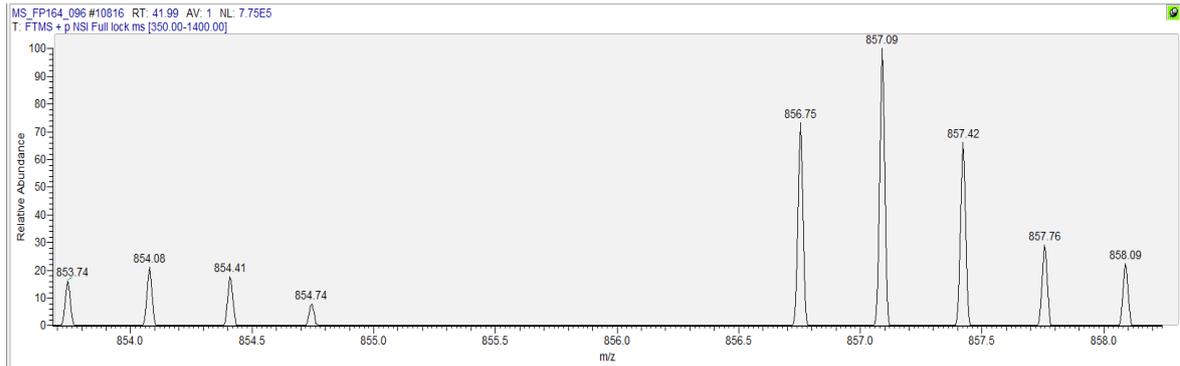


Abbildung 11: Spezifisches Spektrum eines Proteins.

Die linke Seite des in **Abbildung 11** gezeigten Spektrums bildet die reduzierten Thiol-Gruppen ab, die rechte Seite die oxidierten Thiol-Gruppen. Der monoisotopische Peak liegt bei 853,74 Masse/Ladung (m/z) für die reduzierten und bei 856,75 m/z für die oxidierten Thiol-Gruppen. Das vorliegende Protein hat eine Ladung von $z=3$. Deshalb sind alle Peaks, die dem monoisotopischen Peak folgen, circa 0,33 m/z vom vorherigen Peak entfernt, da das Massenspektrometer die Spektren immer als m/z angibt und jeder weitere Peak einem Isotop entspricht, das ein Neutron mehr aufweist. Alle dem monoisotopischen Peak folgenden Peaks sind folglich isotopische Peaks.

2.5.3.3 Validierung der Peptide

Anhand aller Spektren, die dem zu überprüfenden Peptid zugeordnet sind, erfolgte nun die Validierung der Daten. Dabei wurde überprüft, ob das von der Software MaxQuant errechnete Verhältnis zwischen oxidierten Thiol-Gruppen und der Gesamtanzahl an Thiol-Gruppen mit dem Verhältnis in den Massenspektren übereinstimmt. Bei Übereinstimmung des Verhältnisses wurde das Peptid als valide betrachtet; bei deutlicher Abweichung voneinander wurde das Peptid verworfen.

2.6 Auswertung der Einzelproben

Um die Qualität des Versuches bewerten zu können, wurden die Daten der 91 Versuchstiere auch einzeln ausgewertet. Dabei wurde jedes Versuchstier einzeln von MaxQuant analysiert und die vom Programm identifizierten Peptide mit allen in der Datenbank Uniprot.org (32) für die Spezies *Mus Musculus* gelisteten Proteinen abgeglichen. Dabei wurden die Peptide anhand der Datenbank neun verschiedenen Kompartimenten zugeordnet (Download der Dateien am 10.07.2018). Diese neun Kompartimente sind die mitochondriale Matrix (MM), die äußere mitochondriale Membran (MOM), die innere mitochondriale Membran (MIM), der mitochondriale Intermembranraum (MIS), das Lumen des endoplasmatischen Retikulums, der Nukleus, das Zytosol, das Zytoskelett und die Zellmembran. Außerdem

2 Material und Methoden

wurden die Peptide auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken und darauf überprüft, ob es sich um Peroxiredoxine handelte. Von allen zugeordneten Peptiden wurde das Oxidations-Niveau bestimmt und mit bereits bekannten Werten verglichen.

2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung und die Anfertigung der Grafiken erfolgte mittels GraphPad (Version 7, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Mittels der Software STRAP (Version 1.5, Boston University Center for Biomedical Mass Spectrometry, Boston, USA) wurden die Grafiken der Zugehörigkeit der Proteine zu den Kompartimenten erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Methodik

Im ersten Schritt sollten die Ergebnisse unserer erstmals in eukaryontischen Zellen angewandten Methodik validiert werden. Hierzu wurde überprüft, ob sich bekannte Unterschiede in Oxidationsniveaus im eigenen Datensatz reproduzieren lassen:

Der Begriff **Oxidationsniveau** bezeichnet das Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Thiol-Gruppen eines Peptids. Bei einem Wert von 1,0 finden sich demzufolge ausschließlich das Peptid mit oxidiertem Thiol-Gruppe in der Probe, während bei einem Wert von 0 nur reduzierte Thiol-Gruppen vorliegen.

Als erstes wurde überprüft, ob sich das bekannt erhöhte Oxidationsniveaus des endoplasmatischen Lumens in unserem Datensatz abbildet. So zeigt **Abbildung 12** das Oxidationsniveau der Peptide, aufgeschlüsselt nach Zugehörigkeit zu den Kompartimenten. Während der Anteil oxidiertem Cysteine der meisten Kompartimente dem Gesamtdurchschnitt ähnelt, ist das Oxidationsniveau des Lumens des endoplasmatischen Retikulums höher als das der übrigen Kompartimente (**Abbildung 13**). Alle Abbildungen zeigen den Median, die 25%- und 75%-Perzentile.

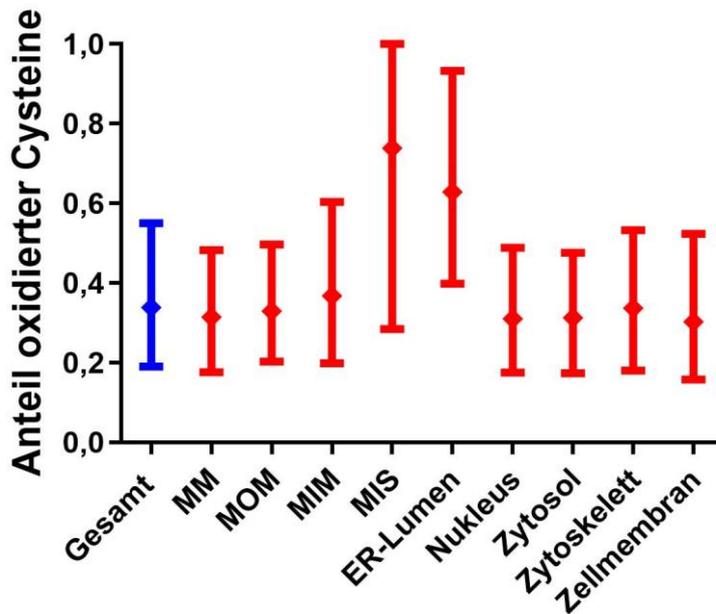


Abbildung 12: Oxidationsniveau der Cysteine nach zellulärem Kompartiment
 Gesamtheit der OxiCAT-untersuchten Individuen, n=88; Gesamtsumme identifizierter Peptide=194.800, MM=Mitochondriale Matrix; MOM=äußere mitochondriale Membran; MIM=innere mitochondriale Membran; MIS=mitochondrialer Intermembranraum; ER Lumen=Lumen des endoplasmatischen Retikulums

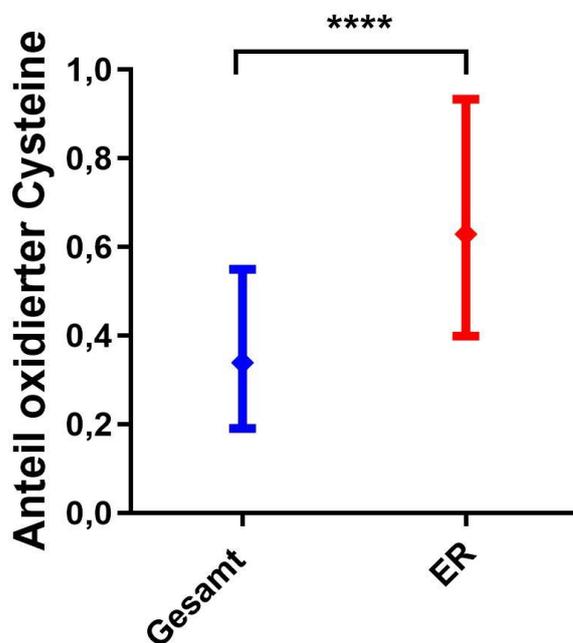


Abbildung 13: Vergleich der Gesamt-Oxidationsniveaus mit denen des ER-Lumen
 Summe identifizierter Peptide des ER-Lumen=249; Gesamt-Summe identifizierter Peptide=194.551; ****= $p < 0,001$ (Wilcoxon-Test)

3 Ergebnisse

Als nächstes sollte überprüft werden, ob mittels unserer neuen Methodik bekannt erhöhte Oxidationsniveaus Thiol-tragender, redox-sensibler Enzyme (Peroxiredoxine) nachweisbar sind. In der Tat zeigten die Peroxiredoxine unseres Datensatzes ein erhöhtes Oxidationsniveau (**Abbildung 14**).

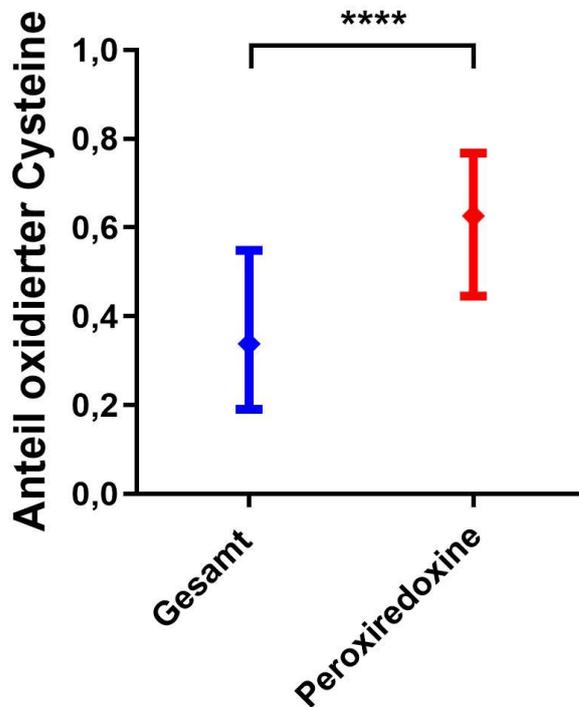


Abbildung 14: Vergleich der Gesamt-Oxidationsniveaus mit denen der Peroxiredoxine
Summe identifizierter Peroxiredoxine=759; Gesamt-Summe identifizierter Peptide=194.041; ****= $p < 0,001$

Zusammenfassend reproduzierte unsere Methodik präzise die erwarteten und vorpublizierten Unterschiede des Oxidationsniveaus hinsichtlich zellulären Kompartiments und RedOx-Sensibilität.

3 Ergebnisse

Mithilfe der Software STRAP konnten die identifizierten Peptide aller 91 Individuen (n=211.327) mittels Uniprot-ID Proteinen und diese per GO-Annotation verschiedenen Kompartimenten, bzw. Prozessen und Funktionen zugeordnet werden (35) (**Abbildungen 15 bis 17**).

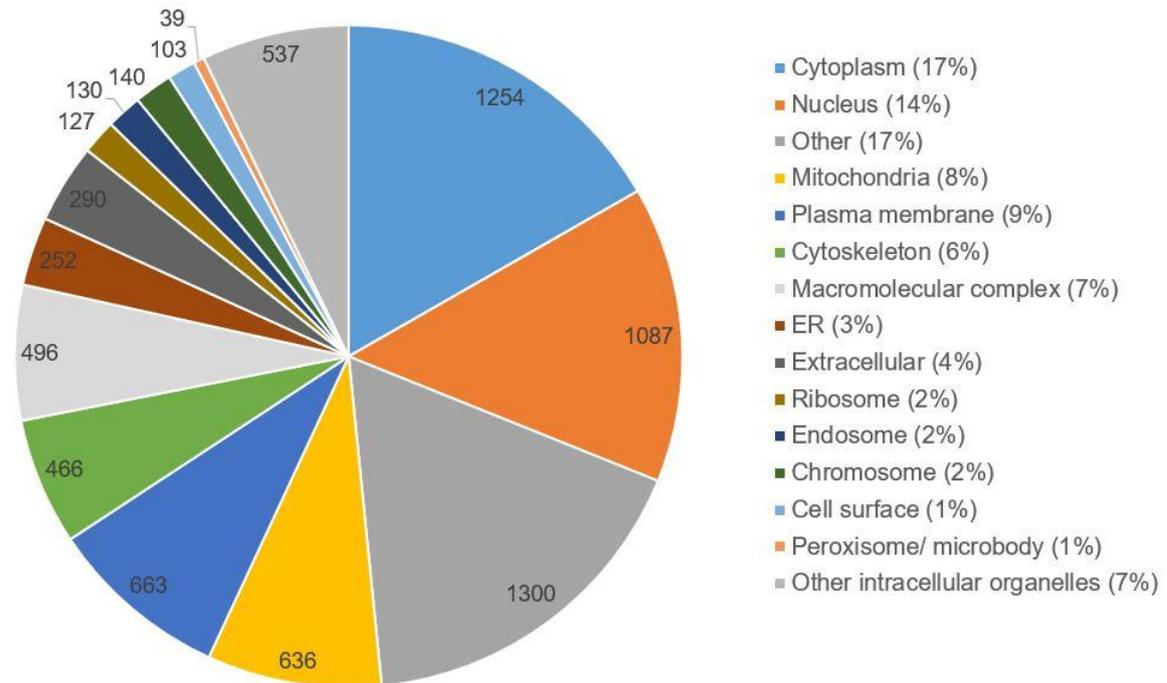


Abbildung 15: STRAP-Auswertung Cellular Compartment
n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019

3 Ergebnisse

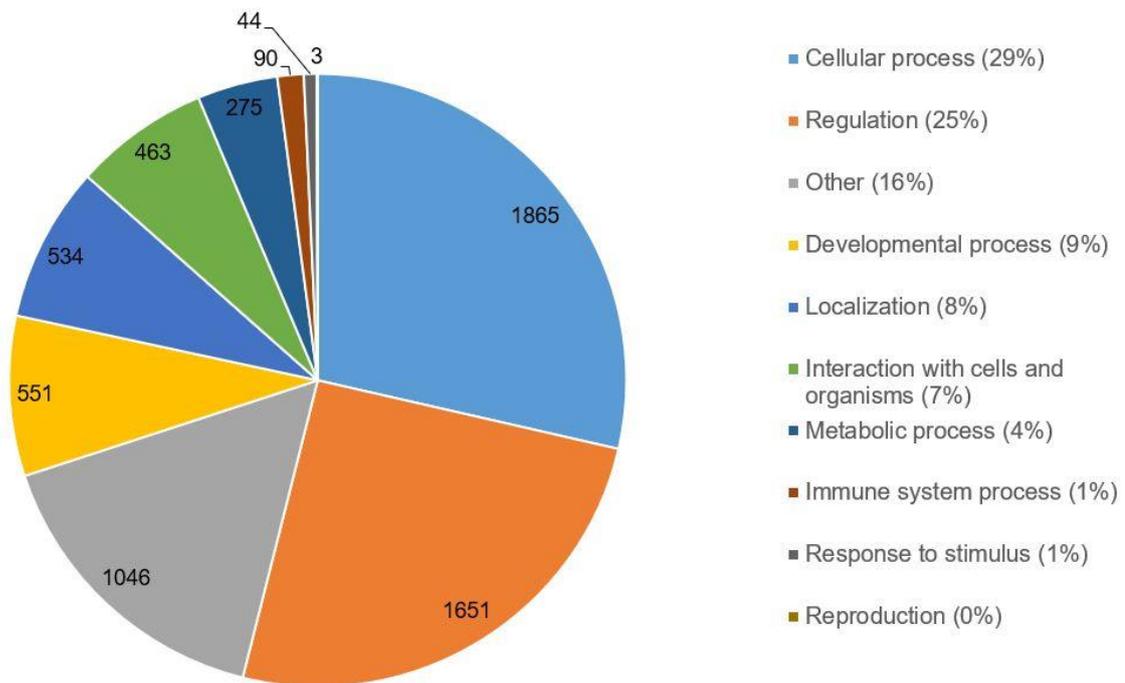


Abbildung 16: STRAP-Auswertung Biological Process
 n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019

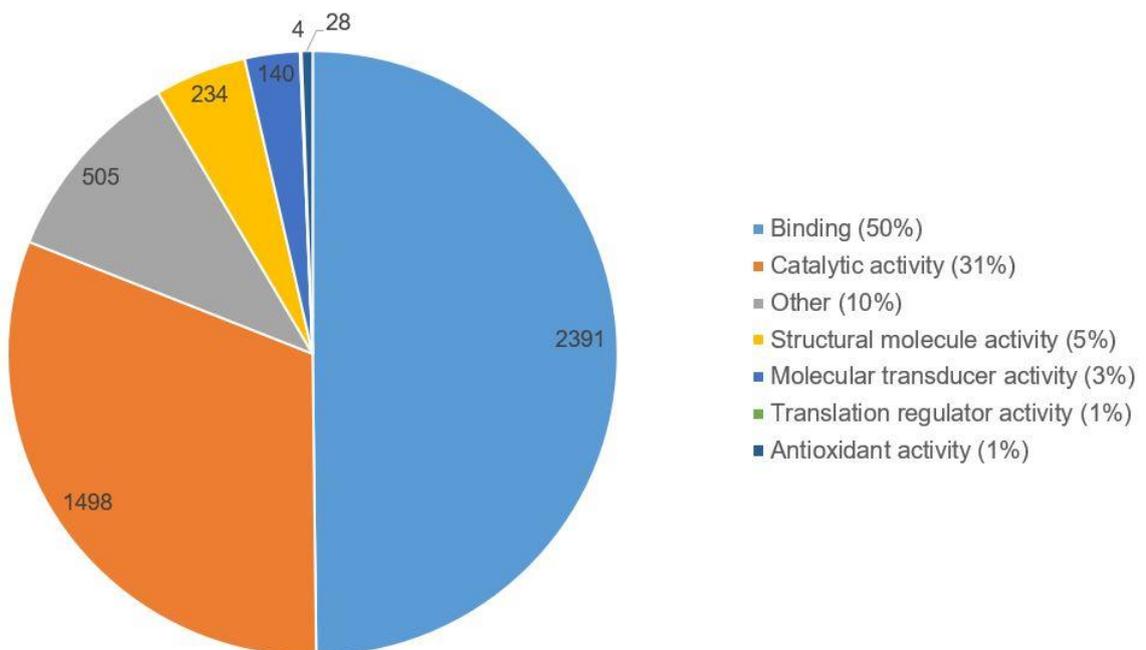


Abbildung 17: STRAP-Auswertung Molecular Function
 n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019

3 Ergebnisse

Die dargestellte Verteilung der durch unsere Methodik identifizierten Peptide auf unterschiedliche Kompartimente ist ebenfalls mit bereits publizierten Daten vereinbar (20) (**Abbildung 18**).

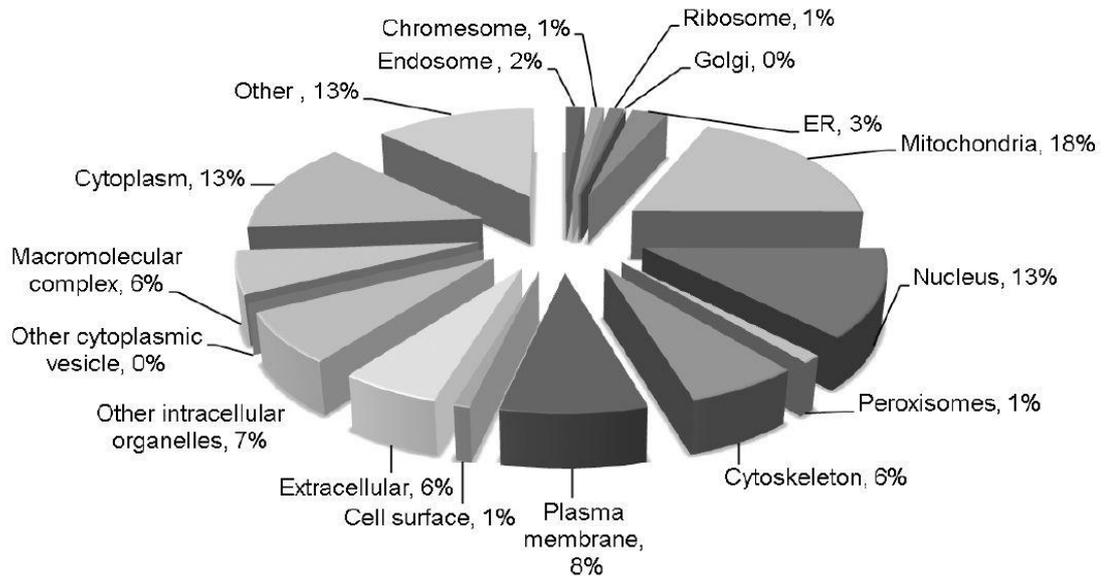


Abbildung 18: Kompartiment-Zugehörigkeit der (20) in identifizierten Proteine
Mit freundlicher Genehmigung von Mark E. McComb, Boston University School of Medicine.

3.2 Deskription des Datensatzes

Im Folgenden soll der Datensatz quantitativ beschrieben werden: ich habe die Oxidationsniveaus aller Peptide bestimmter Gruppen miteinander verglichen, um Unterschiede in Genotyp, bzw. Behandlung festzustellen.

Die Verteilung der Oxidationsniveaus zeigt, dass sich der Großteil im Bereich zwischen 15 und 55 Prozent befindet, was mit dem Mittelwert korreliert. Es finden sich Peaks bei 0 bis 5 Prozent, sowie bei 95 bis 100 Prozent (**Abbildung 19**).

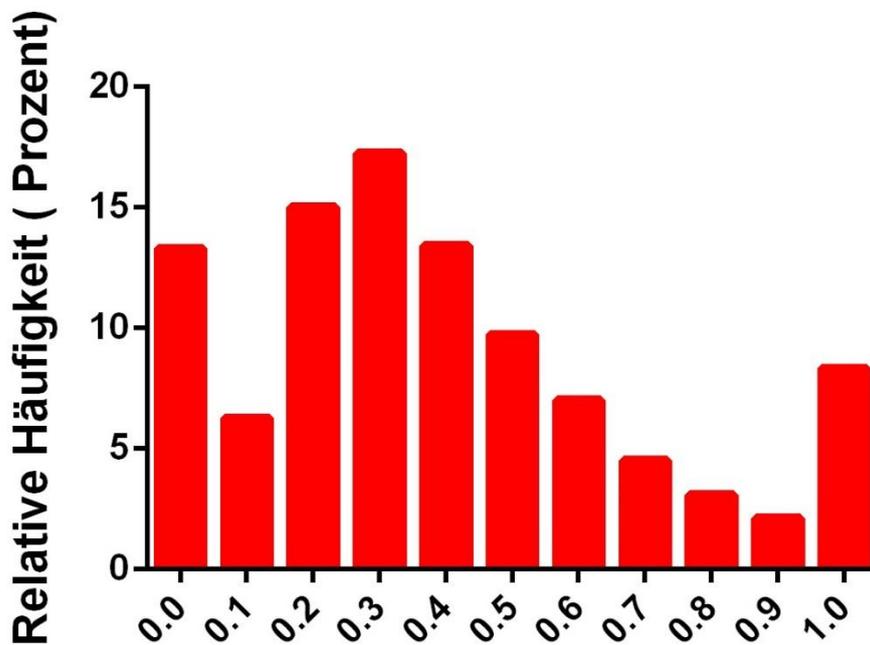


Abbildung 19: Relative Häufigkeit der Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide
Gesamtzahl aller identifizierten Peptide=194.800

3 Ergebnisse

Verglichen wurden die Oxidationsniveaus abhängig vom Genotyp und von der Art der Behandlung. Hierbei unterschieden sich im Oxidationsniveau ausschließlich NNT-Knockout (--)- und Reexpressionsgruppe (++) (Abbildungen 20 und 21).

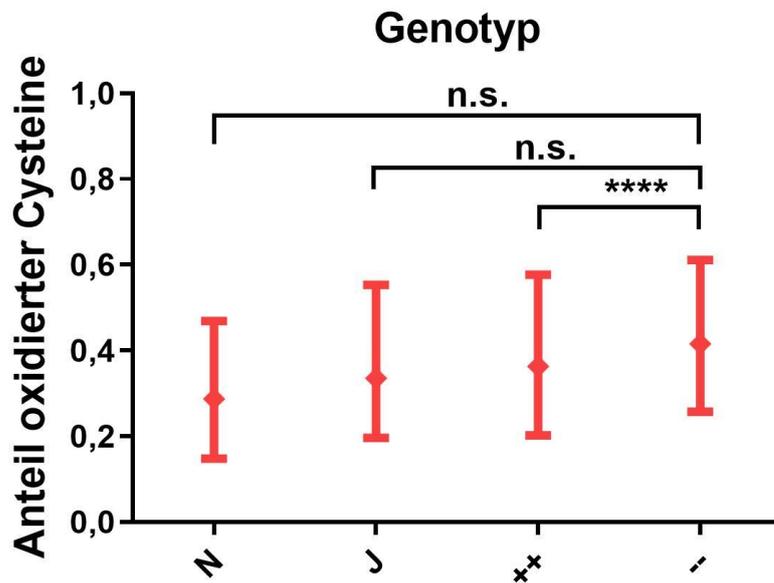


Abbildung 20: Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide, aufgeschlüsselt nach den Genotypen; n=88; Gesamtzahl der Peptide=194.800; ****= $p < 0.001$ (Wilcoxon-Test), n.s. = nicht signifikant

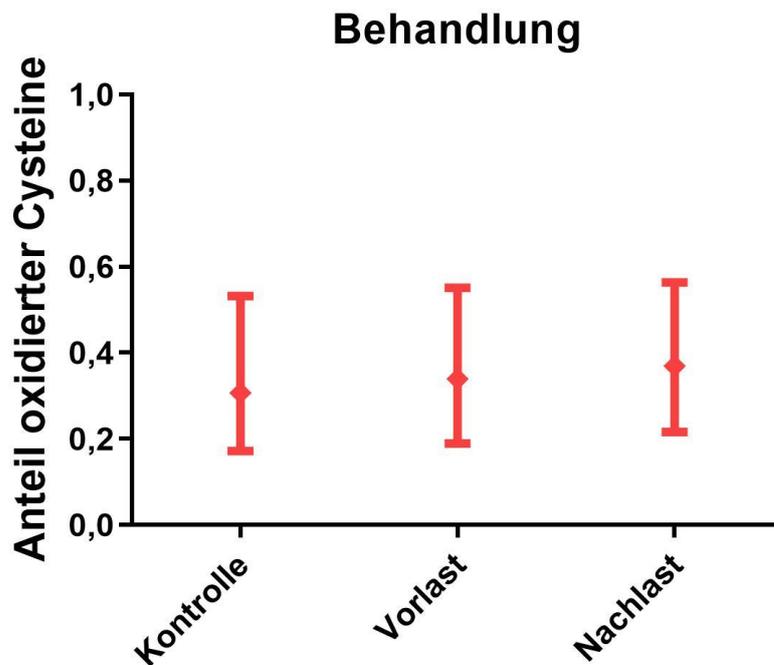


Abbildung 21: Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide, aufgeschlüsselt nach der Art der Behandlung; n=88; Gesamtzahl der Peptide=194.800

3 Ergebnisse

Die Behandlung allein ergab keinen generellen Unterschied im Oxidationsniveau (Abbildung 22 bis 25).

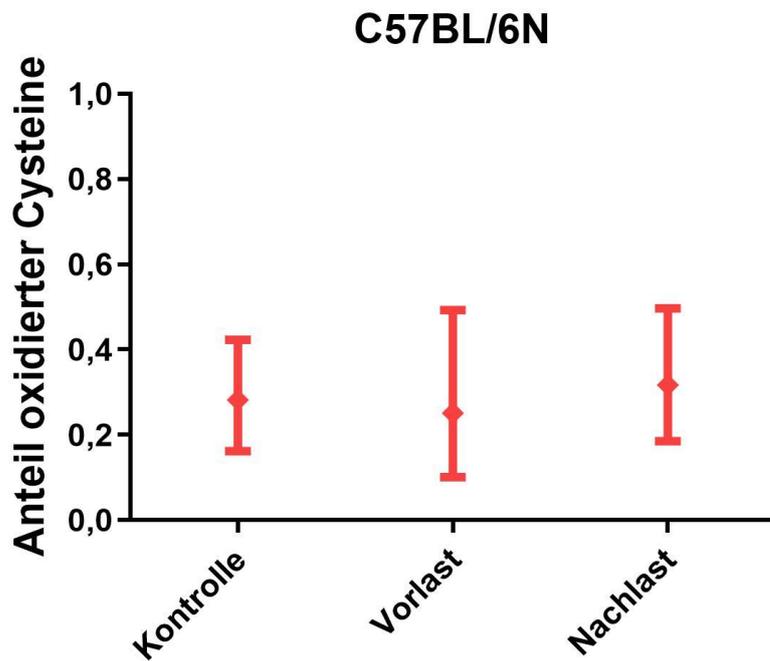


Abbildung 22: Oxidationsniveaus aller in BL/6N-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=26, Gesamtzahl der Peptide=59.927

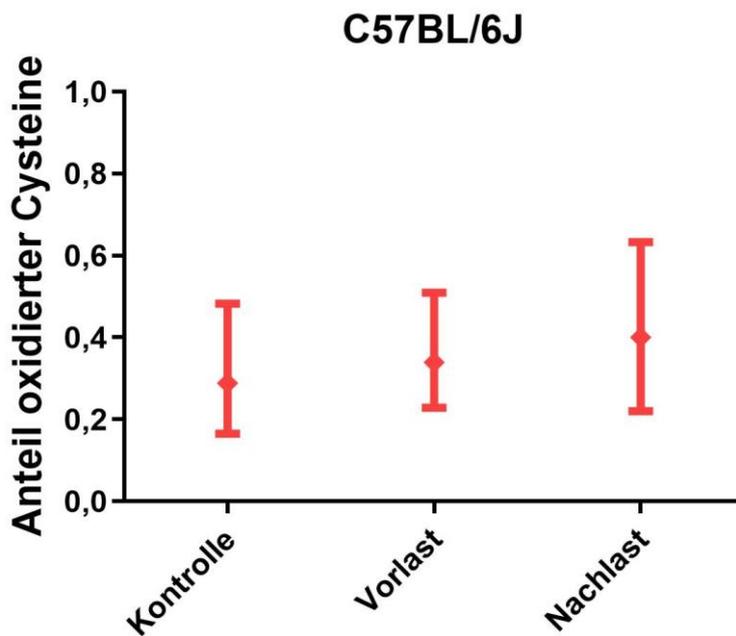


Abbildung 23: Oxidationsniveaus aller in BL/6J-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=28, Gesamtzahl der Peptide=64.430

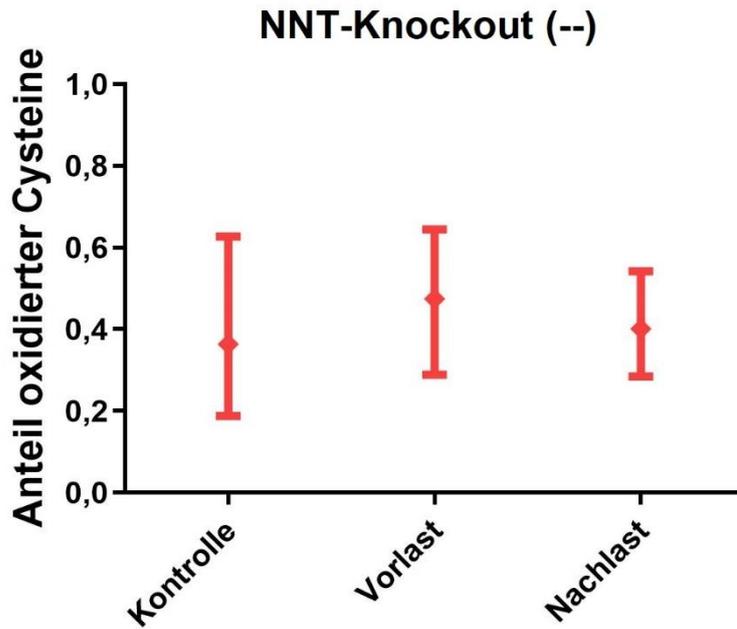


Abbildung 24: Oxidationsniveaus aller in Knockout-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=19, Gesamtzahl der Peptide=38.611

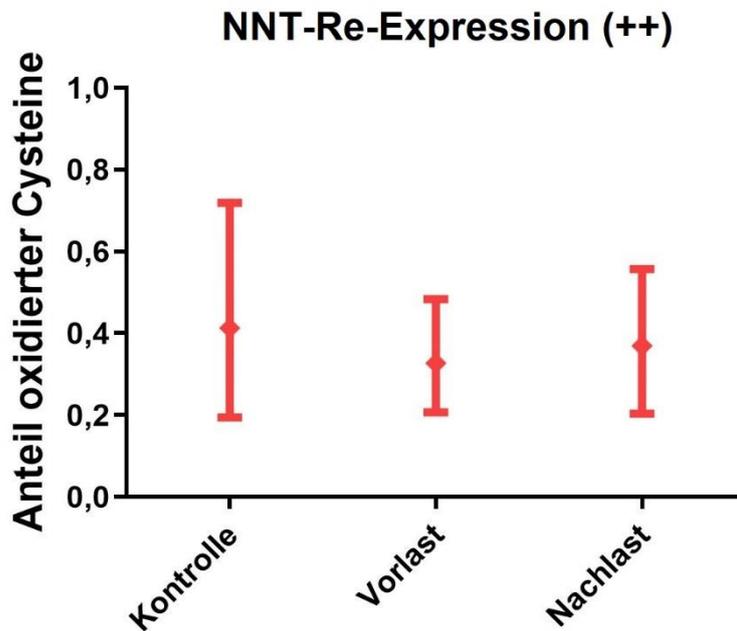


Abbildung 25: Oxidationsniveaus aller in Re-Expressions-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=15, Gesamtzahl der Peptide=31.842

3 Ergebnisse

Zusammenfassend konnten Unterschiede der Oxidationsniveaus nur im Vergleich von Knockout- und Reexpressionsgruppe ermittelt werden.

3.3 Ergebnisse der Spektrenanalyse

Die Identifizierung redox-sensibler Thiol-Switches, die die Anpassung der Herzmuskelzellen vermitteln, war zentraler Teil meiner Arbeit. Die folgenden Tabellen sollen zeigen, wie viele Peptide durch unsere Prüfkriterien in die Analyse eingeschlossen und wie viele der analysierten Peptide von uns letztendlich als valide betrachtet wurden. Insgesamt konnten wir 88 der 91 Versuchstiere in die Analyse einschließen. Drei Individuen zeigten eine fast komplette Oxidation der Peptide, so dass von einem mangelhaften Labeling auszugehen war.

Tabelle 2 zeigt die zu überprüfenden Peptide des ursprünglichen Ansatzes. Insgesamt wurden 663 Peptide durch unsere ursprünglichen Prüfkriterien (Signifikanz der Mittelwert-Unterschiede $<0,05$ oder Differenz der Mittelwerte mehr als 20%) in die Spektren-Analyse eingeschlossen und händisch überprüft.

	Vorlast versus Kontrolle	Vorlast versus Nachlast
BL/6N	35	155
BL/6J	30	39
NNT-Knockout (--)	63	108
NNT-Re-Expression (++)	182	51

Tabelle 2: Eingeschlossene Peptide des ursprünglichen Ansatzes

Bei Auswertung der Spektren mussten wir feststellen, dass bei vielen überprüften Peptiden die dazugehörigen Spektren durch beispielsweise Überlagerung mit Peaks anderer Peptide nicht eindeutig waren und deshalb von uns verworfen wurden. Wir entschlossen uns deshalb, die Prüfkriterien enger zu setzen, was zu einer deutlichen Reduktion der Peptide führte. Ein Teil der Peptide hat mehr als eine Thiol-Gruppe. Dies hatte zur Folge, dass sich im Massenspektrum nicht nur zwei Peaks (einer für reduzierte und einer für oxidierte), sondern drei oder mehr zeigten. Eine Auswertung der Peptide mit mehr als einer Thiol-Gruppe war uns nicht möglich, weshalb wir diese Peptide aus der Analyse ausschlossen.

3 Ergebnisse

Tabelle 3 zeigt die zu überprüfenden Peptide des neuen Ansatzes mit engeren Prüfkriterien (Signifikanz der Mittelwert-Unterschiede $<0,05$ **und** Differenz der Mittelwerte mehr als 20%), insgesamt 67 Peptide.

	Vorlast versus Kontrolle	Vorlast versus Nachlast
BL/6N	7	12
BL/6J	4	3
NNT-Knockout (--)	10	12
NNT-Re-Expression (++)	13	6

Tabelle 3: Eingeschlossene Peptide des neuen Ansatzes

Des Weiteren führten wir einen Vergleich von Knockout- und Re-Expressions-Tieren in den Behandlungen Vorlast und Kontrolle durch. **Tabelle 4** zeigt die zu überprüfenden Peptide dieser beiden Vergleiche.

	Kontrolle	Vorlast
NNT-Knockout (--) gegen	4	33
Re-Expression (++)		

Tabelle 4: Eingeschlossene Peptide aus dem Vergleich von (--)- und (++)-Tieren

Nach Heraussuchen und Analyse der Spektren konnten wir von in Tabelle 3 und 4 gelisteten Peptiden insgesamt **24** als valide betrachten. **Tabelle 5** zeigt die Verteilung der validen Peptide auf die unterschiedlichen Genotypen und Vergleiche.

	Vorlast versus Kontrolle	Vorlast versus Nachlast
BL/6N	2	1
BL/6J	0	1
NNT-Knockout (--)	7	3
NNT-Re-Expression (++)	2	2

Tabelle 5: Nach Spektrenanalyse valide Peptide

Zusätzlich konnten wir aus dem Vergleich von NNT-Knockout- gegen Re-Expressions- Individuen in der Vorlast-Gruppe **fünf** Peptide und in der Kontroll-Gruppe **ein** Peptid als valide betrachten.

Die validen Peptide sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Gruppe	Proteinname	Uniprot-ID	Funktion	P-Value	Diff.	Sequenz
N-Vorlast-Kontrolle	Titin	A2ASS6	Actin filament binding	0,008	-0,373	ATNDAGSALCTSSIVIKEPK
	Haloaciddehalogenase-likehydroxylasedomain-containingprotein2	Q3UGR5	Enzyme binding	0,030	0,228	AADEEKINPPPYLTCESFPH AVDHILQHLL
(++)-Vorlast-Kontrolle	Trifunctional enzyme subunit alpha	Q8BMS1	Fatty acid beta-oxidation	0,021	-0,321	CLAPMMSEVMR
	Ryanodinerceptor2	F6U7V1	Calcium ion transport	0,036	-0,262	LYSAVCALGNHR
(--)-Vorlast-Kontrolle	Striatedmuscle-specificserine/threonine-protein kinase	A0A087WSE3	Protein phosphorylation	0,031	0,210	LSTAKDELTC SAR
	Histidinetriadnucleotide-bindingprotein1	P70349	Regulation of transcription, DNA-templated	0,036	0,213	KCAADLGLKR
	Eukaryotictranslation initiationfactor5A	A0A0A0MQM0	Translational frameshifting	0,045	0,221	GRPCKIVEMSTSK
	Adenylosuccinate synthetaseisozyme	P28650	Purine nucleotide metabolic process	0,037	0,231	CQGGNNAGHTVVVDGKEYDFHLLP SGIINTK
	Cofilin	P45591	Actin filament binding	0,033	0,245	QILVGDIGD TVEDPYTSFVKLLPLNDCR
	Sepiapterinreductase	G3UXX3	Tetrahydrobiopterin biosynthetic process	0,009	0,388	LKSDGALVDCG TSAQK
	39SribosomalproteinL3	Q99N95	Translation	0,031	0,441	IKDSTLPAYKDSCK

Tabelle 6: Identifizierte und für valide befundene Peptide der Vorlast-Kontrolle-Vergleiche

Gruppe	Proteinname	Uniprot-ID	Funktion	P-Value	Diff.	Sequenz
N-Vorlast-Nachlast	NADH-ubiquinoneoxidoreductase	Q91VD9	ATP metabolic process	0,048	0,273	MLFLLGADGGCITR
	Methionine--tRNA ligase	Q68FL6	Methionyl-tRNA aminoacylation	0,022	0,214	ILATSFICTLPAGHR
(++)-Vorlast-Nachlast	Stress-70protein	P38647	Protein folding	0,028	0,220	GAVVGDIDLGTNSCVAVMEGKQAK
	Mitochondrialcarnitine/acylcarnitinecarrierprotein	Q9ZZZ6	Mitochondrial transport	0,018	0,230	ADEPKPISPFKNLLAGGFGG MCLVFVGHPLDVTVK
(--)-Vorlast-Nachlast	Elongationfactor2	P58252	Translational elongation	0,025	-0,362	LMEPIYLVEIQPEQVVGGIYG VLNRK
	CreatinekinaseS-type	Q6P8I7	Phosphocreatine metabolic process	0,010	-0,270	LGYILTSPSNLGTGLR
(++)-(--)-Kontrolle	Nucleolarprotein3	Q9D1X0	Apoptosis repressor	0,044	-0,201	LLLLVQSKGEAACQELLR
	T-complexprotein 1subunitbeta	P80314	Protein folding chaperone	0,039	-0,470	LALVTGGEIASTFDHPELVKLGSKC
(++)-(--)-Vorlast	Long-chain-specificacyl-CoAdehydrogenase, mitochondrial	A0A0R4J083	fatty-acyl-CoA binding	0,039	0,201	AFVDSCLQLHETK
	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Q8BWT1	fatty acid beta-oxidation	0,048	0,202	RGGKYAVGSACIGGGQGIALLIQNTA
(++)-(--)-Kontrolle	Mitochondrialcarnitine/acylcarnitinecarrierprotein	Q9ZZZ6	Acyl carnitine transmembrane transporter activity	0,037	0,207	ADEPKPISPFKNLLAGGFG GMCLVFVGHPLDVTVK
	Catalase	P24270	antioxidant activity	0,041	0,261	SALEHSVQCAVDVK
(++)-(--)-Kontrolle	S-formylglutathionehydrolyase	H3BJP2	formaldehyde catabolic process	0,012	0,304	VFEHSSVELKCK

Tabelle 7: Identifizierte und für valide befundene Peptide aus den Vergleichen Vorlast-Nachlast und NNT-Knockout-Reexpression

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

Die bisher nur in Einzellern (36, 37) verwendete OxICAT-Methode wurde im Rahmen des komplexen Versuchsaufbaus, von dem meine Dissertation einen Teil darstellte, erstmals als Methode des hypothesenfreien, „*untargeted*“ Screening auf regulatorische Thiol-Switches etabliert.

Angesichts eines neuen methodischen Ansatzes wurde zur Validierung der gewählten Protokolle überprüft, ob bekannt unterschiedliche Oxidationsniveaus von spezifischen Enzymen und Organellen auch in unseren Daten reproduziert werden können. Das Lumen des endoplasmatischen Retikulums weist ein hohes H₂O₂-Niveau auf (38), was sich auch in unserem Experiment bestätigt (vgl. Ergebnisse, Abbildung 14 auf Seite 21). Ebenso ließ sich das bekannt deutlich erhöhte (14) Oxidationsniveau der Peroxiredoxine reproduzieren (vgl. Ergebnisse, Abbildung 15 auf Seite 22). Das im Gegensatz zu den anderen Kompartimenten erhöhte Oxidationsniveau in ER-Lumen und mitochondrialem Intermembranraum untermauert die hohe örtliche Auflösung des Redox Signaling (12, 39). Bekannte Verteilungen von Proteinen auf Zell-Kompartimente (20) konnten in unseren Versuchen ebenfalls reproduziert werden (vgl. Ergebnisse, Abbildung 24 auf Seite 28 und **Abbildung 27**).

Ein weiterer Validierungsaspekt ist das erhöhte Oxidationsniveau in Peptiden mit bekannten Disulfidbrücken. Disulfidbrücken werden im Rahmen der Proteinfaltung aus Thiolgruppen durch Oxidation zusammengelagert, weshalb Proteine mit Disulfidbrücken per se höhere Oxidationsniveaus zeigen als Proteine ohne Disulfidbrücken (40). Dies bildete sich als nicht-signifikanter Trend ab (vgl. Ergebnisse, Abbildung 16 auf Seite 26).

Zusammenfassend erscheint der neue methodische Ansatz somit valide.

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

Durch die Kombination aus ICAT-Labeling und Tandem-Massenspektrometrie ergeben sich neue Möglichkeiten in der quantitativen Analyse von Thiol-Switchen im kardialen Gewebe, was die Zusammenschau der bisher publizierten Vorarbeiten zum allgemeinen Screening auf RedOx-Proteomik im kardialen Gewebe zeigt.

Author	Year of Publication	Journal	Used method	Topic	Number of included animals	Identified Cysides
Yao et al. (20)	2015	PlosOne	TMT-Labeling	mCAT (WT vs. TG)	5 vs. 5	2.125
Kiersten et al. (21)	2015	Mol Cell Proteomics	Irreversible Cysteine Modifications	Ischemia/ Reperfusion/ Langendorff Mouse	3 per Group	181
Menazza et al. (22)	2015	J Am Heart Association	Ox-RAC	DCM Human	11 vs. 6	Various Experiments
Pan et al. (23)	2014	Antioxid Redox Signaling	TMT-Labeling	GSNO Treatment/cell culture +- Hypoxia	Cell culture	Various Experiments
Kumar et al. (24)	2013	Free Radic Biol Med	ICAT (NOT OxICAT)	Ischemia/ Reperfusion/ Langendorff Mouse	3 Groups (3 in each Group)	280
Martinez-Acedo et al. (25)	2012	Mol Cell Proteomics	GELSILOX/ Stable Isotope Labeling	Ischemia/ Reperfusion	Isolated Mitochondria	388
Kohr et al. (26)	2011	Circ Res	Resin-assisted Capture (Ox-RAC) à detection of ox. and S-nitrosylation	Ischemia/ Reperfusion/ Langendorff	5 per group	~31

Tabelle 8: Überblick über Vorarbeiten mit dem Ansatz des allgemeinen Screenings auf RedOx-Proteomik in kardialen Gewebe

Während Vorarbeiten mit deutlichen kleineren Zahlen an Individuen arbeiteten und dabei meist nur einige hunderte bis wenige tausende Peptide identifizieren konnten, ergab der Ansatz unseres Versuchsprotokolls mit 91 Versuchstieren eine Gesamtzahl von 211.327

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

identifizierten Peptiden. Diese enorm größere Zahl verdeutlicht, dass die OxICAT-Methode den Einblick in das RedOx-Proteom des Herzmuskels deutlich vergrößert hat.

Durch den Versuchsaufbau wurden keine vollständigen Proteine identifiziert, sondern lediglich Peptide, also Teilstücke der Proteine, die diesen aufgrund ihrer Sequenz zugeordnet werden konnten. Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur von Peptiden die Rede sein. Die validen Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch unsere Versuchsanordnung identifizieren werden konnten, stellen erst den Beginn einer Reihe von weiteren Analysen dar. Die Sequenzierung von Genomen schreitet in der Wissenschaft wesentlich schneller voran, als die Erkenntnis über Funktion und Bedeutung der sequenzierten Proteine (41).

Eine Übersicht der bestehenden Erkenntnisse über von uns für valide befundenen Peptide soll im Folgenden geliefert werden (vgl. Ergebnisse, Tabellen 6 und 7 auf Seiten 33 und 34).

Titin ist das größte aller bekannten Proteine bei Säugetieren, seine Größe reicht von 2970 bis 3700kDa. Es fungiert als Strukturprotein und ist sowohl im Herzmuskel-, als auch im Skelettmuskel zu finden. Aufgrund seiner Größe ist es ein leichtes Ziel möglicher Zellschädigungen, wie Proteolyse oder Oxidation durch freie Radikale (42). Eine Schädigung von *Titin* in Herzmuskelzellen durch Chemotherapeutika wie Anthrazykline ist schon lange bekannt und die Kardiotoxizität stellt eine wichtige Nebenwirkung in der Behandlung mit diesen Medikamenten dar (43). Das in der Knockout-Vorlast-Kontroll-Gruppe gefundene Peptid *Cofilin-2* ist wie *Titin* in Muskel- und Herzmuskelzellen zu finden und an der Kontraktion der Zelle beteiligt (44). Vorarbeiten legen nahe, dass sich *Titin* bei erhöhter kardialer Belastung anpasst und sich andere Isoformen des Proteins bilden. Die Zusammenschau mit der Identifizierung von *Titin* und *Cofilin-2* in unserem Versuchsaufbau lässt vermuten, dass die Proteine auch in der mechanischen Signaltransduktion eine Rolle spielen (42, 45). Das verwandte Protein *Cofilin-1* konnte bereits von Martinez et al. in ihrer Arbeit zum Screening auf regulatorische Thiol-Switche in humanem und bovinem Herzgewebe identifiziert werden (25).

Einige gefundene Peptide sind am Energiemetabolismus der Herzmuskelzelle beteiligt: In der Knockout-Reexpression-Vorlast-Gruppe haben wir die Peptide *mitochondriale long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (LCAD)* und *mitochondriale 3-ketoacyl-CoA thiolase (KT)* identifiziert. Die *LCAD* fügt im ersten Schritt der β -Oxidation eine

Doppelbindung in die Fettsäure ein. Die KT gehört zum *trifunktionalen Enzym* und spaltet im letzten Schritt Acetyl-CoA von der Fettsäure ab (46). LCAD wurde in den Arbeiten von Kumar et al. und Paulech et al., *mitochondriale long-chain specific acyl-CoA Dehydrogenasen* bereits von Martinez et al. und Paulech et al. beschrieben (21, 24, 25).

Das *mitochondriale trifunktionale Enzym*, das wir in der Reexpression-Vorlast-Kontroll-Gruppe gefunden haben, katalysiert drei von vier Schritten der β -Oxidation von Fettsäuren im Mitochondrium. Dabei werden die Fettsäuren in mehreren Runden solange verkürzt, bis Acetyl-CoA oder beim Abbau ungeradzahligter Fettsäuren Propionyl-CoA übrigbleibt. Pro Runde liefert die β -Oxidation ein Acetyl-CoA und je ein Molekül Dihydro-Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) und NADH. Die mehr als 60 bekannten Mutationen der Untereinheiten des Enzyms können zu u.a. zu Kardiomyopathie und Retinopathie führen (47).

Das *mitochondriale carnitine/acylcarnitine carrier protein* konnten wir sowohl in der Reexpression-Vorlast-Nachlast-Gruppe als auch im Knockout-Reexpression-Vorlast-Vergleich identifizieren. Es transportiert Carnitin aus, bzw. Acyl-Carnitin in das Mitochondrium, wo die β -Oxidation des letzterem nach der Abspaltung des Acylrestes beginnen kann (48). Es wurde bereits von Paulech et al. beschrieben (21). Auch die in der BL/6N-Vorlast-Nachlast-Gruppe gefundene *NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase*, die zum Komplex I der mitochondrialen Atmungskette gehört, ist maßgeblich an der ATP-Gewinnung der Zelle beteiligt. Durch die Oxidation von NADH gelangen Protonen in den mitochondrialen Intermembranraum und liefern den Protonengradienten für die ATP-Synthese durch Komplex V (49). Dieses Peptid wurde bereits von Menazza et al., Paulech et al. und Martinez et al. im Rahmen der Suche nach regulatorischen Thiol-Switchen in kardialen Gewebe beschrieben (21, 22, 25).

Creatine kinase S-type, mitochondrial aus der Knockout-Vorlast-Nachlast-Gruppe gehört zu den Kreatinkinasen, die durch die Übertragung einer Phosphatgruppe von Phosphokreatin auf ADP ATP bereitstellen können (50). Wie Titin stellen auch die Isoenzyme der Kreatinkinasen ein mögliches Ziel von reaktiver Sauerstoffspezies dar und Anthrazykline können über die Schädigung von Kreatinkinasen eine Kardiomyopathie begünstigen (51). *Creatine kinase S-type, mitochondrial* wurde ebenfalls bereits von Martinez et al. und Paulech et al. beschrieben (21, 25).

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

Adenylosuccinate synthase isoenzyme 1 aus der Knockout-Vorlast-Kontroll-Gruppe katalysiert den ersten Schritt der de novo-Synthese von Adenosinmonophosphat (AMP) aus Inosinmonophosphat (IMP). In Vertebraten ist es außerdem am Purin-Nukleotid-Zyklus beteiligt, der bei erhöhtem ATP-Verbrauch in drei katalysierten Reaktionen Fumarat aus AMP gewinnt, das dem Citratzyklus zur Regeneration von ATP dient (52, 53).

Bei allen Peptiden war das Oxidationsniveau gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöht oder erniedrigt. Da die Proteine am Energiemetabolismus der Herzmuskelzelle beteiligt sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivität der Enzyme bei Erhöhung der Belastung hochreguliert wurden, möglicherweise dem Grundgedanken der Versuchsanordnung folgend mittels Thiol-Switches.

Der *Ryanodin-Rezeptor*, den wir in der Reexpression-Vorlast-Kontroll-Gruppe identifizieren konnten, sorgt für den Ca^{2+} -Einstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in die Zelle bei Eintreffen von Aktionspotentialen. Erhöhte Phosphorylierung der Rezeptoren, beispielsweise durch eine *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase, (CaMKII)* wurden bei Versuchen mit Vor- und Nachlasterhöhungen (54) und bei Erkrankungen wie dem Vorhofflimmern und der linksventrikulären Dysfunktion im Rahmen einer Herzinsuffizienz entdeckt, und die Inhibierung dieser Kinase könnte mögliche Behandlungsoptionen dieser Erkrankungen bieten (55, 56).

Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), ein Peptid, das im Zytoplasma und im Zellkern vorkommt, konnten wir in der Reexpressions-Vorlast-Kontroll-Gruppe ausfindig machen. EIF5A ist nicht nur an der Initiierung der Translation beteiligt; Untersuchungen legen nahe, dass eIF5A auch als Regulator an der p53-abhängigen Apoptose beteiligt ist (57). Ein weiterer Apoptose-Faktor ist das *Nucleolar protein 3* aus der Reexpressions-Vorlast-Nachlast-Gruppe. Dieses Protein gehört zum sogenannten *Apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC)*, das vor allem in Herz, Skelettmuskel und Gehirn zu finden ist (58). ARC konnte als kardioprotektiver Faktor identifiziert werden, indem es bei erhöhter Volumenbelastung das Auftreten einer dilatativen Kardiomyopathie verzögert (59). Drei weitere zur Proteinbiosynthese gehörende Proteine konnten identifiziert werden: *Mitochondrial 39S ribosomal protein L3* aus der Reexpression-Vorlast-Kontroll-Gruppe ist ein Protein der großen Untereinheit der mitochondrialen 55S-Ribosomen. Diese Ribosomen synthetisieren einige mitochondriale Proteine. Eine Mutation des für dieses Protein

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

codierende Gen *MRPL3* wurde in Verbindung mit dem Auftreten einer Kardiomyopathie gebracht (60). *Cytoplasmic Methionine-tRNA ligase* ist eine cytosolische tRNA-Synthase, die wir in der J-Vorlast-Nachlast-Gruppe identifizieren konnten. Dieses Protein katalysiert eine Reaktion, in der eine tRNA unter ATP-Verbrauch mit L-Methionin beladen wird. Die entstandene Methionin-tRNA steht anschließend der Translation zur Verfügung (61). Der *Elongationfactor 2 (EEF2)* aus der Knockout-Vorlast-Nachlast-Gruppe katalysiert eine Reaktion der ribosomalen Translokation während der translationalen Elongation. In Versuchen konnte durch Zugabe des Oxidationsmittels Cumolhydroperoxid und damit verbundener Erhöhung des oxidativen Stresses eine Inhibierung der Proteinsynthese durch Änderung im Elongationsschritt, an dem EEF2 beteiligt ist, erreicht werden (62). Verschiedene Elongationsfaktoren wurden bereits in (22), (24) und (25) beschrieben.

In der Reexpressions-Knockout-Kontroll-Gruppe konnte das Peptid *T-complex protein 1 subunit beta* identifiziert werden, das zum *chaperon-containing T-complex (TRiC)* gehört. TRiC ist ein Chaperon-Komplex, der an der Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt ist (63). *S-formylglutathione hydrolase* ist am Abbau von Formaldehyd beteiligt (64). *Sepiapterin-Reduktase* katalysiert eine Reduktion in der Biosynthese der Pterine, die das Grundgerüst für einige Vitamine und Cofaktoren bilden (65). *Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase* ist eine Kinase, die OH-Gruppen von Serin oder Threonin phosphoryliert, speziell in quergestreifter Muskulatur (66). Das Peptid *Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2* aus der N-Vorlast-Kontroll-Gruppe gehört zur Gruppe der Haloacid-Dehydrogenasen-Familie (HAD), die eine Reihe von Phosphatasen, Phosphonatasen, P-Typ-ATPasen, Dehalogenasen und andere Proteine enthält (67).

Catalase, ein Peptid, das wir in der Knockout-Reexpression-Vorlast-Gruppe identifizieren konnten, katalysiert die Detoxifikation von H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Dabei wird das Enzym reduziert und kann unter NADPH-Verbrauch wieder oxidiert werden. Katalasen finden sich in nahezu allen Zellen, beim Menschen vor allem in den Peroxisomen der Leber und der Nieren und in den Erythrozyten (68, 69).

Ein Knockout des HSPA9-Gens, zu dem das in der Reexpressions-Vorlast-Nachlast-Gruppe gefundene *mitochondriale Stress-70 Protein* gehört, führte in Versuchen zu einer Verminderung der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, was mit einem vermehrten Auftreten des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) assoziiert werden konnte (70).

4 Diskussion – Stärken und Schwächen des Versuchsaufbaus

In der vorliegenden Arbeit wurde der Weg der händischen Validierung der Spektren gewählt. Hierbei war eine Sensitivitätsanalyse beabsichtigt: es fanden rigorose Hürden zur Validierung Anwendung, insofern die Unterschiede in der Peak-Höhe mit menschlichem Auge unmittelbar nachvollziehbar sein mussten.

MaxQuant führt selbst nicht nur die Identifizierung, sondern auch die Quantifizierung der gefundenen Peaks durch und gibt die Ergebnisse in Form großer Excel-Tabellen aus (71). Hierbei errechnet es unter anderem das Verhältnis der – vom Programm als light und heavy-gelabelten erkannten - Peaks aus. Die Software legt eine Gaußsche Normalverteilungskurve über die detektierten Peaks und erzeugt so in Relation zum Masse/Ladungs-Verhältnis dreidimensionale Kurven. Eigentlich dürfte ein Peak kaum Fläche haben, weil Atomgewichte nicht schwanken. Durch Messungenauigkeiten schwanken die Peaks dennoch, wodurch MaxQuant die Fläche unter der Kurve bestimmen kann. Diese Methodik wurde bisher nur für konventionelle ICAT-Experimente entwickelt und angewandt (72) und ergab, wie bereits vor der Analyse angenommen, sehr viele falsch-positive Treffer.

Falsch-negative Peptide wurden im Übrigen im Rahmen der Arbeit nicht berücksichtigt, denn dafür hätten mehrere Tausend Peptide händisch validiert werden müssen, was den Umfang der Dissertation bei weitem überstiegen hätte.

Insofern mag der im Rahmen dieser Arbeit angewandte händische Algorithmus eine niedrigere Sensitivität aufweisen, bietet aber eine sehr hohe Validität, was die Relevanz der gefundenen Ergebnisse hinsichtlich funktioneller Folgeexperimente unterstreicht.

5 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen sowohl in der Pathogenese vieler Krankheiten (11, 13), als auch in der physiologischen Signaltransduktion eine wichtige Rolle (12). Die Oxidation von Thiol-Gruppen, eine posttranslationale Modifikation, konnte in der Signaltransduktion bereits nachgewiesen werden (16). Weil die mitochondriale Transhydrogenase (NNT) einen Einfluss auf die Detoxifikation von ROS hat, wurden für die Versuchsanordnung vier Genotypen von Mäusen gewählt, die alle eine unterschiedliche Ausprägung der NNT-Aktivität aufwiesen. Durch Vor-, respektive Nachlastserhöhung im Working Heart Model, OxICAT-Labeling und Tandem-Massenspektrometrie konnten über 200.000 Peptide mit Thiol-Gruppen identifiziert werden, von denen wir anhand unserer Prüfkriterien 24 Peptide als valide betrachten konnten. Bekannt unterschiedliche Oxidationsniveaus, sowie bereits publizierte Zugehörigkeiten der Peptide zu zellulären Kompartimenten konnten wir in unseren Ergebnissen reproduzieren (12, 14, 20, 38–40), was die neue Methodik für das Screening auf regulatorische Thiol-Switche im kardialen Gewebe valide erscheinen lässt.

Unter den identifizierten und für valide befundenen Peptiden waren einige aus dem Kreis des kardialen Energiemetabolismus. Auch die Strukturproteine *Titin* und *Cofilin-2*, sowie einige an der Translation/Transkription beteiligte Peptide waren unter den Ergebnissen. Von einigen gefundenen Apoptose-Proteinen wurde das *Nucleolar Protein 3*, das zum ARC gehört, bereits als protektiver Faktor bei Auftreten einer dilatativen Kardiomyopathie identifiziert (58, 59). Unter den Ergebnissen war der *Ryanodin-Rezeptor*, der im Herzen für den Ca^{2+} -Einstrom sorgt und in Verbindung mit Erkrankungen wie dem Vorhofflimmern und der linksventrikulären Dysfunktion bei Herzinsuffizienz gebracht werden konnte (55, 56).

Die weiterführende Analyse der identifizierten Peptide könnte nun mittels *Metabolomics* erfolgen. Dieses Projekt befasst sich mit der gezielten und ungezielten Suche nach sämtlichen Stoffwechselprodukten- und Eigenschaften. Möglicherweise ergibt sich aus der detaillierteren Analyse der validen Proteine eine Art Signalweg, über den die Zelle bei erhöhter Belastung ihre Aktivität mittels Thiol-Switche reguliert (73).

6 Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A

ATP = Adenosintri-phosphat

ADP = Adenosindiphosphat

ROS = Reaktive Sauerstoffspezies

H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

NADH = Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NNT = mitochondriale Transhydrogenase

ICAT = isotope coded affinity tag

m/z = Masse/Ladung

MALDI = Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

TOF = Time-of-flight

MM = mitochondriale Matrix

MOM = äußere mitochondriale Membran

MIM = innere mitochondriale Membran

MIS = mitochondrialer Intermembranraum

kDA = Kilodalton

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektromechanische Kopplung Aktionspotentiale öffnen sarkolemmale Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer quantitativ höheren Ca^{2+} -Freisetzung führt. Durch Bindung des Ca^{2+} an Troponin C kommt es zum Kontraktionszyklus. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und ATPasen (ATP) transportieren Ca^{2+} aus dem Zytosol. *RyR*, *Ryanodinrezeptor*; *PLB*, *Phospholamban* (8). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages. 5

Abbildung 2: Mitochondriale ROS-Balance An der Atmungskette (ETC) werden akzidentiell Elektronen auf Sauerstoff übertragen ($\cdot\text{O}_2^-$), dieses wird über Mangan-abh. Superoxiddismutasen (Mn-SOD) zu H_2O_2 und NADPH-abh. detoxifiziert. NADH wird im Krebs-Zyklus regeneriert und durch die NNT zu NADPH. *GR*, *Glutathion-Reduktase*; *TR*, *Thioredoxin-Reduktase*; *MEP*, *Malatenzym*; *IDH2*, *Isocitrat-Dehydrogenase 2*; *MCU*, *mitochondrialer Calcium-Kanal* (14). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages. 7

Abbildung 3: Die Rolle der NNT bei physiologischer und pathologischer Arbeitslast (14) Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages. 8

Abbildung 4: Modell des Redox-Signaling durch Peroxiredoxine H_2O_2 greift nicht direkt an den redox-sensitiven Proteinen an, sondern über ein Peroxiredoxin (18). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages. 9

Abbildung 5: Darstellung der Vor- und Nachlasterhöhung im Working Heart Model (29) Mit freundlicher Genehmigung der American Society for Clinical Investigation. 11

Abbildung 6: Prinzip der OxICAT-Methode a) Links ein Protein mit reduzierten Thiolgruppen; rechts ein Protein mit einer oxidierten und einer reduzierten Thiol-Gruppe. Nach Denaturierung folgt das Labeling der reduzierten Thiol-Gruppen mit dem light-ICAT (b). Durch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) werden oxidierte Thiol-Gruppen reduziert (c) und anschließend durch Zugabe des heavy-ICAT gelabelt. Vorher reduzierte Thiol-Gruppen sind nun mit dem light-ICAT, während zuvor oxidierte Gruppen mit dem heavy-ICAT gelabelt sind. Die Proteine sind unabhängig ihres vorherigen Oxidationsniveaus chemisch identisch. In der nachfolgenden Massenspektrometrie (MS) zeigen zuvor oxidierte Thiol-Gruppen eine Verschiebung von 9 Dalton im Massenspektrum. *GSNO*, *S-Nitrosoglutathion* (27). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlages. 13

Abbildung 7: Prozess der Auswertung am Beispiel der N-Vorlast-gegen-Kontroll-Tiere . 15

Abbildung 8: Beispielhaftes vollständiges Massenspektrum eines Tieres 17

Abbildung 9: Spektrum für die Identifizierung eines Proteins 18

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 10: Full lock ms-Spektrum zur Quantifizierung eines Proteins	18
Abbildung 11: Spezifisches Spektrum eines Proteins.	19
Abbildung 12: Oxidationsniveau der Cysteine nach zellulärem Kompartiment Gesamtheit der OxiCAT-untersuchten Individuen, n=88; Gesamtsumme identifizierter Peptide=194.800, <i>MM</i> =Mitochondriale Matrix; <i>MOM</i> =äußere mitochondriale Membran; <i>MIM</i> =innere mitochondriale Membran; <i>MIS</i> =mitochondrialer Intermembranraum; <i>ER Lumen</i> =Lumen des endoplasmatischen Retikulums	22
Abbildung 13: Vergleich der Gesamt-Oxidationsniveaus mit denen des ER-Lumen Summe identifizierter Peptide des ER-Lumen=249; Gesamt-Summe identifizierter Peptide=194.551; ****= $p < 0,001$ (Wilcoxon-Test).....	22
Abbildung 14: Vergleich der Gesamt-Oxidationsniveaus mit denen der Peroxiredoxine Summe identifizierter Peroxiredoxine=759; Gesamt-Summe identifizierter Peptide=194.041; ****= $p < 0,001$	23
Abbildung 15: STRAP-Auswertung Cellular Compartment n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019.....	24
Abbildung 16: STRAP-Auswertung Biological Process n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019.....	25
Abbildung 17: STRAP-Auswertung Molecular Function n=91; Gesamtzahl identifizierter Peptide=211.327; rezensierte Proteine der Spezies Mus Musculus=17.019.....	25
Abbildung 18: Kompartiment-Zugehörigkeit der (20) in identifizierten Proteine Mit freundlicher Genehmigung von Mark E. McComb, Boston University School of Medicine.	26
Abbildung 19: Relative Häufigkeit der Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide Gesamtzahl aller identifizierten Peptide=194.800	27
Abbildung 20: Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide, aufgeschlüsselt nach den Genotypen; n=88; Gesamtzahl der Peptide=194.800; ****= $p < 0.001$ (Wilcoxon-Test), n.s. = nicht signifikant.....	28
Abbildung 21: Oxidationsniveaus aller identifizierten Peptide, aufgeschlüsselt nach der Art der Behandlung; n=88; Gesamtzahl der Peptide=194.800.....	28
Abbildung 22: Oxidationsniveaus aller in BL/6N-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=26, Gesamtzahl der Peptide=59.927.....	29
Abbildung 23: Oxidationsniveaus aller in BL/6J-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=28, Gesamtzahl der Peptide=64.430.....	29

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Oxidationsniveaus aller in Knockout-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=19, Gesamtzahl der Peptide=38.611 30

Abbildung 25: Oxidationsniveaus aller in Re-Expressions-Individuen-identifizierten Peptiden, aufgeschlüsselt nach Art der Behandlung; n=15, Gesamtzahl der Peptide=31.842 30

8 Literaturverzeichnis

1. Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(6):e1-82.
2. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG et al. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009; 119(14):1977–2016.
3. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. Pathophysiology. *BMJ* 2000; 320(7228):167–70.
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS et al. 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2016; 69(12):1167.
5. Störk S, Handrock R, Jacob J, Walker J, Calado F, Lahoz R et al. Epidemiology of heart failure in Germany: A retrospective database study. *Clin Res Cardiol* 2017; 106(11):913–22.
6. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007; 93(9):1137–46.
7. Pape H-C, Klinke R, Brenner B, Silbernagl S, editors. *Physiologie*. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-98019>.
8. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868):198–205.
9. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.

10. Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: Role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(10):1259–71.
11. Dietl A, Maack C. Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 2017; 14(4):338–49.
12. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res* 2015; 116(3):531–49.
13. Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(9):1063–77.
14. Nickel AG, Hardenberg A von, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J et al. Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metab* 2015; 22(3):472–84.
15. Krumova K, Cosa G. Chapter 1 Overview of Reactive Oxygen Species. In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1: The Royal Society of Chemistry*; 2016. p. 1–21.
16. Antelmann H, Hellmann JD. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(6):1049–63.
17. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(5):549–61.
18. Sobotta MC, Liou W, Stöcker S, Talwar D, Oehler M, Ruppert T et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol* 2015; 11(1):64–70.
19. Leichert LI, Dick TP. Incidence and physiological relevance of protein thiol switches. *Biol Chem* 2015; 396(5):389–99.
20. Yao C, Behring JB, Di Shao, Sverdlov AL, Whelan SA, Elezaby A et al. Overexpression of Catalase Diminishes Oxidative Cysteine Modifications of Cardiac Proteins. *PLoS ONE* 2015; 10(12):e0144025.
21. Paulech J, Liddy KA, Engholm-Keller K, White MY, Cordwell SJ. Global analysis of myocardial peptides containing cysteines with irreversible sulfinic and sulfonic acid post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14(3):609–20.

22. Menazza S, Aponte A, Sun J, Gucek M, Steenbergen C, Murphy E. Molecular Signature of Nitroso-Redox Balance in Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. *J Am Heart Assoc* 2015; 4(9):e002251.
23. Pan K-T, Chen Y-Y, Pu T-H, Chao Y-S, Yang C-Y, Bomgarden RD et al. Mass spectrometry-based quantitative proteomics for dissecting multiplexed redox cysteine modifications in nitric oxide-protected cardiomyocyte under hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(9):1365–81.
24. Kumar V, Kleffmann T, Hampton MB, Cannell MB, Winterbourn CC. Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using ICAT reagents and mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2013; 58:109–17.
25. Martínez-Acedo P, Núñez E, Gómez FJS, Moreno M, Ramos E, Izquierdo-Álvarez A et al. A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(9):800–13.
26. Kohr MJ, Sun J, Aponte A, Wang G, Gucek M, Murphy E et al. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia/reperfusion injury with resin-assisted capture. *Circ Res* 2011; 108(4):418–26.
27. Lindemann C, Leichert LI. Quantitative redox proteomics: The NOxICAT method. *Methods Mol Biol* 2012; 893:387–403.
28. Reil J-C, Hohl M, Oberhofer M, Kazakov A, Kaestner L, Mueller P et al. Cardiac Rac1 overexpression in mice creates a substrate for atrial arrhythmias characterized by structural remodelling. *Cardiovasc Res* 2010; 87(3):485–93.
29. Hohl M, Wagner M, Reil J-C, Müller S-A, Tauchnitz M, Zimmer AM et al. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *J Clin Invest* 2013; 123(3):1359–70.
30. Downard K. *Mass Spectrometry: A Foundation Course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2004. Available from: URL: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=1185692>.
31. Gogichaeva NV, Williams T, Alterman MA. MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007; 18(2):279–84.

32. UniProt Consortium T. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(5):2699.
33. Hesse M, Meier H, Zeeh B, Bienz S, Bigler L, Fox T. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 9., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2016. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1055/b-004-129729>.
34. University of California, San Francisco. MS-Digest [cited 2018 Jul 27]. Available from: URL: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>.
35. Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Software tool for researching annotations of proteins: Open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem* 2009; 81(23):9819–23.
36. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(24):8197–202.
37. Brandes N, Reichmann D, Tienson H, Leichert LI, Jakob U. Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *J Biol Chem* 2011; 286(48):41893–903.
38. Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(6):721–9.
39. Jones DP, Go Y-M. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12 Suppl 2:116–25.
40. Patil NA, Tailhades J, Hughes RA, Separovic F, Wade JD, Hossain MA. Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1):1791–805.
41. Galperin MY, Koonin EV. From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends Biotechnol* 2010; 28(8):398–406.
42. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin: Structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta* 2007; 375(1-2):1–9.
43. Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(9):8290–9.

44. Papalouka V, Arvanitis DA, Vafiadaki E, Mavroidis M, Papadodima SA, Spiliopoulou CA et al. Muscle LIM protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2009; 29(22):6046–58.
45. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NMP, Lahmers S et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(2):155–62.
46. Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(5):469–77.
47. Xia C, Fu Z, Battaile KP, Kim J-JP. Crystal structure of human mitochondrial trifunctional protein, a fatty acid β -oxidation metabolon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(13):6069–74.
48. Indiveri C, Iacobazzi V, Tonazzi A, Giangregorio N, Infantino V, Convertini P et al. The mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: Function, structure and physiopathology. *Mol Aspects Med* 2011; 32(4-6):223–33.
49. Fedor JG, Jones AJY, Di Luca A, Kaila VRI, Hirst J. Correlating kinetic and structural data on ubiquinone binding and reduction by respiratory complex I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(48):12737–42.
50. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762(2):164–80.
51. Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C R Biol* 2006; 329(9):657–68.
52. Lowenstein J, Tornheim K. Ammonia production in muscle: The purine nucleotide cycle. *Science* 1971; 171(3969):397–400.
53. Borza T, Iancu CV, Pike E, Honzatko RB, Fromm HJ. Variations in the response of mouse isozymes of adenylosuccinate synthetase to inhibitors of physiological relevance. *J Biol Chem* 2003; 278(9):6673–9.
54. Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S et al. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 2010; 122(10):993–1003.

55. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 2010; 106(6):1134–44.
56. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res* 2015; 116(12):1956–70.
57. Li A-L, Li H-Y, Jin B-F, Ye Q-N, Zhou T, Yu X-D et al. A novel eIF5A complex functions as a regulator of p53 and p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(47):49251–8.
58. Koseki T, Inohara N, Chen S, Núñez G. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(9):5156–60.
59. Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006; 113(9):1203–12.
60. Galmiche L, Serre V, Beinat M, Assouline Z, Lebre A-S, Chretien D et al. Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2011; 32(11):1225–31.
61. Kaminska M, Shalak V, Mirande M. The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry* 2001; 40(47):14309–16.
62. Parrado J. Effect of Oxidative Stress, Produced by Cumene Hydroperoxide, on the Various Steps of Protein Synthesis. MODIFICATIONS OF ELONGATION FACTOR-2. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:23105–10.
63. Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J* 1992; 11(13):4767–78.
64. Harms N, Ras J, Reijnders WN, van Spanning RJ, Stouthamer AH. S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: A universal pathway for formaldehyde detoxification? *J Bacteriol* 1996; 178(21):6296–9.
65. Fujimoto K, Takahashi SY, Katoh S. Mutational analysis of sites in sepiapterin reductase phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochimica et*

8 Literaturverzeichnis

Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 2002; 1594(1):191–8.

66. Capra M, Nuciforo PG, Confalonieri S, Quarto M, Bianchi M, Nebuloni M et al. Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers. *Cancer Research* 2006; 66(16):8147.

67. Kuznetsova E, Nocek B, Brown G, Makarova KS, Flick R, Wolf YI et al. Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*: BIOCHEMICAL, STRUCTURAL, AND EVOLUTIONARY INSIGHTS. *J Biol Chem* 2015; 290(30):18678–98.

68. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(2):192–208.

69. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 2015; 87:84–97.

70. Shan Y, Cortopassi G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion* 2016; 26:94–103.

71. Computational Systems Biochemistry. Peptide Table: Max Planck Institute of Biochemistry. Available from: URL: <http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:table:peptidetable>.

72. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; 26(12):1367–72.

73. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; 27(12):1897–905.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Alexander Dietl für die Möglichkeit der Arbeit an diesem Projekt. Die hervorragende und engagierte Betreuung und die tatkräftige Unterstützung zu jeder Zeit waren für mich von größtem Wert.

Herrn Prof. Dr. Lars Maier danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Innere Medizin II und im Forschungsbau der Universitätsklinik durchführen zu können.

Tiefer Dank gilt besonders meinen Eltern, Ute und Alexander Schmidtke, die mich während des Studiums jederzeit und ohne Einwände unterstützt haben, meiner Freundin Isabella, die mich stets durch alle Höhen und Tiefen begleitete, sowie meinen beiden Schwester und dem Rest meiner Familie, ohne die dieses Studium und diese Arbeit nie möglich gewesen wären.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Konstantin Schmidtke