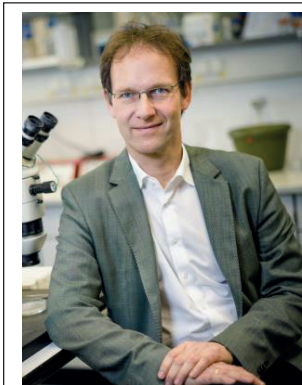


Wolfgang Linke

## Wie Erkenntnisse über das Riesenprotein Titin die Funktion des Herzens besser verständlich machen

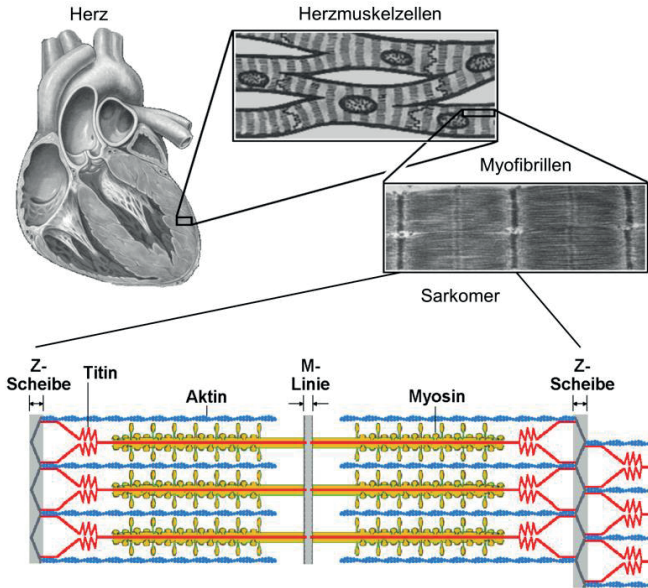


Wolfgang Linke, Professor für Physiologie in Münster, O. Mitglied seit 2016

Unser Herz ist eine Muskelpumpe, die 3 bis 4 Milliarden Mal in einem langen Leben schlägt. Wenn man in die Wand eines Herzens, zum Beispiel im Bereich der linken Herzkammer, hinein zoomt, dann erkennt man neben einer extrazellulären Matrix aus Kollagenfasern die verzweigten Herzmuskelzellen (Abb. 1). Diese Zellen oder Kardiomyozyten bestehen zu mehr als 50% aus Myofibrillen, kontraktile Strängen von kaum mehr als einem Tausendstel Millimeter Durchmesser. Eine Myofibrille setzt sich aus Dutzenden kleiner Fächer zusammen, den Sarkomeren, die die kontraktile Bausteine des Muskels darstellen. Die Sarkomere enthalten die kontraktile Proteine, vor allem Aktin-, Myosin- und Titinfilamente (Abb. 1). Für die Pumpaktivität des Herzens, also die Volumen- bzw.

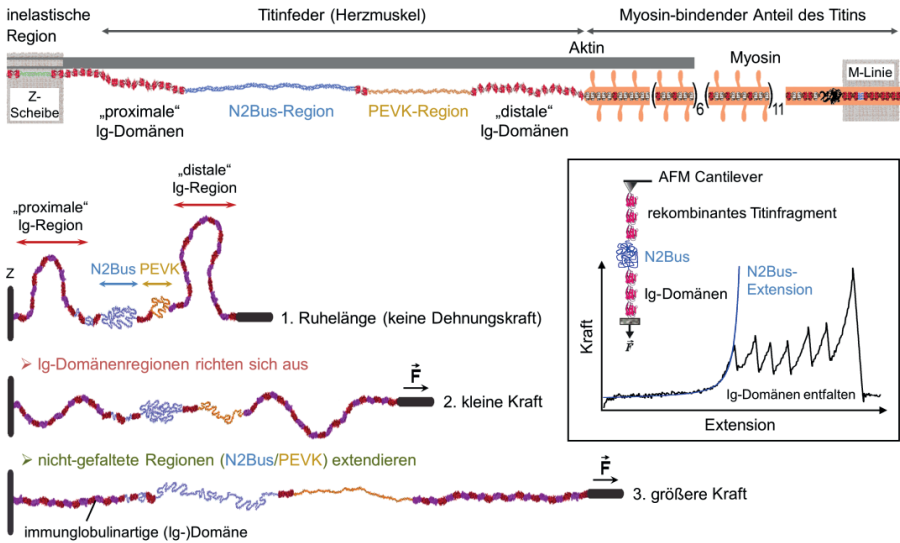
Längenänderung und die Kraftentwicklung, sind letztendlich allein die Sarkomere verantwortlich. Die Funktion der Sarkomere stellt seit vielen Jahren den Hauptschwerpunkt meiner Forschungsaktivitäten dar.

Im Rahmen meiner Postdoktorandenzeit am *Department of Bioengineering* der *University of Washington* in Seattle (USA) bei Prof. Gerald Pollack wurde ich Anfang der 1990er Jahre mit der Mechanik des Sarkomers bekannt gemacht. Damals war vor allem der Beitrag der Titinfilamente zu den mechanischen Eigenschaften des Sarkomers bzw. der Kardiomyozyte noch nahezu unbekannt. Wir stellten uns die Frage, welche Rolle die Titinfilamente für die Elastizität und „passive“ Kraftentwicklung des nicht-aktivierten Sarkomers spielen könnten. Dazu entwickelten wir eine Apparatur, mit der die Kraftentwicklung bei Dehnung einer einzelnen Herzmiofibrille, die aus dem Gewebeverband isoliert worden war, registriert werden konnte (1). Solche mechanischen Messungen quasi am isolierten Sarkomer hatten damals Pilotcharakter, insbesondere an Herzmiofibrillen hatte es zuvor noch keine vergleichbaren Untersuchungen gegeben. Die gemessenen Kräfte liegen im Nanonewton-Bereich, das entspricht Kräften, die etwa 100 bis 1000 Mal kleiner sind als die Gewichtskraft einer Fruchtfliege, die selbst nur 0.0005 g wiegt. Als wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen zeigten wir, dass die Myofibrillen des Herzmuskels deutlich steifer sind als zuvor angenommen. Sie bestimmen die diastolische Spannung der Herzwand entscheidend mit (2). Wir fanden außerdem heraus, dass die Kraftentwicklung des gedehnten, nicht-aktivierten Sarkomers vor allem auf den Eigenschaften des Titins beruht und nicht auf Aktin-Myosin-Wechselwirkungen zurückzuführen ist.



**Abb. 1:** Sarkomere sind die kontraktile Bausteine des Herzmuskels, in denen die kontraktile Filamente Aktin und Myosin zusammen mit dem elastischen Titinfilament und vielen anderen Eiweißen in nahezu kristalliner Struktur angeordnet sind.

Nach diesen wegweisenden Befunden stellte sich zunehmend die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Titinelastizität. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich die weltweit führenden Arbeitsgruppen, die zum Thema Titinsequenz und -struktur arbeiteten, vor allem am *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)* in Heidelberg. Mit Begeisterung nahm ich daher das Angebot von Prof. Johann C. Rüegg an der Physiologie der Universität Heidelberg an, als Wissenschaftlicher Assistent an seinem Institut zum Thema Titinfunktion zu forschen. In diese spannende Zeit fiel dann auch die Aufklärung wesentlicher Eigenschaften des Titinmoleküls. Die Bestimmung der vollständigen Primärsequenz des Titins, damals mittels aufwändiger Sanger-Sequenzierung, ergab, dass es sich um das größte Protein im menschlichen Körper handelt (molekulare Masse 3–4 Megadalton), das aufgrund dieser „titanischen“ Größe seinen Namen zurecht trägt (3). Deutlich wurde auch, dass das Titin mit anderen Proteinen im Sarkomer interagiert (4, 5) und als Rückgrat des Sarkomers entscheidend ist für den korrekten Zusammenbau der kontraktile Bausteine. Meine Arbeitsgruppe nutzte eine Kombination aus Myofibrillenmechanik und Antikörper-basierter Immundetektion elastischer Titinregionen im Sarkomer, um den molekularen Mechanismus der Titinfeder zu entschlüsseln (6).



**Abb. 2:** Schema eines halben Sarkomers mit detaillierter Domänenarchitektur des Titins im menschlichen Herzen (N2B-Isoform) sowie Darstellung des molekularen Mechanismus der Titinelastizität bei Sarkomer-Dehnung. Das Einsetzbild zeigt die Kraft-Dehnungskurve eines rekombinant hergestellten einzelnen „Minititin“-Moleküls, dessen elastische Eigenschaften mittels Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) gemessen wurden.

Bei der Analyse der Primär- und Sekundärstruktur waren in der Titinfeder des Herzens potenziell elastische Bereiche identifiziert worden, deren jeweilige mechanische Rolle jedoch zunächst unklar blieb (3). Längere Bereiche der Titinfeder bestehen aus gefalteten, daher globulären, immunglobulinartigen (Ig-)Domänen. Dazu gehören eine „proximale“, d. h. nahe der Z-Scheibe (= Begrenzung des Sarkomers) befindliche Ig-Region und eine „distale“, am Übergang zum Myosin-bindenden (nichtelastischen) Anteil des Titins liegende Ig-Region (Abb. 2, oben). Dazwischen befinden sich nicht-gefaltete, z. T. sehr lange, Sequenzinsertionen. Hierzu zählt eine Region, die überwiegend aus den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (L) besteht und daher PEVK-Region genannt wird, sowie ein Segment namens N2Bus-Region (*us = unique sequence*), das spezifisch im Herztitin vorkommt, nicht aber in den anderen Varianten (= Isoformen) des Titins im Skelettmuskel. Unsere Untersuchungen zeigten, dass alle diese Regionen zur Extension der Titinfeder beitragen. Werden an das Sarkomer geringe Dehnungskräfte angelegt, dann kommt es zunächst zur Ausrichtung der proximalen und (mit Abstrichen) distalen Ig-Region, indem die kurzen Linker-Elemente zwischen benachbarten Ig-Domänen wie bei einem Scharnier begradigt werden (Abb. 2). Steigt die Dehnungskraft, dann setzt die Extension der nicht-gefalteten Regionen PEVK und N2Bus ein (6–8). Obwohl damals noch umstritten, ist heute klar, dass einige

Ig-Domänen pro Titinmolekül bei physiologischen Dehnungskräften entfalten (9) – ein Prozess, der auch noch biochemisch steuerbar ist (10). Nach diesem Extensionsmodell der Titinfeder im Sarkomer existieren also schlaffere und steifere Titin-„Gummibänder“ in Serie, die nacheinander extendieren.

Den „ultimativen“ Nachweis der Gültigkeit dieses Modells lieferten wir ein paar Jahre später, als ich mit Unterstützung eines Heisenbergstipendiums der DFG in der Arbeitsgruppe von Prof. Julio Fernandez, zunächst an der Mayo Clinic in Rochester, MN (USA), später dann an der Columbia University in New York, als Gastwissenschaftler arbeitete. Unter Verwendung des Rasterkraftmikroskops (*atomic force microscope*, AFM) registrierten wir die Kraft-Extensionskurven einzelner, rekombinant exprimierter Titinfragmente, die aus den jeweiligen Feder-Regionen bestanden (Abb. 2, Einsatzbild). Mittels dieser am Einzelmolekül gewonnenen mechanischen Daten konnten wir die Kraft-Dehnungs-Beziehung des Titins im Herz-Sarkomer rekonstituieren (11). Außerdem konnte so die Elastizität des Titins als entropische, gummiähnliche Elastizität parametrisiert werden.

Nach der Aufklärung grundlegender Eigenschaften der Titinfeder legte meine Arbeitsgruppe zunehmend Augenmerk auf mögliche pathologische Veränderungen des Titins bei Herzerkrankungen. Solche Arbeiten standen im Zentrum unserer Forschungstätigkeiten nach meiner Berufung auf eine Professur für Molekulare Zellbiologie an der Universität Münster sowie anschließend auf einen Lehrstuhl für Kardiovaskuläre Physiologie an der Ruhr-Universität Bochum. Inspiriert wurden diese Untersuchungen besonders auch durch meine langjährige Zusammenarbeit mit dem Herzzentrum der Universitätsmedizin Göttingen, wo ich eine Professur für Kardiale Mechanotransduktion innehabte. Das schwache (insuffiziente) Herz ist oft durch ein „Ausleiern“ der Herzwände charakterisiert; man spricht von Dilatation bzw. Dilatativer Kardiomyopathie (DCM). Einzige Hilfe für Betroffene ist zumeist nur eine Herztransplantation. Die DCM hat im Übrigen auch eine starke genetische Komponente, d. h. die Krankheit kann durch Gen-Mutationen hervorgerufen werden. Interessanterweise ist das am häufigsten mutierte DCM-Gen das *TTN*, das für Titin kodiert. Meine Arbeitsgruppe beteiligt sich intensiv an der Erforschung der Pathomechanismen bei der Entstehung von DCM aufgrund von *TTN*-Mutationen (12, 13).

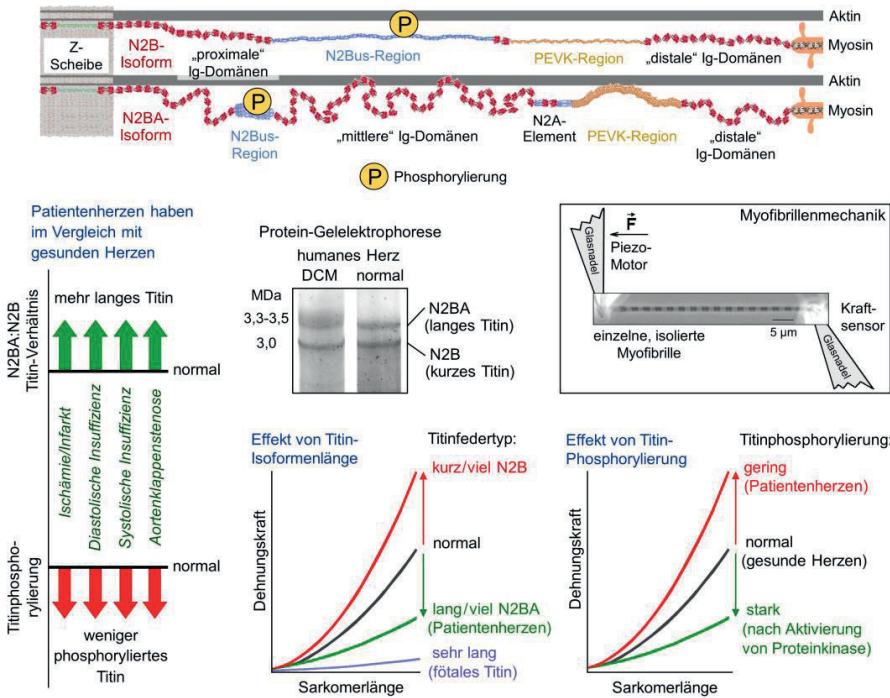
Ziel der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Herzinsuffizienz ist, die Veränderungen („*Remodeling*“), die zur Entstehung und Entwicklung der Krankheit führen, besser zu verstehen und nach potenziellen Behandlungsmöglichkeiten zu suchen. Ein früher Ansatz in meiner Arbeitsgruppe bestand darin, das Titin in terminal insuffizienten (transplantierten) Patientenherzen im Vergleich mit gesunden Herzen auf mögliche Veränderungen der Isoformenexpression hin zu untersuchen. Obwohl es in Säugetieren nur ein Titin gibt, entstehen durch alternatives Spleißen von prä-mRNA viele unterschiedlich lange Titinisoformen, deren Domänenzusammensetzung sich vor allem im Bereich der Titinfederregion unterscheidet. Im Herzmuskel-Sarkomer liegen Isoformen eines kurzen N2B-Typs und eines längeren N2BA-Typs gemeinsam vor (Abb. 3, oben). Bei Auftrennung der Titin-

Proteine mittels Gel-Elektrophorese kann man den Größenunterschied deutlich erkennen (Abb. 3). Da bei Dehnung des Sarkomers beide Isoformen zusammen extendieren, ist klar, dass viel mehr Kraft zur Dehnung der kurzen N2B-Variante als zur Dehnung der langen N2BA-Isoform aufgebracht werden muss. Entscheidend für die „passive“ Spannung des Herz-Sarkomers ist also der relative Anteil an N2B-Isoform bzw. das Verhältnis von leicht dehnbarer N2BA- zu steifer N2B-Isoform (Abb. 3). Im gesunden, erwachsenen menschlichen Herzen beträgt das N2BA:N2B-Verhältnis 30:70–40:60 (14). Dieses Verhältnis ändert sich dramatisch während der Herzentwicklung. Im fötalen Herzen wird eine sehr lange, dehnbare N2BA-Isoform exprimiert, die vor, während und kurz nach der Geburt durch kürzere N2BA-Isoformen und N2B ersetzt wird (15). Der daraus resultierende Anstieg der Titin-basierten Myozytensteifigkeit, den man z. B. an isolierten Myofibrillen registrieren kann (Abb. 3), erfolgt im Sinne einer Adaptation des Herzens an die gesteigerten hämodynamischen Anforderungen nach der Geburt.

Im Verlauf einer Herzinsuffizienz wird der entwicklungsbedingte Austausch der Titinisoformen zum Teil wieder umgekehrt (Abb. 3): der Anteil langer N2BA-Isoformen erhöht sich auf bis zu >50% und die Dehnbarkeit des Sarkomers nimmt zu (14, 16). Möglicherweise ist diese Umwandlung der Titinisoformen ein Anpassungsmechanismus des insuffizienten Herzens, um einer fibrotischen (= Kollagen-) Versteifung des Myokards entgegen zu wirken. Bei der Verschiebung des Titinisoformenverhältnisses in der Entwicklung und bei Herzinsuffizienz spielen wichtige Hormone wie das Trijodthyronin der Schilddrüse und das Insulin eine entscheidende Rolle (17, 18). Diese Hormone beeinflussen vermutlich die Aktivität eines Spleißingfaktors für Titin (19). In den letzten Jahren stellten wir fest, dass ein pathologisch erhöhtes N2BA:N2B-Isoformenverhältnis bei vielen Herzinsuffizienz-Typen regelmäßig auftritt (Abb. 3, links). Das Vorhandensein eines dehnbaren Titins kann zwar eine abgesenkte Wandsteifigkeit in manchen insuffizienten Herzen erklären, aber nicht den bei anderen Herzpatienten beobachteten pathologischen Anstieg der Myokard-Steifigkeit.

Aufgrund dieser Befunde suchten wir nach weiteren Modulatoren der Titinsteifigkeit. Im Fokus aktueller Untersuchungen steht seit mehreren Jahren, und zunehmend nach meinem Ruf auf einen Lehrstuhl für Physiologie an der Universität Münster, die Eigenschaft der Titinfeder, durch Bindung/Entbindung von Phosphatgruppen ihre Steifigkeit zu verändern. Solche als Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bezeichneten biochemischen Veränderungen werden durch bestimmte Enzyme vermittelt, die man als Proteinkinasen bzw. -phosphatasen kennt. Wir identifizierten die Proteinkinase G (20) und die Kalzium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (21) als Enzyme, die die N2Bus-Region im Herztitin phosphorylieren, sowie die Proteinphosphatase PP5, die diese Titinregion dephosphoryliert (22). Während Phosphorylierung der N2Bus-Region die Dehnbarkeit der Titinfeder erhöht, bedeutet Dephosphorylierung der N2Bus-Region eine verminderte Dehnbarkeit bzw. erhöhte Steifigkeit (Abb. 3, rechts unten). Pathophysiologisch bedeutsam ist, dass bei herzkranken Patienten eine verminderte Phospho-

rylierung der N2Bus-Region auftritt (Abb. 3, links unten), wodurch die Herzen übermäßig steif werden (20, 22).



**Abb. 3:** Bedeutung von Titinisoformen-Komposition und Titinphosphorylierung für die mechanischen Eigenschaften der Sarkomere im Herzmuskel. Das Sarkomer enthält eine Mischung aus relativ kurzer/steifer N2B-Titinisoform und längerer/sehr dehnbarer N2BA-Isoform. In beiden Varianten wird die herzspezifische N2Bus-Region phosphoryliert; dies bewirkt einen Abfall der Titinsteifigkeit. Bei verschiedenen Herzinsuffizienz-Typen findet man eine Veränderung des N2BA:N2B-Isoformenverhältnisses hin zu N2BA-Varianten, was das Sarkomer dehnbarer macht. Gleichzeitig findet oft eine verminderte Phosphorylierung der N2Bus-Region statt, wodurch das Titin steifer wird, was insgesamt zu einem pathologischen Anstieg der Wandsteifigkeit in Patientenherzen führen kann. DCM: dilatative Kardiomyopathie.

Eine erhöhte Myokardsteifigkeit ist hervorstechendes Merkmal vor allem bei diastolischer Herzinsuffizienz, bei der die Pumpfunktion des Herzens zwar erhalten, die Füllung in der Diastole jedoch behindert ist. Betroffene Patienten verlieren dramatisch an Leistungsfähigkeit. Die diastolische Herzinsuffizienz ist mindestens so häufig wie die systolische Herzinsuffizienz, jedoch gibt es anders als bei letztgenannter noch keine wirksame Behandlung. Unsere Studien zeigten im Tiermodell, dass die pathologisch verminderte Titinphosphorylierung bei diastolischer Herzin-

suffizienz durch Aktivierung des Proteinkinase-G-Signalwegs umkehrbar ist, wodurch die Titin-basierte Myokardsteifigkeit wieder normalisiert wird (23, 24). Weil somit die Dehnbarkeit der Herzkammern zunimmt, wird deren Füllbarkeit verbessert. In aktuellen Arbeiten (22, 25) suchen wir nach Möglichkeiten, durch medikamentös vermittelte Erhöhung der Phosphorylierung der N2Bus-Region des Titins die Kardiomyozytensteifigkeit und damit die Steifigkeit der Herzwand abzusenken, mit dem Ziel, potenzielle Therapiekonzepte für Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz zu entwickeln.

## Literatur

1. Linke, W. A., M. L. Bartoo & G. H. Pollack (1993) Spontaneous sarcomeric oscillations at intermediate activation levels in single isolated cardiac myofibrils. *Circ. Res.* 73:724–734.
2. Linke, W. A., V. I. Popov & G. H. Pollack (1994) Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys. J.* 67:782–792.3.
3. Labeit, S. & B. Kolmerer (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 270:293–296.
4. Sorimachi, H., A. Freiburg, B. Kolmerer, S. Ishiura, G. Stier, C. C. Gregorio, D. Labeit, W. A. Linke, K. Suzuki & S. Labeit (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.* 270:688–695.
5. Linke, W. A., M. Ivemeyer, S. Labeit, H. Hinssen, J. C. Rüegg & M. Gautel (1997) Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys. J.* 73:905–919.
6. Linke, W. A., M. Ivemeyer, N. Olivieri, B. Kolmerer, J. C. Rüegg & S. Labeit (1996) Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J. Mol. Biol.* 261:62–71.
7. Linke, W. A., M. Ivemeyer, P. Mundel, M.R. Stockmeier & B. Kolmerer (1998) Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8052–8057.
8. Linke, W. A., D. E. Rudy, T. Centner, M. Gautel, C. Witt, S. Labeit & C. C. Gregorio (1999) I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J. Cell Biol.* 146:631–644.
9. Rivas-Pardo, J. A., E. C. Eckels, I. Popa, P. Kosuri, W. A. Linke & J. M. Fernández (2016) Work done by titin protein folding assists muscle contraction. *Cell Rep.* 14:1339–1347.
10. Alegre-Cebollada, J., P. Kosuri, D. Giganti, E. Eckels, J. A. Rivas-Pardo, N. Hamdani, C. M. Warren, R. J. Solaro, W. A. Linke & J. M. Fernández (2014) S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell.* 156:1235–1246.
11. Li, H., W. A. Linke, A. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, J. G. Kerkvliet, H. Lu, P. E. Marszalek & J. M. Fernandez (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature.* 418:998–1002.

12. Hinson, J.T., A. Chopra, N. Nafissi, W.J. Polacheck, C.C. Benson, S. Swist, J. Gorham, L. Yang, S. Schafer, C.C. Sheng, A. Haghghi, J. Homys, N. Hubner, G. Church, S.A. Cook, W.A. Linke, C.S. Chen, J.G. Seidman & C.E. Seidman (2015) Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science*. 349:982–986.
13. Schäfer, S., A. de Marvao, E. Adami, L. Fiedler, B. Ng, E. Khin, O. Rackham, S. van Heesch, M. Kui, R. Walsh, U. Tayal, S.K. Prasad, T.J.W. Dawes, N.S.J. Ko, D. Sim, F. Mazzarotto, F. Kreuchwig, D. de Kliejn, T. Totman, C. Biffi, N. Tee, V. Schneider, A. Faber, J.G. Seidman, C.E. Seidman, W.A. Linke, J.P. Kovalik, D.P. O'Regan, J.S. Ware, N. Hubner & S.A. Cook (2017) Titin truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nat. Genet.* 49:46–53.
14. Neagoe, C., M. Kulke, F. del Monte, J.K. Gwathmey, P.P. de Tombe, R.J. Hajjar & W.A. Linke (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. 106:1333–1341.
15. Opitz, C.A., M.C. Leake, I. Makarenko, V. Benes & W.A. Linke (2004) Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ. Res.* 94:967–975.
16. Makarenko, I., C.A. Opitz, M.C. Leake, C. Neagoe, M. Kulke, J.K. Gwathmey, F. del Monte, R.J. Hajjar & W.A. Linke (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human DCM hearts. *Circ. Res.* 95:708–716.
17. Krüger, M., C. Sachse, W.H. Zimmermann, T. Eschenhagen, S. Klede, & W.A. Linke (2008) Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/AKT pathway. *Circ. Res.* 102:439–447.
18. Krüger, M., K. Babicz, M. von Frieling-Salewsky & W.A. Linke (2010) Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48:910–916.
19. Linke, W.A. & S. Bucker (2012) King of hearts: a splicing factor rules cardiac proteins. *Nat. Med.* 18:660–661.
20. Kruger, M., S. Kötter, A. Grützner, P. Lang, C. Andresen, M.M. Redfield, E. Butt, C.G. dos Remedios & W.A. Linke (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ. Res.* 104:87–94.
21. Hamdani, N., J. Krysiak, M.M. Kreusser, S. Neef, C.G. dos Remedios, L.S. Maier, M. Krüger, J. Backs & W.A. Linke (2013) Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ. Res.* 112:664–674.
22. Krysiak, J., A. Unger, L. Beckendorf, N. Hamdani, M. von Frieling-Salewsky, C.G. dos Remedios, M.M. Redfield, F. Sheikh, U. Gergs, P. Boknik & W.A. Linke (2018) Protein phosphatase-5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat. Commun.* 9:262.



23. Bishu, K., N. Hamdani, S. F. Mohammed, M. Kruger, T. Ohtani, O. Ogut, F. V. Brozovich, J. C. Burnett, W. A. Linke & M. M. Redfield (2011) Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation*. 124:2882–2891.
24. Hamdani, N., K. G. Bishu, M. von Frieling-Salewsky, M. M. Redfield & W. A. Linke (2013) Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc. Res.* 97:464–471.
25. Eisenberg, T., M. Abdellatif, S. Schroeder, U. Primessnig, S. Stekovic, T. Pendl, A. Harger, J. Schipke, A. Zimmermann, A. Schmidt, M. Tong, C. Ruckstuhl, C. Dammbrueck, A. S. Gross, V. Herbst, C. Magnes, G. Trausinger, S. Narath, A. Meinitzer, Z. Hu, A. Kirsch, K. Eller, D. Carmona-Gutierrez, S. Büttner, F. Pietrocola, O. Knittelfelder, P. Rockenfeller, C. Simonini, A. Rahn, M. Horsch, K. Moreth, J. Beckers, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, M. Hrabec de Angelis, F. Neff, T. Moustafa, G. Haemmerle, M. Mayr, P. Willeit, M. von Frieling-Salewsky, B. Pieske, L. Sorzano, T. Pieber, R. Pechlaner, J. Willeit, S. Sigrist, W.A. Linke, C. Mühlfeld, J. Sadoshima, J. Dengjel, S. Kiechl, G. Kroemer, S. Sedej & F. Madeo (2016) Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med.* 22:1428–1438.