

Das Fto-Protein nimmt Einfluss auf den Verlauf eines Myokardinfarkts



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Melanie Wehmöller
aus Recklinghausen

Oktober 2018

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Ulrich Rüther
2. Prof. Dr. Axel Gödeck

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.2. Der akute Myokardinfarkt	2
1.3. Das “Fat mass and obesity associated“-Gen (Fto)	5
1.4. Die FTO-Funktion	6
1.5. Der Verlust von FTO im Menschen	8
1.6. Die Fto-Mausmutanten	9
1.7. Der mTOR- (mechanistic target of rapamycin) Signalweg	11
1.8. Einfluss der Fto-Defizienz auf dem Myokardinfarkt	15
2. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Antikörper	18
3.2. Chemikalien	20
3.3. Oligonukleotide	23
3.4. Geräte	24
3.5. Kits	25
3.6. Puffer und Lösungen	27
3.7. Versuchsmaterial	31
3.8. Arbeit mit Mäusen	33
3.8.1. Tierschutz	33
3.8.2. Tierhaltung und Verpaarung	33
3.8.3. Behandlung von Mäusen	33
3.8.4. Induktion der Ischämie/Reperfusion unter Verwendung des „close-chest“- Models.....	34
3.8.5. Echokardiographie	37
3.8.6. Präparation von Mäusen.....	37

3.8.7.	Isolation von Kardiomyozyten aus dem Herzen.....	37
3.9.	Molekularbiologische Methoden	38
3.9.1.	DNA-Isolation aus Schwanzspitzen	38
3.9.2.	RNA-Isolation aus Mauserherzen	38
3.9.3.	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
3.9.4.	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
3.9.5.	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.9.6.	Reverse Transkription.....	41
3.9.7.	Quantitative „real time“-PCR (q-RT-PCR) Analyse.....	42
3.9.8.	Mikroarray-Analyse	43
3.9.9.	Dot-Blot-Analyse	44
3.10.	Histologie	45
3.10.1.	Die TTC/ Evans Blue-Färbung	45
3.10.2.	Fixierung von Mauserherzen in Paraffin	46
3.10.3.	Anfertigung von Paraffin-Schnitten	46
3.10.4.	Anfertigung von Kryoschnitten	46
3.10.5.	Gömöri-Trichrom-Färbung	47
3.10.6.	TUNEL-Färbung.....	48
3.11.	Protein-biochemische Methoden	49
3.11.1.	Extraktion von Proteinen.....	49
3.11.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
3.11.3.	SDS-PAGE	49
3.11.4.	Western-Blot	50
3.11.5.	Immunodetektion	51
3.11.6.	Stripping von Western-Blot Membranen	52
3.12.	Statistische Auswertung.....	52
4.	Ergebnisse	53
4.1.	Der Einfluss des Fto-Verlustes auf die Myokardinfarktgröße	53

4.1.1.	Untersuchung der Herzfunktion <i>Fto</i> ^{-/-} -Tieren nach kardialer Ischämie	53
4.1.2.	Analyse des Myokardinfarkts 24 Stunden nach einer Ischämie/Reperfusion .	55
4.1.3.	Untersuchung der Apoptose 24 Stunden nach kardialer Ischämie.....	56
4.1.4.	Untersuchung der Infarktnarbe von <i>Fto</i> ^{+/+} - und <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen drei Wochen nach kardialer Ischämie	58
4.2.	Der Einfluss des Fto-Verlustes auf die mRNA-Expression	59
4.2.1.	Die Expression von pro-inflammatorischen Markern in <i>Fto</i> ^{+/+} - und <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen 24 Stunden nach kardialer Ischämie	59
4.2.2.	Mikroarray-Analyse <i>Fto</i> ^{+/+} - und <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen 24 Stunden nach kardialer I/R .	61
4.3.	Der Fto-Verlustes führt zu Veränderungen im mTOR-Signalweg	69
4.3.1.	<i>Fto</i> -defiziente Tiere wiesen eine reduzierte mTORC1-Aktivität auf.....	69
4.3.2.	Der Fto-Verlust führt zu einer verstärkten Proteinexpression von TSC2 und PRAS40.....	71
4.3.3.	<i>Fto</i> ^{-/-} -Tiere zeigen im Herzen eine erhöhte <i>Tsc2</i> und <i>Akt1s1</i> (PRAS40) mRNA-Expression.....	72
4.3.4.	Analysen der <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen weisen auf eine gesteigerte Autophagie hin	73
4.4.	Einfluss eines Fto-Inhibitors auf den Verlauf eines Myokardinfarkts	75
4.4.1.	Analyse der Behandlung von wildtypischen Mäusen mit dem Fto-Inhibitor Rhein.....	75
4.4.2.	Untersuchung der Herzfunktion von Rhein behandelten Tieren nach kardialer Ischämie.....	76
4.4.3.	Analyse der Infarktgröße von Rhein behandelten Tieren 24 Stunden nach kardialer Ischämie	78
4.4.4.	Bestimmung der Infarktnarbengröße der Rhein behandelten Tiere 3 Wochen nach kardialer Ischämie.....	78
4.4.5.	Auswirkungen der postoperativen Rhein-Behandlung auf die Herzfunktion nach kardialer Ischämie.....	79
4.4.6.	Auswirkung der postoperativen Rhein-Behandlung nach Myokardinfarkt auf die Infarktnarben-Bildung	80
4.5.	Analyse eines Kardiomyozyten-spezifischen Fto-Verlustes im I/R-Modell.....	81

4.5.1.	Erstellung einer Mauslinie zur Induzierung eines Kardiomyozyten-spezifische Fto-Verlustes	81
4.5.2.	Analyse der Herzfunktion von Kardiomyozyten-spezifischen Fto-defizienten Tieren nach kardialer Ischämie	83
4.5.3.	Analyse der Myokardinfarktgröße in den Kardiomyozyten-spezifischen Fto-defizienten Tieren 24 Stunden nach kardialer Ischämie.....	84
4.5.4.	Untersuchung der Infarktnarbe in <i>Fto^{fl/fl}</i> - und <i>Cre;Fto^{fl/fl}</i> -Herzen 3 Wochen nach kardialer Ischämie	84
5.	Diskussion	86
5.1.	Einfluss des Fto-Verlustes auf den I/R-Schaden	86
5.1.1.	Der Verlust von Fto wirkt kardioprotektiv auf den I/R-Schaden	86
5.1.2.	Der Fto-Verlust führte zu einer Reduktion in der Expression von <i>Mcp1</i> und <i>Mmp9</i>	87
5.1.3.	Der Fto-Verlust führte zu einer reduzierten Aktivierung des mTORC1-Signalwegs	87
5.1.4.	Der Fto-Verlust führte zu einer Zunahme der Autophagie	92
5.1.5.	Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von Fto auf den Myokardinfarkt	93
5.2.	Einfluss der prä- und postoperativen Rhein-Behandlung auf den I/R-Schaden	96
5.3.	Der Kardiomyozyten-spezifische Fto-Verlust hatte keinen Einfluss auf den I/R-Schaden.....	96
5.4.	Ausblick.....	97
6.	Zusammenfassung.....	99
7.	Abstract.....	100
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Abkürzungsverzeichnis	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2015.....	1
Abbildung 2.	Die drei Phasen des Heilungsprozesses nach einem akuten Myokardinfarkt.....	4
Abbildung 3.	Die oxidative Demethylase-Funktion von FTO.	8
Abbildung 4.	Der anatomische Vergleich von wildtypischen Mäusen (<i>Fto^{+/+}</i>) mit <i>Fto</i> -defizienten Mäusen (<i>Fto^{-/-}</i>).....	10
Abbildung 5.	Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges.	14
Abbildung 6.	Ligatur der proximalen linken Koronararterie.....	35
Abbildung 7.	Ausschnitte eines Elektrokardiogramms (EKG) eines Mauserzens.....	36
Abbildung 8.	Echokardiographische Untersuchung von <i>Fto^{-/-}</i> - und <i>Fto^{+/+}</i> -Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (<i>Baseline</i> ; BL) und 24 h, 1 und 3 Wochen nach kardialer Ischämie-Induktion.	54
Abbildung 9.	<i>Fto^{-/-}</i> -Herzen wiesen im Vergleich zu <i>Fto^{+/+}</i> -Herzen eine verringerte Infarktgröße 24 Stunden nach der Ischämie/Reperfusion auf.	55
Abbildung 10.	<i>Fto^{-/-}</i> -Herzen wiesen eine reduzierte Apoptose im Vergleich zu <i>Fto^{+/+}</i> -Herzen auf.	57
Abbildung 11.	<i>Fto^{-/-}</i> -Tiere wiesen eine kleinere Infarktnarbe und höhere Wanddicke auf. Darüber hinaus zeigten die <i>Fto^{-/-}</i> Tiere in der Narbenregion weniger Fibrose sowie eine erhöhte Anzahl an Kardiomyozyten.....	59
Abbildung 12.	Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Marker im ischämischen und nicht ischämischen Bereich.	61
Abbildung 13.	Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter <i>Fto^{-/-}</i> -Herzen verglichen mit <i>Fto^{+/+}</i> -Herzen.	64
Abbildung 14.	Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter <i>Fto^{+/+}</i> -Herzen verglichen mit I/R-operierte <i>Fto^{+/+}</i> -Herzen.	65

Abbildung 15. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen verglichen mit I/R-operierte <i>Fo</i> ^{-/-} -Herzen.	66
Abbildung 16. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von I/R-operierter <i>Fto</i> ^{+/+} -Herzen verglichen mit I/R-operierte <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen..	68
Abbildung 17. In <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen findet eine verminderte mTORC1-Signalwegs-Aktivierung statt.....	70
Abbildung 18. In <i>Fto</i> ^{-/-} -Herzen wurde eine verstärkte Expression von TSC2 und PRAS40 gemessen.....	72
Abbildung 19. In <i>Fto</i> ^{-/-} Herzen konnte eine erhöhte mRNA-Expression von <i>TSC2</i> und <i>AKT1S1</i> gemessen werden.....	73
Abbildung 20. <i>Fto</i> ^{-/-} Herzen wiesen eine gesteigerte Autophagie auf.	74
Abbildung 21. Die Rhein-Behandlung führte zu einer gesteigerten m ⁶ A-RNA-Methylierung im Herzen.....	76
Abbildung 22. Echokardiographische Untersuchung von <i>Fto</i> ^{+/+} ; Tris und <i>Fto</i> ^{+/+} ; Rhein behandelten Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (<i>Baseline</i> ; BL), 24 Stunden, 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der Ischämie.....	77
Abbildung 23. Die Rhein behandelten Tiere wiesen eine signifikant reduzierte Infarktgröße auf.....	78
Abbildung 24. Die Behandlung mit Rhein führte zu einer kleineren Infarktnarbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie.....	79
Abbildung 25. Echokardiographische Untersuchung von <i>Fto</i> ^{+/+} ; Tris und <i>Fto</i> ^{+/+} ; Rhein behandelten Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (<i>Baseline</i> ; BL), 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der Ischämie.	80
Abbildung 26. Die postoperative Rhein-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Infarktnarbe.	81
Abbildung 27. Analyse der Kardiomyozyten-spezifischen <i>Fto</i> -Inaktivierung.	82
Abbildung 28. Echokardiographische Untersuchung von <i>Fto</i> ^{fl/fl} - und Cre; <i>Fto</i> ^{fl/fl} -Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (<i>Baseline</i> ; BL), 24 Stunden, 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der Ischämie.....	83
Abbildung 29. Der Kardiomyozyten-spezifische <i>Fto</i> -Verlust führte zu keiner Reduktion der Infarktgröße.....	84

Abbildung 30. Der Kardiomyozyten-spezifische Fto-Verlust führte zu keiner Reduktion der Infarktnarbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie.85

Abbildung 31. Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges.89

Abbildung 32. Der Fto-Verlust führte zu einer erhöhten Proteinexpression von TSC2 und PRAS40, welches eine Inhibierung des mTORC1-Signalweges bewirkt.94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Primäre Antikörper.....	18
Tabelle 2. Sekundäre Antikörper.....	19
Tabelle 3. Chemikalien.....	20
Tabelle 4. Oligonukleotide.....	23
Tabelle 5. Geräte.....	24
Tabelle 6. Kits.....	25
Tabelle 7. Verbrauchsmaterial.....	31
Tabelle 8. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	50

1. Einleitung

1.1. Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahre 2016 die drei häufigsten Todesursachen weltweit ischämische Herzerkrankungen, Schlaganfälle und Infektionen der Atemwege. Von weltweit 56.874 Millionen Todesfällen im Jahre 2016 starben 9.433 Millionen an den Folgen einer ischämischen Herzerkrankung. Damit nehmen diese den ersten Platz der häufigsten Todesursachen ein. Vorwiegend waren hier die westlichen Industrienationen betroffen (WHO, 2018). Auch in Deutschland waren 2015 die häufigsten Todesursachen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Abbildung 1). An zweithäufigster Stelle wurde der akute Myokardinfarkt genannt. An erster und dritter Stelle stehen die chronischen ischämischen Herzerkrankungen und die Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt, 2017). Diese Erkrankungen können unter anderem Langzeitfolgen eines akuten Myokardinfarkts sein. Aufgrund der hohen Anzahl an Todesfällen ist die Erforschung und Entwicklung neuer Medikamente und Therapien von besonderer Bedeutung.

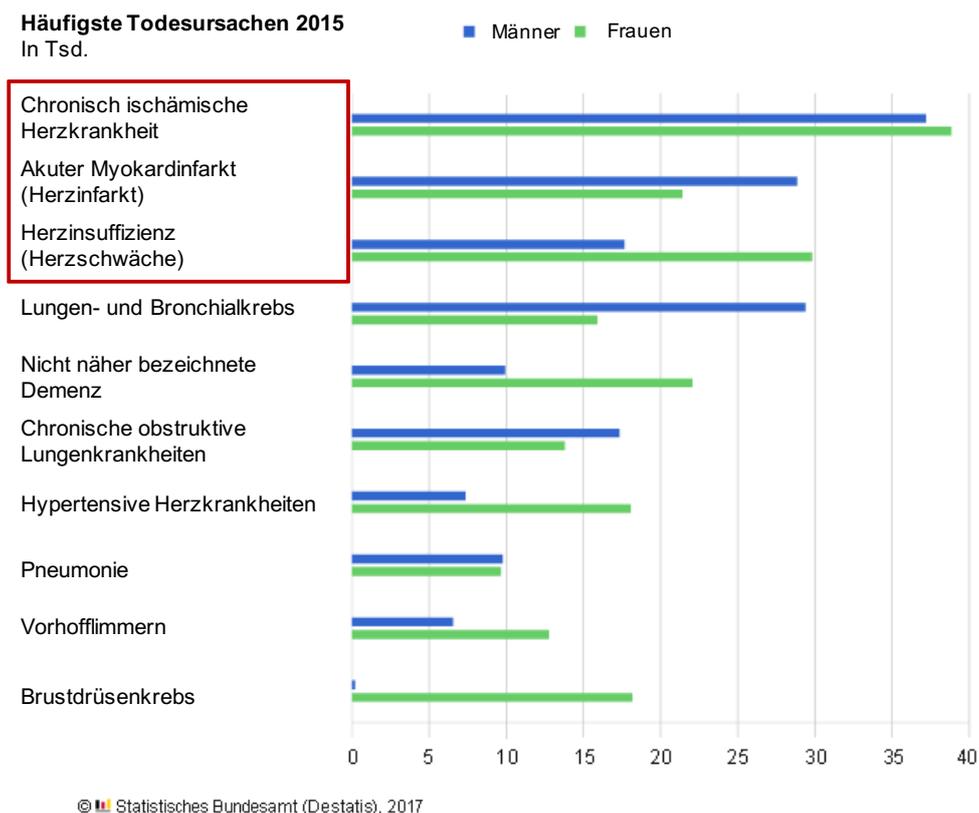


Abbildung 1. Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2015. Insgesamt führten im

Jahre 2015 Erkrankungen des Kreislaufsystems am häufigsten zum Tode. Vor allem chronisch ischämische Herzerkrankungen und der akute Myokardinfarkt waren, sowohl bei Frauen als auch bei Männer, die häufigste Todesursache (Quelle: Statistisches Bundesamt, Jahr 2017).

1.2. Der akute Myokardinfarkt

Durch Arteriosklerose hervorgerufene Gefäßveränderungen oder die hieraus resultierende Thrombusbildung in den Koronargefäßen, kann es zu einer Durchblutungsstörung des Myokards (Herzmuskel) kommen. Hierbei wird ein Teil des Myokards ischämisch, was zur Unterversorgung der Zellen und letztendlich zum Absterben von Kardiomyozyten führt (Alpert et al., 2008; Thygesen et al., 2007). Aufgrund des Sauerstoffmangels können die Mitochondrien über oxidative Phosphorylierung nicht genügend Adenosintriphosphat (ATP) bereitstellen. Auch das Umstellen des Stoffwechsels auf die anaerobe Glykolyse kann den Energiebedarf der Kardiomyozyten, der nötig ist um die Herzfunktion aufrecht zu erhalten, nicht abdecken. (Jennings et al., 1990a; Jennings et al., 1990b). Um den Myokardschaden möglichst gering zu halten, ist es daher von großer Bedeutung, den Gefäßverschluss möglichst schnell zu öffnen (Brodie, 2008).

Nach Einsetzen der Reperfusion, durch Wiederherstellen des Blutflusses, beginnt der Heilungsprozess des durch die Ischämie geschädigten Myokards. Dieser kann grundlegend in drei Phasen unterteilt werden: Die inflammatorische-, die proliferative- und die Heilungsphase. Die inflammatorische Phase beginnt nach Einsetzen der Reperfusion (Dobaczewski et al., 2010; Liehn et al., 2010; Prabhu and Frangogiannis, 2016). Nekrotische und apoptotische Zellen setzen sogenannte Gefahrensignale (DAMPs; *damage-associated molecular patterns*) frei, zu denen z.B. IL1- α (Interleukin1- α), Fibronektin, ATP oder mitochondriale DNA zählen. Diese Moleküle binden an spezielle Rezeptoren, wie unter anderem an TLRs (*toll-like receptors*) und den IL-1R (IL-1 Rezeptor) (Bujak et al., 2008; de Haan et al., 2013; Rohde et al., 2014; Satoh et al., 2006; Tian et al., 2007; Timmers et al., 2012; Timmers et al., 2008). Dieser Vorgang führt zur Aktivierung der MAPKs- (*mitogen-activated protein kinase*) und des NF- κ B- (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Signalweges (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Vor allem letzterer führt zu einer weiteren Aktivierung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosesfaktor- α), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6 (Interleukin-6) und verschiedener chemotaktischer Zytokine wie z.B. MCP-1/CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1/chemokine (C-C motif) ligand 2*) (Bujak et al., 2008; Gwechenberger et al., 1999; Liehn et al., 2010; Maekawa et al., 2002; Timmers et al., 2012). Hierdurch kommt es zur Einwanderung erster Immunzellen, vorwiegend neutrophile Granulozyten, die für die Beseitigung toter und nekrotischer Zellbestandteile notwendig sind.

Jene wiederum sekretieren weitere Zytokine, wodurch die Einwanderung anderer Immunzelltypen, wie Monozyten und Lymphozyten, gefördert wird (Abbildung 2 A) (Liu et al., 2016; Prabhu and Frangogiannis, 2016). Nach Beseitigung von toten und nekrotischen Kardiomyozyten sowie Bestandteilen der extrazellulären Matrix, kommt es zur Inhibition der Inflammation und zum Übergang in die proliferative Phase. Dazu werden unter anderem große Mengen an TGF- β (*transforming growth factor- β*), TIMP-1 (*tissue Inhibitor of metalloproteinases 1*) und IL-10 (Interleukin-10) freigesetzt (Dobaczewski et al., 2010; Ikeuchi et al., 2004; Rainer et al., 2014; Yang et al., 2000). TGF- β induziert die Einwanderung und Transdifferenzierung von Myofibroblasten. Diese sekretieren große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. Kollagen, um eine stabile Narbe zu bilden und Rupturen zu verhindern (Dobaczewski et al., 2010; Hashimoto et al., 2001). TIMP-1 ist ein Metalloproteinase-Inhibitor, der zur Narbenbildung den weiteren Abbau der extrazellulären Matrix inhibiert (Creemers et al., 2001; Hirohata et al., 1997; Phatharajaree et al., 2007). IL-10 hingegen ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und unterdrückt die weitere Sekretion der zuvor sekretierten pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine. Dies führt zur Rekrutierung spezifischer anti-inflammatorischer Monozyten und Lymphozyten (Ammirati et al., 2012; Fiorentino et al., 1991; Timmers et al., 2012). Abschließend folgt die Heilungsphase, in der es zur Ausbildung der Infarkt Narbe kommt. Hierbei kommt es unter anderem zur weiteren Vernetzung der extrazellulären Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin und der Hyaluronsäure (Dobaczewski et al., 2010). Bei den Myofibroblasten, welche in großen Mengen die genannten extrazellulären Proteine sekretiert haben, kommt es zur Aktivierung der Apoptose. Hierdurch werden am Ende der Heilungsphase alle Myofibroblasten beseitigt (Takemura et al., 1998; Zhao et al., 2004). Außerdem kann es noch zur Apoptose weiterer myokardialer Zellen kommen, was zur Atrophie der Herzwand und zur Dilatation des Ventrikels führt. Letztendlich entsteht in der Narbenregion eine zellarme sowie metabolisch inaktive Ventrikelwand (Abbildung 2 C). Da innerhalb des Narbengebiets sehr wenige bis keine Kardiomyozyten mehr vorhanden sind, kann innerhalb dieser Region keine effiziente Herzkontraktion stattfinden. Zudem kommt es durch den hohen Anteil an Matrixproteinen zur weiteren Versteifung der Narbenregion, was letztendlich zu einer eingeschränkten Herzfunktion führt. Ist die Herzfunktion so stark reduziert, dass nicht genügend Blut in den Blutkreislauf gepumpt wird, spricht man von einer Herzinsuffizienz, welche im schlimmsten Fall zum Tod führen kann (Benjamin et al., 2017; Dobaczewski et al., 2010; Gerczuk and Kloner, 2012; Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Derzeit ist die effizienteste Behandlung eines Myokardinfarktes die frühe Reperfusion des Myokards mittels Fibrinolyse oder perkutanen koronaren Intervention (PCI) (Benjamin et al., 2017; Brodie, 2008; Hausenloy et al., 2017). Dennoch wird durch die Ischämie, sowie den

nachfolgenden Reperfusionsschaden, eine beträchtliche Verletzung am Myokard verursacht (Verma et al., 2002; Yellon and Hausenloy, 2007). Viele weitere Therapieansätze zur Reduktion der Infarktgröße und des Ischämie-/Reperfusionsschaden wurden in klinischen Studien untersucht. Leider erwies sich ein großer Teil dieser Studien als nicht erfolgreich (Benjamin et al., 2017; Kloner et al., 2017). Daher ist es von besonderer Bedeutung, neue molekulare Ziele zu identifizieren, die einen Einfluss auf den Myokardschaden haben und als neue therapeutische Intervention genutzt werden können. Das *“fat mass and obesity associated gene”* (*FTO*) könnte hierfür ein interessantes Target sein. Dieses Gen ist vor allem dadurch bekannt geworden, dass es mit der Entwicklung von Adipositas in Verbindung gebracht wurde (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Hinney et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Dies ist ein wichtiger Faktor, der an der Entstehung eines Myokardinfarktes beteiligt sein kann. Zusätzlich ist bekannt, dass Adipositas den Heilungsprozess eines Myokardinfarktes verschlechtern kann (Kazlauskienė et al., 2015; Yusuf et al., 2005; Yusuf et al., 2004).

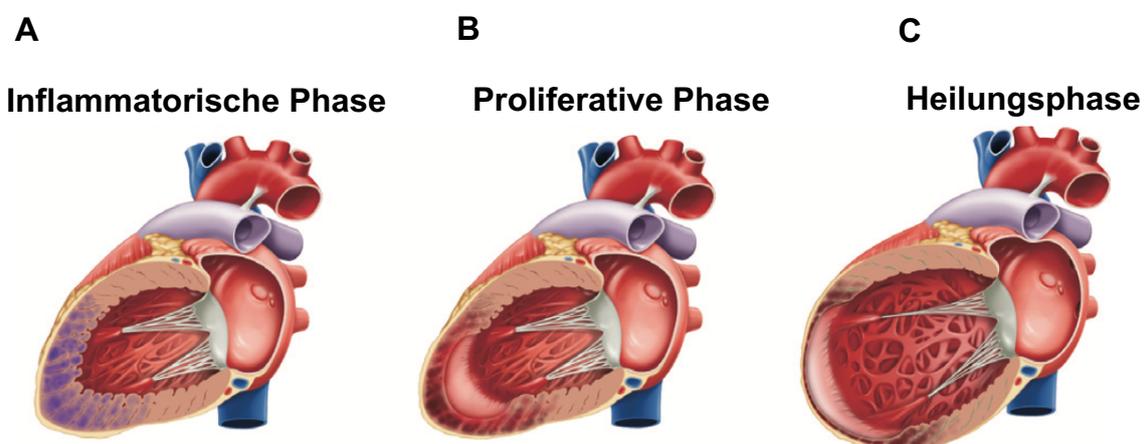


Abbildung 2. Die drei Phasen des Heilungsprozesses nach einem akuten Myokardinfarkt. A) In der inflammatorischen Phase kommt es zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Dieses führt zur Einwanderung von Immunzellen, die an der Beseitigung von toten und nekrotischen Zellbestandteilen beteiligt sind. B) In der proliferativen Phase kommt es zur Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine, um die inflammatorische Phase zu beenden. Nun werden speziell von Myofibroblasten große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen sekretiert, um die Herzwand zu stabilisieren und die fibrotische Narbe zu bilden. C) In der Heilungsphase kommt es zur weiteren Vernetzung der extrazellulären Matrixproteine, um eine stabile Infarkt Narbe auszubilden. Modifiziert nach (Yan et al., 2012).

1.3. Das “*Fat mass and obesity associated*“-Gen (*Fto*)

Erstmals wurde das *Fto*-Gen (*Fat mass and obesity-associated*) 1999 in der „*Fused toes*“ (*Ft*)-Mausmutante beschrieben (Peters et al., 1999). Bei dieser Mausmutante lag eine Deletion von 1,6 Mb im *Ft*-Lokus auf Chromosom 8 vor, welche 6 verschiedene Gene umfasste. Dazu zählen *Fts*, *Ftm* (*Fantom*), *Irx3* (*Iroquois 3*), *Irx5* (*Iroquois 5*), *Irx6* (*Iroquois 6*) und *Fto* (Peters et al., 2002). Heterozygote *Ft*-Mausmutanten wiesen eine Syndaktylie in den Vordergliedmaßen und eine Hyperplasie des Thymus auf (van der Hoeven et al., 1994). Homozygote Träger waren hingegen embryonal letal und starben zwischen Embryonaltag E10,5 und E12,5 aufgrund von schweren Entwicklungsdefekten. *Fto* war das Größte der 6 deletierten Gene. Es besteht aus neun Exons und hat eine Länge von 250 kb. Das Gen codiert für ein 502 Aminosäuren langes Protein, welches sowohl in Vertebraten als auch in Algen konserviert vorliegt (Robbens et al., 2008). In Invertebraten, Pilzen und Grünpflanzen kann es hingegen nicht nachgewiesen werden. Das *Fto*-Gen ist in Mäusen sowohl embryonal als auch im adulten Gewebe ubiquitär exprimiert. Die höchste Expression liegt vor allem in endokrinen Geweben, dem Gehirn sowie dem Skelettmuskel vor (Frayling et al., 2007; Fredriksson et al., 2008; Gerken et al., 2007; Peters et al., 2002; Peters et al., 1999). Allerdings wuchs das Interesse an dem *Fto*-Gen erst im Jahre 2007, als vier verschiedene Gruppen unabhängig voneinander mittels genomweiter Assoziationsstudien, einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Fettleibigkeit und dem Body-Mass-Index (BMI) nachwiesen (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Hinney et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Homozygote Träger eines SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im ersten Intron wiegen durchschnittlich 3-4 kg mehr und haben hierdurch ein 1,67-fach erhöhtes Risiko an Adipositas zu erkranken. In zahlreichen weiteren Studien wurde gezeigt, dass weitere SNPs in Zusammenhang mit verschiedenen metabolischen Symptomen stehen. Dazu zählen Änderungen im Leptin-, Insulin- und Glukosespiegel, Plasma-HDL-Cholesterol-Spiegel, Diabetes mellitus Typ 2 und ein verändertes Sättigungsgefühl. Erste Symptome und Gewichtsunterschiede können bereits im frühen Kindesalter, zwei Wochen nach der Geburt, beobachtet werden (Andreasen et al., 2008; Cecil et al., 2008; den Hoed et al., 2009; Freathy et al., 2008; Haupt et al., 2009; Jacobsson et al., 2008a; Jacobsson et al., 2008b; Lopez-Bermejo et al., 2008; Speakman et al., 2008; Tanofsky-Kraff et al., 2009; Vasan et al., 2013; Vasan et al., 2014; Wardle et al., 2009). Die Verbindung des *FTO*-Gens mit der Entstehung von Adipositas konnte bereits in zahlreichen Populationen mit unterschiedlichem Geschlecht, Alter und ethnischer Herkunft belegt werden (Cornes et al., 2009; Jacobsson et al., 2012; Kamura et al., 2016; Reuter et al., 2016a; Reuter et al., 2016b; Saldana-Alvarez et al., 2016; Tonjes et al., 2010). Eine Studie von 2014 zeigte, dass die Introns des *FTO*-Gens direkt mit dem Promotor von *IRX3* interagieren. Verschiedene SNPs in dem humanen *FTO*-Gen führten zu einer veränderten

Expression von *IRX3*. Eine veränderte Expression von *FTO* hingegen konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigen *Irx3*-defiziente Mäuse ebenfalls ein reduziertes Körpergewicht. Dies führte zu der Annahme das *Irx3* möglicherweise auch an der Entstehung von Adipositas beteiligt ist und durch *Fto* reguliert werden kann (Osorio, 2014; Smemo et al., 2014).

1.4. Die FTO-Funktion

Mittels bioinformatischer Analysen konnte das FTO-Protein der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen-Superfamilie zugeordnet werden. Die größte Sequenzhomologie wurde zwischen dem DNA-Reparatur-Protein AlkB aus *Escherichia coli* (*E. coli*) und den Säugetierhomologen ALKBH2 und ALKBH5 gefunden (Gerken et al., 2007; Han et al., 2010a; Han et al., 2010b; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro, 2007). Wenig später konnte *in vitro* gezeigt werden, dass FTO die Demethylierung von 3-Methylthymidin und 3-Methyluridin in einzelsträngiger RNA (ssRNA) und DNA (ssDNA) in Abhängigkeit von Fe²⁺-Ionen und 2-Oxoglutarat katalysieren kann (Gerken et al., 2007; Jia et al., 2008). Allerdings scheint FTO eine zweimal so hohe Affinität zu ssRNA als zu ssDNA (ss, *single-stranded*) aufzuweisen. Dieses Phänomen wurde nach Aufklärung der Kristallstruktur von FTO näher analysiert. Am C-terminalen Ende von FTO liegt eine bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannte Tertiärstruktur vor, die den Zugang zum aktiven Zentrum am N-terminalen Terminus für doppelsträngige und nicht-methylierte RNA sowie DNA, verhindert (Han et al., 2010a; Han et al., 2010b). Kurz darauf konnten Jia et al. zeigen, dass N6-Methyladenosin (N(6)-methyl-2'-O-Methyladenosin; (m⁶A)), welches an RNA oder DNA gebunden war, ein weiteres Substrat von FTO darstellt, welches zudem ein 50-fach höhere Affinität als 3-Methyluridin aufwies (Jia et al., 2011). m⁶A-Methylierungen sind die häufigsten Nukleotid-Modifizierungen von RNA, 3-Methyluridin hingegen liegt vor allem bei ribosomaler RNA vor (Desrosiers et al., 1974; Kowalak et al., 1993). Mittels FTO-Überexpression sowie Expressionsreduktion konnte in Zellen gezeigt werden, dass die m⁶A-Methylierung von mRNA beeinflusst werden kann (Jia et al., 2011). Bei einer Reduktion von FTO kam es somit zu einer Erhöhung der m⁶A-RNA-Methylierung und bei Überexpression folglich zu einer Reduktion der m⁶A-Methylierungsstellen. Im Jahr 2012 hatten zwei Gruppen unabhängig voneinander eine Methode entwickelt, um m⁶A-Methylierungsstellen in mRNA näher zu untersuchen. Hierzu wurde ein spezifischer m⁶A-Antikörper verwendet, über den die m⁶A-methylierte mRNA mittels Immunpräzipitation isoliert werden konnte. Die isolierte RNA wurde anschließend durch Sequenzierung analysiert. Diese Datensätze zeigten, dass es vor allem im Bereich des Stop-Codons und der 3'-UTR (*untranslated region*) von mRNAs zu einer spezifischen Anreicherung der m⁶A-Methylierungen kam (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Aber auch in langen Intron-Bereichen konnten m⁶A-Methylierungen gefunden werden. Diese Methylierungsmuster sind evolutionär hoch konserviert und wurden

sowohl im Menschen als auch in der Maus nachgewiesen (Dominissini et al., 2012). In der Studie von Meyer et al. wurde 2012 erstmals der direkte Einfluss von FTO auf das RNA-Methylom belegt. Die Überexpression von FTO in HEK293T- (*human embryonic kidney*) Zellen führt zu einer deutlichen Abnahme der m⁶A-Methylierung im gesamten Transkriptom (Meyer et al., 2012). Überraschenderweise widerlegten Mauer et al. Anfang 2017 die zuvor beschriebene Annahme, dass m⁶A das primäre Target von FTO ist (Mauer et al., 2017). In dieser Studie konnte mittels Chromatographie und Massenspektrometrie belegt werden, dass FTO mit einer signifikant höheren Effizienz m⁶A_m mRNA demethyliert. Diese Basenmodifikation liegt in 30 % aller mRNAs vor und tritt nur in Verbindung mit einem N⁷-Methylguanin (m⁷G, Cap-Struktur) am 5'-Ende der RNA auf. Nach dem N⁷-Methylguanin folgt, verbunden über ein Triphosphat, ein 2'-O-Methyladenosin (A_m) oder ein N⁶,2'-O-Dimethyladenosin (m⁶A_m). Hierbei handelt es sich um eine zweite Methylierung an der 6-Position des Stickstoffatoms (N⁶). Tritt nun die Basenabfolge m⁷G-ppp-m⁶A_m auf, kann FTO die Methylierung am sechsten Stickstoffatom entfernen (m⁷G-ppp-m⁶A) (siehe Abbildung 3). Gleichzeitig konnten Mauer et al. zeigen, dass die m⁶A-Modifizierung das spezifische Target der ALKBH5 Demethylase ist (Mauer et al., 2017).

Zudem konnten Mauer et al. erste Auswirkungen der m⁶A_m-Modifikation auf die mRNA beschreiben. So wurde gezeigt, dass durch die Basenabfolge m⁷G-ppp-m⁶A_m die mRNA stabilisiert und die Halbwertszeit im Durchschnitt um 2,5 Stunden erhöht wurde. Diese Stabilisierung wurde vor allem durch eine reduzierte mRNA-Degradation bewirkt. Dies erfolgte zum einen durch ein vermindertes Entfernen der m⁷G-ppp-Cap-Struktur und zum anderen durch eine Inhibierung des microRNA-induzierten Abbaus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei einem FTO-Verlust zu einer Stabilisierung von 30 % der mRNAs kommt, wodurch letztendlich eine erhöhte Proteintranslation vorliegen kann. Da FTO fälschlicherweise zuvor für eine m⁶A-Demethylase gehalten wurde, kann zum einen dadurch erklärt werden, dass es bei einer starken Überexpression zu einem geringen Anteil auch die m⁶A-Methylierung demethylieren kann. Allerdings tritt dieser Zustand physiologisch nicht auf (Mauer et al., 2017). Zum anderen scheint der Verlust von FTO auch indirekt einen Einfluss auf die m⁶A-Methylierung zu nehmen (Jia et al., 2011). Durch die Kontrolle des mRNA-Abbaus beeinflusst FTO einen großen Teil des Transkriptoms, was wiederum zu sekundären Effekten führen kann, die schließlich die m⁶A-Methylierungen der RNA beeinflussen. Die zuvor entwickelte Technik, um m⁶A-Methylierungstellen zu analysieren, nutzte einen Antikörper, der sowohl die m⁶A- als auch die m⁶A_m-Methylierungen erkannte. Dies erklärt, warum zuvor angenommen wurde, dass FTO einen spezifischen Einfluss auf das m⁶A-Methylom ausüben kann. Allerdings muss beachtet werden, dass in den zuvor erstellten Methylomdaten auch m⁶A-mRNA Targets vorhanden waren, auf die FTO keinen direkten Einfluss nimmt (Mauer et al., 2017).

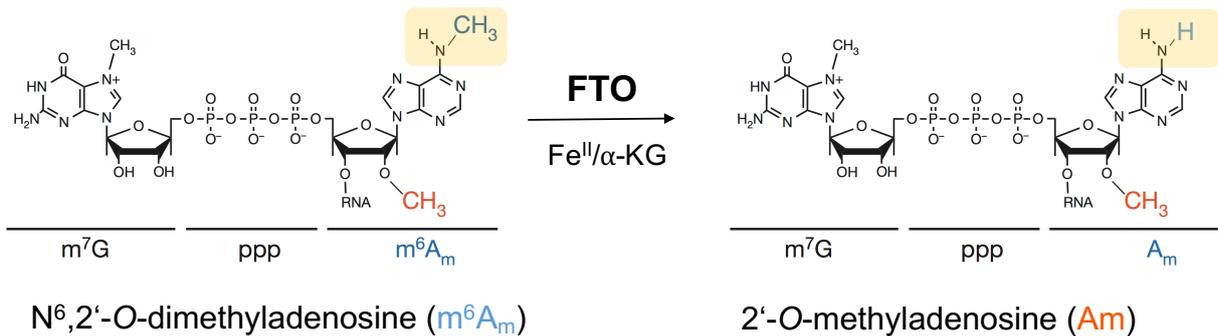


Abbildung 3. Die oxidative Demethylase-Funktion von FTO. FTO kann in Abhängigkeit von Eisen(II) und α -Ketoglutarat $\text{N}^6, 2'\text{-O-Diemethyladenosin (m}^6\text{A}_m)$ zu $2'\text{-O-Methyladenosin (A}_m)$ demethylieren. Dies destabilisiert die mRNA und führt zu deren Abbau. Modifiziert nach (Mauer et al., 2017).

1.5. Der Verlust von FTO im Menschen

Bisher sind zwei Berichte von Mutationen im *FTO*-Gen bekannt, die zu einem Verlust oder zur Reduktion der Demethylase-Aktivität im Menschen führen. In der Studie von Boissel et al. wurde eine große palästinensisch-arabische Familie untersucht (Boissel et al., 2009). Hierbei zeigte sich, dass neun Individuen von dem polymalformativen Syndrom betroffen waren. Eine genetische Analyse belegte, dass es zu einer Mutation an der Position kam, welche im codierenden Bereich des *FTO*-Gens liegt. Der Austausch einer Base (Guanin zu Adenin) bewirkte, dass in der Aminosäuresequenz an Position 316 die Aminosäure Arginin durch Glutamin ausgetauscht (Arg316Gln) wurde. Dieser Aminosäureaustausch erfolgte in der 2-Oxoglutarat-Bindedomäne, welche zur Katalyse der Demethylierung benötigt wird. Folglich führte die Mutation zu einem kompletten Verlust der Demethylase-Aktivität. Die neun Betroffenen zeigten postnatale Wachstumsretardationen, psychomotorische Retardationen, Mikrozephalie, funktionelle Gehirndefizite und faziale Dysmorphismen. Einige Individuen wiesen noch weitere morphologische Gehirnfehlbildungen, proportionale Fehlbildungen des Gesichts, hypertrophe Kardiomyopathien und eine postnatale Sterblichkeit nach drei Jahren auf (Boissel et al., 2009). Einige Jahre später wurde eine weitere im Menschen vorkommende *FTO*-Mutation entdeckt (Daoud et al., 2016). Bei einem tunesischen Mädchen wurde eine Mutation an Position 956 (Cytosin zu Thymin) in Exon 5 identifiziert. Im Protein führte dies an Position 316 zum Austausch von Serin zu Phenylalanin (Ser319Phe). Aufgrund dessen kam es zu einer Reduktion der Demethylase-Aktivität und zum reduzierten Umsatz des 2-Oxoglutarat. Die Patientin wies ebenfalls Wachstums- und funktionelle Gehirndefizite auf.

Zusätzlich war sie von einer reduzierten Sehkraft und beidseitigem Hörverlust betroffen (Daoud et al., 2016).

1.6. Die *Fto*-Mausmutanten

Zur näheren Untersuchung der physiologischen Funktion von *Fto* wurden verschiedene Mausmutanten erstellt. Mit Hilfe dieser Mutanten war es möglich, genauere Erkenntnisse über die *in vivo* Funktion im gesamten Organismus zu erlangen. Die erste Mausmutante wurde im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert (Fischer et al., 2009). Die Inaktivierung des *Fto*-Gens wurde durch eine Deletion der Exons 2 und 3 sowie das Einsetzen einer Neomycin-Resistenzgenkassette erzeugt. Die *Fto*^{+/-}-Tiere wiesen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Phänotyps verglichen mit den *Fto*^{+/+}-Tieren auf. Die *Fto*^{-/-}-Mausmutanten hingegen zeigten eine postnatale Sterblichkeit von 50 %, verglichen mit den *Fto*^{+/-}- sowie *Fto*^{+/+}-Mäusen. Embryonal als auch direkt nach der Geburt, lagen keine Unterschiede in der Größe und dem Gewicht zwischen den *Fto*^{-/-}- und den *Fto*^{+/-}- sowie *Fto*^{+/+}-Tieren vor. Doch bereits zwei Tage nach der Geburt kam es zu einer signifikanten Wachstumsretardation der *Fto*^{-/-}-Tiere. Im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Tieren war bereits nach 6 Wochen eine Gewichtsreduktion von 30-40 % in den weiblichen und männlichen *Fto*^{-/-}-Tiere nachweisbar. Weiterhin zeigten die *Fto*^{-/-}-Mäuse eine verringerte Körpergröße von 10,1 cm auf 8,6 cm bei Männchen und von 10,3 cm auf 9,4 cm bei Weibchen. Die Gewichtsreduktion der *Fto*^{-/-}-Tiere wurde primär auf die Reduktion der Muskelmasse sowie des weißen Fettgewebes zurückgeführt. Mit Hilfe von MRI- (*magnetic resonance imaging*) Messungen konnte eine Reduktion des Fettgewebes von 60 % in Männchen und 30 % in Weibchen ermittelt werden. Im braunem Fettgewebe lag hingegen kein Unterschied zwischen den *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Tieren vor. Auch unter einer hochkalorischen Diät waren die *Fto*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Tieren vor einer Gewichtszunahme geschützt. Zusätzlich konnte hier eine Reduktion der Gewichtszunahme in den *Fto*^{+/-}-Tieren gemessen werden. Weitere Analyse-Parameter zeigten, dass die *Fto*^{-/-}-Tiere sogar mehr Nahrung aufnahmen und eine geringere Bewegungsaktivität aufwiesen. Allerdings zeigten sie einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine erhöhte Kohlendioxidproduktion. Dies führte zu der Annahme, dass *Fto*^{-/-} Tiere einen gesteigerten Energieumsatz besitzen, welcher vor der Gewichtszunahme schützt (Fischer et al., 2009).



Abbildung 4. Der anatomische Vergleich von wildtypischen Mäusen ($Fto^{+/+}$) mit Fto -defizienten Mäusen ($Fto^{-/-}$). $Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigten im Alter von 20 Wochen eine deutlich reduzierte Körpergröße, sowie eine Reduktion des viszeralen Fettgewebes. Modifiziert nach (Fischer et al., 2009)

In einer weiteren Mausmutante wurde im Fto -Protein die Aminosäure Phenylalanin für Isoleucin an Position 367 substituiert (Phe367Ile), wodurch es zu einer verringerten katalytischen Aktivität des Fto -Proteins kam. Diese Tiere zeigten ebenfalls eine geringere Gewichtszunahme und eine Reduktion des weißen Fettgewebes. Die Futteraufnahme und die Aktivität waren nicht verändert, allerdings zeigten die Mausmutanten ebenfalls einen erhöhten Stoffwechsel. Alle weiteren phänotypischen Ausprägungen, wie die Wachstumsretardation und die postnatale Mortalität der $Fto^{-/-}$ -Tiere, konnten bei dieser Mausmutante nicht beobachtet werden. Insgesamt lag im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Mäusen, mit einem vollständigen Fto -Verlust, ein deutlich abgeschwächter Phänotyp vor, welcher vermutlich auf die Restaktivität des Fto -Proteins zurückzuführen war (Church et al., 2009).

2010 wurde von Church et al. eine weitere Fto -Mausmutante beschrieben. Hierbei handelte es sich um eine „*Knock-in*“-Mutante, die ein bis zwei zusätzliche Kopien des Fto -Gens trugen (Church et al., 2010). Diese Tiere zeigten eine drastisch erhöhte Nahrungsaufnahme, welche zu einer Zunahme des Gewichts und des Fettgewebes führte. Allerdings zeigten diese Tiere keinen Unterschied im Stoffwechsel und in der physischen Aktivität. Diese Daten wurden sowohl unter einer normalen als auch einer hochkalorischen Diät ermittelt. Unter der hochkalorischen Diät wiesen die Tiere mit erhöhter Fto -Expression zusätzlich eine deutlich verschlechterte Glukose-Toleranz auf. Im Weiteren wurde die Leptin- und Adiponektinkonzentration unter einer normalen sowie hochkalorischen Diät untersucht. Beide

Hormone sind maßgeblich an der Regulation des Hungergefühls beteiligt. Leptin führt zu einer Hemmung des Hungergefühls und ist zusätzlich am Fettstoffwechsel beteiligt. In beiden Versuchsbedingungen wiesen die Tiere mit den zusätzlichen *Fto*-Genkopien eine verringerte Leptin- und Adiponektin-Konzentration auf. Dies führte zu der Annahme, dass vor allem die Verringerung der Leptin-Konzentration zu der erhöhten Nahrungsaufnahme und der hieraus resultierenden Zunahme an Gewicht und Fettgewebe beiträgt. Über den genaueren molekularen Mechanismus, der zu den beschriebenen Phänotypen führte, ist bisher nichts bekannt (Church et al., 2010).

In einer weiteren Studie wurden *Fto*-defiziente Mäuse mit Leptin-defizienten Mäusen (*Lep^{ob/ob}*) gekreuzt. Die Leptin-Defizienz führt zu einem Verlust des Sättigungsgefühls, folglich entwickeln die Tiere eine starke Adipositas. Die Tiere, die zusätzlich einen *Fto*-Verlust besaßen, waren jedoch vor der Gewichtszunahme geschützt und wiesen eine verbesserte Glukosetoleranz auf. Bisher ist nicht genau bekannt, wie der *Fto*-Verlust vor Adipositas schützt (Ikels et al., 2014). Einige Studien zeigten, dass der *Fto*-Verlust zu einer gestörten Adipozyten-Differenzierung führte. Ebenso scheint *Fto* auch eine Rolle beim Erhalt der Lipide in Adipozyten zu spielen (Martin Carli et al., 2018). Nach einem durch Tamoxifen induzierten *Fto*-Verlust in Adipozyten, kam es zum Abbau und Verlust von bereits bestehenden Adipozyten (Zhao et al., 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Fto* einen Einfluss auf den mTOR- (*mechanistic target of rapamycin*) Signalweg hat (Gulati et al., 2013; Li et al., 2018; Wang et al., 2017). Dieser Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von vielen physiologischen Prozessen, wozu auch die Lipidsynthese zählt (Saxton and Sabatini, 2017; Sciarretta et al., 2018a; Sciarretta et al., 2014).

1.7. Der mTOR- (*mechanistic target of rapamycin*) Signalweg

Wie bereits erwähnt ist der mTOR- (*mechanistic* (zuvor *mammalian* genannt) *target of rapamycin*) Signalweg ein bedeutender Regulator von vielen zellulären Prozessen, zu denen die Proteinbiosynthese, der Metabolismus, die Lipidsynthese, die Zellproliferation, die Autophagie, die Mitochondrienbiogenese und die akute Stressantwort zählen (Brown et al., 1994; Laplante and Sabatini, 2009; Sabatini et al., 1994; Sabers et al., 1995; Saxton and Sabatini, 2017; Sciarretta et al., 2018a). mTOR selbst interagiert mit mehreren spezifischen Adapterproteinen, um zwei verschiedene makromolekulare Komplexe zu bilden: mTORC1 (*mTOR complex 1*) und mTORC2 (*mTOR complex 2*). mTORC1 besteht aus den Proteinen Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), Tel2 (*Tel 2 interacting protein 1*), PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40 kDa*) und DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*). Raptor und mLST8 sind

hierbei die Hauptkomponenten, die nach Interaktion zur Aktivierung des Komplexes führen (Hara et al., 2002; Kaizuka et al., 2010; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003; Nojima et al., 2003; Schalm et al., 2003). PRAS40 und DEPTOR haben dagegen eine inhibierende Wirkung und regulieren hierdurch die mTORC1-Aktivität (Abbildung 5) (Peterson et al., 2009; Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007). mTORC2 beinhaltet ebenfalls mLST8, Tel2 und DEPTOR. Zusätzlich gehören mSin1 (*mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein 1*), Protor1/2 und Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) zum mTORC2-Komplex (Abbildung 5) (Jacinto et al., 2004; Saxton and Sabatini, 2017; Sciarretta et al., 2018a). mTORC1 fördert vor allem anabolische Prozesse, wie die Nukleotid-, Protein- und Lipid-Synthese und fördert hierdurch das Zellwachstum. Vor allem die Proteinsynthese wird über die Aktivierung der p70S6K (*70 kDa ribosomal S6 kinase beta 1*) reguliert. Mit der mTORC1-Aktivierung werden gleichzeitig katabolische Prozesse, wie die Autophagie inhibiert (Sciarretta et al., 2018a; Wullschleger et al., 2006). Dies erfolgt über Phosphorylierung der ULK1- (*Unc-51 like autophagy activating kinase*) Kinase. Bei der Autophagie handelt es sich um einen evolutionär hochkonservierten Prozess, bei dem fehlgefaltete Proteine und nicht funktionale Organellen von einem Membranvesikel, Autophagosom genannt, umschlossen werden. Diese Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen und zerlegen die Proteine und Organellen in ihre einzelnen Komponenten. Die entstandenen Aminosäuren, Lipide und Kohlenhydrate können so gerade bei Nährstoffmangel und Zellstress dem Zellmetabolismus wieder zur Verfügung gestellt werden (Bravo-San Pedro et al., 2017a; Galluzzi et al., 2017). Kommt es zum Nährstoff- oder Sauerstoffmangel, wird mTORC1 inhibiert und hierdurch die Autophagie aktiviert. Zwei Hauptsignalwege, die zur Regulation von mTORC1 führen, sind der AKT- (Proteinkinase B) und der AMPK- (*AMP-activated protein kinase*) Signalweg (Laplante and Sabatini, 2013). AKT ist vorwiegend unter nährstoffreichen Bedingungen aktiv und inhibiert durch Phosphorylierung PRAS40 und den TSC (tuberous sclerosis protein) 1/2-Komplex. Zur vollständigen Inhibition des TSC-Komplexes müssen 4 Aminosäurereste (Ser939, Ser981, Ser1130 und Ser1132) des TSC2-Proteins phosphoryliert werden. PRAS40 wird durch Phosphorylierung an Thr246 durch AKT sowie am Ser183 und Ser221 durch mTOR selber inhibiert (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002; Potter et al., 2002; Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007; Wang et al., 2008). Der TSC1/2-Komplex ist ein indirekter Inhibitor von mTORC1, indem er das GTP-Bindeprotein Rheb (Ras homolog enriched in brain), einen positiven Regulator von mTORC1, inhibiert (Castro et al., 2003; Garami et al., 2003; Manning and Cantley, 2003; Zhang et al., 2003). Die Inhibierung von PRAS40 und dem TSC1/2-Komplex führt folglich zur Aktivierung von mTORC1 (Garami et al., 2003; Sancak et al., 2007). Die AMPK hingegen wird vorwiegend durch Nährstoffmangel und Hypoxie aktiv und phosphoryliert Raptor und den TSC1/2-Komplex (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2006). Der TSC1/2-Komplex wird diesmal jedoch aktiviert und inhibiert wiederum mTORC1 (Tee et al.,

2003). Die Phosphorylierung von Raptor verhindert ebenfalls die mTORC1-Aktivierung (Gwinn et al., 2008; Hara et al., 2002; Nojima et al., 2003). Die Aktivierung von mTORC2 ist bisher noch nicht genau charakterisiert. Diese scheint allerdings unabhängig vom Nährstoffmangel zu erfolgen (Kapahi et al., 2010; Zinzalla et al., 2011). Vielmehr führen verschiedene Wachstumsfaktoren sowie der Insulin/PI3K- (*phosphoinositide3-kinase*) Signalweg zu dessen Aktivierung (Huang et al., 2008; Liu et al., 2015; Zinzalla et al., 2011). Die Aktivierung von mTORC2 fördert das Zellüberleben und die Zellpolarität, durch Phosphorylierung von AKT, SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) und PKC- α (*protein kinase C- α*) (siehe Abbildung 5) (Braz et al., 2004; Garcia-Martinez and Alessi, 2008; Guertin et al., 2006; Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). In Abbildung 5 ist eine schematische Darstellung des mTOR-Signalweges dargestellt.

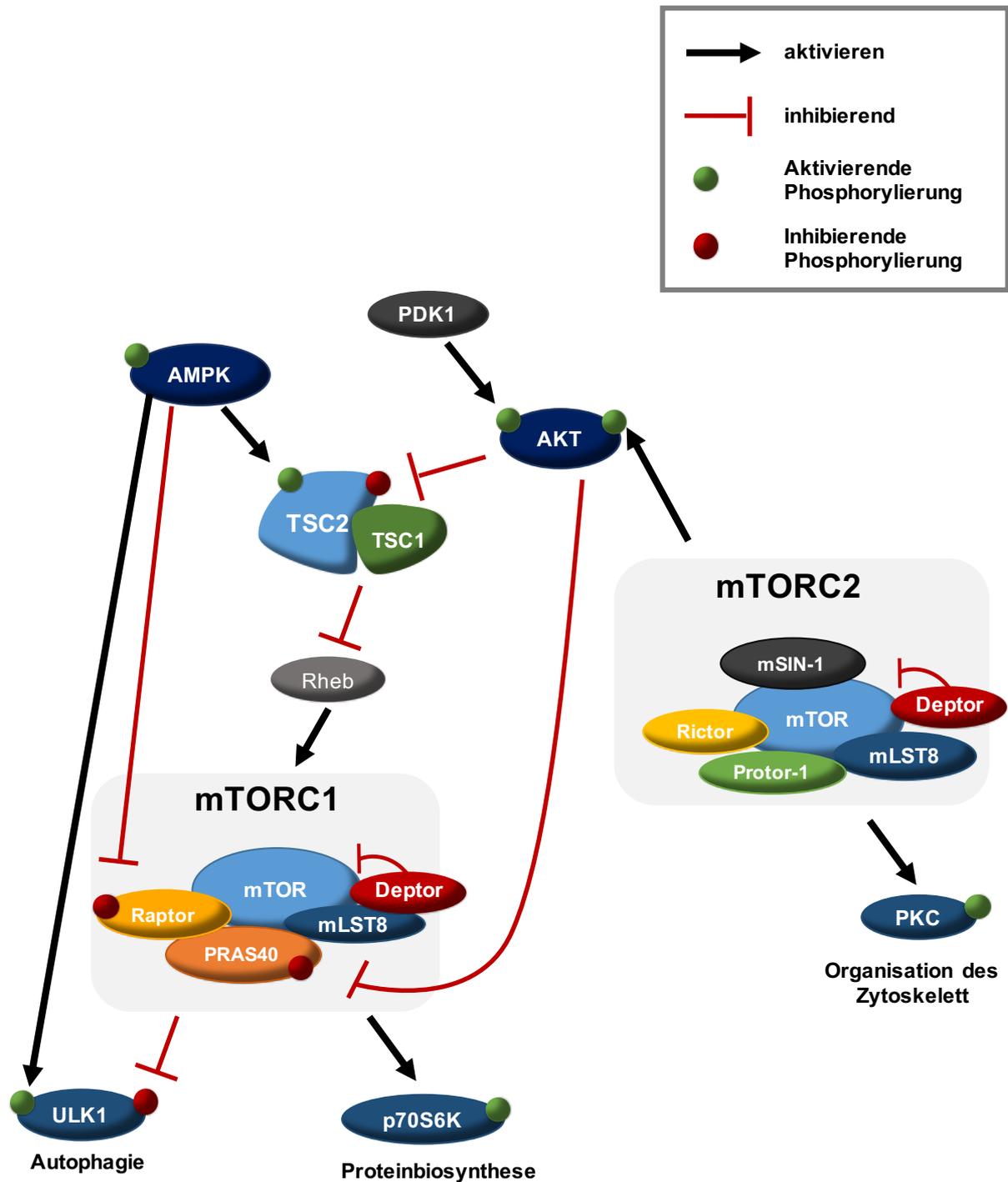


Abbildung 5. Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges. mTORC1 (mTOR complex 1) wird aus den Komponenten Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kDa) und DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) gebildet. Dieser Komplex aktiviert die Proteinbiosynthese über Phosphorylierung der p70S6K (70 kDa ribosomal S6 kinase beta 1) und inhibiert die Autophagie über Phosphorylierung der ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase). Hingegen setzt sich mTORC2 (mTOR complex 2) aus Komponenten mLST8, DEPTOR, mSin-1

(mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein 1), Protor1/2 und Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) zusammen. Dieser ist für die Organisation der Zellpolarität, das Zellüberleben und das Zytoskelett zuständig, welches unter anderem durch die Phosphorylierung von PKC α (*protein kinase C- α*) und AKT (*protein kinase B*) erfolgt. Die Aktivierung von AKT führt wiederum zur Aktivitätsregulation von mTORC1, indem PRAS40 und der TSC (tuberous sclerosis protein) 1/2-Komplex phosphoryliert werden. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Inhibitoren von mTORC1, welche durch die AKT-Phosphorylierung inaktiviert werden. Ein weiterer Regulator des mTORC1 ist die AMPK (AMP-activated protein kinase), welche hingegen über Phosphorylierung den TSC1/2-Komplex aktiviert und hierdurch mTORC1 inhibiert. Zusätzlich kann die AMPK die Autophagie auch direkt über ULK-Phosphorylierung aktivieren.

Bezüglich Fto wurde bisher gezeigt, dass *in vitro* in MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) sowie in Neuronen und Myozyten von *Fto*^{-/-}-Tieren, eine verringerte mTORC1-Aktivierung vorlag (Gulati et al., 2013; Li et al., 2018; Wang et al., 2017). Wie zuvor beschrieben, ist dieser Komplex für die Regulation der Proteinbiosynthese sowie den Lipidmetabolismus verantwortlich und kann hierdurch das Zellwachstum maßgeblich steigern (Laplane and Sabatini, 2009; Saxton and Sabatini, 2017). Unter Betrachtung des Phänotyps der Fto-defizienten Mäuse, bei denen eine postnatale Wachstumsretardation und eine Störung im Fettstoffwechsel vorliegt, scheint der mTORC1-Komplex einen bedeutenden Einfluss zu haben (Fischer et al., 2009). Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt mTOR eine wichtige Rolle. Besonders während einer akuten kardialen Ischämie ist die Regulation des mTOR-Signalwegs ein wichtiger Faktor (Sciarretta et al., 2018a; Sciarretta et al., 2014). So konnte bereits gezeigt werden, dass während einer kardialen Ischämie die Minderung der mTORC1-Aktivität, mittels spezifischer Inhibitoren, zu einer Reduktion der Infarktgröße sowie der Apoptose von Kardiomyozyten führte. Folglich führte dies zu einem Erhalt der Herzfunktion (Buss et al., 2009; Das et al., 2012; Volkert et al., 2013).

1.8. Einfluss der Fto-Defizienz auf dem Myokardinfarkt

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fto einen großen Einfluss auf viele physiologische Prozesse hat, wie auf das Zellwachstum und den Fettmetabolismus. Durch seine RNA-Demethylase-Funktion hat es zudem einen bedeutenden Einfluss auf das gesamte Transkriptom. Diese Eigenschaften machen Fto zu einem interessanten Target, um dessen Einfluss auf einen Myokardinfarkt zu untersuchen. Im Jahr 2018 zeigte eine Gruppe, dass bei einer chronischen Herzinsuffizienz, nach einem akuten Myokardinfarkt, es zu einer verminderten Expression von Fto im Herzen kam (Mathiyalagan et al., 2018). Dieses konnte sowohl in den Herzen von Mäusen, Schweinen und auch im Menschen beobachtet werden.

Mittels der zuvor beschriebenen m⁶A-Immunpräzipitation konnte diese Gruppe zeigen, dass viele detektierte mRNA-Targets am Erhalt der Herzkontraktion beteiligt sind. Es wurde daher angenommen, dass die Reduktion der Fto-Expression ebenfalls zu einer reduzierten Expression dieser Targets führte und die Herzfunktion hierdurch verschlechtert wurde. Mit Hilfe einer adenoviralen Überexpression von Fto in der Maus konnte die Herzfunktion nach einer kardialen Ischämie deutlich verbessert werden.

In dieser Arbeit wurden hingegen Fto-defiziente Mäuse genutzt, um den Einfluss der Fto-Demethylase im Myokardinfarkt näher zu untersuchen. Hierzu wurde sowohl bei *Fto*^{-/-}- als auch bei *Fto*^{+/+}-Tieren ein myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R) induziert. Erste Analysen zeigten bereits, dass der Verlust von Fto zu einem Erhalt der Herzfunktion nach I/R führte (Simone Gorressen, Ulrich Rüter, unpublizierte Daten).

2. Zielsetzung

Erste Untersuchungen konnten zeigen, dass eine globale Fto-Defizienz in Mäusen zu einem Erhalt der Herzfunktion nach kardialer Ischämie/Reperfusion führte (Simone Gorressen, Ulrich Rütter, unpubliziert). Diese Tiere wiesen eine signifikant bessere Ejektionsfraktion und ein deutlich verbessertes *fractional shortening* auf. Daher soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Fto-Verlustes auf den Myokardinfarkt in Mäusen näher untersucht werden. Hierzu soll zunächst die Infarktgröße in der akuten sowie der subakuten Phase analysiert werden. Da Fto als RNA-Demethylase direkt auf das RNA-Transkriptom wirkt, soll mittels Mikroarray-Analyse der Fto-Verlust auf das Herztranskriptom nach Myokardinfarkt untersucht werden. Eine nachfolgende Signalweganalyse der erhaltenen Daten soll die molekularen Unterschiede in den Fto-defizienten zu den wildtypischen Mäusen verdeutlichen. Die hieraus erhobenen Daten sollen mittels Western-Blot-Analyse geprüft und näher untersucht werden.

Bei den bisher erhobenen Daten, zur verbesserten Herzfunktion nach Myokardinfarkt, wurden ausschließlich Tiere verwendet, die einen globalen Fto-Verlust vorliegen hatten. Daher ist es auch von Interesse zu analysieren, ob der positive Effekt des Fto-Verlustes herzspezifisch ist. Dazu werden Mäuse generiert, bei denen durch Tamoxifen-Gabe ein spezifischer Fto-Verlust in den Kardiomyozyten verursacht wird. Auch hier soll nach kardialer Ischämie die Infarktgröße, die Infarkt Narbe sowie die Herzfunktion analysiert werden.

Von besonderem Interesse ist es, neue Therapieansätze zur Behandlung eines Myokardinfarktes zu entwickeln. Daher soll in einem ersten Versuch, vor sowie nach Induzierung einer kardialen Ischämie, wildtypischen Mäusen ein Fto-Inhibitor verabreicht werden. Um die Wirksamkeit der Behandlung zu untersuchen, wurde auch hier die Infarktgröße in der akuten sowie subakuten Phase analysiert, als auch die Herzfunktion mittels Echokardiographie untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Antikörper

Tabelle 1. Primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung
non-phospho-Akt	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
non-phospho-mTOR	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
non-phospho-PRAS40	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
non-phospho-S6 ribosomal protein	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
non-phospho-TSC2	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
phospho-(Ser2448)-mTOR	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
phospho-(Ser473)-Akt	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
phospho-(Ser939)-TSC2,	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology

phospho-(Thr246)-PRAS40	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
phosphor-(Ser235/236)-S6 ribosomal protein	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
SQSTM1/p62	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
α -Actin	Verwendete Verdünnung 1:2000 (Western-Blot), Sigma-Aldrich, A2066
α -Actinin	Verwendete Verdünnung 1:500 (Färbung auf Kryoschnitten), Abcam, ab 18061
α -Fatso	Verwendete Verdünnung 1:100 (Western-Blot), Santa Cruz Biotechnology, sc-271713
α -LC3B	Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western-Blot), Cell Signaling Technology
α -m ⁶ A	Verwendete Verdünnung 1:250 (Dot-Blot), Synaptic System Nr. 202003

Tabelle 2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung
α -mouse-HRP	Verwendete Verdünnung 1:5000 (Western-Blot), DakoCytomation, P0260
α -rabbit-HRP	Verwendete Verdünnung 1:5000 (Western-Blot), DakoCytomation, P0448

α -rabbit-Cy®3	Verwendete Verdünnung 1:500 (Färbung), Dianova, 711-165-152.
-----------------------	--------------------------------------------------------------

3.2. Chemikalien

Tabelle 3. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4-Hydroxytamoxifen	H6278-50MG, Sigma Aldrich GmbH, München
Acrylamid-Mix 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Betaisodona	Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Bouin's Lösung	Sigma Aldrich, GmbH, München, # HT10132-11
BSA	Invitrogen, Oregon, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Erdnussöl	P2144 Sigma Aldrich
Eselserum	Millipore #S30100ML

Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem #A2937.1000
Evans Blue - Lösung	AppliChem, # A4388,0025
FBS	Invitrogen, Oregon, USA
Glycerol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
GW280264X	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
Heparin	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran	Pirmala critical care
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	VWR International BVBA
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin	Ketaset 100 mg / ml; Zoetis; # 21283
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Rhein	275611-50MG, Sigma Aldrich

Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blue Dye, 0,4 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ultraschallgel	Aquasonic 100 Gel, Parker Laboratories
Xylazin 2 %	Xylazinhydrochlorid; Serumwerk Bernburg

3.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Scientific oder Sigma–Aldrich synthetisiert.

Tabelle 4. Oligonukleotide

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
HPRT	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
IL1α	CATAACCCATGATCTGGAAG	ATTCATGACAAACTTCTGCC
MCP1	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TTGGTGACAAAACTACAGC
TNFα	CTATGTCTCAGCCTCTTCTC	CATTTGGGAACTTCTCATCC
TGFβ	GAGATTTGCAGGTATTGATGG	CAACAACATTAGCAGGAGATG
MMP9	CTTCCAGTACCAAGACAAAG	ACCTTGTTACCTCATTTTG
IL6	GTCTATAACCACTTCACAAGTC	TGCATCATCGTTGTTTCATAC
AKT1S1	GAGGAGGAAGATGAGGAC	TGAAGAGACCTCCATTATCG
TSC2	CTCTGTTTATTATCACCCCTG	TCTTCCATGTAGGATCTGTC
FTO	CGCCTCTCCCCATCTAAATCCT	AAGCCAAGAACAAGTCCATACCTG
NEO	CTGTGCTCGACGTTGTCAGT	GATCCCCTCAGAAGAACTCGT
Cre	GTAGCCTATGCTGTGTCTGG	CCCACCAGCCTTGTCTTAAT
Flox site	TCAATCCTGGGCTAACATTTACCA	TTTATGGCCTTCGGCTTCAC

3.4. Geräte

Tabelle 5. Geräte

Geräte	Hersteller
Beatmungsgerät	Minivent Mircoventilator, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Binokular	Discovery.V8, Zeiss, Oberkochen
Fotokamera	Axiocam MRm, Zeiss, Oberkochen
Fotoprogramm	„AxioVision“ Zeiss, Oberkochen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Heizblock: Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Fischer Scientific ,Perbio Science Deutschland, Bonn
Kryostat	Leica CM 2050S, Wetzlar
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau
Luminescence Image Analyser	LAS-4000 mini, Fujifilm #8692184, Tokyo, Japan
Mikroskop	Axio Imager.A2, Zeiss, Oberkochen
Mikrotom	Leica, Wetzlar
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Schüttler CH-4103	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquelle Western-Blot: Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien USA, #4376357
Ultraschallgerät & Schallkopf	Vevo2100 bzw. Vevo 3100, VisualSonics Inc.
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

3.5. Kits

Tabelle 6. Kits

Funktion	Hersteller
Bioanalyzer Assay	Eukaryote Total RNA Nano, Agilent
Color Prestained Protein Standard	NEB, P7712S

Detektion von apoptotischen Zellen im Gewebe	Click-iT™ Plus TUNEL Assay for <i>In Situ</i> Apoptosis Detection (Invitrogen)
Detektion von Chemilumineszenz	ECL Prime Western-Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München)
Erstellen von cDNA aus RNA Proben	QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen (#205311)
Erstellen von cDNA aus RNA Proben zur weiteren Analyse im Microarray	GeneChip® WT PLUS Reagent Kit 902462; Thermo Fisher Scientific
Färbelösung zur H&E Färbung	Weigerts Eisen Hämatoxylin Lösung (Dr. K. Hollborn & Söhne)
Isolation von RNA aus Gewebeproben	RNeasy Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen (#74804)
Microarray Analyse Assay	Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Gene Expression Microarray
Qubit Assay	RNA HS, Thermo Fisher Scientific
SYBR Green RT-PCR Mastermix	SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) von Thermo Fischer Scientific (#K0221)

3.6. Puffer und Lösungen

Blocking Puffer (Western-Blot)	5 % BSA in TBS-T
DNA-Probenpuffer 6x für Agarosegele	20 % (m/V) Glycerol in TBE-Puffer 0,1 % (m/V) Bromphenolblau
Laemmlipuffer 5x	10 % (m/V) SDS 5 % (m/V) β -Mercaptoethanol 50 % (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Puffer 1	26 mM Natriumchlorid (NaCl) 4,4 mM Kaliumchlorid (KCl) 1,0 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) ad 500 ml ddH ₂ O (Millipore Wasser)
Puffer 2	4 mM Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) 10 mM N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'' - [2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 30 mM 2,3 Butanedione monoxime (BDM) 11 mM Glukose 50 ml Puffer1 1 L ddH ₂ O (Millipore Wasser)

Puffer 3	<p>4 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)</p> <p>10 mM N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'' - [2-ethane sulfonic acid] (HEPES)</p> <p>11 mM Glukose</p> <p>50 ml Puffer1</p> <p>1 L ddH₂O (Millipore Wasser)</p>
Ladepuffer	<p>137 mM Natriumchlorid (NaCl)</p> <p>5,4 mM Kaliumchlorid (KCl)</p> <p>0,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2)</p> <p>1 L ddH₂O (Millipore Wasser)</p> <p>5 µl 1 M CaCl_2 auf 10 ml frisch dazugeben</p>
Phosphate Buffered Saline (PBS)	<p>150 mM NaCl</p> <p>8 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4)</p> <p>1,7 mM NaH_2PO_4 (pH 7,4)</p> <p>10 mM HEPES</p> <p>5,5 mM Glucose</p>
PBS-T	<p>0,05 % (V/V) Tween-20 in PBS</p>
Proteaseinhibitoren	<p>„COMPLETE“ Tabletten, Roche (Mannheim)</p> <p>Eine Tablette gelöst in 2 ml PBS ergibt eine 25-fache Stocklösung.</p>

Sammelgelpuffer (5 %) (SDS-PAGE)	1,72 ml H ₂ O 0,5 ml 30 % Acrylamid-Mix 380 µl 1M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 30 µl APS 3 µl TEMED
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (m/V) SDS
Probenpuffer	8 M Urea 2M Thiourea 12 ml 50 mM Trsi-HCl (pH 8) 3 % SDS 15 g Serva Blue 10 % Glycerol ad 50 ml mit 50 mM Tris-HCl (pH8)
Stripping Puffer (Western-Blot)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % (m/V) SDS 0,1 % β-Mercaptoethanol
TAE Puffer 50x (Agarosegele)	2 M Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA 1 M Essigsäure ad 1000 ml H ₂ O

TBE-Puffer	88 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	88 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris
	0,1 % SDS
	20 % Methanol
	192 mM Glycin
	ad 100 ml H ₂ O
Trenngelpuffer (10%) (SDS-PAGE)	4 ml H ₂ O
	3,3 ml Acrylamid-Mix
	2,5 ml Tris (pH 6,8)
	100 µl APS
	100 µl 10 % SDS
	4 µl TEMED
Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM NaCl
TBS-T	0,05 % (V/V) Tween-20 in TBS

3.7. Versuchsmaterial

Tabelle 7. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1 ml Spritze	Braun, Melsungen, # 9166017V
20 ml Spritze	Braun, Melsungen, # 4606205V
27 G Kanüle	Sterican 100, Braun, Melsungen, # 3200120
5/0 Prolene	Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland
7/0 Prolene	Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland
BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford
Blunt retractor 2,5 mm	Fine Science Tools, Heidelberg, 18200-10
Blunt retractor 5 mm	Fine Science Tools, Heidelberg, 18200-11
Einmalspitzen	Braun, Melsungen
Eppendorf Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen (15 und 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Nitra Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Micro-Mosquito	Fine Science Tools, Heidelberg, 13011-12
Mikro-Nadelhalter	AESCU LAP, Tuttlingen FD31R

Mikro-Schere	Fine Science Tools, Heidelberg, 15000-00
Nadelhalter	Fine Science Tools, Heidelberg, 12003-15
Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg, 11051-10
Pinzette Dumont	Fine Science Tools, Heidelberg, 11251-35
Polyethylenring	P-10
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Schere	Fine Science Tools, Heidelberg, 14088-10
Skalpell	Neolab, Heidelberg, # 11566
Sterilpipetten Costar Stripette	Corning Incorporated, Coming, USA
SuperFrost Plus	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Veterinary Fluosorber	Fluovac Harvard Apparatur, Edenbridge, Kent, UK

3.8. Arbeit mit Mäusen

3.8.1. Tierschutz

Alle Analysen an Mäusen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind nach § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006, BGBl. I S. 1206 von Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt worden. Ebenfalls wurde für die Durchführung der beschriebenen Analysen eine ordnungsbehördliche Ausnahmegenehmigung gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes in der Neufassung vom 25.05.1998, BGBl. I S. 1105 erteilt. Alle durchgeführten Tierversuche wurden über das Aktenzeichen 84-02.04.2013.A396 sowie 84-02.04.2016.A507 genehmigt

3.8.2. Tierhaltung und Verpaarung

Alle in dieser Arbeit genutzten Tiere wurden in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Gezüchtet wurden die $Fto^{-/-}$ - (internationaler Name: C57BL/6J.129Sv(CB6F1)- Fto^{tm1JV}) und $Fto^{+/-}$ - (internationaler Name: C57BL/6J) Tiere aus einer Kreuzung männlicher und weiblicher $Fto^{+/-}$ -C57BL/6J-Mäusen. Diese wurden im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert. Zusätzlich wurden $Fto^{fl/fl}$ -Mäuse (C57BL/6N.Cg- $Fto^{tm1a(EUCOMM)Wtsj}$) und $Cre; Fto^{fl/fl}$ -Tiere (internationaler Name: C57BL/6;Cg-Tg($Fto^{fl/fl}$)(MHCMerCreMer)) aus der Kreuzung mit einer hemizygoten α -MHC-MerCreMer-Maus sowie einer homozygoten $Fto^{fl/fl}$ -Maus. Gehalten wurden die Tiere in Makrolon-Käfigen des Typs 2 bzw. 3, welche mit entstaubtem sowie entkeimtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe) ausgestreut waren. Die Haltung erfolgte bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-80 %, 22-24°C sowie einen 12 stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Zudem hatten die Tiere dauerhaften Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*.

3.8.3. Behandlung von Mäusen

In dieser Arbeit wurden die Tiere in einem Alter von 8 Wochen mit 4-Hydroxytamoxifen (H6278-50MG, Sigma Aldrich) behandelt. Dieses wurde in einem Ultraschallbad in 10 ml Erdnussöl (P2144 Sigma Aldrich) gelöst und den Tieren intraperitoneal (i.p.) injiziert. Der Behandlungszeitraum lag bei 10 Tagen. Die Lagerung der Tamoxifen-Lösung erfolgte bei -20°C.

Eine weitere Behandlung erfolgte mit dem Anthranoid Rhein (275611-50MG, Sigma Aldrich). Es wurde in 10 ml einer 100 mM Tris Lösung pH 7,4 für 4 Stunden im Wasserbad (37°C) gelöst. Die Verabreichung erfolgte oral mit Hilfe einer Schlundsonde (50 mg/kg). Die Behandlung wurde für drei Wochen vor Infarkt-Induzierung oder drei Wochen nach Induzierung der Ischämie durchgeführt. Die Lagerung der Rhein-Lösung erfolgte bei -20°C.

3.8.4. Induktion der Ischämie/Reperfusion unter Verwendung des „close-chest“-Models

3.8.4.1. Anlage der Ligatur

Für die Induktion der Ischämie/Reperfusion wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 16-17 Wochen verwendet.

Zunächst wurden die Tiere gewichtsadaptiert mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kg BW) und Xylazin (10 mg/kg BW) anästhesiert. Anschließend wurden die Mäuse mittels einer peripheren Venenverweilkanüle (20G; Braun) intubiert und an der Beatmungsmaschine angeschlossen (1/3 100 %iger Sauerstoff und 2/3 Raumluft). Das Hubvolumen hierzu betrug 250 µl mit einer Atemfrequenz von 140 Atemzügen/min. Zusätzlich wurde zum Erhalt der Narkose 1,5 % Isofluran hinzugeführt. Zur konstanten Erhaltung der Körpertemperatur von 37°C während des gesamten Eingriffes wurden die Tiere auf einer elektrischen Heizplatte fixiert. Nun wurde die linke Thoraxhälfte rasiert und mittels einer Jodlösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma) desinfiziert. Die Haut wurde durch einen ca. 1 cm langen Schnitt geöffnet, um anschließend eine Thorakotomie im 3. Intercostalraum durchzuführen. Nach Freipräparation des Herzens wurde eine Ligatur der proximalen linken Koronararterie mit einem 7-0 Prolenefaden (Ethicon) angelegt (Abbildung 6 A und B). Die beiden Enden des Prolenefadens wurden anschließend durch einen Polyethylen-Schlauch/-Ring (PE-10) geführt (Abbildung 6 C). Danach erfolgt der Thoraxverschluss mit 5/0 Prolenefaden (Ethicon). Dabei wurden die beiden Enden des vorherigen 7-0 Prolenefaden an beiden Seiten des Knotens aus dem Thorax geführt. Danach wurden die 7-0 Prolenefäden durch die Muskelschicht (M. pectoralis major) geführt und in eine zuvor präparierte Hauttasche platziert. Der Verschluss der Haut erfolgte ebenfalls mit dem 5/0 Prolenefaden. Abschließend erfolgte eine weitere Desinfektion der Haut mit der Jodlösung und die Isofluran Narkose wurde beendet. Sobald die Reflexe der Tiere wieder vorhanden waren, wurde dieses extubiert und

zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gelegt. Zur weiteren postoperativen Analgesierung wurden alle 6-8 Stunden den Tieren Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg, s.c.) injiziert.

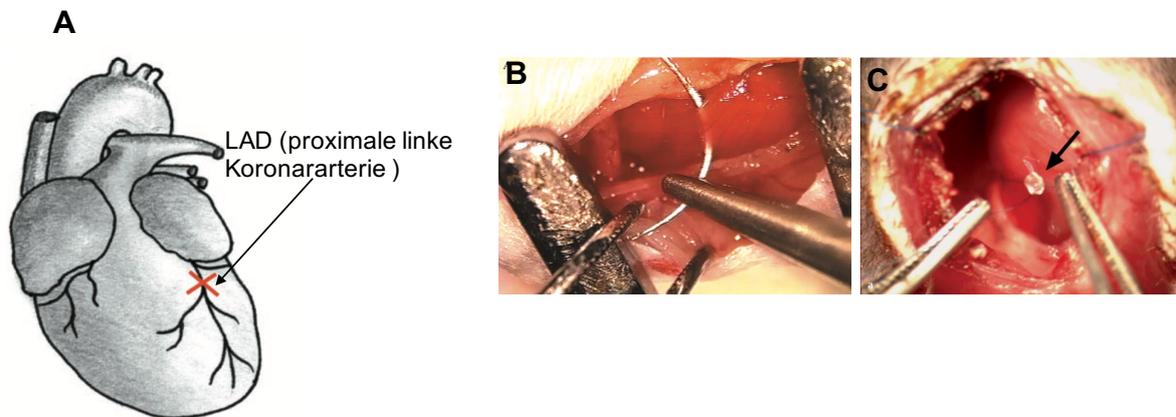


Abbildung 6. Ligatur der proximalen linken Koronararterie. A) Schematische Darstellung der Lager der proximalen linken Koronararterie (LAD= left anterior descending artery). B) Unterstechen der LAD. C) Anlegen der Ligaturschleife mittels eines kleinen Polyethylen-Schlauchs. Modifiziert nach (Dewald et al., 2004; Tarnavski et al., 2004)

3.8.4.2. Induktion der Ischämie

Die Ischämie wurde 3-4 Tage nach Anlage der Ligatur bei geschlossenem Thorax induziert. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran (3 % Isofluran, 1/3 100 % Sauerstoff, 2/3 Raum-Luft) mittels Inhalations-Narkosekammer narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere auf dem beheizten Operationstisch fixiert und über eine Maske weiter anästhesiert (2 % Isofluran, 1/3 100 % Sauerstoff, 2/3 Raumluft). Um den konstanten Erhalt der Körpertemperatur zu gewährleisten, wurde eine rektale Temperaturmessung während der gesamten Operation durchgeführt. Die Haut der Tiere wurde erneut mit Jodlösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma) desinfiziert und zur Kontrolle der Narkose sowie der Ischämie, wurde ein EKG an den Extremitäten angeschlossen. Nun erfolgte das erneute Öffnen des Hautschnittes und die Entnahme der Prolenefäden aus der Hauttasche. Diese werden rechts und links zur Seite weggeführt und an zwei Magnethaltern locker befestigt. Die EKG-kontrollierte Induzierung der Ischämie erfolgte durch einen leichten Zug an den rechts und links befindlichen Magnethaltern. Dies führte zu einer Okklusion der LAD, was im EKG durch eine sofortige ST-Streckenerhebung kontrolliert wurde (Abbildung 7 B). Die Ischämie wurde für 45 min aufrecht gehalten und durch das Zerschneiden der Prolenefäden beendet. Die erfolgreiche Reperfusion wurde ebenfalls im EKG durch Abnahme der ST-Streckenerhebung kontrolliert. Die Haut wurde anschließend wieder mit (5/0) Prolenefäden verschlossen. Während der Aufwachphase

wurden die Tiere mit 100 % Sauerstoff beatmet und zur Schmerzstillung Temgesic (0.05 – 0.1mg/kg, s.c.) subkutan injiziert. Anschließend erfolgte eine postoperative Beobachtung über 24 Stunden mit 6-8 stündiger Gabe von Temgesic (0.05 – 0.1mg/kg, s.c.).

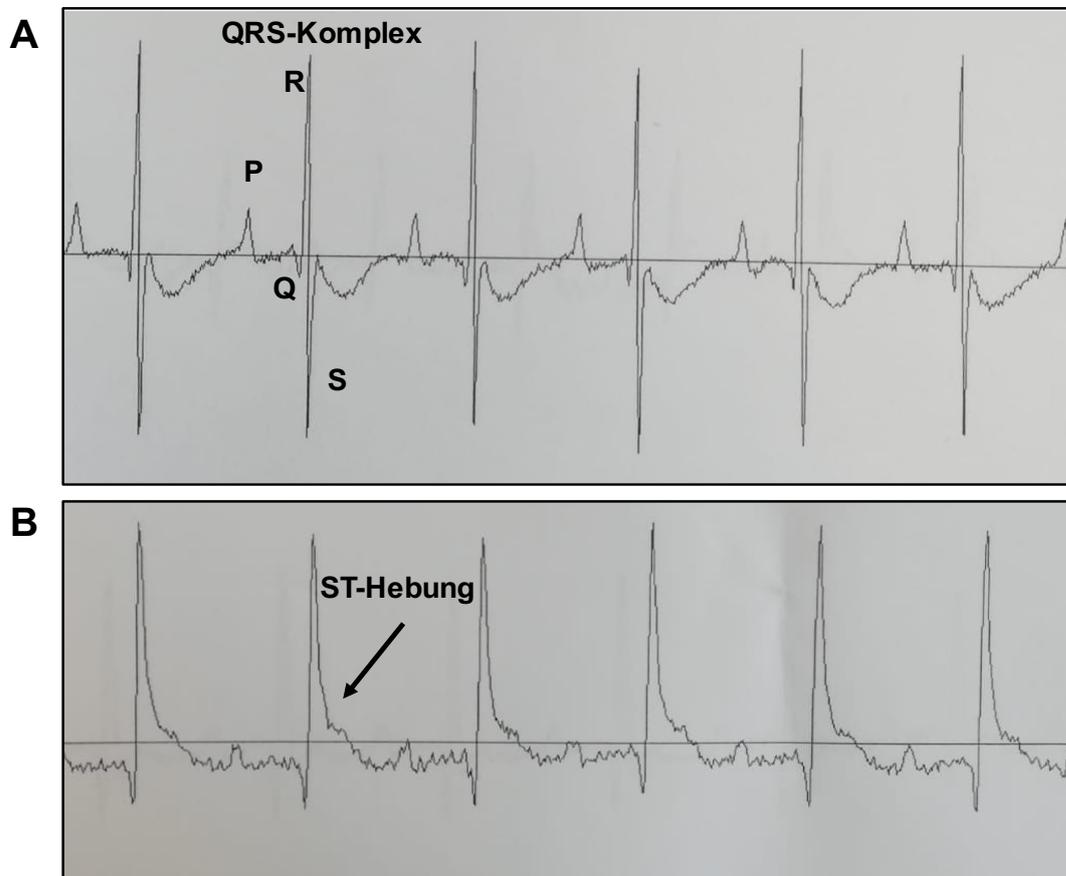


Abbildung 7. Ausschnitte eines Elektrokardiogramms (EKG) eines Mauserzens. A) EKG zum basalen Zustand, vor Induzierung der Ischämie. Die P-Welle entspricht der Depolarisation der Vorhöfe. Der QRS-Komplex entspricht der Depolarisation der Herzkammer. B) EKG nach Induzierung der Ischämie. Die Ischämie-Induktion wurde über die ST-Hebung kontrolliert.

Zur Kontrolle wurden Sham-Tiere operiert. In dieser Gruppe wurde keine Ischämie induziert. Die Prolenefäden wurden lediglich aus der Hauttasche entfernt und mittels EKG wurde kontrolliert das es zu keiner ST-Streckenerhebung kam.

Die Anlage der Ligatur und die Induzierung der Ischämie wurden von speziell ausgebildeten und zugelassenen Mitgliedern (Dr. Simone Goressen, Dominik Semmler) des SFB 1116 („Serviceprojekt“) für die Rhein-Behandlung sowie ein Teil der Fto-defizienten Tiere im chronischen Modell durchgeführt.

3.8.5. Echokardiographie

Die linksventrikuläre Funktionsanalyse des Herzens erfolgte mittels Echokardiographie. Dazu wurde ein Ultraschallgerät mit einem 18–38 MHz Schallkopf (Vevo2100 bzw. Vevo 3100, VisualSonics Inc.) verwendet. Die Tiere wurden, wie zuvor beschrieben, mittels Isofluran narkotisiert und auf eine beheizte Elektroden–Kontakt–Platte gelegt. Die Narkose wurde während des Versuchs mittels einer Atemmaske mit einem Gemisch aus 1-1,5 Vol % Isofluran und 100 % Sauerstoff aufrechterhalten. Die Temperatur, Atmung und Herzfrequenz der Versuchstiere wurden über spezielle Drucksensoren der Platte kontinuierlich überwacht. Um eine gute Bildgebung zu gewährleisten, wurde der komplette Thorax von Haaren befreit und ein Schallgel (Aquasonic 100 Gel, Parker Laboratories) aufgetragen. Untersucht wurden die Zeitpunkte präoperativ als Baseline (BL) und postoperativ im Verlauf von 24 h, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen nach Ischämie. Analysiert wurde das endsystolische Volumen (ESV), das enddiastolische Volumen (EDV), die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und das „fractional shortening“ (FS).

Die Echokardiographischen Untersuchungen wurden von zugelassenen Mitgliedern (Dr. Simone Goessen, Dominik Semmler) des SFB 1116 („Serviceprojekt“) durchgeführt und ausgewertet. Die statistische Auswertung zu den gewonnenen Daten erfolgte durch den Experimentator (Melanie Wehmöller).

3.8.6. Präparation von Mäusen

Die Tiere wurden zunächst durch Einleiten einer Inhalationsnarkose mit Isofluran in einer Kammer getötet. Danach wurde der Thorax geöffnet und das Herz freipräpariert. Mit Hilfe einer Flügelkanüle wurde das Herz anschließend mit PBS perfundiert und entnommen. Wurden die Herzen für weitere Protein- oder RNA-Analysen verwendet, so wurden diese in RNA/later (Qiagen) überführt und in Flüssigstickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur histologischen Analyse wurden die Herzen zunächst in PFA fixiert.

3.8.7. Isolation von Kardiomyozyten aus dem Herzen

Vor Entnahme der Herzen wurde den Tieren 400 U Heparin-Natrium 25 000 (I.E./ 5 ml) (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) i.p. injiziert. 10 min später erfolgte durch zervikale Dislokation die Tötung des Tieres. Das Herz wurde entnommen und anschließend mit der Aorta über eine Kanüle geheftet und mit einem Seidenfaden fixiert. Mit Hilfe einer Spritze

wurde das Herz über die Kanüle mit PBS perfundiert. Anschließend wurde das Herz über die Kanüle an ein Schlauchsystem angeschlossen und nochmals mit Puffer 2 durchspült, um das restliche Blut zu entfernen. Danach erfolgte eine Inkubation mit einer Kollagenaselösung für 6 min bei 30°C (2,8 ml/ min). Anschließend wurde das Herz von der Kanüle genommen und in eine Petrischale überführt, die mit Puffer 1 gefüllt war. Die Vorhöfe wurden abgetrennt und verworfen. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurde danach das Herz für 10 min bei 37°C in Puffer 1 inkubiert. Danach wurde das verdaute Herzgewebe wieder in eine Petrischale überführt und mit einer feinen Schere zerkleinert. Um die Kardiomyozyten aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Gewebestücke mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgesaugt und langsam wieder herausgelassen. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Das erhaltene Lysat wurde durch ein Nylonnetz (Porengröße 150 µm) gegeben, um die Zellen von den übergebliebenen Geweberesten zu trennen. Anschließend erfolgte eine 10 min Sedimentation der Zellen. Das entstandene Pellet enthielt die Kardiomyozyten, da diese größer und schweren sind als die anderen Zelltypen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in Puffer 1 resuspendiert und gewaschen. Abschließend folgten zwei weitere Waschschrte mit Puffer 2 und 3. Die isolierten Zellen wurden zum Schluss in den Probenpuffer zur nachfolgenden Western-Blot-Analyse überführt.

3.9. Molekularbiologische Methoden

3.9.1. DNA-Isolation aus Schwanzspitzen

Zunächst wurde die Schwanzspitzenbiopsie mit 750 µl Dottersackpuffer und 30 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 µl gesättigte NaCl-Lösung (>6 M) hinzugegeben und bei 13000 U/min zentrifugiert. Hierdurch werden ausgefallene Proteine sowie Haare pelletiert. Anschließend wurden 750 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 U/min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet getrocknet bevor es nachfolgend in 250 µl ddH₂O resuspendiert wurde. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

3.9.2. RNA-Isolation aus Mausherzen

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit von Qiagen (#74804). Dazu

wurden die zuvor bei -80°C gelagerten Herzen mit Hilfe des Precellys24-Dual-Systems (Peqlab Biotechnologie, #EQ03119.200.RD000.0) homogenisiert. Es wurden in 2 ml Gefäßen, befüllt mit Keramikkügelchen (Precellys® Keramik-Kit 1,4 mm, 432-3751DE), maximal 50 mg Herzgewebe mit 1 ml QIAzol Lysis Reagenz versetzt. Zusätzlich wurde der Precellys24-Dual mittels Cryolys (Peqlab Biotechnologie, EQ05068-200-RD000.0) auf 4°C gekühlt. Die Homogenisierung erfolgte bei 5000 U/min für 30 Sekunden für zwei Durchläufe. Anschließend wurde das Homogenisat in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 200 μl Chloroform versetzt und für 15 Sekunden vermischt. Die Trennung der RNA von Proteinen und DNA erfolgte bei 12,000 x g für 15 min bei 4°C . Die weitere Aufreinigung der RNA über eine Säule erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Um eine Kontamination durch genomische DNA zu verhindern, wurde ein zusätzliche DNase-Verdau durchgeführt (RNase-Free DNase Set, Qiagen #79254). Auch dieser erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Konzentration der isolierten RNA wurde im Anschluss spektralphotometrisch bestimmt. Die weitere Lagerung der RNA erfolgte wieder bei -80°C .

3.9.3. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren wurde photometrisch mittels Eppendorf Biophotometers bestimmt. Die optische Dichte der Probe wurde bei 230 nm (Polysaccharide), 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) gemessen. Lag ein Verhältnis von $\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 1 : 2 : 1$ vor, wurde die Nukleinsäure Probe als „rein“ bezeichnet. Zusätzlich sollte der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen 1,7 und 2 liegen.

3.9.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten (Mullis *et. al.*, 1987). Durch Verwendung einer spezifischen thermostabilen DNA-Polymerase, werden spezifische DNA-Sequenzen exponentiell vervielfältigt. Zu Beginn des Zyklus wird die Matrizen-DNA bei 98°C denaturiert. Die führt zur Spaltung der DNA-Stränge. Anschließend folgt eine Erniedrigung der Temperatur, hierdurch können sich die Oligonukleotide an die homologen Bereiche der Matrizen-DNA anlagern (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide. Diese wird unter anderem durch die Länge der Oligonukleotide, deren GC-Gehalt und der Salzkonzentration beeinflusst. Um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Nach dem Anlagern der Primer an den Matrizen-Strang, wird die Temperatur auf 72°C erhöht,

welches der optimalen Temperatur der verwendeten DNA-Polymerase entsprach. Diese beginnt vom 3'OH-Ende des angelagerten Oligonukleotides den DNA-Abschnitt zu verlängern (Elongation), welches am Ende zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt führt. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte wird die DNA exponentiell amplifiziert. Die PCR wurde im Thermocycler (PEQLAB Ltd) durchgeführt und verwendet wurde eine Taq-Polymerase.

Standard PCR-Ansatz

Template DNA	100 ng
10 mM dNTPs	0,4 µl
10 µM <i>Forward</i> Primer	1 µl
10 µM <i>Reverse</i> Primer	1 µl
5x Green Taq-Polymerase Puffer (Promega)	4 µl
Taq DNA-Polymerase	1U (0,2 µl)
H ₂ O	ad 20 µl

Standard PCR-Programm

98°C	30 s	Initial Denaturierung	
98°C	10 s	Denaturierung	} 30-40 Zyklen
T _m -5°C	10 s	Annealing	
72°C	15-30 s/kb	Elongation	
72°C	5 min	Finale Elongation	

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und analysiert.

3.9.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. Agarose ist ein Polysaccharid, welches aus Galactose und 3,6-Anhydrogalactose besteht. Diese wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Actetat, 2 mM EDTA pH 8,2) aufgekocht. Beim Abkühlen kommt es zur Vernetzung der Galactose-Moleküle und es bilden sich Agarose-Fäden aus, so dass es zu Porenbildung im Gel kommt. Aufgrund der negativen Ladung an der Phosphatgruppe der Nukleinsäuren wandern diese beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Da die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Nukleinsäuren abhängt, führt dies folglich zur Trennung der DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht.

Um die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, wurde dem Agarosegel 0,05 µl/ml GelRed hinzugegeben. Dieses interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und emittiert Licht nach Bestrahlung mit UV-Licht (256 nm), welches eine Detektion ermöglicht. Zur DNA-Größentrennung wurden 1-2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde abgewogen und mit TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde das GelRed hinzugegeben und das Gel in den Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Nukleinsäureproben wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V bis zur gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die anschließende Dokumentation erfolgte mit dem INTAS iX Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

3.9.6. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA mittels einer speziellen Polymerase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die hierzu verwendete Polymerase stammt aus Viren und besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, wodurch ein komplementärer DNA-Strang gebildet werden kann. Hierdurch entsteht ein RNA-DNA-Hybridstrang, welcher durch eine unspezifische Endoribonuklease-Aktivität hydrolysiert wird, sodass ein freier DNA-Einzelstrang vorliegt. Dieser wird durch die zusätzliche DNA-Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase zu einem DNA-Doppelstrang synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur reversen Transkription das QuantiTect Reverse

Transcription Kit von Qiagen (#205311) verwendet. Zur cDNA Synthese wurde 1 µg der zuvor aus dem Herzen isolierten RNA eingesetzt. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die erhaltenen cDNA Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.9.7. Quantitative „real time“-PCR (q-RT-PCR) Analyse

Bei der quantitative „real time“-PCR handelt es sich um eine spezielle PCR-Methode zur relativen Analyse der RNA-Expression. Die Quantifizierung des jeweiligen Targets erfolgt während der exponentiellen Phase, am Ende jedes Elongations-Zyklus mittels Fluoreszenzmessung. Die neu synthetisierten DNA-Stränge werden Fluoreszenz-markiert, so dass mit Zunahme der DNA-Stränge auch die Fluoreszenz-Intensität steigt. In dieser Arbeit wurde zur Fluoreszenz-Markierung der SYBR-Green Farbstoff verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Cyanin-Farbstoff, der in die kleine Furche der DNA interkaliert. Dieser emittiert bei Anregung grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Amplifikate, kommt es folglich auch zu einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde der SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) von Thermo Fischer Scientific (#K0221) genutzt und im „StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block“ (Applied Biosystems #4376357) angewendet. Die hierzu verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Alle Messwerte wurden in Triplikaten gemessen und zur Quantifizierung wurden der CT-Wert (*Cycle Threshold*/ Schwellenwert-Zyklus) genutzt. Diese Angabe beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz gemessen werden kann. Zur Normalisierung wurde zu jedem gemessenen Gen zusätzlich ein konstitutives Gen („house keeping gen“/ Haushalts-Gen) gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Bei diesem Referenzgen wird davon ausgegangen, dass es konstant in den Zellen exprimiert wird und daher als Abgleich genutzt werden kann. Der Ansatz der qRT-PCR, sowie das verwendete Programm wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Zunächst wurden dazu die CT-Werte des Haushalts-Gens von den CT-Werten des zu untersuchenden Gens abgezogen. Hierdurch ergab sich der ΔCT -Wert, welcher für die Zielgruppe als auch die Referenzgruppe ermittelt wurde (Fto-negative Herzen und Fto-wiltypische Herzen). Die erhaltenen ΔCT -Wert der einzelnen Gruppen wurden nachfolgend nochmals voneinander subtrahiert, wodurch der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert gebildet wurde. Der relative

Expressionsunterschied einer Probe zwischen $Fto^{-/-}$ - Herzen und $Fto^{+/+}$ -Herzen (Ratio) ergibt sich aus $2^{-\Delta\Delta CT}$.

$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Zielgruppe} - \Delta CT \text{ Referenzgrupp}$

Ratio = $2^{-\Delta\Delta CT}$

3.9.8. Mikroarray-Analyse

Die Mikroarray-Analyse wurde von dem BMFZ des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Für die Transkriptom-Analyse wurden jeweils eine Anzahl von vier Mausherzen je Genotyp ($Fto^{+/+}$ und $Fto^{-/-}$) und Kondition (Sham operiert und I/R) genutzt. Die genaue Konzentration der RNA-Proben wurde fluorometrisch mit dem Qubit Assay (RNA HS, Thermo Fisher Scientific) bestimmt und die Qualität der RNA über Kapillarelektrophorese mittels Bioanalyzer Assay (Eukaryote Total RNA Nano, Agilent) untersucht. Für die Transkriptom-Analyse wurden nur RNA-Proben genutzt, die einen hohen „RNA Integrity Numbers“ (RIN; median = 10) -Wert aufwiesen. Von diesen Proben wurden insgesamt 100 ng RNA in cDNA umgeschrieben und mit Biotin markiert. Hierzu wurde das Kit GeneChip® WT PLUS Reagent Kit 902462 von Thermo Fisher Scientific genutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Anschließend wurde die cDNA fragmentiert und an den Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Gene Expression Microarray für 16 Stunden bei 45°C hybridisiert. Die Durchführung wie die Detektion erfolgten nach Herstellerangaben.

3.9.8.1. Statistische Transkriptom-Analyse

Die Datenanalyse der erhaltenen Affymetrix CEL Daten wurden mit der GeneSpring GX Software (Vers. 12.5; Agilent Technologies) durchgeführt. Alle Proben wurden auf eine Signalintensität normalisiert, um die Variabilität unter den verschiedenen Arrays zu minimieren. Alle Probengruppen wurden mit dem GeneSprings ExonRMA16 Algorithmus zusammengefasst (Bolstad et al., 2003). Die Vorprozessierung der Daten wurde durch die Normalisierung aller Proben zur Kontrolle (*baseline transformation*) abgeschlossen.

Anschließend wurden die Proben nach den verschiedenen experimentellen Konditionen gruppiert (z. B. Sham und I/R operierte Herzen). Für den weiteren paarweisen Vergleich muss im jeweiligen Probensatz ein Signal detektierbar sein, das oberhalb des Hintergrundsignals liegt:

- 1) Die unterschiedliche Genexpression wurde statistisch mittels eines Moderator T-Tests ermittelt. Für die erhaltenen p-Werte wurde keine Alphafehler-Kumulierung durchgeführt. Ein p-Wert von ≤ 0.01 wurde als signifikant angenommen.
- 2) Die unterschiedlichen Genexpressionen wurden statistisch mittels einer einfaktoriellen ANOVA getestet. Für die erhaltenen p-Werte wurde keine Alphafehler-Kumulierung durchgeführt. Ein p-Wert von ≤ 0.01 wurde als signifikant angenommen.

Die anschließende hierarchische Clusteranalyse wurde mit der Euklidischen-Distanz und dem Ward's Verfahren durchgeführt.

3.9.8.2. Signalweg-Analyse

Aus den ermittelten Transkriptomdaten wurde eine Signalwegs-Analyse angewendet. Dazu wurde die *Ingenuity Pathway Analyse Software* von Qiagen Bioinformatics genutzt. Durchgeführt wurde eine Core-Analyse unter Verwendung eines *Fold change* von $Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ Sham, von $Fto^{+/+}$ I/R vs. $Fto^{-/-}$ I/R, $Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{+/+}$ I/R und $Fto^{-/-}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ I/R. Zusätzlich wurde eine Vergleichsanalyse von $Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{+/+}$ I/R und $Fto^{-/-}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ I/R durchgeführt. Hierdurch können nochmals deutlich die Unterschiede zwischen $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Herzen nach I/R veranschaulicht werden.

3.9.9. Dot-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der m^6A/m^6A_m -Methylierung der RNA wurde eine Dot-Blot-Analyse durchgeführt. Aus den isolierten RNA-Proben wurde eine Verdünnung von 500 ng/ μ l hergestellt und für 3 min bei 95°C inkubiert. Dies führte zum Aufbrechen von Sekundärstrukturen. Danach wurden 2 μ l der Verdünnungen auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) aufgetragen und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Das Vernetzen der RNA mit der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung für 60 Sekunden. Danach wurde die Membran für 5 min in PBS-T gewaschen. Das Abblockieren der Membran erfolgte mit 5 % BSA, gelöst in PBS-T für 1 Stunde. Die Inkubation mit den anti- m^6A -Antikörper (1:250 gelöst in 5 % BSA in PBS-T; Synaptic System Nr. 202003) erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag folgten 3 Wachschriffe mit PBS-T für je 5 min. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper anti-rabbit IgG-HRP (1:10 000 gelöst in 5 % BSA in PBS-T) wurde bei RT für eine Stunde durchgeführt. Abschließend wurde die Membran nochmals 3x mit PBS-T für je 5

min gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben verwendet und im Luminescence Image Analyser (LAS-4000 mini, Fujifilm #8692184) gemessen. Zur Kontrolle, dass überall die gleichen RNA-Mengen vorlagen, wurde anschließend eine Methylblau-Färbung durchgeführt. Dazu wurde die Membran 1 min in der Färbelösung inkubiert und danach mit PBS-T gewaschen. In dem Bereich, wo die RNA an der Membran gebunden war, trat eine Blaufärbung auf. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mittels der Software „ImageJ“ des National Institute of Health (NIH) USA.

3.10. Histologie

3.10.1. Die TTC/ Evans Blue-Färbung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurde die TTC (2, 3, 5 - Triphenyltetrazoliumchlorid)/ Evans Blue-Färbung angewendet. Nach einer Reperfusion-Zeit von 24 Stunden wurde eine tiefe Narkose durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (90 mg / kg) und Xylazin (15 mg / kg) induziert. Zusätzlich wurden 400 U Heparin-Natrium 25 000 (I.E./ 5 ml) (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) i.p. injiziert, um die Blut-Agglutination zu verhindern. Anschließend erfolgte die Entnahme des Herzens. Die Aorta des Herzens wurde über eine Kanüle gezogen und mit einem Seidenfaden fixiert. Die Perfusion des Herzens erfolgte mittels 0,9 % NaCl-Lösung. Danach erfolgte eine erneute Ligatur der Koronararterie und eine 1 %-Evans Blue-Lösung wurde über die Aorta injiziert. Nach ausreichender Blaufärbung wurde das Herz in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und für 1 Stunde bei -20°C eingefroren. Danach konnte das Herz vom Apex an in 1- 1,5 mm dünne Scheiben geschnitten werden, wodurch 6-8 Scheiben entstanden. Es folgte die Gewichtsbestimmung der Herzscheiben und die anschließende Überführung in die TTC-Lösung. Die Inkubation wurde bei 37°C für 3 min durchgeführt. Anschließend wurden direkt Aufnahmen von den gefärbten Herzschnitten angefertigt. Das durch Evans Blue angefärbte Gewebe war nicht von der Ischämie betroffen. Die Bereiche unterhalb der Ligatur waren weiß oder rot gefärbt. Hierbei handelte es sich um das Risikogebiet (*area at risk*, AAR). Bei den rötlichen Bereichen handelte es sich um noch lebendes Gewebe, welches mittels der TTC-Lösung gefärbt wurde. Durch Dehydrogenasen kommt es zu einer Redox-Reaktion, die die Umwandlung der farblosen Substanz Triphenyltetrazoliumchlorid zu 2, 3, 5 – Triphenyltetrazoliumchlorid bewirkt. Im toten Gewebe liegen keine aktiven Dehydrogenasen vor, wodurch es zu keiner Färbung kommt. Daher erschien das tote Gewebe weiß. Hierbei handelte es sich um das Infarktgebiet. Zur Auswertung der Infarktgröße wurden die verschiedenen Bereiche prozentual in Relation zur Masse des Herzschnittes gesetzt.

Verwendet wurde hierzu die Diskus Software von Hilgers.

3.10.2. Fixierung von Mausherzen in Paraffin

Zur histologischen Analyse des Myokardinfarkts wurden die Herzen 21 Tage nach Induzierung der Ischämie, wie in Abschnitt 2.11.5 beschrieben, präpariert. Nach 24 stündiger Fixierung bei 4°C in 4 % PFA wurden die Herzen kurz in fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 % Ethanol) entwässert. Die Inkubation in der jeweiligen Ethanol-Lösung erfolgte für je 2 Stunden. Danach wurden die Herzen in ein Paraffinbad gegeben und für 4 Stunden inkubiert. Nachfolgend wurde ein Vakuum angeschlossen und die Proben wurden für weitere 4 Stunden inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben im flüssigen Paraffin (Roth) in Einweg-Ausgießformen eingebettet und für 24 Stunden ausgehärtet.

3.10.3. Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Von den in Paraffin eingebetteten Herzen wurden mittels eines Mikrotoms (Leica) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Zu Vergleichbarkeit wurde jedes Herz vom Apex cordis aus begonnen zu schneiden und in 10 Ebenen unterteilt. Dazu wurden jeweils 20 Schnitte auf einem Objektträger (SuperFrost Plus, Roth #H867.1) aufgenommen und anschließend 150 µm verschnitten. Zur Aufnahme der Schnitte wurden diese zuvor in ein 40°C erwärmtes Wasserbad gegeben, bis die Schnitte keine Wellungen mehr aufwiesen. Anschließend folgte zur Fixierung eine weitere Inkubation der Objektträger bei 50°C für 30 min. Die vollständige Trocknung der Schnitte geschah über Nacht bei 37°C.

3.10.4. Anfertigung von Kryoschnitten

Nach 24 stündiger Reperfusion wurden die Herzen, wie in Abschnitt 2.11.5 beschrieben, entnommen und für 24 Stunden bei 4°C in PFA-fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in eine 30 %igen Saccharose Lösung, für mindestens 24 Stunden bei 4°C, um das Gewebe zu entwässern. Danach wurden die Organe in Einweg-Ausgießformen mittels O. C. T. (Sakura Finetechnical #4583) eingebettet und bei -20°C eingefroren. Die Lagerung der Blöcke erfolgte bei -80°C.

Für die nachfolgende Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Proben zunächst im Kryostat (Leica CM 2050S) bei -20°C für 20 min inkubiert. Die Fixierung der Blöcke auf dem Objektträger geschah mittels des O.C.T. Mediums. Wie bereits in Abschnitt 2.13.3 beschrieben wurden zur Vergleichbarkeit die Herzen vom Apex cordis aus in 10 Ebenen geschnitten

(Aufnahme von 20 Schnitten und anschließend 150 µm Verschnitt). Die Dicke der Schnitte betrug 8 µm. Diese wurden auf SuperFrost Plus (Roth #H867.1) Objektträgern aufgenommen. Die Lagerung der Kryoschnitte erfolgte bei -20°C.

3.10.5. Gömöri-Trichrom-Färbung

Zur Analyse der Kollagenarbangröße nach 21 Tagen Reperfusion wurde die Gömöri-Trichrom-Färbung verwendet. Hierzu wurden Paraffinschnitte genutzt, die wie in den Abschnitten 3.10.2 und 3.10.3 beschrieben angefertigt wurden. Für die nachfolgende Analyse wurde aus jeder der 10 Ebenen ein Schnitt für die Färbung verwendet. Zu Beginn wurden die Schnitte für 2 mal 15 min in Xylol vom Paraffin befreit. Anschließend wurde eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 %ige Ethanol-Lösung) für jeweils 5 min durchgeführt. Zuletzt wurden die Schnitte für 5 min in destilliertem Wasser inkubiert. Danach folgte die nächste Inkubation in einer auf 56°C erwärmten Bouin's Lösung (Sigma) für 15 min. Drauffolgend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 5 min gewaschen. Zur ersten Färbung wurden die Schnitte für 5 min in Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung (Dr. K. Hollborn & Söhne) inkubiert und anschließend erneut für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Im zweiten Färbeschritt wurden die Paraffinschnitte für 25 min in die Gömöri-Lösung (0,6 g Chromotrope, 0,3 g Anilinblau, 1 % Essigsäure, 0,8 g Wolframatophosphorsäure-Hydrat) gegeben. Der nachfolgende Waschschrift erfolgte diesmal in einer 0,5 %igen Essigsäure-Lösung (in dest H₂O), um die überschüssige Gömöri-Färbelösung zu entfernen. Die Fixierung der gefärbten Präparate wurde über eine aufsteigende Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 90 % und 2x 100 %ige Ethanol-Lösung) für jeweils 2 min erreicht, sowie einer abschließenden Inkubation für 5 min in Xylol. Die Muskelfasern wurden rot angefärbt und die Zellkerne blau angefärbt. Die Kollagenarbe wurde ebenfalls durch eine Blaufärbung deutlich. Die Dokumentation erfolgte über ein Binokular (Discovery.V8, Zeiss) und ein Mikroskop (Axio Imager A2, Zeiss). Genutzt wurde dazu das Fotoprogramm „AxioVision“ (Zeiss) und die Kamera AxioCam MRm. Analysiert wurde die Kollagenarbangröße in Relation zum linken Ventrikel, der Fibrose-Gehalt sowie die Anzahl der Kardiomyozyten im Narbengewebe. Dies wurde mit Hilfe des Programms „ImageJ“ vom National Institute of Health (NIH) USA durchgeführt.

3.10.6. TUNEL-Färbung

Zu Analyse von apoptotischen Zellen wurde eine TUNEL- (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*) Färbung durchgeführt. Kommt es zur Apoptose einer Zelle, wird die DNA im Zellkern durch Endonukleasen fragmentiert. Hierdurch werden die Hydroxygruppen (3'-OH Gruppe) freigelegt, an denen eine terminale Transferase (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) speziell markierte Nukleotide anfügen kann. Dies ermöglicht z.B. mittels Fluoreszenz die Zellkerne der apoptotischen Zellen sichtbar zu machen.

Untersucht wurden Kryoschnitte von Herzen 24 Stunden nach Reperfusion. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils ein Schnitt aus den 10 Ebenen gefärbt. Diese wurden zunächst mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vektor Laboratories) umrandet und anschließend dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T gewaschen, um das restliche Einbettmedium zu entfernen. Für die TUNEL-Färbung wurde der Click-iT Plus TUNEL Assay von Invitrogen verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Alexa Flour 488 Farbstoff. Die weitere Durchführung geschah nach den Herstellerangaben. Zusätzlich wurden nach der TUNEL-Färbung die Kardiomyozyten mittels eines Aktinin-Antikörpers (Abcam) angefärbt und die Zellkerne mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) sichtbar gemacht. Zur Färbung der Kardiomyozyten wurden die Präparate zunächst mit 10 % Eselsserum (Millipore #S30100ML) in PBS-T für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde der Erstantikörper α -Aktinin (1:200) in 1% Eselsserum in PBS-T auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C, unter Verwendung einer feuchten Kammer, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und die Schnitte dreimal für 10 min in 3 % BSA in PBS gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper α -rabbit-Cy[®]3 (Dianova; 711-165-152) 1:200 in 1 % Eselsserum in PBS-T auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation geschah für 2 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach folgten erneut drei Waschschriffe für je 10 min in 3 % BSA in PBS. Zum Anfärben der Zellkerne wurden 10 μ l DAPI (0,1 μ g/ml) zu dem Mowiol (5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst mit 10 ml Glycerin) gegeben. Zum Schluss wurden die Objektträger mit dem DAPI versetzten Mowiol abgedichtet. Nach dem Aushärten des Mowioles erfolgte die Lagerung im Dunkeln bei 4°C. Alle zuvor beschriebenen Schritte wurden ebenfalls in abgedunkelten Räumen oder lichtundurchlässigen Kammern durchgeführt, um ein vorzeitiges Ausbleichen der fluoreszierenden Zweitantikörper zu verhindern. Die Aufnahme der Färbungen erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.A2, Zeiss). Die Bilder wurden mit dem zugehörigen Fotoprogramm „AxioVision“ (Zeiss) und der Kamera AxioCam MRm Top (Zeiss) erfasst. Zur Überlagerung der Farbkanäle sowie der nachfolgenden Analyse wurde das Programm „ImageJ“ des National Institute of Health (NIH) USA genutzt.

3.11. Protein-biochemische Methoden

3.11.1. Extraktion von Proteinen

Nach Isolation der Mausherzen, wie in Abschnitt 3.8.6 beschrieben, wurde mittels eines Skalpells ein kleines Stück Gewebe abgetrennt und mit Hilfe eines weiteren Skalpells zerkleinert. Anschließend wurde Lämmli-Puffer oder Urea-Puffer hinzugegeben und die Proben bei 95°C für 3 min aufgekocht.

3.11.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein BCA Assay verwendet. Hierfür wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit, von Thermo Fisher Scientific genutzt. Die Standardreihe sowie die Durchführung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.11.3. SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode um Proteine nach ihrem Molekulargewicht voneinander aufzutrennen (Laemmli et al., 1970). Zunächst werden hierzu die Proteine in einem Sammelgel konzentriert, bevor diese in das Trenngel übergehen, um nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt zu werden. Dabei gilt, je höher die Acrylamid-Konzentration im Trenngel, desto kleinere Proteine können sauber voneinander aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10 % bis 15 % verwendet (siehe Tabelle 7). Die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte mittels zwei abgedichteten Glasplatten, zwischen denen das Trenn- bzw. Sammelgel gegossen wurde. Die Zugabe von Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Polymerisierungskatalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter bewirkt eine radikalische Polymerisation, wodurch Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (im Verhältnis 37,5:1) sich miteinander vernetzen. Nach dem Aushärten der Gele wurden diese in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und mit den Proteinproben beladen. Es wurden 5 µl oder 50 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Als Referenz wurde in die erste Kammer ein Proteingrößenstandard gegeben (Color Prestained Protein Standard, P7712S, NEB). Das im Puffer enthaltene SDS bewirkte eine einheitliche negative Ladung der Proteine, wodurch diese im elektrischen Feld zur Anode wanderten. Die Größentrennung der Proteine erfolgte bei 95 V (konstanter Ampere-Wert).

Tabelle 8. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
ddH ₂ O	0,95 ml	0,6 ml	–	1,75 ml
1M Tris/HCl pH 6,8	–	–	–	0,3 ml
1M Tris/HCl pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml	–
20 % SDS	30 µl	30 µl	30 µl	12,5 µl
Acrylamid	1,9 ml	2,25 ml	2,8 ml	0,4 ml
TEMED	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl	2,5 µl
10X APS	30 µl	30 µl	30 µl	12,5 µl

3.11.4. Western-Blot

Die Durchführung basiert auf der erstmaligen Beschreibung dieser Methode von (Renart et al., 1979).

Der Western-Blot ist eine Methode, um Proteine die zuvor in der SDS-Page aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Membran zu übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine PVDF-Membran (Roth) verwendet, welche eine hohe Bindungskapazität besitzt. Hierdurch können die aufgetrennten Proteine später für weitere Untersuchungen genutzt werden. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde ein spezielles Semi-Dry-Blot System genutzt. Es wurden dazu sechs Lagen Whatman 3 MM-Papier und eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) auf die Maße des SDS-Gels zugeschnitten. Auf die Anode der Blotkammer wurden anschließend sechs Lagen in Anodenpuffer getränktes Whatman 3 MM-Papier (VWR, #732-0591) aufgelegt. Dabei waren jeweils 3 Whatman 3 MM-Papiere in Anodenpuffer I (0,3 M Tris-Base, 20 % Methanol, pH 10,4) und 3 Whatman 3 MM-Papiere in Anodenpuffer II (25 mM Tris-Base, 20 % Methanol, pH 10,4) getränkt. Danach folgte die PVDF-Membran, welche zuvor für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend in

Transferpuffer gewaschen wurden. Das SDS-Gel wurde aus der Gelapparatur entnommen und ebenfalls für 1 min in Transferpuffer geschwenkt und danach auf die Membran aufgelegt. Nachfolgend wurden drei weitere Lagen Whatman 3 MM-Papier in Kathodenpuffer III (25 mM Tris-Base, 20 % Methanol, pH 9,4; 40 mM Aminokapronsäure) getränkt aufgelegt. Beim Auflegen der Schichten wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen, die den Transfer der Proteine behindern könnten. Anschließend wurde die Kathode aufgelegt und bei 54 mA pro 9 cm² für 70 min (Bio-Rad Power Supply) wurden die Proteine auf die Membran transferiert. Der Transfer der Proteine wurde anschließend mittels Ponceau-S-Färbung (0,2 % (w/v) Ponceau-S; 3 % Trichloressigsäure (w/v) in ddH₂O) überprüft. Dafür wurde die Membran in die Ponceau-S-Lösung gegeben und kurz geschwenkt. Danach wurde die Membran direkt mit H₂O gewaschen, um die Proteinbanden voneinander zu differenzieren.

3.11.5. Immunodetektion

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurde die PVDF-Membran mit den jeweiligen Antikörpern behandelt. Dazu wurde die Membran für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend bei RT für 1 Stunde mit 5 % BSA in TBS-T geblockt. Dadurch wurden freie Bindungsstellen der Membran gesättigt und unspezifische Bindungen der Antikörper konnten vermieden werden. Der primären Antikörper wurde danach über Nacht bei 4°C unter ständigem schütteln inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnung sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Verdünnung der Antikörper geschah in 5 % BSA in TBS-T. Anschließend folgten erneut drei Waschschrte mit TBS-T für jeweils 10 min. Die sekundären Antikörper (Antikörper 1:5000 verdünnt in 5 % in TBS-T, Tabelle 2) wurden für 1 Stunde bei RT inkubiert. An den verwendeten sekundären Antikörpern war eine Peroxidase gekoppelt, welche eine Oxidation von Luminol mittels Wasserstoffperoxid katalysierte. Durch die Detektion der Chemilumineszenz konnte das Protein auf der Membran sichtbar gemacht werden. Danach wurde zweimal für 10 min mit TBS-T und einmal für 10 min mit TBS gewaschen. Zur Detektion des Signals wurde das ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Luminescence Image Analyser (LAS-4000 mini, Fujifilm #8692184) detektiert und visualisiert. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mittels der Software „ImageJ“ des National Institute of Health (NIH) USA.

3.11.6. Stripping von Western-Blot Membranen

Um sicher zu stellen, dass eine gleichmäßige Beladung der Proteinproben vorlag, wurde nach der Detektion des phosphorylierten Proteins mit einem weiteren Antikörper die Gesamtmenge an Protein analysiert. Dazu mussten zunächst die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Die Membran wurde nach der Detektion einmal für 5 min mit TBS-T gewaschen und danach in 50 ml des Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % (m/V) SDS; 0,1 % β -Mercaptoethanol) überführt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, um alle Reste des Stripping-Puffers zu entfernen. Nachfolgend wurde die Membran erneut für 1 Stunde in Blocking-Puffer inkubiert und für die weitere Immunodetektion, wie zuvor beschrieben in Abschnitt 3.11.5, verwendet.

3.12. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Excel von Microsoft sowie die GraphPad Prism 6 Software genutzt. Die dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (engl. *standard error of mean*) angegeben. Wurden wiederholte Messreihen durchgeführt (z.B. Echokardiographische Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten), erfolgte die Signifikanzanalyse über eine zweifaktorielle ANOVA gefolgt von einem Tukey post-hoc Test. Wurden mehr als drei Gruppen miteinander analysiert, wurde die einfaktorielle ANOVA gefolgt von einem Tukey post-hoc Test angewendet. Bei dem Vergleich von zwei Gruppen miteinander wurde ein Students T-Test angewendet. Die Signifikanzen wurden in folgende Kategorien eingeteilt * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4. Ergebnisse

4.1. Der Einfluss des *Fto*-Verlustes auf die Myokardinfarktgröße

4.1.1. Untersuchung der Herzfunktion *Fto*^{-/-}-Tieren nach kardialer Ischämie

Erste Analysen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass *Fto*^{-/-}-Tiere eine verbesserte Herzfunktion nach kardialer Ischämie mit Reperfusion aufwiesen (Simone Gorressen, Ulrich Rütter, unpublizierte Daten). In der vorliegenden Arbeit soll im genaueren die Auswirkungen des *Fto*-Verlustes auf eine Ischämie/Reperfusions-Schaden untersucht werden.

Die Untersuchung der Herzfunktion erfolgte mittels Echokardiographie, über einen Zeitraum von drei Wochen. Zur genaueren Analyse und weiteren Unterstützung der zuvor erhobenen Daten wurde die n-Zahl der Tiere erhöht sowie weitere Parameter untersucht. In Abbildung 8 sind die Analysen des enddiastolischen Volumens (EDV), des endsystolischen Volumens (ESV), der Ejektionsfraktion (EF) und des „fractional shortening“ (FS) dargestellt. Der erste untersuchte Parameter war das EDV, dies ist das maximale Blutvolumen, das am Ende der Diastole im Ventrikel vorliegen kann. Die Diastole ist hierbei die Füllungsphase des Herzens, bei der sich der Ventrikel ausdehnt. Für das EDV wurde bereits in der Untersuchung vor Myokardinfarkt (*baseline*; BL) ein signifikant geringeres Volumen in den *Fto*^{-/-}-Tieren gemessen. Dies war jedoch auf die Größe der *Fto*-defizienten Mäuse zurückzuführen. Im Vergleich zu wildtypischen Mäusen war diese geringer und somit war auch die Größe des Herzens reduziert. Über den Verlauf von 24 h, 1 Woche und 3 Wochen wurde dieser Unterschied in den *Fto*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Tieren deutlich größer. Besonders drei Wochen nach kardialer Ischämie kam es zu einer klaren Erhöhung des EDV von 25 % in den *Fto*^{+/+}-Tieren im Vergleich zum BL-Wert. In den *Fto*^{-/-}-Tieren hingegen konnte nur eine geringe Zunahme von 15 % gemessen werden (Abbildung 8 A). Das ESV hingegen ist das Blutvolumen, das am Ende der Systole, somit nach Kontraktion des Herzens im Ventrikel vorliegt. Dieses war in den *Fto*^{-/-}-Mäusen nach kardialer Ischämie kaum erhöht im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Mäusen, wo ein sehr deutlicher Anstieg zu beobachten war. Drei Wochen nach kardialer Ischämie war das ESV in den *Fto*^{-/-}-Tieren, verglichen zu den *Fto*^{+/+} Tieren, um 57 % weniger erhöht (35,7 μ l \pm 4,9 μ l zu 61,8 μ l \pm 6,2 μ l) (Abbildung 8 B). Die nachfolgende EF berechnet sich aus dem EDV und dem ESV. Sie bezeichnet das Blutvolumen in Prozent, welches nach Kontraktion des Herzens ausgeworfen wird, bezogen auf das Gesamtvolumen. Dieses war in den *Fto*^{-/-}-Mäusen nach einer und 3 Wochen um 148 % und 133 % höher als in den *Fto*^{+/+}-Mäusen (49,4 \pm 2,1 % versus 33,3 \pm 3 % und 46,8 \pm 3,3 % versus 35,1 \pm 2,7 %)

(Abbildung 8 C). Als letzter Parameter wurde das FS untersucht. Es beschreibt die Verkürzung des Ventrikels während der Kontraktion des Herzens. Dies ist ein relativer Wert der in Prozent angegeben wird und sich aus dem systolischen und diastolischen Diameter der linken Herzkammer berechnet. In den wildtypischen Mäusen kam es 24 Stunden nach Induktion der Ischämie zu einem deutlichen Abfall des FS, welcher nach 1 und 3 Wochen noch stärker wurde. In den *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte hingegen nach Induktion der Ischämie keine Abnahme des FS beobachtet werden. Drei Wochen nach der Ischämie wiesen die *Fto*^{-/-}-Tiere ein um 375 % besseres FS als die *Fto*^{+/+}-Tiere auf (19,81 ± 3,4 % versus 5,21 ± 1,7 %) (Abbildung 8 D). Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass die *Fto*^{-/-}-Tiere eine deutlich bessere Herzfunktion nach kardialer Ischämie aufwiesen als die *Fto*^{+/+}-Tiere. Zudem deutete der geringere Anstieg des EDV und ESV in den *Fto*^{-/-}-Mäusen darauf hin, dass eine geringere Dilatation des linken Ventrikels erfolgte. Demzufolge scheint *Fto* einen bedeutenden Einfluss auf den Verlauf eines Ischämie-/Reperfusionsschadens zu nehmen. In der weiterführenden Arbeit soll nun im genaueren der Einfluss des *Fto*-Verlustes auf den Myokardinfarkt untersucht werden.

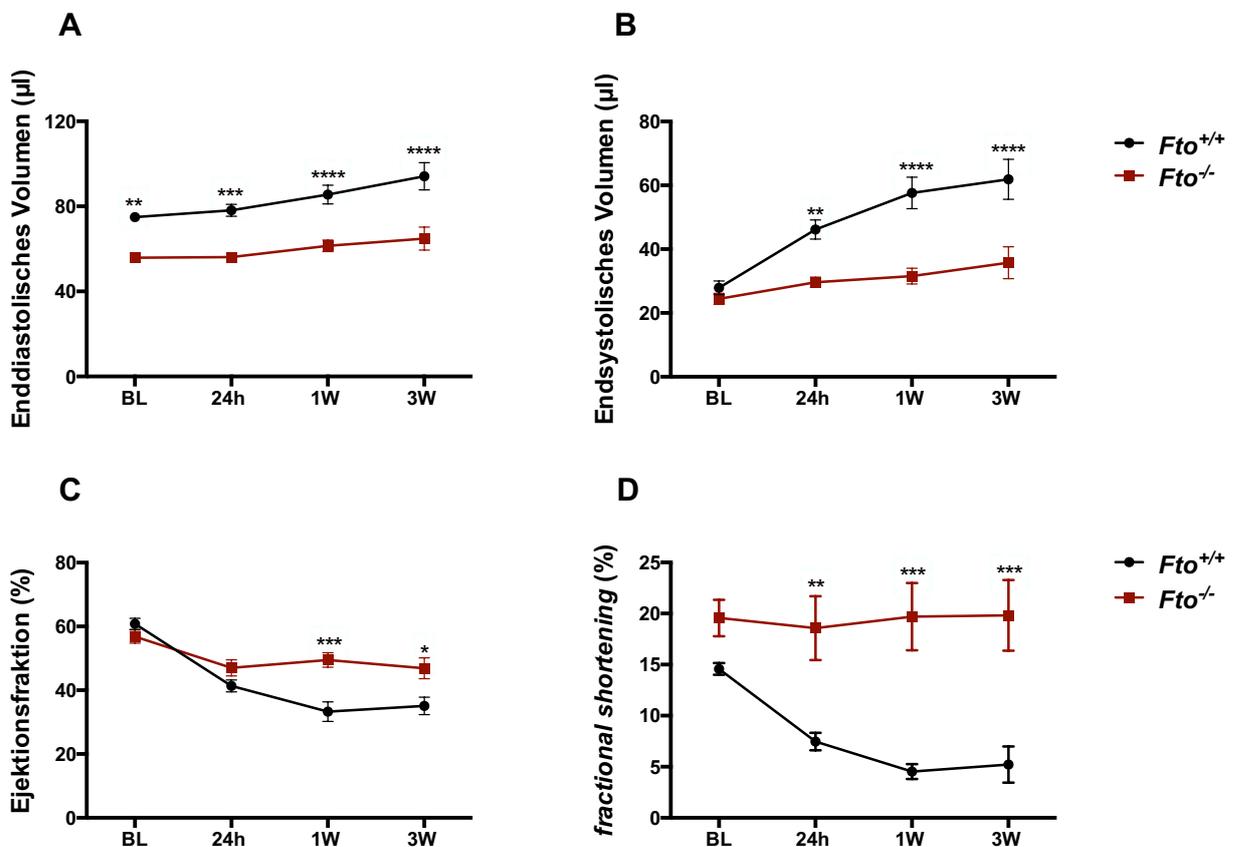


Abbildung 8. Echokardiographische Untersuchung von *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Mäusen zum Zeitpunkt

vor I/R (*Baseline*; BL) und 24 h, 1 und 3 Wochen nach kardialer Ischämie-Induktion. Untersucht wurde das enddiastolische Volumen (A), das endsystolische Volumen (B), die Ejektionsfraktion (C) und das „fractional shortening“ (D). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n=9$ für beide Gruppen. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und anschließenden Tukey's post hoc Test durchgeführt. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

4.1.2. Analyse des Myokardinfarkts 24 Stunden nach einer Ischämie/Reperfusion

Aufgrund der signifikant besseren Herzfunktion der $Fto^{-/-}$ -Tiere, wurde nachfolgend die Infarktgröße 24 Stunden nach Ischämie mittels TTC-/Evans Blue-Färbung analysiert (Abschnitt 3.10.1). Als Kontrolle wurden wie zuvor $Fto^{+/+}$ -Tiere verwendet. Die murinen Herzen wurden nach 24 Stunden Reperfusion entnommen und das Risikogebiet (*area at risk*; AAR) durch Evans Blue-Färbung sichtbar gemacht. Durch die erneute Okklusion der LAD wurde das ischämische Gebiet (AAR) nicht blau eingefärbt (Abbildung 9 A). In den $Fto^{+/+}$ - sowie den $Fto^{-/-}$ -Herzen wurde eine gleich große AAR im Verhältnis zum linken Ventrikel (LV), gemessen (Abbildung 9 B). Daher ist eine veränderte Infarktgröße nicht auf einen Unterschied in dem Risikogebiet zurückzuführen, sondern auf den Einfluss des Fto -Verlustes. Die Infarktgröße wurde im nächsten Schritt durch die TTC-Färbung sichtbar gemacht. Bei den weißen Bereichen handelte es sich um totes Gewebe, welches im gesamten das Infarktgebiet umfasste. Die rot eingefärbten Bereiche stellten das lebende Gewebe dar, welches durch die TTC-Lösung angefärbt wurde. Beim Vergleich der $Fto^{-/-}$ -Herzen mit den $Fto^{+/+}$ -Herzen zeigte sich, dass die $Fto^{-/-}$ -Herzen einen kleineren Infarkt bezogen auf das Risikogebiet aufwiesen (62.36 Infarkt/AAR \pm 2.942 % versus 42.61 ± 5.507 % Infarkt/AAR, Abbildung 9 C). Da das Risikogebiet, wie oben beschrieben, bei beiden Genotypen im Verhältnis zum linken Ventrikel gleich war, zeigt dieses Ergebnis, dass der Verlust von Fto in der akuten Phase zu einem signifikant reduzierten Gewebeschaden führte.

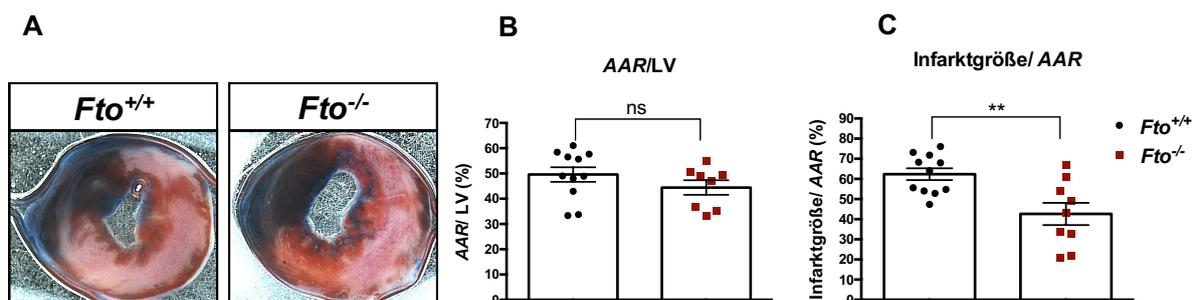


Abbildung 9. $Fto^{-/-}$ -Herzen wiesen im Vergleich zu $Fto^{+/+}$ -Herzen eine verringerte Infarktgröße 24

Stunden nach der Ischämie/Reperfusion auf. (A) Repräsentative Darstellung der TTC-Färbung 24 Stunden nach einer Ischämie. (B) Quantifizierung der AAR (*area at risk*) im Verhältnis zum LV (linken Ventrikel). (C) Quantifizierung der Infarktgröße im Verhältnis zur AAR. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{+/+}$ n= 11; $Fto^{-/-}$ n= 9 Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

4.1.3. Untersuchung der Apoptose 24 Stunden nach kardialer Ischämie

Da ein reduzierter Gewebeschaden möglicherweise auf eine Reduktion der Apoptose zurückzuführen ist, wurde eine TUNEL-Färbung 24 Stunden nach der kardialen Ischämie durchgeführt (Abschnitt 3.10.6). Hierbei werden spezifisch Zellkerne von apoptotischen Zellen angefärbt (Abbildung 10 A). Mittels eines α -Aktinin Antikörpers wurden zusätzlich die Kardiomyozyten gefärbt. Bei der Quantifizierung der $Fto^{-/-}$ -Herzen, im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Kontrollherzen wurde deutlich, dass signifikant weniger TUNEL-positive Zellen vorlagen (Abbildung 10 B). Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines *cleaved Caspase 3* Antikörpers durchgeführt. Gehen Zellen in die Apoptose über, kommt es zur proteolytischen Spaltung der *Caspase 3*. Für die Western-Blot-Analyse wurde Myokardgewebe aus dem ischämischen Bereich, unterhalb der LAD Ligatur, verwendet. Als Ladekontrolle wurde Aktin genutzt. In den $Fto^{-/-}$ -Tieren wurde im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Tieren eine signifikant schwächere Bande für die *cleaved Caspase 3* detektiert (Abbildung 10 C). Bei Betrachtung des Verhältnisses von *cleaved Caspase 3* zu *Caspase 3* zeigte sich, dass dieses in den $Fto^{-/-}$ -Herzen signifikant geringer war, als in den $Fto^{+/+}$ -Herzen (Abbildung 10 D). Sowohl die TUNEL-Färbung, als auch die Western-Blot-Analyse der *Caspase 3*-Aktivierung, wiesen auf eine reduzierte Apoptose in den $Fto^{-/-}$ -Herzen hin.

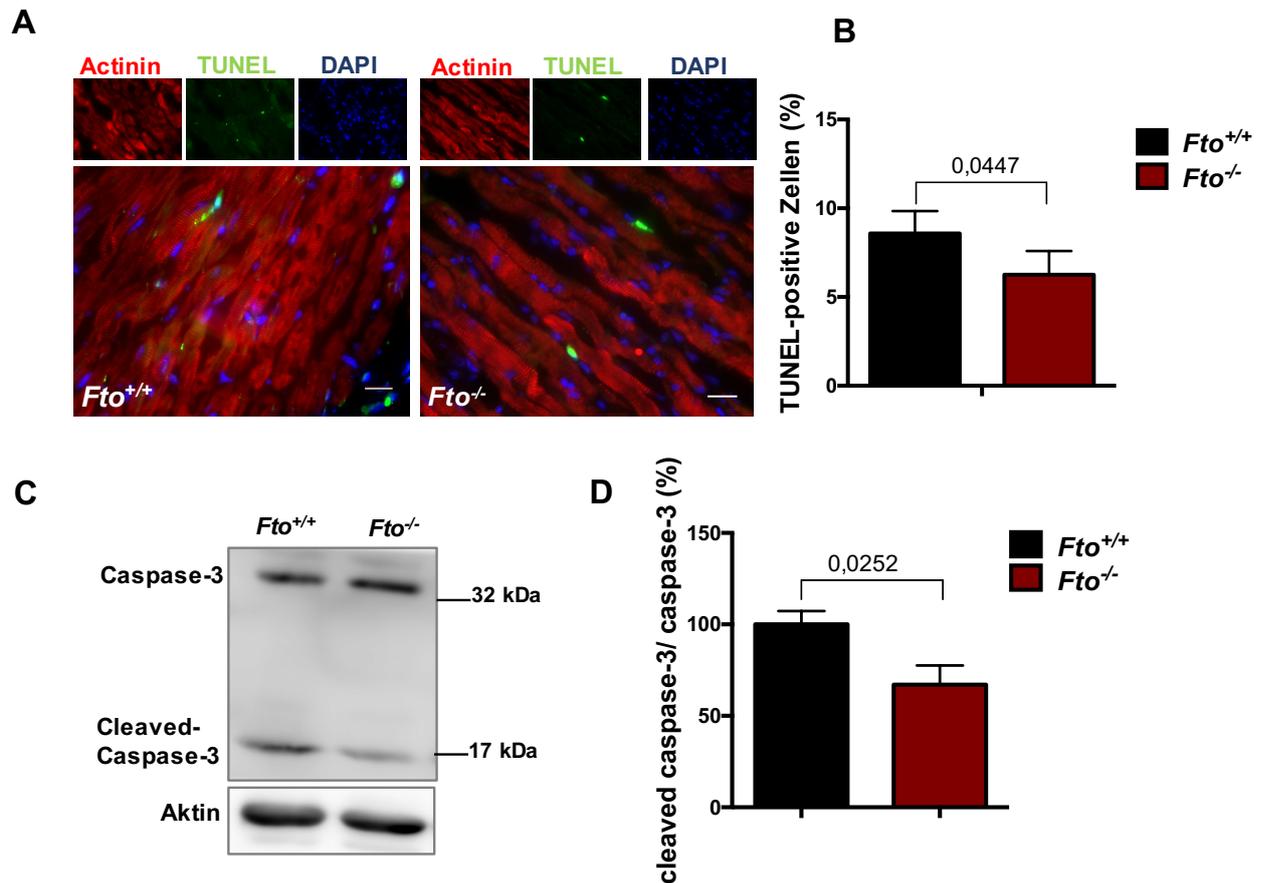


Abbildung 10. *Fto*^{-/-}-Herzen wiesen eine reduzierte Apoptose im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Herzen auf. (A) Repräsentative Abbildungen der TUNEL-Färbung. Die Kardiomyozyten wurden mit einem α -Aktinin Antikörper gefärbt. (B) Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen. In *Fto*^{-/-}-Herzen waren deutlich weniger TUNEL-positiv zu detektieren als in *Fto*^{+/+}-Herzen. n=5 (C) Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten aus dem infarzierten Bereich des LV 24 h nach kardialer Ischämie von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Herzen. Repräsentative Abbildungen der Ladekontrolle Aktin, sowie der *Caspase* 3 und dessen gespaltener Form, der *cleaved Caspase* 3. (D) Quantitative Auswertung des *cleaved Caspase* 3/*Caspase* 3 Verhältnisses. Die Normalisierung erfolgte zu der *Fto*^{+/+}-Kontrolle und wurde in Prozent (%) dargestellt. In den Gewebeproben der *Fto*^{-/-}-Herzen lag signifikant weniger *cleaved-Caspase* 3 vor als in den *Fto*^{+/+}-Herzen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, n=6. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

4.1.4. Untersuchung der Infarktnarbe von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Herzen drei Wochen nach kardialer Ischämie

Nach der zuvor beobachteten Reduktion der Apoptose und der Infarktgröße in $Fto^{-/-}$ -Tieren in der akuten Phase, wurde nachfolgend in der chronischen Phase die Infarktnarbe drei Wochen nach Ischämie untersucht. Zudem wurde die Herzstruktur näher analysiert, um weitere Informationen zum kardialen *Remodeling* zu erhalten. Dazu wurde eine Gömöri-Trichrom-Färbung durchgeführt (Abschnitt 3.10.5), um vor allem extrazelluläre Matrix-Bestandteile, wie beispielsweise Kollagen anzufärben (Abbildung 11 A). Zunächst wurde die Infarktgröße relativ zum LV bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass in den $Fto^{-/-}$ -Tieren eine deutlich kleinere Infarktgröße/LV im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Tieren vorlag (Abbildung 11 B). Nachfolgend wurde die Wanddicke des linken Ventrikels im Infarktbereich analysiert. Dabei zeigte sich, dass die $Fto^{-/-}$ -Herzen in den Ebenen 3 bis 10 eine deutlich dickere Ventrikelwand besaßen als die $Fto^{+/+}$ -Herzen der Kontrolltiere (Abbildung 11 C). In den nächsten beiden Analysen wurde der Narbenbereich um das 400-fache vergrößert, um die Gewebestruktur zu untersuchen. Betrachtet wurden die Fibrose sowie die Anzahl an Kardiomyozyten im Narbengewebe. Die Fibrose beschreibt die Vermehrung von Bindegewebsfasern welches zu einer Gewebeverhärtung des LV führt. Hierdurch sowie dem Verlust von Kardiomyozyten wird die Kontraktionsfähigkeit des LV stark beeinträchtigt (Prabhu and Frangogiannis, 2016). In den $Fto^{-/-}$ -Herzen war eine geringere Fibrose messbar als in den $Fto^{+/+}$ -Herzen (Abbildung 11 D und E). Dies zeigte sich dadurch, dass der blau gefärbte extrazelluläre Matrix-Anteil in den $Fto^{+/+}$ -Kontrolltieren deutlich höher war als in den $Fto^{-/-}$ -Tieren. Zudem konnte eine höhere Anzahl an Kardiomyozyten im Narbengewebe nachgewiesen werden (Abbildung 11 D und F). Demzufolge scheint es in den $Fto^{-/-}$ -Tieren zu einer geringeren Ausdünnung der linken Ventrikelwand während des *Remodelings* zu kommen. Die erhöhte Anzahl der Kardiomyozyten kann zusätzlich zum Erhalt der Kontraktionsfähigkeit beitragen.

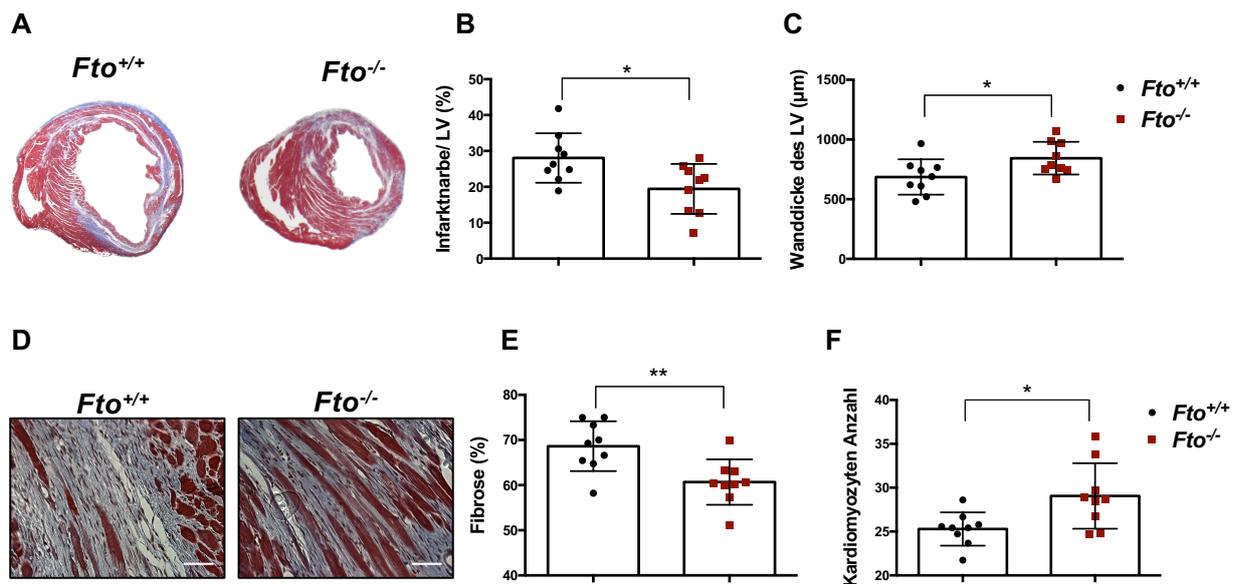


Abbildung 11. *Fto*^{-/-}-Tiere wiesen eine kleinere Infarkt Narbe und höhere Wanddicke auf. Darüber hinaus zeigten die *Fto*^{-/-} Tiere in der Narbenregion weniger Fibrose sowie eine erhöhte Anzahl an Kardiomyozyten. (A) Repräsentative Bilder der Gömöri-Trichrom-Färbung 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (B) Quantifizierung der Infarkt Narbengröße in Prozent zur Größe des LV. (C) Quantifizierung der Wanddicke des LV in μm. (D) 400-fache Vergrößerung der Gömöri-Trichrom-Färbung. Der Maßstab entspricht 50 μm. (E) Quantifizierung der Fibrose in der Infarkt Narbe. (F) Quantifizierung der Kardiomyozyten-Anzahl in der Infarkt Narbe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, n=9. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

4.2. Der Einfluss des *Fto*-Verlustes auf die mRNA-Expression

4.2.1. Die Expression von pro-inflammatorischen Markern in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Herzen 24 Stunden nach kardialer Ischämie

Die inflammatorische Antwort und die Zytokinexpression sind wichtige Prozesse zur Heilung eines Myokardinfarktes. Zytokine und Chemokine werden kurz nach Auftreten des Gewebeschadens sekretiert und können an der Apoptose oder dem Überleben von Kardiomyozyten beteiligt sein (de Haan et al., 2013; Prabhu and Frangogiannis, 2016). Daher wurde eine Expressionsanalyse verschiedener Zytokine und Chemokine nach 24 stündiger Reperfusion durchgeführt (Abschnitte 3.9.2, 3.9.6 und 3.9.7.) Untersucht wurde der ischämische sowie nicht ischämische Bereich von Sham- und I/R-operierten Herzen von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Bei den Sham Kontroll-Tieren wurde wie in Abschnitt 3.8.4.1 die Ligatur-Anlage durchgeführt aber keine Ischämie induziert. Die Expression wurde normalisiert

zu den *Fto*^{+/+} Sham-Kontrollen und in Prozent angegeben. Analysiert wurden die Gene *Il-1 α* , *Il-6*, *Mcp1*, *Tnf- α* , *Tgf- β* und *Mmp9*. Bei allen untersuchten Genen lag eine erhöhte Expression in den infarzierten Herzen, im ischämischen, als auch in dem nicht ischämischen Bereich vor (Abbildung 12). Allerdings lag in den Sham-operierten Herzen der *Fto*^{-/-}-Tiere verglichen zu den Sham *Fto*^{+/+}-Kontrollen bereits eine erhöhte Expression der Gene *Il-1 α* , *Il-6* und *Tnf- α* vor (Abbildung 12 A, B und D). Bei *Mmp9* konnte hingegen in den *Fto*^{-/-}-Herzen eine deutliche Reduktion in der Expression sowohl in der Sham-Gruppe, als auch in der I/R-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 12 F). Nach kardialer Ischämie konnte eine signifikante Reduktion in der Expression von *Mcp1* und *Tgf- β* im ischämischen Bereich von *Fto*^{-/-}-Herzen gemessen werden (Abbildung 12 C, E und F). Auch für *Il-1 α* konnte eine verminderte Expression in *Fto*^{-/-}-Herzen beobachtet werden (Abbildung 12 A). Für die Expression von *Il-6* und *Tnf- α* konnte hingegen kein Unterschied zwischen *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Herzen gemessen werden (Abbildung 12 B und D). Zusätzlich wurde die Expression im nicht ischämischen Bereich, das heißt oberhalb der LAD Ligatur, des LV analysiert. Hier wurde eine signifikante Reduktion in der Expression von *Il-6* und *Mcp1* in den *Fto*^{-/-}-Herzen detektiert (Abbildung 12 B und C). Für die anderen Zielgene *Il-1 α* , *Tnf- α* , *Tgf- β* und *Mmp9* konnte im nicht ischämischen Bereich kein Expressions-Unterschied in den *Fto*^{-/-}-Herzen, verglichen zu den *Fto*^{+/+}-Herzen, beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den *Fto*^{-/-}-Herzen insgesamt eine verringerte Expression von *Mcp1*, *Tgf- β* und *Mmp9* vorlag.

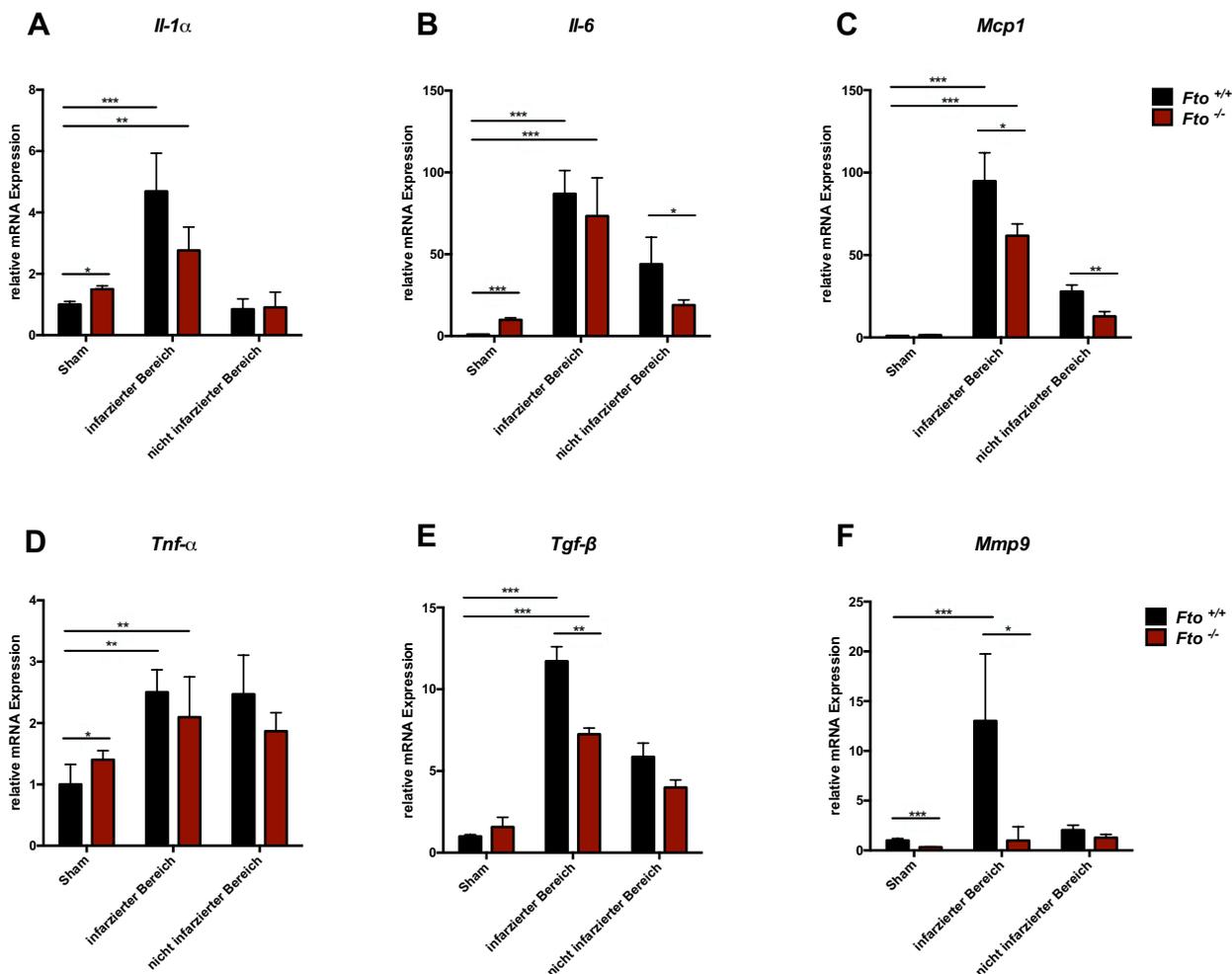


Abbildung 12. Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Marker im ischämischen und nicht ischämischen Bereich. Mittels qRT-PCR wurden die Gene *Il-1α*, *Il-6*, *Mcp1*, *Tnf-α*, *Tgf-β* und *Mmp9* untersucht. Als Kontrolle dienten Sham operierte Herzen in denen keine Ischämie induziert wurde. Analysiert wurde der ischämische Bereich (Gewebe des LV unterhalb der LAD Ligatur) sowie der nicht ischämische Bereich (Gewebe des LV oberhalb der LAD Ligatur). Das Herzgewebe wurde 24 Stunden nach Myokardinfarkt entnommen und die RNA isoliert. Die Expression wurde in Bezug zu den *Fto*^{+/+} Sham-Kontrollen in Prozent angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, *Fto*^{+/+} n=6; *Fto*^{-/-} n=7. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001

4.2.2. Mikroarray-Analyse *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Herzen 24 Stunden nach kardialer I/R

Es ist bekannt, dass 30 % aller mRNAs eine potentielle m⁶A_m-Methylierungsstelle in Verbindung mit einem N⁷-Methylguanin (m⁷G, Cap-Struktur) am 5'-Ende der RNA aufweisen

(Mauer et al., 2017). Wird diese spezifische Methylierungsstelle von Fto-demethyliert, wird die mRNA destabilisiert und abgebaut. Demzufolge kann der Verlust von Fto bis zu 30 % der gesamten mRNA-Expression beeinflussen und hierdurch zu weiteren indirekten Expressionsveränderungen anderer Gene führen (Mauer et al., 2017). Dies kann letztendlich die Proteintranslation beeinflussen und folglich zu Abweichungen in der Signalwegs-Aktivierung führen. Daher wurde im Weiteren eine Mikroarray-Analyse durchgeführt, deren Daten nachfolgend zur Signalwegs-Analyse genutzt wurden. Dazu wurde die gesamte RNA aus dem infarzierten LV von Sham- sowie I/R-operierten Tieren isoliert (Abschnitte 3.9.2). Anschließend folgte die Qualitätskontrolle der RNA und die Durchführung des Mikroarrays (Abschnitt 3.9.8). Dabei wurden nur RNA-Proben mit einem RIN Faktor von mindestens 9 verwendet. In der statistischen Auswertung wurden insgesamt vier Vergleiche durchgeführt ($Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ Sham; $Fto^{+/+}$ I/R vs. $Fto^{-/-}$ I/R und $Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{+/+}$ I/R; $Fto^{-/-}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ I/R) (Abschnitt 3.9.8.1). Aus den hieraus erhaltenen Datensätzen wurde anschließend eine Signalwegs-Analyse durchgeführt (Abschnitt 3.9.8.2). Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in Abbildung 13 bis 16 aufgeführt. Aufgelistet wurden die Signalwege nach ihren berechneten p-Werten, angefangen mit dem höchsten p-Wert. In dem zugehörigen Balkendiagramm wurde der Anteil der betroffenen Gene in Prozent dargestellt. Durch farbliche Markierung wurde zusätzlich angegeben, wie viele Gene hoch- bzw. runterreguliert sind. Beim basalen Vergleich von $Fto^{+/+}$ Sham- mit $Fto^{-/-}$ Sham-Herzen konnten erste Signalwege identifiziert werden, welche eine Fto-abhängige veränderte Aktivität aufwiesen (Abbildung 13). In den weiteren Vergleichen zwischen $Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{+/+}$ I/R und $Fto^{-/-}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ I/R wurde deutlich, dass es 24 Stunden nach einem I/R-Schaden zu einer Hochregulation vieler Gene kam. Dies deutete auf eine Aktivitätsänderung in den aufgelisteten Signalwegen hin (Abbildung 14 und Abbildung 15). Dabei war auffällig, dass in beiden Gruppen ähnliche Signalwege betroffen waren, allerdings mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten. Der deutlichste Unterschied lag bei den Signalwegen „*eIF2 Signaling*“, „*Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*“ und „*mTOR Signaling*“ vor. Bei der Analyse der $Fto^{+/+}$ -Herzen ($Fto^{+/+}$ Sham vs. $Fto^{+/+}$ I/R) waren die Signalwege „*eIF2 Signaling*“ und „*Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*“ am signifikantesten verändert (Abbildung 14). In der Analyse des Datensatzes der $Fto^{-/-}$ -Herzen ($Fto^{-/-}$ Sham vs. $Fto^{-/-}$ I/R) hingegen schienen diese Signalwege unterschiedlich stark verändert zu sein, verglichen zu der $Fto^{+/+}$ -Gruppe und ordneten sich erst an Position 9 und 20 ein (Abbildung 15). Der mTOR-Signalweg wurde in der $Fto^{+/+}$ -Gruppe an Position 5 gelistet ist, nahm aber in der $Fto^{-/-}$ -Gruppe nur Position 10 ein.

Im letzten Vergleich zwischen $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Tieren nach I/R wurden ebenfalls die zuvor auffälligen Signalwege genannt. Besonders bei der Betrachtung der Signalwege „*eIF2 Signaling*“ und „*Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*“ war der überwiegende Anteil der

Gene runterreguliert (Abbildung 16). Diese Signalwege sind vor allem an der Proteinsynthese und deren Regulation beteiligt. Auch im mTOR-Signalweg wurde ein geringerer Anteil an runterregulierten Genen berechnet. Die Proteinsynthese und die Regulation des Signalwegs „*Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*“ erfolgt über den mTOR-Signalweg. Zudem ist es bekannt, dass der mTOR-Signalweg einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf eines Myokardinfarkts haben kann. Daher wurde in den nachfolgenden Analysen die Aktivität des mTOR-Signalwegs auf Proteinebene genauer untersucht.

***Fto*^{+/+} Sham vs. *Fto*^{-/-} Sham**

■ runterreguliert
 ■ hochreguliert
 Keine Übereinstimmung mit dem Datensatz
 ■ Relativer p-Wert



Abbildung 13. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter *Fto*^{-/-}-Herzen verglichen mit *Fto*^{+/+}-Herzen. Die RNA wurde 24 Stunden nach Sham-Operation aus dem LV unterhalb der Ligatur-Schleife isoliert und für die Mikroarray-Analyse genutzt. Die nachfolgende Signalwegs-Analyse erfolgte mittels der IPA Software von Qiagen. Dargestellt wurden die berechneten veränderten Signalwege, sortiert nach ihren p-Werten. Die Zahlen rechts neben dem Balkendiagramm geben die gesamte Anzahl aller Gene an, welche zu dem angegebenen Signalweg gehören. Im Balkendiagramm wurde der Anteil an Genen in Prozent dargestellt, welche in ihrer Expression

abwichen.



Abbildung 14. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter *Fto*^{+/+}-Herzen verglichen mit I/R-operierte *Fto*^{+/+}-Herzen. Die RNA wurde 24 Stunden nach Sham-Operation bzw. nach Induktion der Ischämie aus dem LV unterhalb der Ligatur-Schleife isoliert und für die Mikroarray-Analyse genutzt. Die nachfolgende Signalwegs-Analyse erfolgte mittels der IPA Software von Qiagen. Dargestellt wurden die berechneten veränderten Signalwege, sortiert nach ihren p-Werten. Die

Zahlen rechts neben dem Balkendiagramm geben die gesamte Zahl aller Gene an, welche zu dem angegebenen Signalweg gehören. Im Balkendiagramm wurde der Anteil an Genen in Prozent dargestellt, welche in der Expression abweichen. Der rote Kasten markiert jene Signalwege, die beim Vergleich von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Herzen vor und nach I/R, die größten Unterschiede in den Wahrscheinlichkeiten aufwiesen.

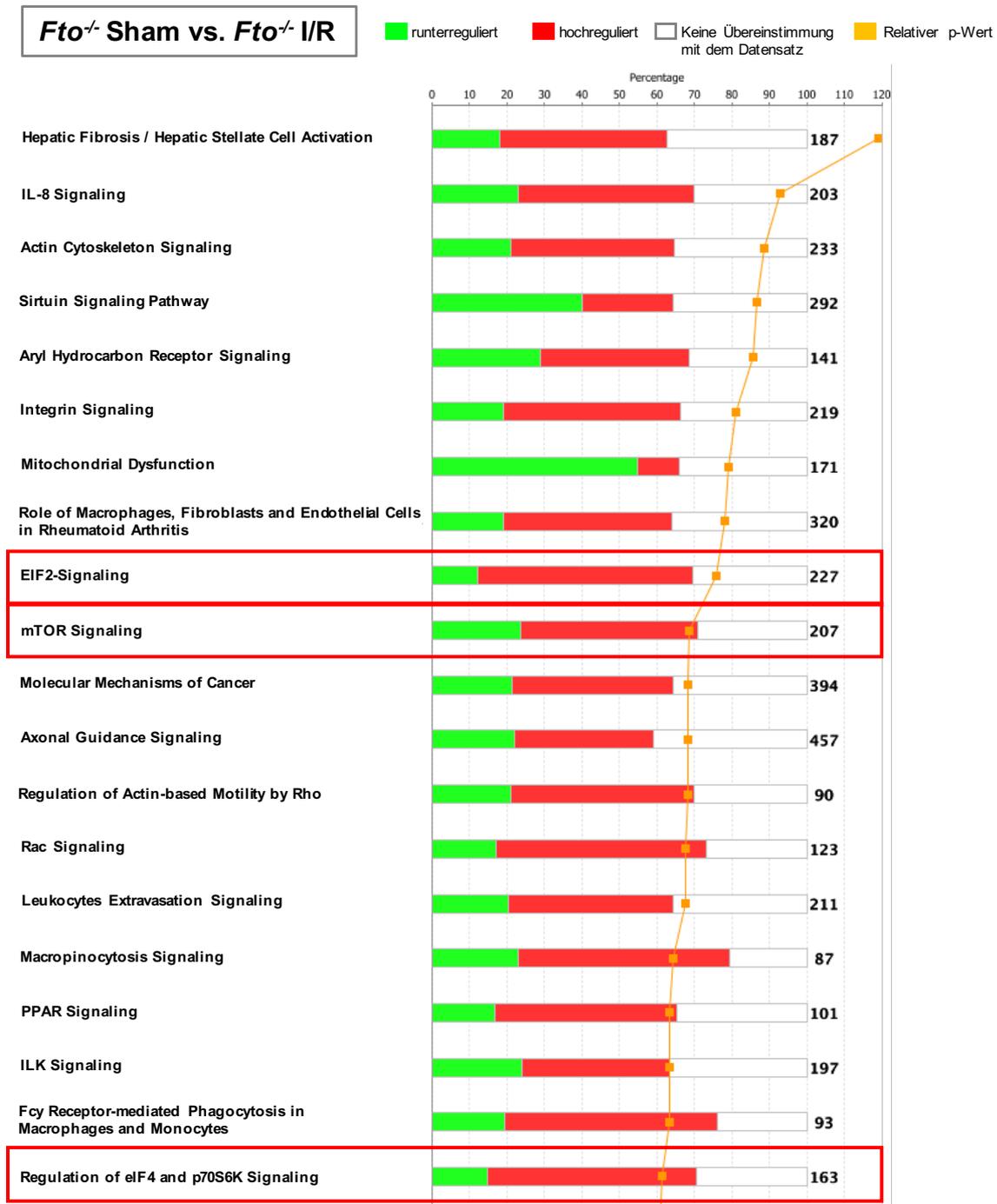


Abbildung 15. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten

Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von Sham-operierter *Fto*^{-/-}-Herzen verglichen mit I/R-operierte *Fo*^{-/-}-Herzen. Die RNA wurde 24 Stunden nach Sham-Operation bzw. nach Induktion der Ischämie aus dem LV unterhalb der Ligatur-Schleife isoliert und für die Mikroarray-Analyse genutzt. Die nachfolgende Signalwegs-Analyse erfolgte mittels der IPA Software von Qiagen. Dargestellt wurden die berechneten veränderten Signalwege, sortiert nach ihren p-Werten. Die Zahlen rechts neben dem Balkendiagramm geben die gesamte Zahl aller Gene an, welche zu dem angegebenen Signalweg gehören. Im Balkendiagramm wurde der Anteil an Genen in Prozent dargestellt, welche in der Expression abweichen. Der rote Kasten markiert jene Signalwege, die beim Vergleich von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Herzen vor und nach I/R, die größten Unterschiede in den Wahrscheinlichkeiten aufweisen.



Abbildung 16. Graphische Darstellung der ersten 20 veränderten Signalwege, mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten für Änderungen von I/R-operierter *Fto*^{+/+}-Herzen verglichen mit I/R-operierte *Fto*^{-/-}-Herzen. Die RNA wurde 24 Stunden nach Sham-Operation bzw. nach Induktion der Ischämie aus dem LV unterhalb der Ligatur-Schleife isoliert und für die Mikroarray-Analyse genutzt. Die nachfolgende Signalwegs-Analyse erfolgte mittels der IPA Software von Qiagen. Dargestellt wurden die berechneten veränderten Signalwege, sortiert nach ihren p-Werte. Die Zahlen rechts neben dem Balkendiagramm geben die gesamte Zahl aller Gene an, welche zu dem angegebenen

Signalweg gehören. Im Balkendiagramm wurde der Anteil an Genen in Prozent dargestellt, welche in der Expression abweichen. Der rote Kasten markiert jene Signalwege, die beim Vergleich von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Herzen vor und nach I/R, die größten Unterschiede in den Wahrscheinlichkeiten aufwiesen.

4.3. Der Fto-Verlustes führt zu Veränderungen im mTOR-Signalweg

4.3.1. Fto-defiziente Tiere wiesen eine reduzierte mTORC1-Aktivität auf

Für die genauere Untersuchung der Ergebnisse aus der Mikroarray-gestützten Signalwegs-Analyse, wurde zunächst auf Proteinebene die Aktivität des mTORC1- und mTORC2-Komplexes analysiert. Hierzu wurde der Phosphorylierungs-Status der Zielproteine mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert (Abschnitt 3.11.3, 3.11.4, 3.11.5). Dazu wurden Proteinlysate aus dem infarzierten Bereich des LV 24 Stunden nach Myokardinfarkt verwendet. Als Kontrolle dienten wie zuvor die Sham-operierten Herzen, in denen keine Ischämie induziert wurde. Der mTORC2-Komplex ist für die Aktivierung von AKT (*serine/threonine-protein kinase*) über Phosphorylierung des Ser 473 verantwortlich (Sarbassov et al., 2005; Saxton and Sabatini, 2017). Bereits in Sham-operierten $Fto^{-/-}$ -Herzen konnte ein signifikant erhöhtes Phosphorylierungs-Verhältnis von phospho-(Ser473)-AKT/AKT im Vergleich zur $Fto^{+/+}$ -Kontrolle gemessen werden. 24 Stunden nach kardialer Ischämie kam es zu einem Anstieg des phospho-AKT-Anteils in den $Fto^{+/+}$ -Herzen. In den $Fto^{-/-}$ -Herzen konnte hingegen keine erhöhte Menge an phosphoryliertem AKT beobachtet werden (Abbildung 17 A). Insofern kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Beeinträchtigung des mTORC2-Signalweges kam. Stattdessen schien eine erhöhte Aktivität vorzuliegen. Der mTORC1-Komplex reguliert unter anderem die Proteinsynthese und aktiviert den eIF4 und p70S6 Kinase 1 Signalweg (Nojima et al., 2003; Saxton and Sabatini, 2017). Ein nachfolgendes Target der p70S6 Kinase 1 ist das ribosomale Protein S6 (rib-S6). Dessen Aktivierung wurde über einen Antikörper analysiert, der spezifisch die Phosphorylierung am Ser235/236 des ribosomalen S6-Proteins detektiert. In den Sham-operierten $Fto^{-/-}$ -Herzen konnte eine signifikant verringerte Phosphorylierungs-Verhältnis nachgewiesen werden. Nach I/R kam es in $Fto^{+/+}$ - als auch in $Fto^{-/-}$ -Herzen zu einer Zunahme des phospho-rib-S6/rib-S6 Verhältnisses. Allerdings war das Verhältnis von phospho-rib-S6/rib-S6 in den $Fto^{-/-}$ -Herzen geringer, als in den $Fto^{+/+}$ -Herzen (Abbildung 17 B). Diese Beobachtungen zeigen, dass es in den $Fto^{-/-}$ -Herzen bereits basal zu einer verminderten mTORC1-Signalwegsaktivierung kam, im Vergleich zu $Fto^{+/+}$ -Herzen. mTOR selbst besitzt ebenfalls mehrere Phosphorylierungs-Stellen, über die verschiedene Signalwege aktiviert werden können. Die Phosphorylierung am Ser2448 ist spezifisch für die mTORC1-Komplex-Aktivierung. In der Western-Blot-Analyse

wurde hingegen kein Unterschied in dem phospho-(Ser2448)-mTOR/mTOR Verhältnis von *Fto*^{+/+} zu *Fto*^{-/-}Sham- als auch I/R-operierten Herzen beobachtet (Abbildung 17 C). Einerseits wäre aufgrund des reduzierten phospho-rib-S6/rib-S6 Verhältnisses eine verminderte mTOR-Aktivierung zu erwarten gewesen. Andererseits sollte die erhöhte AKT-Aktivierung zu einer gesteigerten mTORC1-Aktivierung führen und somit indirekt auch eine erhöhte Phosphorylierung von mTOR am Ser2448 bewirken (Laplante and Sabatini, 2013; Saxton and Sabatini, 2017). Entgegen der Erwartungen wurde jedoch keine Änderung in der mTOR-Phosphorylierung in *Fto*^{-/-}-Herzen beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass es zu einer Einschränkung des mTORC1-Signalweges erst nach mTOR-Phosphorylierung kam.

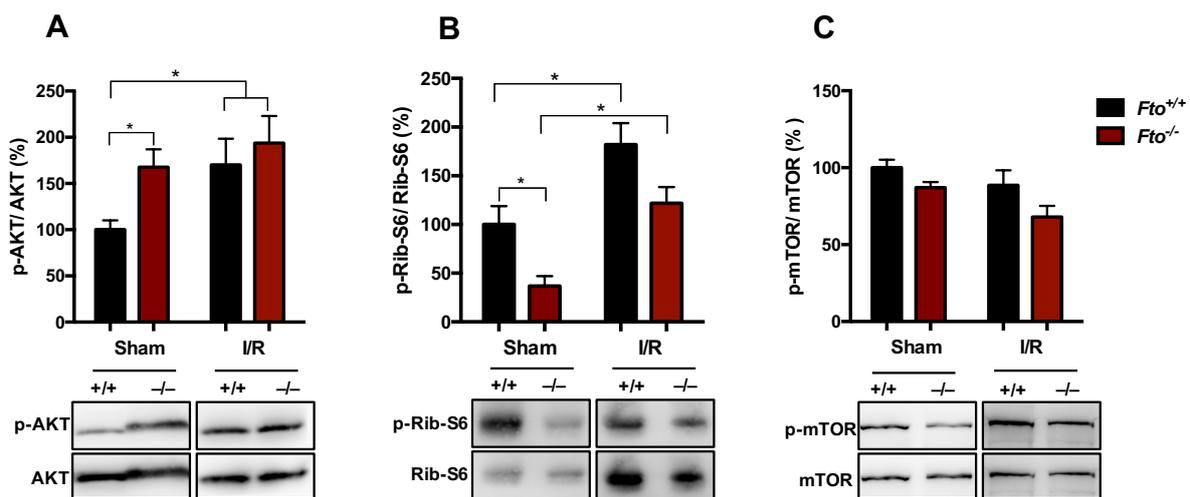


Abbildung 17. In *Fto*^{-/-}-Herzen findet eine verminderte mTORC1-Signalwegs-Aktivierung statt. Dargestellt wurde das relative Phosphorylierungs-Verhältnis von AKT, dem ribosomalen S6 Protein und mTOR. Untersucht wurde das infarzierte Myokard 24 Stunden nach Ischämie, verglichen zu den Sham-Kontrollen. (A) Quantifizierung und repräsentative Western-Blots der AKT-Phosphorylierung von Ser473. (B) Quantifizierung und repräsentative Western-Blots der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Protein von Ser235/236. (C) Quantifizierung und repräsentative Western-Blots der mTOR-Phosphorylierung von Ser2488. Die Expression wurde zu den *Fto*^{+/+} Sham-Kontrolle normalisiert und in Prozent (%) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, *Fto*^{+/+} n=6 I/R; *Fto*^{-/-} n=4 I/R; *Fto*^{+/+} n=8 I/R; *Fto*^{-/-} n=7 I/R. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test. * p<0.05

4.3.2. Der *Fto*-Verlust führt zu einer verstärkten Proteinexpression von TSC2 und PRAS40

Um die zuvor beschriebene Vermutung zu bestätigen, wurde als nächstes die Aktivierung der AKT-Zielproteine untersucht. Dazu zählen TSC2, welches von AKT am Ser939 phosphoryliert wird und PRAS40, das durch Phosphorylierung am Thr246 durch AKT inhibiert wird (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002; Vander Haar et al., 2007). Bei TSC2 handelt es sich um einen indirekten Inhibitor des mTORC1-Komplexes (Abschnitt 1.7 und Abbildung 5) (Inoki et al., 2002). Bei der Betrachtung der TSC2-Expression in Sham-operierten Herzen konnte eine erhöhte Proteinexpression in *Fto*^{-/-}-Herzen gemessen werden. Beim Verhältnis von phospho-TSC2/TSC2 lag hingegen zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied vor. In den I/R-operierten Herzen konnten keine Expressionsunterschiede sowie Veränderungen in den Phosphorylierungs-Verhältnissen der *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Tieren detektiert werden. Da keine Veränderung im phospho-TSC2/TSC2-Verhältnis bestand war davon auszugehen, dass keine verstärkte Inhibition des TCS-Komplexes auftritt und daher die mTOR-Phosphorylierung nicht eingeschränkt war (Abbildung 18 A). Das zweite Zielprotein von AKT ist PRAS40, dieses bindet an den mTORC1-Komplex und inhibiert dessen Signalweiterleitung. Durch AKT-Phosphorylierung kommt es zu einer Dissoziation von PRAS40 vom mTORC1-Komplex, welches zu einer verstärkten Signalaktivierung des mTORC1-Komplexes führt (Abschnitt 1.7) (Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007). In Sham- als auch in I/R-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen wurde signifikant mehr PRAS40-Protein detektiert, verglichen zu *Fto*^{+/+}-Herzen. Bei der Analyse des Phosphorylierungs-Verhältnisses wurde in den *Fto*^{-/-}-Herzen in der Sham-Kontrolle, sowie in den I/R-Herzen signifikant weniger p-PRAS40/PRAS40 gemessen (Abbildung 18 B). Die erhöhte PRAS40-Menge könnte die verstärkte Aktivierung von AKT möglicherweise kompensieren. Das vermehrte Vorliegen von PRAS40 könnte daher den mTORC1-Komplex weiter inhibieren und die Aktivierung der Zielproteine (ribosomales S6 Protein; Abbildung 18 B) vermindern.

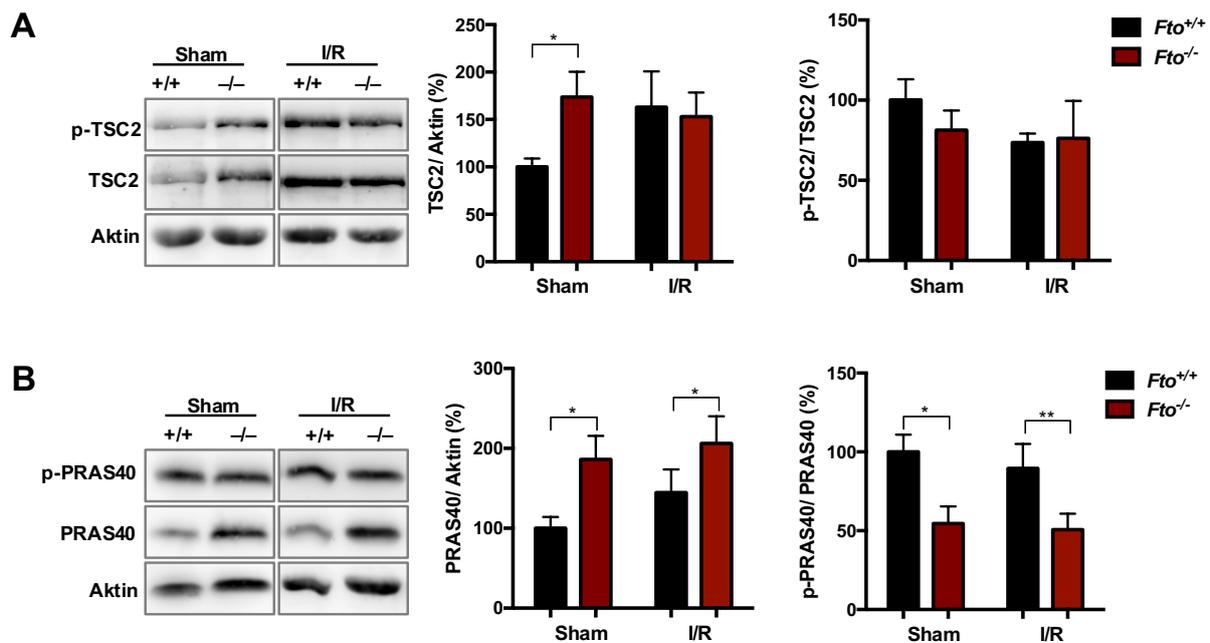


Abbildung 18. In *Fto*^{-/-}-Herzen wurde eine verstärkte Expression von TSC2 und PRAS40 gemessen. Analysiert wurde die Proteinexpression, sowie das relative Phosphorylierungs-Verhältnis von TSC2 und PRAS40. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. (A) Quantifizierung und ein repräsentativer Western-Blot der TSC2-Expression sowie dessen Phosphorylierung am Ser939. (B) Quantifizierung und ein repräsentativer Western-Blot der PRAS40-Expression sowie dessen Phosphorylierung am Thr246. Die Expression wurde zu der *Fto*^{+/+} Sham-Kontrolle normalisiert und in Prozent (%) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, *Fto*^{+/+} n=6 I/R; *Fto*^{-/-} n=4 I/R; *Fto*^{+/+} n=8 I/R; *Fto*^{-/-} n=7 I/R. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test. * p<0.05

4.3.3. *Fto*^{-/-}-Tiere zeigen im Herzen eine erhöhte *Tsc2* und *Akt1s1* (PRAS40) mRNA-Expression

Aufgrund der höheren Proteinexpression von TSC2 und PRAS40 wurde die mRNA-Expression beider Gene mittels qRT-PCR überprüft. Dazu wurde die RNA aus dem ischämischen Bereich isoliert (Abschnitt 3.9.2), in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 3.9.6) und die qRT-PCR durchgeführt (Abschnitt 3.9.7). Für *Tsc2* konnte in den *Fto*^{-/-} Sham-Herzen eine deutlich stärkere Expression gemessen werden. Nach der I/R kam es bei den *Fto*^{+/+}- als auch bei *Fto*^{-/-}-Tieren zu einer verringerten Expression der *Tsc2*-mRNA. Zudem konnte kein Expressionsunterschied zwischen den *Fto*^{+/+} und *Fto*^{-/-}-Herzen beobachtet werden (Abbildung 19 A). Das zweite Target, bei dem eine Expressionsänderung beobachtet wurde, war PRAS40,

dessen Genname *Akt1s1* ist. Hier konnte ein Expressionsanstieg in den Sham-Kontrollen, als auch in den infarzierten Herzen der *Fto*^{-/-}-Herzen gemessen werden (Abbildung 19 B).

Die hier gemessene mRNA-Expression stimmte mit den vorherigen Ergebnissen aus der Analyse der Proteinexpression überein (Abbildung 18 A und B). Beide Analysen zeigten für *Tsc2* eine erhöhte Expression in Sham-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen, sowie eine erhöhte Expression von *Akt1s1*, sowohl in Sham- als auch in I/R-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen.

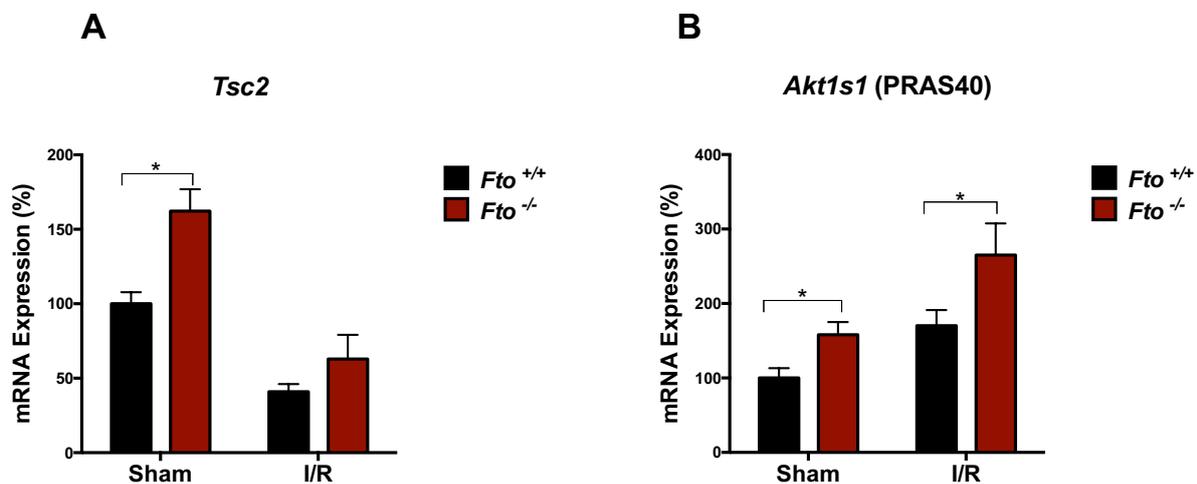


Abbildung 19. In *Fto*^{-/-} Herzen konnte eine erhöhte mRNA-Expression von *TSC2* und *AKT1S1* gemessen werden. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Genutzt wurde Herzgewebe aus dem ischämischen Bereich des LV. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Herzen in denen keine Ischämie induziert wurde. Die Expression wurde zu der *Fto*^{+/+} Sham-Kontrolle normalisiert und in Prozent (%) angegeben. (A) mRNA-Expression von *Tsc2*. (B) mRNA-Expression von *Akt1s1*. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, *Fto*^{+/+} Sham n=8; *Fto*^{-/-} Sham n=5; *Fto*^{+/+} I/R n=6; *Fto*^{-/-} I/R n=7. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test. * p<0.05

4.3.4. Analysen der *Fto*^{-/-}-Herzen weisen auf eine gesteigerte Autophagie hin

Wie zuvor beschrieben, reguliert der mTORC1-Komplex bedeutende physiologische Prozesse, wie das Zellwachstum und die Proliferation über die Steigerung der Proteinsynthese und Minderung der Autophagie (Abschnitt 1.7). Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Menge an LC3B-I (*microtubule-associated protein light chain 3*) und p62 (*sequestosome-1*) analysiert. Während der Autophagie wird das cytosolische LC3B-I an Phosphatidylethanolamin konjugiert und bildet die LC3B-II Form. Diese Form wird zum Autophagosom rekrutiert und ist an dessen Aufbau beteiligt. P62 markiert jene Proteine, die mittels Autophagie degradiert werden sollen.

Das Protein kann unter anderem an LC3B und Ubiquitin binden und wird dadurch Teil des Autophagosoms. Durch die spätere Fusion des Autophagosoms mit den Lysosomen kommt es zum Abbau des p62-Proteins. Daher kann p62 unter anderem als Autophagie-Marker genutzt werden (Galluzzi et al., 2017; Mizushima and Yoshimori, 2007). In der Western-Blot-Untersuchung von Sham-operierten Herzen zeigte sich, dass in *Fto*^{-/-}-Herzen mehr von der LC3B-II Form vorlag als in *Fto*^{+/+}-Herzen. Insgesamt führt dies zu einer Steigerung des LC3B-II/LC3B-I Verhältnis. Nach Durchführung der I/R wurde dieser Unterschied noch deutlicher aufgrund einer signifikanten Zunahme des LC3B-II/LC3B-I Verhältnis in den *Fto*^{-/-}-Herzen (Abbildung 20 A und B). Bei der Quantifizierung der p62-Proteinmenge wurde sowohl in *Fto*^{-/-} Sham-, als auch in I/R-operierten Herzen eine Reduktion von p62 beobachtet. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. In den *Fto*^{-/-} I/R-Herzen war die Abnahme p62-Proteinmenge im Vergleich zu den *Fto*^{+/+} I/R-Herzen deutlicher. Der p-Wert lag bei 0,067, nahe am Signifikanzniveau von 0,05 (Abbildung 20 A und C). Das erhöhte LC3B-II/LC3B-I Verhältnis deutete darauf hin, dass mehr des cytosolischen LC3B-I in die LC3B-II Form umgewandelt wurde, um diese in die Autophagosomen einzubauen. Allerdings kann es auch bedeuten, dass es zu einem gestörten Autophagosomen-Abbau kam. Dies würde bedeuten, dass eine Beeinträchtigung in der Lysosomenfusion mit den Autophagosom vorlag. Auch dies würde zu einer Zunahme der LC3B-II Form führen. Allerdings wurde eine Reduktion des p62-Proteins beobachtet, was für einen lysosomalen Abbau des p62-Proteins sprechen würde. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse auf eine gesteigerte Autophagie in den infarzierten Herzen der *Fto*^{-/-}-Tiere hin.

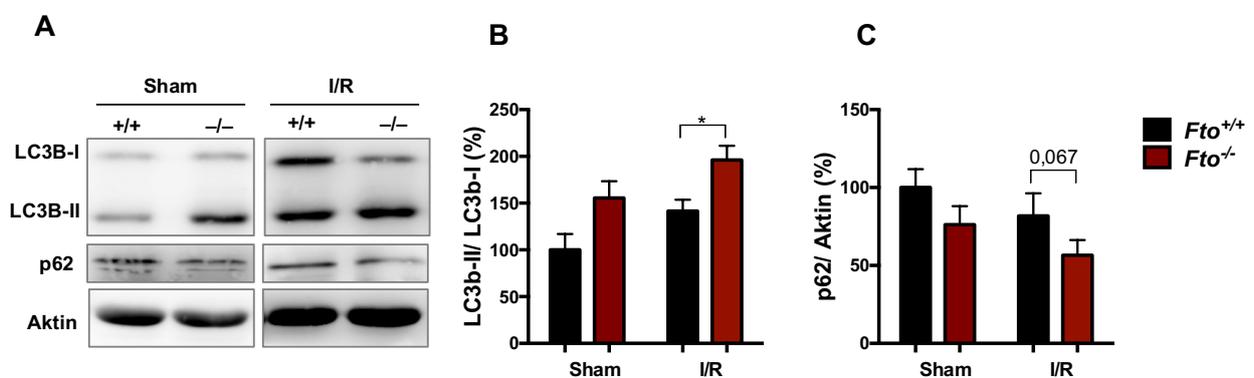


Abbildung 20. *Fto*^{-/-} Herzen wiesen eine gesteigerte Autophagie auf. Western-Blot-Analyse des LC3B-II/LC3B-I (*microtubule-associated protein light chain 3*) Verhältnis sowie die der Proteinmenge von p62 (*Sequestosome 1*). Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet (A) Repräsentativer Western-Blot der LC3B und p62 Expression. (B) Quantifizierung der LC3B-II/LC3B-I Ratio. (C) Quantifizierung der p62-Proteinmenge. Die Menge an Protein wurde zu der

Fto^{+/+} Sham-Kontrolle normalisiert und in Prozent (%) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, *Fto*^{+/+} Sham n=6; *Fto*^{-/-} Sham n=4; *Fto*^{+/+} n=8 I/R; *Fto*^{-/-} n=7 I/R. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test. * p<0.05

4.4. Einfluss eines Fto-Inhibitors auf den Verlauf eines Myokardinfarkts

4.4.1. Analyse der Behandlung von wildtypischen Mäusen mit dem Fto-Inhibitor Rhein

Ein bekannter Fto-Inhibitor ist Rhein, welcher aus der Rhabarberpflanze *Rheum palmatum* stammt. Er gehört zu der Gruppe der Anthranoide. In einigen Ländern ist Rhein als Arzneimittel mit den Namen Diacerein zugelassen und wird zur Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen (Arthrosen) eingesetzt. Bekannt ist, dass Rhein entzündungshemmend und schmerzlindernd wirkt, welches durch Hemmung der Zytokinexpression hervorgerufen werden kann (Sun et al., 2016). Von Chen et al. wurde Rhein erstmals als Fto-Inhibitor beschrieben, welches im aktiven Zentrum von Fto bindet und hierdurch dessen Demethylase-Aktivität inhibiert. Ein Einfluss auf die Expression von Fto wurde allerdings nicht beobachtet (Chen et al., 2012).

In einem ersten Versuchsansatz wurde unter Verwendung von Rhein untersucht, ob die Reduktion der Fto-Demethylase-Aktivität eine Auswirkung auf den Verlauf eines Myokardinfarkts hatte. Dazu wurden zunächst wildtypische Mäuse im Alter von 10-11 Wochen für 3 Wochen mit Rhein behandelt. Die Gabe erfolgte oral mittels einer Schlundsonde (Abschnitt 3.8.3). Als Kontrollgruppe wurden zusätzlich Tiere mit 100 mM Tris-HCl pH 7,4 ebenfalls durch orale Gabe behandelt, da das Rhein in diesem Puffer gelöst war. Ob die Verabreichung von Rhein eine Auswirkung auf die Fto-Aktivität hatte, wurde über den Methylierungs-Status der RNA überprüft. Hierzu wurde eine Dot-Blot-Analyse unter Verwendung eines m⁶A-Antikörpers durchgeführt (Abschnitt 3.9.9). Sollte die Fto-Demethylase-Aktivität durch Rhein inhibiert werden, sollte es zu einer Zunahme der RNA-Methylierung kommen. Hierzu wurde nach einer 3 wöchigen Behandlung die RNA aus dem Herzen isoliert und auf eine Nylonmembran aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines m⁶A-Antikörpers. Dieser erkannte sowohl die m⁶A- als auch die m⁶A_m-Methylierung. Ein Antikörper der spezifisch an die m⁶A_m-Methylierung bindet ist derzeit noch nicht vorhanden. Als vergleichende Kontrolle wurde zusätzlich die RNA aus Fto-defizienten Mäusen genutzt. Die RNA aus den Herzen von *Fto*^{-/-}-Tieren wies die stärkste m⁶A/m⁶A_m-Methylierung auf, im Vergleich zur RNA aus *Fto*^{+/+}-Tieren die mit 100 mM Tris behandelt wurden. In den Rhein behandelten Tieren wurde außerdem eine Zunahme der m⁶A/m⁶A_m-RNA-Methylierung nachgewiesen. Jedoch zeigten die Proben der Rhein-behandelten Tiere eine größere Varianz,

im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($Fto^{-/-}$ und $Fto^{+/+}$; Tris) (Abbildung 21 A und B). Da es insgesamt zu einer eindeutigen Zunahme der RNA-Methylierung kam, ist davon auszugehen, dass die Rhein-Behandlung die Fto-Demethylase-Aktivität inhibierte.

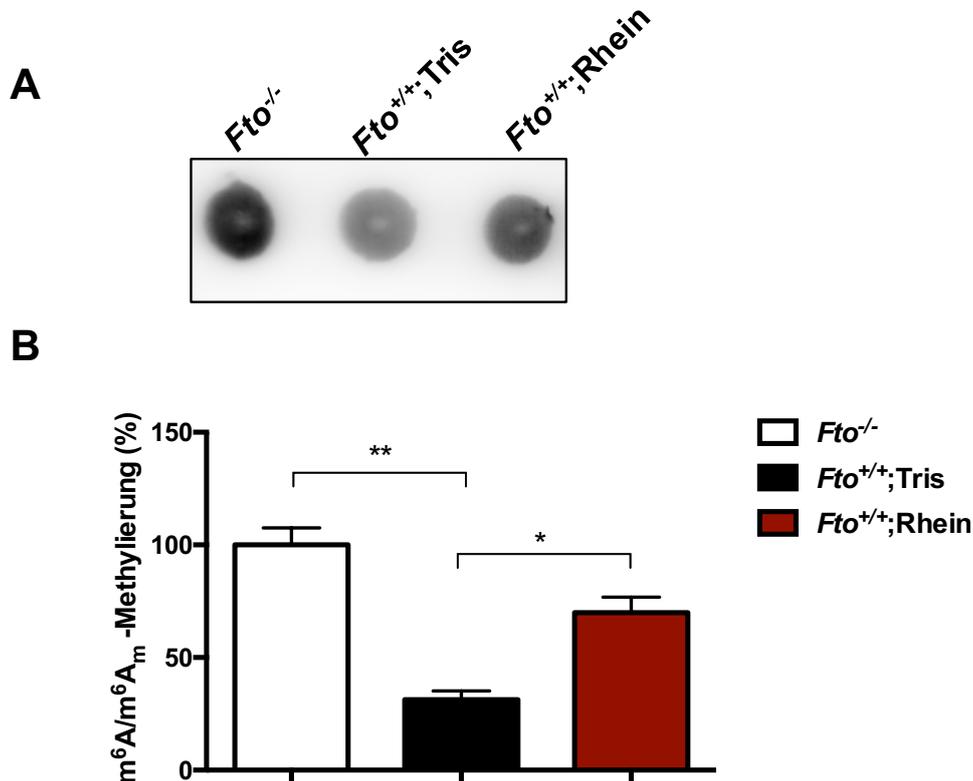


Abbildung 21. Die Rhein-Behandlung führte zu einer gesteigerten m⁶A-RNA-Methylierung im Herzen. Hierzu wurden $Fto^{+/+}$ -Tiere für 3 Wochen mit Rhein oder als Kontrolle mit 100 mM Tris-HCl pH 7,4 (Lösungsmittel) behandelt. Die RNA wurde anschließend aus den Herzen isoliert und mittels Dot-Blot-Analyse auf die m⁶A/m⁶A_m-Methylierung untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde RNA aus den Herzen von $Fto^{-/-}$ -Tieren verwendet. (A) Dot-Blot-Analyse unter Verwendung eines m⁶A-Antikörpers. (B) Quantifizierung der m⁶A/m⁶A_m-RNA-Methylierung. Die RNA-Methylierung wurde zu der $Fto^{-/-}$ -Kontrolle normalisiert und in Prozent (%) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test. * p<0.05, ** p<0.01

4.4.2. Untersuchung der Herzfunktion von Rhein behandelten Tieren nach kardialer Ischämie

Nach Behandlung der Tiere mit Rhein über einen Zeitraum von 3 Wochen wurde eine Ischämie/Reperfusion durchgeführt und die Herzfunktion mittels Echokardiographie beobachtet (Abschnitt 3.8.5). Analysiert wurden dazu die Zeitpunkte 24 Stunden, 1, 2, und 3

Wochen nach kardialer Ischämie. Als Parameter wurde das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV), die Ejektionsfraktion (EF) und das *fractional shortening* (FS) betrachtet. 1 Woche nach kardialer Ischämie konnte in den Rhein behandelten Tieren eine signifikant geringere Zunahme des EDV im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden ($111,27 \pm 6,404 \mu\text{l}$ versus $84,746 \pm 3,097 \mu\text{l}$) (Abbildung 22 A). Auch 2 und 3 Wochen nach kardialer Ischämie kam es nur zu einer geringfügigen Zunahme des Ventrikelvolumens ($110,53 \pm 6,156$ versus $85,653 \pm 3,277$ und $120,76 \pm 4,86$ versus $85,82 \pm 3,225$) (Abbildung 22 A). Im ESV war bereits 24 Stunden nach kardialer Ischämie eine signifikant geringere Zunahme in den Rhein behandelten Tieren messbar ($52,322 \pm 3,27 \mu\text{l}$ versus $39,832 \pm 2,46 \mu\text{l}$). Besonders 1, 2 und 3 Wochen nach kardialer Ischämie kam es in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg des ESV. In der Rhein behandelten Gruppe hingegen wurde nur ein leichter Anstieg beobachtet (Abbildung 22 B). Nach 3 Wochen war die Vergrößerung des ESV in der Rhein behandelten Gruppe um 24,5 % geringer als in der Kontrollgruppe ($77,258 \pm 2,352$ versus $51,902 \pm 2,892$). Die Beobachtungen des EDV und ESV deutete auf eine geringere Dilatation des LV in den Rhein behandelten Tieren hin. In der Ejektionsfraktion als auch im *fractional shortening* lag hingegen keine signifikante Verbesserung vor (Abbildung 22 C und D).

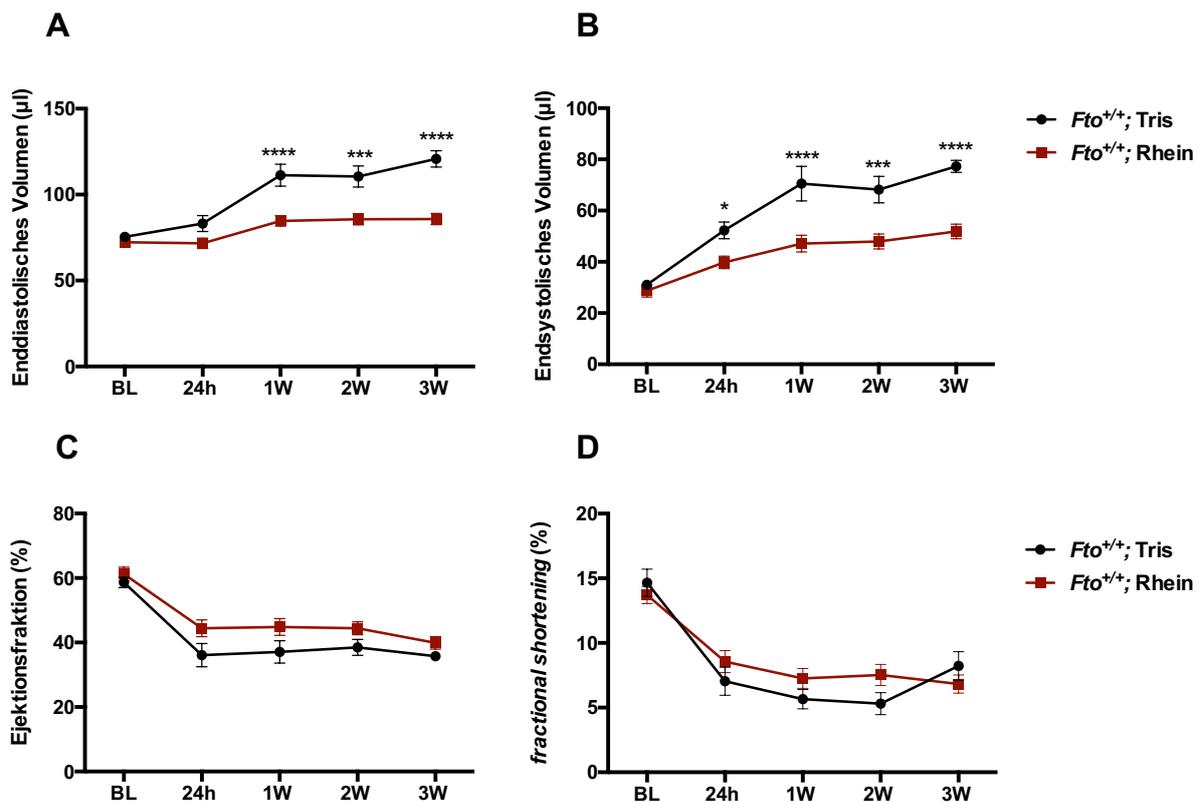


Abbildung 22. Echokardiographische Untersuchung von $Fto^{+/+}; \text{Tris}$ und $Fto^{+/+}; \text{Rhein}$ behandelten Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (Baseline; BL), 24 Stunden, 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der

Ischämie. Untersucht wurde das enddiastolische Volumen (A), das endsystolische Volumen (B), die Ejektionsfraktion (C) und das *fractional shortening* (D). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{+/+}$; Tris n=8; $Fto^{+/+}$; Rhein n=14. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und anschließendem Tukey's post-hoc Test durchgeführt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

4.4.3. Analyse der Infarktgröße von Rhein behandelten Tieren 24 Stunden nach kardialer Ischämie

Die echokardiographischen Daten deuteten auf eine geringere Dilatation des LV hin. Dies könnte unter anderem einhergehen mit einer veränderten Infarktgröße. Um dies zu überprüfen wurde erneut eine TTC- und Evans Blue-Färbung durchgeführt. Das Risikogebiet war in beiden Gruppen identisch (Abbildung 23 B). In der Rhein behandelten Gruppe konnte allerdings eine sichtbare Verringerung der Infarktgröße/AAR gemessen werden ($49,11 \pm 2,762$ % versus $37,61 \pm 2,78$ %) (Abbildung 23 A und C).

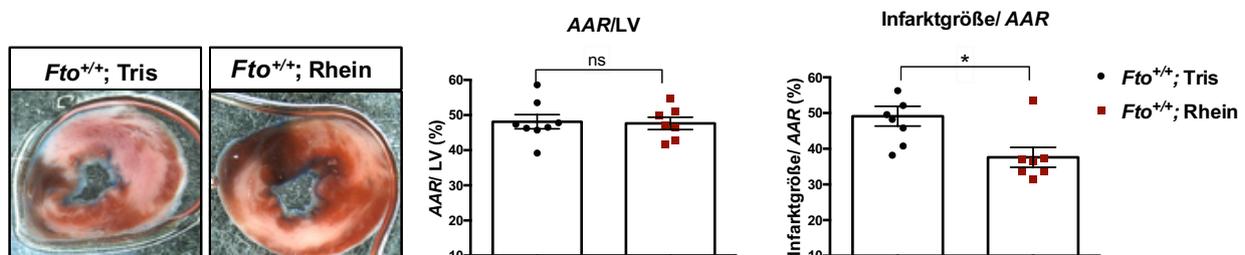


Abbildung 23. Die Rhein behandelten Tiere wiesen eine signifikant reduzierte Infarktgröße auf. (A) Repräsentative Darstellung der TTC-Färbung 24 Stunden nach kardialer Ischämie. (B) Quantifizierung der AAR (*area at risk*) zum LV (linken Ventrikel). (C) Quantifizierung der Infarktgröße zur AAR. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{+/+}$; Tris n=8; $Fto^{+/+}$; Rhein n=7. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

4.4.4. Bestimmung der Infarktнарбengröße der Rhein behandelten Tiere 3 Wochen nach kardialer Ischämie

Da die Rhein-Behandlung zu einem verbesserten EDV und ESV sowie einer kleineren Infarktgröße führte, wurde nachfolgend die Größe der Infarktнарbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie untersucht. Durch die Gömöri-Trichrom-Färbung zeigte sich, dass die Rhein-Behandlung auch zu einer signifikant kleiner Infarktнарbe im LV führte ($29,94 \pm 2,618$ % versus $21,85 \pm 1,444$ %). Dies entsprach einer Reduktion der Infarktgröße von 27 % (Abbildung 24 A und B). Zusätzlich wiesen die Rhein behandelten Tiere eine höhere Wanddicke innerhalb der

Narbenregion auf, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($661,0 \pm 46,44 \mu\text{m}$ versus $832,2 \pm 56,88 \mu\text{m}$) (Abbildung 24 A und C).

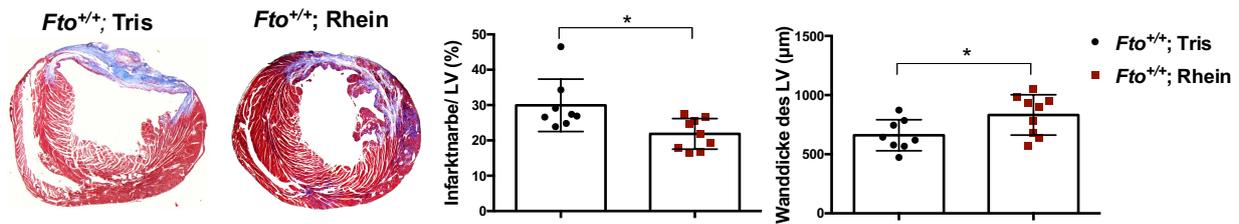


Abbildung 24. Die Behandlung mit Rhein führte zu einer kleineren Infarktnarbe 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (A) Repräsentative Bilder der Gömöri-Trichrom-Färbung 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (B) Die Quantifizierung der Infarktgrößengröße wurde in Prozent zur Größe des LV angegeben. (C) Die Wanddicke des LV wurde in μm angegeben und in den Ebenen 3 bis 10 gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, *Fto*^{+/+}; Tris n=8; *Fto*^{+/+}; Rhein n=9. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit dem Fto-Inhibitor Rhein kardioprotektiv wirkte. Es wurde eine geringere Zunahme des EDV und ESV in den echokardiographischen Untersuchungen gemessen, sowie eine kleinere Infarktgröße 24 Stunden und 3 Wochen nach kardialer Ischämie. Allerdings konnte nach der Rhein-Behandlung keine verbesserte Herzfunktion beobachtet werden, da es keine signifikanten Abweichungen in der EF sowie dem FS von der Kontrollgruppe gab. Dennoch deutete die geringere Zunahme des EDV und ESV, die reduzierte Infarktgröße, sowie die größere Wanddicke innerhalb der Infarktzone auf eine reduzierte Dilatation und geringere Atrophie des LV hin. Dies zeigt, dass die präoperative Rhein-Behandlung eine kardioprotektive Wirkung hat.

4.4.5. Auswirkungen der postoperativen Rhein-Behandlung auf die Herzfunktion nach kardialer Ischämie

Da die Vorbehandlung mit Rhein eine kardioprotektive Wirkung auf den Myokardinfarkt hatte, sollte in einer abschließenden Versuchsreihe die Wirkung von Rhein nach Induktion der Ischämie untersucht werden. Dazu wurde wildtypischen Tieren, eine Stunde nach kardialer Ischämie, das Rhein mittels einer Schlundsonde verabreicht (Abschnitt 3.8.3). Die Behandlung erfolgte täglich über den Versuchszeitraum von drei Wochen. Die echokardiographische Untersuchung wurde zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 Wochen nach der Ischämie durchgeführt. Allerdings konnte in keinem der vier gemessenen Parameter ein Unterschied zwischen Rhein und Kontroll behandelten Tieren gemessen werden (Abbildung 25). Folglich scheint die

Behandlung mit Rhein nach Myokardinfarkt in der Maus keinen Einfluss auf die Herzfunktion zu haben.

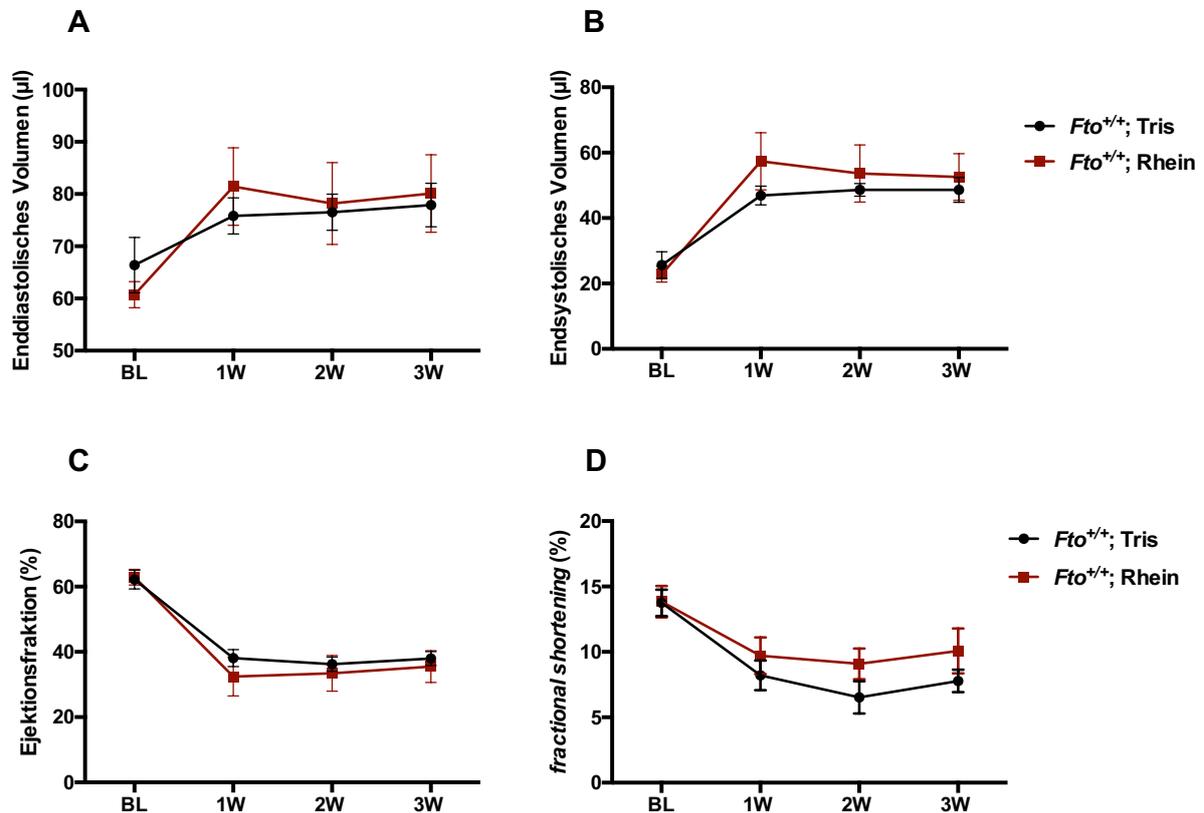


Abbildung 25. Echokardiographische Untersuchung von *Fto*^{+/+}; Tris und *Fto*^{+/+}; Rhein behandelten Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (*Baseline*; BL), 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der Ischämie. Die postoperative Rhein-Behandlung nach Myokardinfarkt führte zu keiner Verbesserung der Herzfunktion. Untersucht wurde das enddiastolische Volumen (A), das endsystolische Volumen (B), die Ejektionsfraktion (C) und das *fractional shortening* (D). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM, *Fto*^{+/+}; Tris n=6; *Fto*^{+/+}; Rhein n=7. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und anschließendem Tukey's post-hoc Test durchgeführt.

4.4.6. Auswirkung der postoperativen Rhein-Behandlung nach Myokardinfarkt auf die Infarktarnen-Bildung

Abschließend wurde die Infarktnarbe mittels Gömöri-Trichrom-Färbung quantifiziert. Auch hier konnte kein Unterschied in der Größe der Infarktnarbe zwischen den zwei behandelten Gruppen beobachtet werden (Abbildung 26 A und B).

Dementsprechend führte die Behandlung mit dem Fto-Inhibitor Rhein nach einem Myokardinfarkt weder zu einem besseren Erhalt der Herzfunktion, noch zu einer verringerten

Infarktgröße. Hingegen führte die Inhibition der Fto-Demethylase-Funktion vor Induktion der Ischämie zu einer kardioprotektive Wirkung.

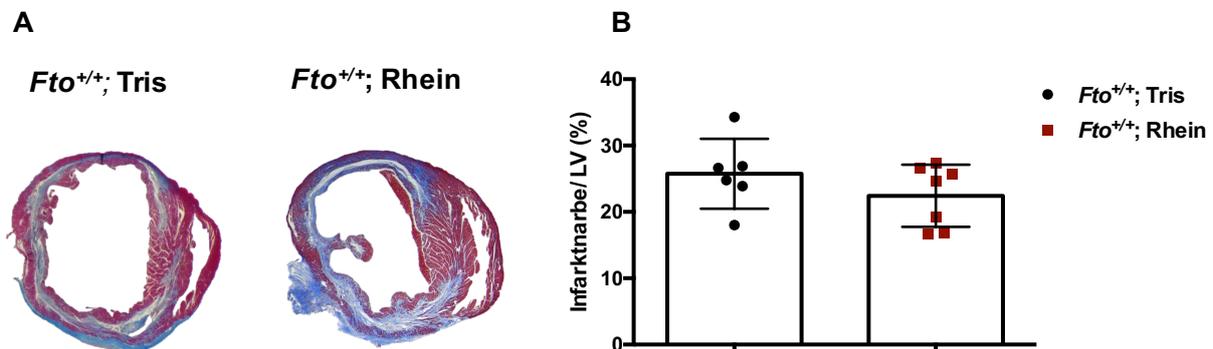


Abbildung 26. Die postoperative Rhein-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Infarktgröße. (A) Repräsentative Bilder der Gömöri-Trichrom-Färbung 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (B) Die Größe der Infarktgröße wurde in Prozent vom LV angegeben. (C) Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, *Fto*^{+/+}; Tris n=7; *Fto*^{+/+}; Rhein n=7. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test

4.5. Analyse eines Kardiomyozyten-spezifischen Fto-Verlustes im I/R-Modell

4.5.1. Erstellung einer Mauslinie zur Induzierung eines Kardiomyozyten-spezifischen Fto-Verlustes

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein globaler Fto-Verlust oder die Inhibition der Fto-Demethylase Funktion den I/R-Schaden verringerte und die Herzfunktion verbesserte. Daher wurde in weiteren untersucht, ob ein Kardiomyozyten-spezifischer Verlust von Fto ausreichend ist, um den Erhalt der Herzfunktion, sowie eine Reduktion der Infarktgröße nach kardialer Ischämie zu bewirken. Dazu wurden zwei verschiedenen Mausstämmen miteinander gekreuzt. Der eine Mausstamm trug zwei loxP-Sequenzen (*locus of X-over P1*), die einen Teil des *Fto*-Gens flankieren. Der andere hingegen besaß ein Cre (*causes recombination*)-Rekombinasegen, welches unter einem kardiomyozyten-spezifischen sowie Tamoxifen induzierbaren Promotor exprimiert wurde (α -MHC-MerCreMer). Durch die Kreuzung dieser beiden Stämme waren alle Nachkommen der F3-Generation homozygot für die LoxP-Sequenzen und einige trugen zusätzlich das Cre-Rekombinasegen (*Cre*; *Fto*^{fl/fl}). Durch 10-tägige Injektion von Tamoxifen wurde die Expression der Cre-Rekombinase in den

Kardiomyozyten induziert. Dieses Enzym erkennt die beiden loxP-Stellen und schneidet die DNA-Sequenz innerhalb dieser Sequenzen aus. Hierdurch kam es zu einer Inaktivierung des *Fto*-Gens ausschließlich in den Kardiomyozyten. Der Erfolg des induzierten Gen-Verlustes wurde mittels qRT-PCR und Western-Blot-Analyse überprüft. Hierzu wurde *Cre;Fto^{fl/fl}*- und *Fto^{fl/fl}*-Tieren für 10 Tage Tamoxifen i.p. (intraperitoneal) injiziert (Abschnitt 3.8.3). Die *Fto^{fl/fl}*-Tiere wurden als Kontrolle genutzt. Da diese Tiere kein Cre-Rekombinasegen besaßen, sollte es zu keiner Inaktivierung des *Fto*-Gens kommen. In Zusammenarbeit mit Annette Kronenbitter (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; AG Schmitt) wurden die Kardiomyozyten aus den Herzen der behandelten Tiere 2 Wochen später isoliert und für die RNA- sowie Proteinanalysen verwendet (Abschnitte 3.8.7, 3.9.7, 3.11.3, 3.11.4, 3.11.5). In der Western-Blot-Analyse wurde kein Fto-Protein in den *Cre;Fto^{fl/fl}*-Kardiomyozyten detektiert (Abbildung 27 A). Hingegen wurde in der qRT-PCR Analyse eine *Fto*-mRNA-Expression gemessen, welche allerdings im Vergleich zu den *Fto^{fl/fl}*-Tieren um die Hälfte reduziert war (Abbildung 27 B). Da kein Protein in der Western-Blot-Analyse detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die *Fto*-Inaktivierung bezüglich der Proteinexpression in den Kardiomyozyten erfolgreich war.

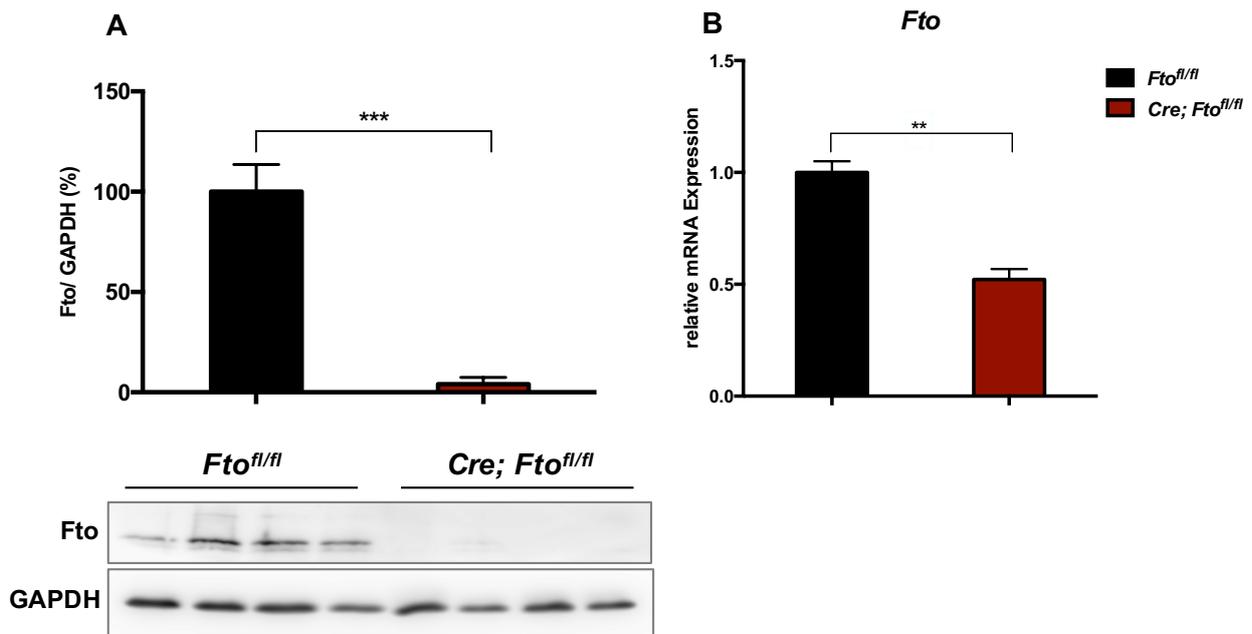


Abbildung 27. Analyse der Kardiomyozyten-spezifischen *Fto*-Inaktivierung. Zur Induzierung des *Fto*-Verlustes wurden *Cre;Fto^{fl/fl}*- und *Fto^{fl/fl}*-Tiere für 10 Tage mit Tamoxifen mittels i.p. Injektion behandelt. 2 Wochen später wurden die Kardiomyozyten aus dem Herz isoliert und mittels Western-Blot-Analyse (A) und qRT-PCR (B) untersucht. (A) Quantifizierung und ein repräsentativer

Western-Blot der Fto-Proteinexpression. Als Ladekontrolle wurde GAPDH genutzt. (B) qRT-PCR Analyse der *Fto*-mRNA-Expression in Kardiomyozyten. Die Expression wurde zu den *Fto^{fl/fl}*-Kontrollen normalisiert und in Prozent (%) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, *Fto^{fl/fl}* n=4; *Cre;Fto^{fl/fl}* n=4. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

4.5.2. Analyse der Herzfunktion von Kardiomyozyten-spezifischen *Fto*-defizienten Tieren nach kardialer Ischämie

Da die Induzierung des *Fto*-Verlustes in den Kardiomyozyten erfolgreich verlief, wurde als nächstes die Herzfunktion nach Durchführung der Ischämie/Reperfusion mittels Echokardiographie untersucht (Abschnitt 3.8.5). Dazu wurde 24 Stunden, 1, 2 und 3 Wochen nach der Ischämie das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV), die Ejektionsfraktion (EF) und das „fractional shortening“ (FS) bestimmt. In keinem der untersuchten Parameter konnte ein Unterschied zwischen *Fto^{fl/fl}* und *Cre; Fto^{fl/fl}* Herzen beobachtet werden (Abbildung 28 A-D). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde eine identische Herzfunktion ermittelt.

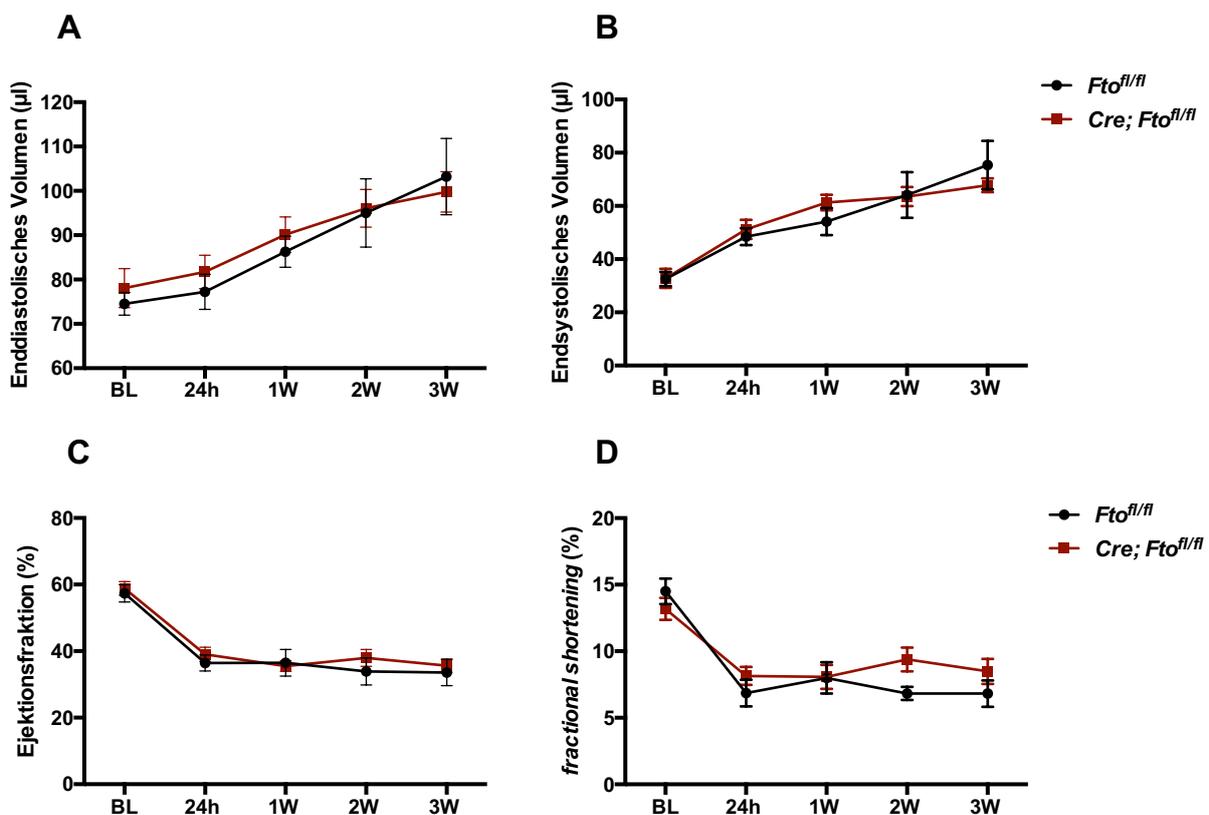


Abbildung 28. Echokardiographische Untersuchung von *Fto^{fl/fl}*- und *Cre;Fto^{fl/fl}*-Mäusen zum Zeitpunkt vor I/R (*Baseline*; BL), 24 Stunden, 1, 2 und 3 Wochen nach Induktion der Ischämie.

Untersucht wurde das enddiastolische Volumen (A), das endsystolische Volumen (B), die Ejektionsfraktion (C) und das „fractional shortening“ (D). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{fl/fl}$ n=10; $Cre;Fto^{fl/fl}$ n=12. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und anschließendem Tukey's post-hoc Test durchgeführt.

4.5.3. Analyse der Myokardinfarktgröße in den Kardiomyozyten-spezifischen Fto -defizienten Tieren 24 Stunden nach kardialer Ischämie

Da in den zuvor untersuchten Herzfunktionsanalysen kein Unterschied festgestellt wurde, wurde als nächstes untersucht, ob die Kardiomyozyten-spezifische Fto -Inaktivierung einen Einfluss auf die Infarktgröße hatte. Dies erfolgte mittels TTC- und Evans Blue-Färbung (Abschnitt 3.10.1). Dazu wurden zunächst die Herzen 24 Stunden nach I/R entnommen und mit Hilfe der Evans Blue-Färbung wurde das Risikogebiet (*area of risk*; AAR) bestimmt. Dieses war in beiden Gruppen identisch ausgeprägt (Abbildung 29 B). Mittels der TTC-Färbung wurde anschließend zwischen metabolisch aktivem und nicht aktivem Gewebe unterschieden und somit die Infarktgröße bestimmt. Bei der Quantifizierung der Infarktgröße war ebenfalls kein Unterschied messbar (Abbildung 29 A und C).

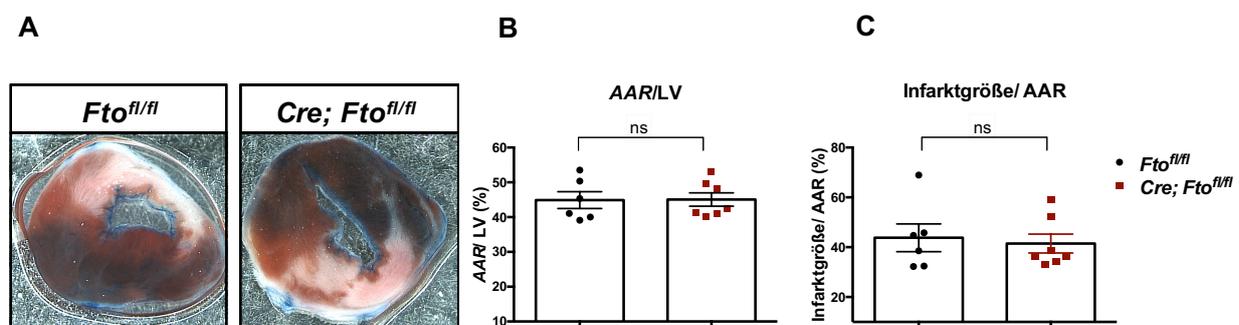


Abbildung 29. Der Kardiomyozyten-spezifische Fto -Verlust führte zu keiner Reduktion der Infarktgröße. (A) Eine repräsentative Darstellung der TTC-Färbung 24 Stunden nach kardialer Ischämie. (B) Quantifizierung der AAR (*area at risk*) zum LV (linken Ventrikel). (C) Quantifizierung der Infarktgröße zur AAR. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{fl/fl}$ n=6; $Cre;Fto^{fl/fl}$ n=7. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

4.5.4. Untersuchung der Infarktnarbe in $Fto^{fl/fl}$ - und $Cre;Fto^{fl/fl}$ -Herzen 3 Wochen nach kardialer Ischämie

In einem abschließenden Versuch wurde nochmals mittels Gömöri-Trichrom-Färbung die Kollagenarbangröße 3 Wochen nach kardialer Ischämie untersucht (Abschnitt 3.10.5). Dazu wurde die Größe der Kollagenarbe relativ zum LV bestimmt. Auch hier konnte kein

signifikanter Unterschied in der Infarktgröße zwischen den $Fto^{fl/fl}$ - und $Cre;Fto^{fl/fl}$ -Herzen festgestellt werden (Abbildung 30A und B). Allerdings konnte in den $Cre;Fto^{fl/fl}$ -Herzen eine leichte Verringerung der Infarktgrabengröße gemessen werden (Abbildung 30 B).

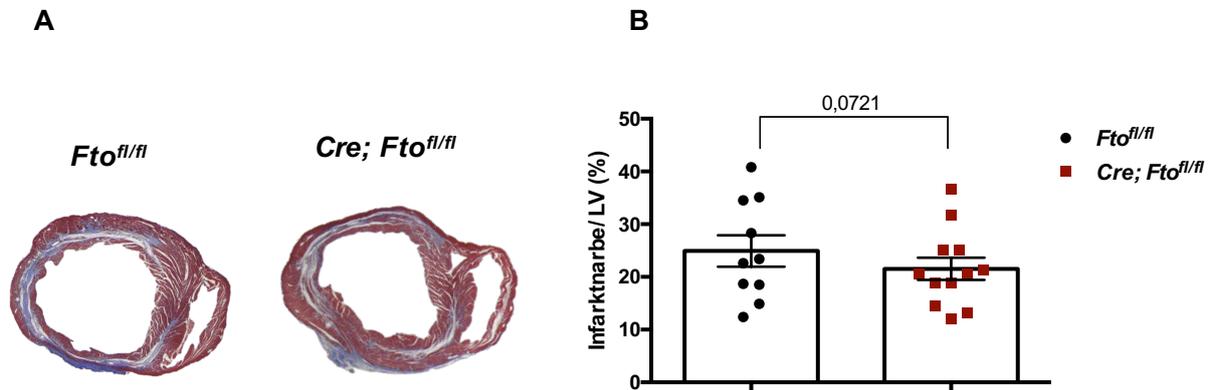


Abbildung 30. Der Kardiomyozyten-spezifische Fto -Verlust führte zu keiner Reduktion der Infarktgraben 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (A) Repräsentative Bilder der Gömöri-Trichrom-Färbung 3 Wochen nach kardialer Ischämie. (B) Die Größe der Infarktgraben wurde in Prozent zu der Größe des LV angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, $Fto^{fl/fl}$ $n=10$; $Cre;Fto^{fl/fl}$ $n=12$. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Kardiomyozyten-spezifische Verlust von Fto keinen Einfluss auf die Herzfunktion oder auf die Myokardinfarktgröße hatte. Der reine Verlust von Fto in den Kardiomyozyten ist demzufolge nicht ausreichend, um den Ischämie/Reperfusionsschaden zu mindern.

5. Diskussion

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählten im Jahre 2016 die ischämischen Herzerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. So starben 9,433 Millionen Menschen an einer ischämischen Herzerkrankung (WHO, 2018). In klinischen Studien wurden bereits viele Therapien zur Reduktion der Infarktgröße und zum den Erhalt der Herzfunktion getestet. Jedoch erwiesen sich viele dieser Studien als nicht erfolgreich (Benjamin et al., 2017; Kloner et al., 2017). Demzufolge ist es dringend notwendig neue Therapieansätze zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde daher im näheren der Einfluss des *Fto*-Verlustes auf den kardialen I/R-Schaden untersucht. *FTO* steht in Zusammenhang mit der Entwicklung von Adipositas im Menschen (Scuteri et al., 2007). Dies ist ein bekannten Risikofaktor, der an der Entstehung eines Myokardinfarktes beteiligt sein kann (Yusuf et al., 2005; Yusuf et al., 2004). Bereits in ersten Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *Fto* zu einer signifikant besseren Herzfunktion nach einem I/R-Schaden in Mäusen führt.

5.1. Einfluss des *Fto*-Verlustes auf den I/R-Schaden

5.1.1. Der Verlust von *Fto* wirkt kardioprotektiv auf den I/R-Schaden

In den ersten Analysen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass *Fto*^{-/-}-Tiere eine kleinere Infarktgröße/AAR 24 Stunden nach kardialer Ischämie aufwiesen (Abbildung 9). Dies war vermutlich vor allem auf die Reduktion der Zell-Apoptose in den *Fto*^{-/-}-Herzen zurückzuführen (Abbildung 10). Die Apoptose ist an dem Ausmaß der Gewebeschädigung nach I/R beteiligt (Hochhauser et al., 2007; Kajstura et al., 1996; Lee et al., 2003). Während eines Herzversagens kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Zell-Apoptose (van Empel et al., 2005). Die Verminderung des Gewebeschadens kann unter anderem zum Erhalt der Herzfunktion beitragen (Chiong et al., 2011; Hochhauser et al., 2007). Besonders in der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt kommt es zu den meisten Todesfällen (Chitnis et al., 2014). Daher ist eine Reduktion der Infarktgröße sowie eine bestmögliche Aufrechterhaltung der Herzfunktion bereits in der frühen Phase nach der Ischämie von großer Bedeutung, um die Überlebenschance der Patienten zu erhöhen. Aber auch auf lange Sicht kann dies die Sterberate reduzieren und die Lebensqualität der Patienten erhöhen (Atlas Writing et al., 2018; Hausenloy et al., 2017; Lloyd-Jones et al., 2010). 3 Wochen nach Myokardinfarkt konnte in den *Fto*^{-/-}-Tieren eine kleinere Infarktnarbe gemessen werden (Abbildung 11 A und B). Zudem wiesen diese Tiere ein signifikant dickeres linksventrikuläres Myokard auf (Abbildung 11 C).

Dies spricht für eine geringere Dilatation und Atrophie des LV, was zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen kann. Die echokardiographischen Voranalysen belegen einen signifikanten Erhalt der Herzfunktion, was vorrangig an der kaum beeinträchtigten Ejektionsfraktion (EF) sowie dem *fractional shortening* (FS) deutlich wurde (Abbildung 8). Zusammenfassend führt der Verlust von Fto zu einer reduzierten Schädigung des Myokards, welches mit einer kleineren Infarkt Narbe und einem Erhalt der Herzfunktion einhergeht.

5.1.2. Der Fto-Verlust führte zu einer Reduktion in der Expression von *Mcp1* und *Mmp9*

Die Inflammation ist ein wichtiger Prozess der am *Remodeling* des Ventrikels nach Myokardinfarkt beteiligt ist. Hierdurch hat die Inflammation Auswirkungen auf die Wundheilung und die Herzfunktion. Gesteuert wird die inflammatorische Antwort durch die Sekretion verschiedener Zytokine (Huang and Frangogiannis, 2018). Diese werden als Biomarker genutzt, da sie Prognosen zum Heilungsverlauf eines Myokardinfarkt liefern können (Huang and Frangogiannis, 2018; Kaptoge et al., 2014; Seropian et al., 2016). Aufgrund dessen wurde die Expression von pro-inflammatorischen Markern im Herzen von *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Tieren untersucht. Bei der Analyse fielen besonders die Marker *Mcp1* und *Mmp9* auf, da deren Expression sowohl im ischämischen, als auch nicht ischämischen Bereich reduziert war. Bezüglich *Mcp1* wurde bereits in Mäusen gezeigt, dass ein Verlust oder die Inhibierung von *Mcp1*, die Infiltration von Monozyten und Makrophagen nach Myokardinfarkt verringerte. Zusätzlich führte dies zu einer geringeren Fibrose, sowie einer kleineren Infarktgröße (Dewald et al., 2005; Frangogiannis et al., 2007; Liehn et al., 2010). Hinsichtlich *Mmp9* bewirkte der Verlust in Mäusen ebenfalls eine reduzierte Einwanderung von Makrophagen in das infarzierte Myokard. Weiterhin kam es zu einer verminderten Kollageneinlagerung und Dilatation des LV (Ducharme et al., 2000; Lindsey et al., 2006). Auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Infiltration pro-inflammatorischer Monozyten und Makrophagen den kardialen Gewebeschaden verringerte (Chan et al., 2013; Gao et al., 2011; Kaikita et al., 2004; Zhao et al., 2013). Da Fto als RNA-Demethylase fungiert, kann es die Expression verschiedener mRNAs beeinflussen. Daher könnte der Fto-Verlust zu einer verringerten Expression von *Mcp1* und *Mmp9* geführt haben, was zu einer Minderung des I/R-Schadens beiträgt. Die verringerte *Mcp1*- und *Mmp9*-Expression könnte hierzu beigetragen haben.

5.1.3. Der Fto-Verlust führte zu einer reduzierten Aktivierung des mTORC1-Signalwegs

Um im näheren die molekularen Ursachen zu untersuchen, die ausschlaggebend am verbesserten Ausgang nach Myokardinfarkt in *Fto*^{-/-}-Tieren beteiligt sind, wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Hierdurch wurde der Einfluss von Fto auf transkriptioneller Ebene genauer untersucht. Aufgrund der Demethylase-Funktion von Fto war zu erwarten,

dass die ersten Auswirkungen des *Fto*-Verlustes auf transkriptioneller Ebene im mRNA-Expressionsprofil auftreten. Mit Hilfe der Signalwegs-Analyse sollten Signalwege ermittelt werden, welche aufgrund der mRNA-Expressionsunterschiede eine veränderte Aktivität aufweisen könnten (Abschnitt 4.2.2). Hierbei fiel besonders auf, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer vergleichbaren Signalwegs-Änderungen in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Tieren kam, allerdings mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten. Der deutlichste Unterschied lag beim Signalweg „*Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*“ vor. Dieser Signalweg ist vor allem an der Regulation der Proteinsynthese beteiligt (Laplanche and Sabatini, 2013). Beim Vergleich zwischen *Fto*^{+/+} Sham vs. *Fto*^{+/+} I/R wurde dieser Signalweg an zweiter Stelle gelistet, wohingegen der Signalweg beim Vergleich mit den *Fto*^{-/-}-Herzen erst an zwanzigster Stelle genannt wurde (Abbildung 15 und 16). Beim Vergleich der *Fto*^{+/+}-Herzen mit den *Fto*^{-/-}-Herzen nach I/R wurde nochmals deutlich, dass der überwiegende Anteil der veränderten Gene runterreguliert war (Abbildung 16). Die Regulation des eIF4 und p70S6K Signalwegs ist ein wichtiger Prozess nach dem ischämischen Gewebeschaden. Mit dem Einsetzen der Reperfusion beginnt der Heilungsprozess, dabei kommt es zur Aktivierung oder Umschaltung vieler verschiedener Signalwege. Dies führt zu einer erhöhten Expression verschiedener Gene, die für Proteine kodieren, welche am Heilungsprozess beteiligt sind (Liehn et al., 2011; Prabhu and Frangogiannis, 2016). Daraus folgt ein erhöhter Proteinsynthesebedarf, welcher unter anderem über den eIF4 und p70S6K Signalweg reguliert wird (Sciarretta et al., 2018a). Daher kam es vermutlich nach I/R in den *Fto*^{+/+}-Herzen zu einer überwiegenden Hochregulierung von Genen aus diesem Signalweg. Beim Vergleich der Sham- und I/R-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen kam es ebenfalls zu einer Änderung des eIF4- und p70S6K-Signalwegs. Jedoch lag hier ein geringerer p-Wert vor als in *Fto*^{+/+}-Herzen. Die beiden Signalwege des eIF4 sowie der p70S6K werden über den mTOR-Signalweg reguliert, wobei dies speziell durch die Aktivierung des mTORC1-Komplexes erfolgt (Saxton and Sabatini, 2017). Demzufolge könnte eine verringerte mTORC1-Aktivierung in den *Fto*^{-/-}-Herzen für die geringere Aktivität des eIF4- und p70S6K-Signalweges verantwortlich sein. Eine Inhibierung des mTORC1-Komplexes während eines Myokardinfarktes kann die Apoptose sowie die Infarktgröße reduzieren und zum Erhalt der Herzfunktion beitragen (Buss et al., 2009; Volkert et al., 2013). Daher wurde der mTOR-Signalweg mittels Western-Blot-Analyse genauer untersucht. In Abbildung 31 wurde hierzu die Interaktion der analysierten Zielproteine untereinander schematisch dargestellt.

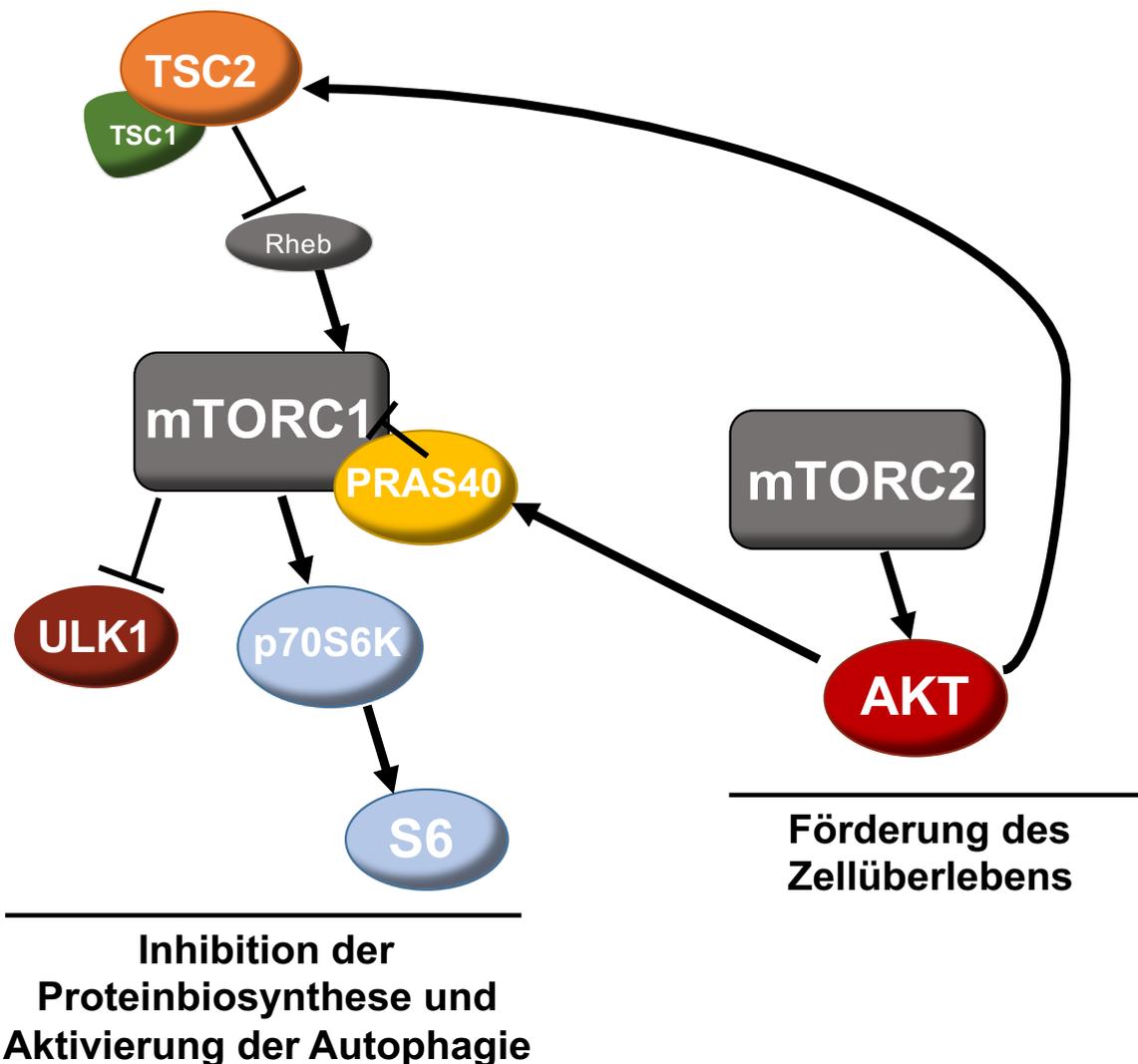


Abbildung 31. Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges. Die Aktivität des mTORC1-Komplexes kann durch den TSC-Komplex und PRAS40 inhibiert werden. Der TSC1/2-Komplex ist ein indirekter Inhibitor von mTORC1, indem es das GTP-Bindeprotein Rheb, ein positiver Regulator von mTORC1, inhibiert. Akt kann durch Phosphorylierung die inhibitorische Wirkung des TSC-Komplexes und PRAS40 aufheben. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivität des mTORC1-Komplexes und zur Erhöhung der Proteinbiosynthese über Aktivierung der p70S6K und zur Reduktion der Autophagie über Inhibierung der ULK1.

In den entsprechenden Western-Blot-Analysen konnten die Beobachtungen aus der Mikroarray-Analyse bestätigt werden (Abschnitte 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3). Insbesondere in den Sham-operierten Herzen der *Fto^{-/-}*-Tiere zeigte sich eine signifikante Reduktion in der ribosomalen S6 Protein-Phosphorylierung, was auf eine verringerte p70S6K-Aktivierung zurückzuführen ist (siehe Abbildung 31 und Abbildung 18 B). Interessanterweise konnte

allerdings keine verminderte mTOR-Aktivierung beobachtet werden (Abbildung 18 C). Daher kann vermutet werden, dass eine Inhibierung des mTORC1-Komplexes nach der mTOR-Phosphorylierung geschieht. Bei der Analyse der mTORC2-Aktivität zeigte sich, dass eine erhöhte Phosphorylierung von AKT in Sham-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen vorlag (Abbildung 18 A). AKT inhibiert über Phosphorylierung TSC2 und PRAS40, welche beide den mTORC1-Signalweg inhibieren. Demzufolge wäre eine erhöhte mTORC1-Aktivierung zu erwarten gewesen (Abbildung 31) (Laplanche and Sabatini, 2013). Daher wurden im nächsten Schritt die beiden AKT-Zielproteine TSC2 und PRAS40 untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass eine erhöhte Proteinmenge von TSC2 und PRAS40 in den *Fto*^{-/-}-Herzen vorlag. Insbesondere bei der Quantifizierung des phospho-PRAS40/PRAS40-Verhältnis zeigte sich eine Reduktion des phospho-PRAS40 Anteils, verglichen zu den *Fto*^{+/+}-Herzen (Abbildung 18 B). Vermutlich ist dies auf die erhöhte Proteinexpression von PRAS40 zurückzuführen, da trotz erhöhter AKT-Aktivität immer noch ein Überschuss an nicht-phosphoryliertem PRAS40 vorlag. PRAS40 bindet direkt am mTORC1-Komplex und inhibiert damit dessen Aktivität. Erst nach Phosphorylierung durch AKT dissoziiert PRAS40 von dem mTORC1-Komplex und ermöglicht die Signalweiterleitung (Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007; Wang et al., 2007). Durch die erhöhte Menge an PRAS40 ist vermutlich mehr im mTORC1-Komplex gebunden und inhibiert dessen Signalweiterleitung. Der TSC-Komplex, zu welchem TSC2 gehört, ist ein indirekter Inhibitor vom mTORC1-Komplex, da es das GTP-Bindeprotein Rheb inhibiert. Rheb wiederum ist ein positiver Regulator des mTORC1-Komplexes und führt zu dessen Aktivierung (Castro et al., 2003; Manning and Cantley, 2003; Potter et al., 2002). In der Analyse des phospho-TSC2/TSC2-Verhältnis wurde kein Unterschied in den *Fto*^{-/-}- zu den *Fto*^{+/+}-Herzen beobachtet. In den Sham-operierten *Fto*^{-/-}-Herzen wurde allerdings eine gesteigerte Expression von TSC2 gemessen (Abbildung 18 A). Diese könnte ebenfalls die erhöhte Aktivität von AKT kompensieren, sodass es letztendlich zu keinem Unterschied im Verhältnis von phosphorylierter Form zu nicht-phosphorylierter Form kam. Vermutlich konnte aufgrund dessen keine Änderung in der mTOR-Phosphorylierung gemessen werden, da die Aktivierung von mTOR selber nicht inhibiert wurde.

Darauffolgend wurde die Expression der mRNA von *Tsc2* und *Akt1s1* (PRAS40) untersucht. Auch hier zeigte sich für *Tsc2* in *Fto*^{-/-} Sham-operierten Herzen eine erhöhte Expression. Äquivalent zur Proteinexpression von PRAS40 wies *Akt1s1* in den Sham- sowie I/R-operierten Herzen eine gesteigerte Expression auf (Abbildung 19). Die erhöhte mRNA-Expression der beiden Targets kann möglicherweise direkt auf den *Fto*-Verlust zurückgeführt werden. Mauer et al. zeigte 2017, dass *Fto* als m⁶A_m-RNA-Demethylase fungiert und die Entfernung dieser Methylgruppe die mRNA-Stabilität negativ beeinflusste. Die m⁶A_m-Methylierung bewirkte eine gewisse Stabilität gegen das DCP2-Decappingenzym, welches am mRNA-Abbau beteiligt ist.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch diese Methylierungen auch der microRNA-vermittelte Abbau inhibiert werden kann. Folglich bewirkt die m⁶A_m-Methylierung eine Stabilisierung der mRNA und führt letztendlich zu einer erhöhten Proteintranslation (Mauer et al., 2017). Mittels einer transkriptionsweiten Markierung von m⁶A_m-mRNA-Targets, konnte gezeigt werden, dass auch *Tsc2* und *Akt1s1* verschiedene m⁶A_m-Methylierungen aufweisen (Linder et al., 2015; Mauer et al., 2017). Durch das Fehlen von *Fto* kommt es zu keiner Demethylierung der beiden mRNAs. Die hieraus resultierende erhöhte mRNA-Stabilität kann zu einer erhöhten Menge von *Tsc2* und *Akt1s1* führen, welches schließlich eine Zunahme der Proteintranslation bewirkt. Interessanterweise wurde in *Fto*^{-/-}-Mäusen auch in Myozyten, MEFs und im Gehirn eine Reduktion des mTORC1-Signalweges beobachtet. In allen drei Studien konnte eine verringerte p70S6K-Aktivierung gezeigt werden (Gulati et al., 2013; Li et al., 2018; Wang et al., 2017). Dies führt zu der Annahme das *Fto* scheinbar einen globalen Effekt auf den mTOR-Signalweg in der Maus hat.

Der Einfluss des mTOR-Signalwegs auf einen Myokardinfarkt wurde bereits genauer untersucht. Während einer Ischämie kommt es zu einem Mangel an Nährstoffen. Die Reduktion der mTORC1-Aktivität führt zu einer Reduktion des Energieverbrauches und zur Aktivierung der Autophagie (Sciarretta et al., 2014). Während der Ischämie wird hierdurch das Zellüberleben bis zu einem gewissen Maß gewährleistet. Demensprechend ist eine Reduktion der mTORC1-Aktivität während einer kardialen Ischämie protektiv. Die reduzierte Zell-Apoptose führt zu einer verringerten Infarktgröße und resultiert in einer verbesserten Herzfunktion (Buss et al., 2009; Das et al., 2012; Di et al., 2012; Volkers et al., 2013; Wu et al., 2013a). In einer Studie von Volkers et al. wurde gezeigt, dass während einer permanenten Ischämie eine spezifische Inhibition des mTORC1-Komplexes durch Überexpression von PRAS40, die Apoptose sowie Infarktgröße reduzierte und die Herzfunktion verbesserte. Eine Inhibierung des mTORC2-Signalweges durch einen *Knockdown* von Rictor führte hingegen zu einer deutlichen Zunahme des ischämischen Schades und zu einer Verschlechterung der Herzfunktion. Um den ischämischen Schaden zu verringern sollte folglich eine Reduktion des mTORC1-Signalweges initiiert werden, die mTORC2-Aktivität jedoch erhalten bleiben (Volkers et al., 2013). In den *Fto*^{-/-} Sham-operierten Herzen konnte das beschriebene Verhältnis beobachtet werden, welches vermutlich zu einer Reduktion des ischämischen Schadens geführt hat und sich in der reduzierten Infarktgröße zeigte. Welche Auswirkung die Inhibition des mTORC1-Komplexes nach einer Reperfusion hat, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Verabreichung von Rapamycin mit dem Einsetzen der Reperfusion eine protektive Wirkung hatte (Filippone et al., 2017). Eine andere Studie zeigte hingegen, durch einen Eingriff in die Gsk-3β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*)

Kinase Expression, dass eine Inhibierung des mTORC1-Komplexes den I/R-Schaden erhöhte (Zhai et al., 2011). Erfolgte die mTORC1-Inhibierung allerdings vor Beginn der Ischämie, resultierte dies eindeutig in einer Minderung des I/R-Schadens (Andres et al., 2014; Das et al., 2012). In den *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte bereits eine Minderung des mTORC1-Signalweges in Sham-operierten Herzen beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass bereits vor der Ischämie eine verminderte mTORC1-Aktivität vorlag, was mit der Vorbehandlung mit einem mTOR-Inhibitor vergleichbar ist. Dies könnte eine Verringerung der Zell-Apoptose bewirken, was die kleinere Infarktgröße der *Fto*^{-/-}-Tiere bedingen könnte. Nach Reperfusion kam es in den *Fto*^{-/-}-Herzen wie bei den *Fto*^{+/+}-Herzen zu einer Steigerung der mTORC1-Aktivität, jedoch war diese in den *Fto*^{-/-}-Tieren etwas geringer als in den *Fto*^{+/+}-Tieren. Ob dies einen Einfluss auf den weiteren Heilungsprozess hat, ist aufgrund der widersprüchlichen Studien nicht eindeutig. Allerdings wurden über den Zeitraum von drei Wochen keine negativen Auswirkungen beobachtet werden.

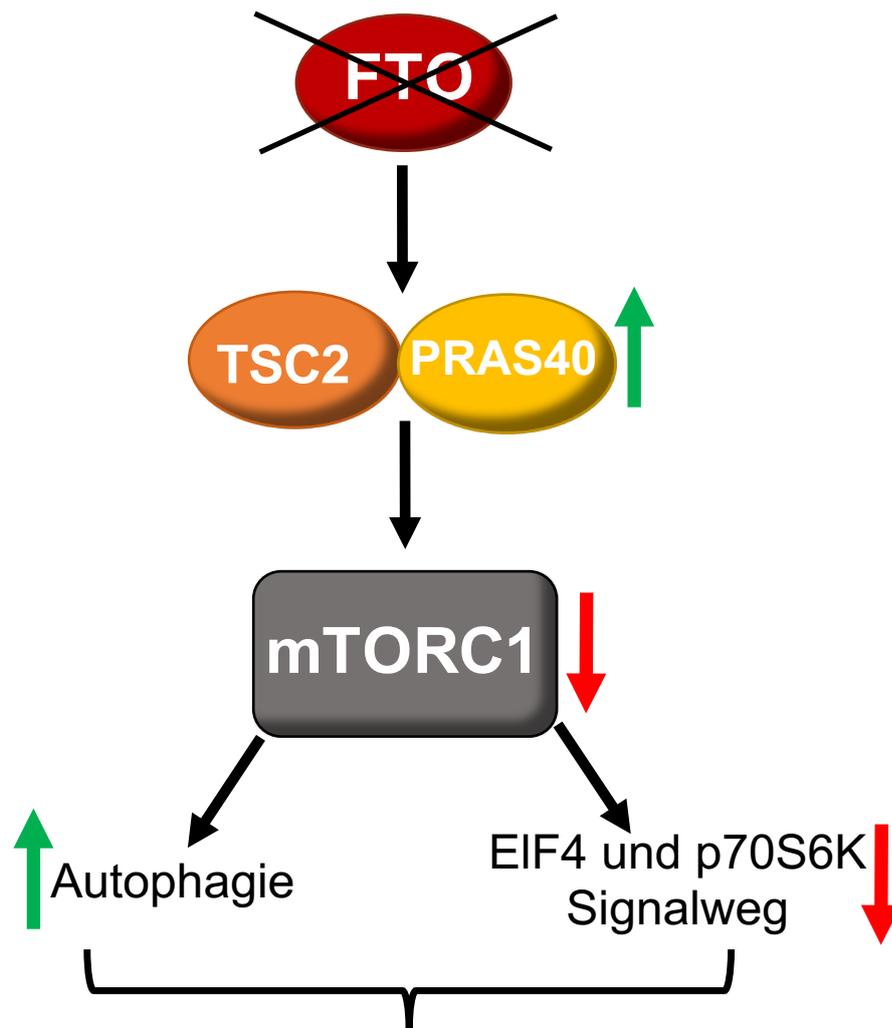
5.1.4. Der Fto-Verlust führte zu einer Zunahme der Autophagie

Im Weiteren wird durch den mTORC1-Komplex die Autophagie reguliert. Bei der Inhibierung von mTORC1 kommt es zu einer Steigerung der Autophagie (Laplante and Sabatini, 2013; Levine et al., 2011). In den *Fto*^{-/-}-Herzen wurde nach kardialer I/R eine erhöhte Menge an LC3B-II/LC3B-I gemessen, was ein Indikator für eine Zunahme an Autophagosomen ist (Abbildung 20 A). Kommt es zu einer Steigerung der Autophagie wird die LC3B-I Form in LC3B-II umgewandelt und in die Autophagosomenmembran eingebaut. Als weiterer Autophagie-Marker diene p62. Dieses markiert die Proteine, welche mittels Autophagie degradiert werden sollen. Bei der Fusion des Autophagosom mit den Lysosomen kommt es zum Abbau des p62-Proteins. Daher wies die Reduktion von p62 in den *Fto*^{-/-}-Herzen auf einen erhöhten lysosomalen Abbau der Autophagosomen hin (Abbildung 20 B). Allerdings ist p62 kein ausreichender Marker um den autophagosomalen Abbau zu analysieren (Mizushima and Yoshimori, 2007). p62 interagiert mit vielen weiteren Signalmolekülen, die dessen Expression beeinflussen können. Unter anderem ist es an der proteasomalen Proteindegradation beteiligt (Myeku and Figueiredo-Pereira, 2011; Pankiv et al., 2007). Um eine genauere Aussage über den Autophagosomenabbau treffen zu können, müsste eine Behandlung der Sham- und I/R-operierten Tiere mit einem Autophagie-Inhibitor, wie z.B. Chloroquine oder Bafilomycin A, durchgeführt werden. Diese inhibieren die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen (Mauthe et al., 2018). In einer anschließenden Western-Blot-Analyse sollte es aufgrund der Behandlung zu einer weiteren Zunahme der LC3B-II Form im Verhältnis zur LC3B-I Form kommen. Dies würde darauf hindeuten, dass der lysosomale Abbau nicht gestört ist. Kommt

es jedoch zu keiner weiteren Zunahme des LC3B-II im Verhältnis zum LC3B-I, lag zuvor schon eine Störung im Autophagosomenabbau vor. Infolgedessen würde es zu einer Akkumulation von Autophagosomen kommen, was zur Aktivierung der Apoptose führen könnte (Loos et al., 2014; Mauthe et al., 2018; Tal et al., 2009). Andererseits ist zu beachten, dass eine Behandlung der Tiere mit einem Autophagie-Inhibitor auch die Infarktgröße und Herzfunktion nach Myokardinfarkt beeinflussen kann (Bravo-San Pedro et al., 2017a; Sciarretta et al., 2018b). Einige Studien zeigten bereits, dass eine Zunahme der Autophagie den kardialen Gewebeschaden minimieren kann (Bravo-San Pedro et al., 2017b; Riquelme et al., 2016; Wu et al., 2013c; Xie et al., 2014). Eine Inhibition hingegen kann die Apoptose fördern und den Gewebeschaden hierdurch erhöhen (Sciarretta et al., 2012; Wu et al., 2014). Besonders während der Ischämie wirkt eine gesteigerte Autophagie kardioprotektiv (Kanamori et al., 2011). Den Zellen können hierdurch Aminosäuren und Monosaccharide zur ATP-Produktion bereitgestellt werden. Dies ermöglicht den Kardiomyozyten, zumindest für eine gewisse Zeit, den Nährstoffmangel besser zu bewältigen. Zudem scheint die Autophagie, sowie einige Autophagie-assoziierte Proteine, eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort zu spielen. Durch den kontrollierten Abbau von zerstörten Mitochondrien oder Zellbestandteilen kann vermutlich eine erhöhte Inflammation im Gewebe vermieden werden (Egan et al., 2011; Levine et al., 2011; Matsui et al., 2007; Sciarretta et al., 2018b; Wu et al., 2013b; Xie et al., 2014; Zhang et al., 2017). Aufgrund dessen kann die vermutlich erhöhte Autophagie, welche durch die erhöhte Menge an LC3B-II/LC3B-I nachgewiesen wurde, in den *Fto*^{-/-}-Tieren zur Reduktion des Gewebeschadens beitragen.

5.1.5. Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von Fto auf den Myokardinfarkt

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die m⁶A_m-Methylierung der *Tsc2*- und *Akt1s1*-mRNA wahrscheinlich zu einer Zunahme der mRNA-Menge in den *Fto*^{-/-}-Mäusen führte. Diese wiederum erhöhte die Menge der Proteine TSC2 und PRAS40, welche zu einer reduzierten Aktivierung des mTORC1-Signalweges führen. Infolgedessen kam es zu einer Steigerung der Autophagie (Abbildung 32). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass beide Prozesse den I/R-Schaden verringern (Buss et al., 2009; Das et al., 2012; Dhingra et al., 2013; Filippone et al., 2017; Kanamori et al., 2011; Sciarretta et al., 2012; Volkers et al., 2013; Wu et al., 2013c). Somit könnte die reduzierte Aktivität des mTORC1-Signalwegs, sowie die daraus resultierende gesteigerte Autophagie für die reduzierte Apoptose, Infarktgröße, Infarktnarbe und die verbesserte Herzfunktion in *Fto*^{-/-}-Tieren verantwortlich sein.



Reduktion der Apoptose, Infarktgröße und Fibrose sowie Verbesserung der Herzfunktion

Abbildung 32. Der Fto-Verlust führte zu einer erhöhten Proteinexpression von TSC2 und PRAS40, welches eine Inhibierung des mTORC1-Signalweges bewirkt. Dies führte zu einer Aktivierung der Autophagie und Inhibierung der Proteinbiosynthese. Die Aktivität des mTORC2-Komplexes war erhöht und fördert das Zellüberleben. Zusammenfassend bewirkte dies eine Reduktion der Apoptose, der Infarktgröße und Fibrose sowie einen verbesserten Erhalt der Herzfunktion nach kardialer I/R in der *Fto*^{-/-}-Tieren.

In einer früheren Studie wurde ebenfalls der Einfluss von Fto auf einen Myokardinfarkt untersucht. Mathiyalagan et al. zeigten mittels einer m⁶A-Immünpräzipitation, dass viele der mRNA-Transkripte die eine Funktion in der Herzkontraktion besitzen, eine m⁶A/m⁶A_m-Methylierung aufweisen. Nach Myokardinfarkt wurde eine Verringerung der Fto-Expression in

Herzen von Mäusen, Schweinen sowie Menschen beobachtet, welches gleichzeitig zu einer Zunahme der m⁶A/m⁶A_m-Methylierung führte. Daraufhin wurde von den Autoren die Hypothese aufgestellt, dass die Zunahme der mRNA-Methylierung zu einem erhöhten Abbau der Transkripte führte, die vor allem am Erhalt der Herzkontraktion beteiligt waren. Mittels AAV9 (*Adeno-associated virus serotype 9*), sowie adenoviraler Überexpression von Fto sollte es den Autoren zufolge zu einer Demethylierung der Transkripte kommen und damit zu einer erhöhten Stabilität (Mathiyalagan et al., 2018). Dies ist jedoch widersprüchlich zu der Arbeit von Mauer et al. (Mauer et al., 2017). Tatsächlich führt die Überexpression von Fto zu einer verbesserten Herzfunktion sowie einer kleineren Infarktgröße 4 Wochen nach kardialer Ischämie (Mathiyalagan et al., 2018). Dieser Studie zufolge hätte in den *Fto*^{-/-}-Tieren hingegen eine deutlich schlechtere Herzfunktion sowie ein vergrößerter Infarkt nach kardialer Ischämie auftreten sollen. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass in der erwähnten Studie eine permanente kardiale Ischämie durchgeführt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen das Ischämie/Reperfusion-Modell verwendet. Während einer dauerhaften Ischämie bestehen andere physiologische Bedingungen als nach Einsetzen der Reperfusion. Folglich führt dies zu einer unterschiedlichen Genexpression und Signalwegs-Aktivierung (Buja, 2005; Yellon and Hausenloy, 2007). Daher könnte es möglich sein, dass in beiden physiologischen Konditionen die Expression von Fto unterschiedliche Auswirkungen hat. Des Weiteren wurde die Immunpräzipitation der mRNA mittels des m⁶A-Antikörpers durchgeführt. Mit diesem ist es, wie schon zuvor erwähnt, nicht möglich zwischen der m⁶A- und m⁶A_m-Methylierung zu unterscheiden (Mauer et al., 2017). Daher könnte es sein, dass einige der detektierten Transkripte nicht direkt durch Fto reguliert wurden. Zudem wurde angenommen, dass die erhöhte m⁶A-Methylierung die mRNA destabilisiert. Vorausgesetzt dass einige der detektierten Transkripte auch eine m⁶A_m-Methylierung aufwiesen, würde dies nach Mauer et al. jedoch zu einer Stabilisierung der mRNAs führen (Mauer et al., 2017). Daher wäre direkt durch eine erhöhte Fto-Expression keine erhöhte Expression der mRNA-Transkripte, die an der Herzkontraktion beteiligt sind, zu erwarten. Eine Möglichkeit wäre, dass es durch sekundäre Effekte, welche die m⁶A-Methylierungen der RNA beeinflussen, zu einer Erhöhung der Expression der Target-Transkripte kommt. Bezüglich der Ergebnisse aus dieser Arbeit wäre bei einer Überexpression von Fto eine Zunahme der mTORC1-Aktivität zu erwarten. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte mTOR-Aktivität während der Reperfusion das kardiale Remodeling reduziert (Bezzarides et al., 2016; Dhingra et al., 2013; Lu et al., 2010; Zhai et al., 2011). Dies könnte ebenfalls erklären warum eine Überexpression von Fto ebenfalls zu einer verbesserten Herzfunktion führt.

5.2. Einfluss der prä- und postoperativen Rhein-Behandlung auf den I/R-Schaden

In einem ersten Versuch zur Analyse von Fto als ein mögliches therapeutisches Target, wurden wildtypische Mäuse mit dem Fto-Inhibitor Rhein behandelt (Sun et al., 2016). Mittels einer Dot-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass die Behandlung zu einer signifikanten Zunahme der m^6A/m^6A_m -Methylierung im Herzen führte. Diese war jedoch nur halb so hoch wie in *Fto*^{-/-}-Herzen. Möglicherweise konnte keine vollständige Inhibition der Fto-Demethylase-Funktion erreicht werden. Jedoch ist zu beachten, dass aufgrund der Antikörperspezifität keine präzise Annahme über den m^6A_m Methylierungs-Status möglich ist (Mauer et al., 2017). Nichtsdestotrotz bewirkte die präoperative Behandlung eine Reduktion der Infarktgröße, sowie eine geringere Zunahme des EDV und ESV. Auch in einer Studie von 2015 konnte die kardioprotektive Wirkung einer Diacerein-Behandlung während einer permanenten Ischämie gezeigt werden (Torina et al., 2015). Hierbei handelt es sich um eine diacetylierte Form des Rheins, welches als Medikament genutzt wird. In der Leber wird das Diacerein zu Rhein deacetyliert (Nicolas et al., 1998). Die Diacerein-behandelten Tiere wiesen ebenfalls eine kleinere Infarktnarbe und ein verbessertes des EDV und ESV auf (Torina et al., 2015).

Die postoperative Behandlung zeigte hingegen keinen Erfolg. Es kam weder zu einer verminderten Infarktgröße noch zu einer verbesserten Herzfunktion. Bezüglich der mTOR-Inhibition, nach Einsetzen der Reperfusion, gibt es bisher widersprüchliche Studien (Andres et al., 2014; Das et al., 2012; Zhai et al., 2011). Daher ist keine eindeutige Einschätzung zu der Effizienz der postoperativen Rhein-Behandlung möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass die Behandlung nicht effizient genug ist, um die Demethylase-Funktion von Fto zu hemmen. In der präoperativen Behandlung konnte zwar ein positiver Effekt auf die Infarktgröße beobachtet werden, aber keine Verbesserung der EF und des FS, wie vorab bei den *Fto*^{-/-}-Tieren. In der zuvor genannten Studie von Torina et al. 2015, zur Rhein-Behandlung während eines akuten Myokardinfarktes, wurde den Tieren eine höhere Dosis verabreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Dosis von 50 mg/kg appliziert, während in der Studie von Torina et al. 80 mg/kg appliziert wurde.

5.3. Der Kardiomyozyten-spezifische Fto-Verlust hatte keinen Einfluss auf den I/R-Schaden

Der Fto-Verlust konnte spezifisch in Kardiomyozyten durch Tamoxifen-Zugabe erfolgreich induziert werden. Allerdings schien dieser Zelltyp-spezifische Fto-Verlust keinen Einfluss auf den I/R-Schaden zu haben. Weder in der Infarktgröße, noch in der Herzfunktion, konnte ein

Unterschied verglichen zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Der gesamte Anteil des Herzens besteht zu 60 % aus Kardiomyozyten, welche für die Herzkontraktion zuständig sind. Dennoch ist deren Überleben von weiteren Zellen abhängig (Pinto et al., 2016). Das Herz besteht zusätzlich zu einem großen Anteil aus anderen Zelltypen, wie Endothelzellen und Fibroblasten. Diese können bis zu 40 % der gesamten Herzmasse ausmachen und sind unter anderem für die intrazelluläre Kommunikation und den vaskulären Transport zuständig (Pinto et al., 2016; Zhou and Pu, 2016). Daher könnte der Fto-Verlust in Endothelzellen oder Fibroblasten ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den I/R-Schaden haben. Weiterhin könnte der Fto-Verlust in anderen Organen und Geweben ebenfalls Auswirkungen auf den Myokardschaden haben. Beispielweise wurde gezeigt, dass Fto einen großen Effekt auf die Bildung und den Erhalt des Fettgewebes hat (Fischer et al., 2009; Ikels et al., 2014; Martin Carli et al., 2018; Wang et al., 2015). Dieses ist wiederum für die Sekretion von Adipokinen verantwortlich, welche unter anderem die Immunzellantwort regulieren (Fasshauer and Bluher, 2015; Nakamura et al., 2014). So konnte bereits in Abhängigkeit von Fto eine veränderte Leptin- und Adiponektin-Sekretion beobachtet werden (Church et al., 2009; Labayen et al., 2011). Beide Adipokine können zudem den Ausgang eines Myokardinfarktes über verschiedenen Mechanismen positiv beeinflussen (McGaffin et al., 2009; Shibata et al., 2005; Tao et al., 2007). Auch der mTORC1-Komplex hat Auswirkungen auf das Fettgewebe, da dieser an der Regulation der Lipid-Synthese und des Metabolismus beteiligt ist (Saxton and Sabatini, 2017). Es wurde bereits gezeigt, dass Fto den mTORC1-Signalweg in unterschiedlichen Geweben und Zellen inhibiert (Gulati et al., 2013; Li et al., 2018; Wang et al., 2017). Daher könnte Fto ebenfalls einen Effekt auf den mTOR-Signalweg im Fettgewebe haben.

Da der Kardiomyozyten-spezifische Fto-Verlust keinen Einfluss auf den I/R-Schaden hatte, ist davon auszugehen, dass der positive Effekt des Fto-Verlustes nicht von den Kardiomyozyten abhängig ist.

5.4. Ausblick

Fto beeinflusst über die mRNA-Stabilität die Expression einer großen Anzahl verschiedener Gene. Dies hat letztendlich Auswirkungen auf die Aktivierung verschiedener Signalwege und beeinflusst hierdurch die Regulation verschiedener physiologischer Prozesse. In dieser Arbeit konnten die Auswirkungen des Fto-Verlustes auf den mTOR-Signalweg gezeigt werden. Vermutlich werden noch weitere Signalwege durch Fto reguliert. In den Daten der Signalwegs-Analyse wurden zahlreiche weitere Signalwege aufgeführt, in denen eine Änderung in der Genexpression vorlag. Beim Vergleich von *Fto*^{+/+} zu *Fto*^{-/-} I/R-operierten Herzen wurden

folgende weitere Signalwege aufgelistet: „*IL 8 Signaling*“, „*Role of macrophages, Fibroblasts, Endothelial Cells in rheumatoid Arthritis*“, „*Fcy receptor mediated phagocytosis in macrophages and monocytes*“ und „*Leukocyte extravasation signaling*“. Alle genannten Signalwege sind an der inflammatorischen Antwort, der Einwanderung von Immunzellen sowie dessen Funktion beteiligt. Auch die Expressionsanalyse 24 Stunden nach kardialer Ischämie zeigte eine geringere Expression der Gene *Mcp1* und *Mmp9*. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition oder Verlust dieser Gene zu einer verminderten Infiltration von Monozyten und Makrophagen führte (Dewald et al., 2005; Ducharme et al., 2000; Lindsey et al., 2006). Des Weiteren wurde in einigen Studien gezeigt, dass der mTOR-Signalweg Auswirkungen auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs hat (Chen et al., 2014; Dan et al., 2008; Dhingra et al., 2013; Gao et al., 2015). Der NF- κ B-Signalweg ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt (Gordon et al., 2011). Daher ist zu vermuten, dass Fto auch einen Einfluss auf die Regulation des Immunsystems hat (Liu et al., 2016; Prabhu and Frangogiannis, 2016). Die Immunantwort ist ausschlaggebend für den Heilungsprozess nach Einsetzen der Reperfusion und kann die Infarktgröße sowie Herzfunktion entscheidend beeinflussen (Liu et al., 2016). Daher könnte es in nachfolgenden Studien auch von Bedeutung sein die Immunzellaktivierung und Einwanderung in das infarzierte Gewebe zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehören ischämische Herzerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Adipositas ist einer der häufigsten Risikofaktoren für die Bildung eines Myokardinfarktes und kann zudem dessen Heilungsprozess verschlechtern. Das *fat mass and obesity associated gene (FTO)* steht in Verbindung mit der Entwicklung von Adipositas in Mäusen und im Menschen. Bei Fto handelt es sich um eine m⁶A_m-RNA-Demethylase, welche die RNA-Stabilität und damit die Translation beeinflussen kann. Hierdurch hat Fto eine große Auswirkung auf die Regulation des gesamten Transkriptoms. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Fto auf molekulare Prozesse nach einem Myokardinfarkt untersucht. Hierzu wurde in Fto-defizienten Mäusen eine Ischämie/Reperfusionsschaden induziert und analysiert. Die Fto-defizienten Tiere wiesen 24 Stunden nach kardialer Ischämie im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine reduzierte Apoptose und Infarktgröße auf. Auch die Herzfunktion war in den Fto-defizienten Tieren über einen Zeitraum von 3 Wochen deutlich besser erhalten. Zudem wurde 3 Wochen nach Ischämie eine signifikant kleinere Infarktnarbe verglichen zu den wildtypischen Tieren beobachtet. Zur näheren Untersuchung des Einflusses von Fto auf molekularer Ebene wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Die Daten der Signalwegs-Analyse deuteten darauf hin, dass Fto einen Einfluss auf den mTOR-Signalweg hat. In weiteren molekularen Analysen zeigte sich eine erhöhte Expression von TSC2 und PRAS40, welche zu einer Reduktion der mTORC1-Aktivität führten, aber keinen Einfluss auf den mTORC2-Signalweg hatten. Die verringerte Aktivität des mTORC1-Komplexes führte infolgedessen zu einer erhöhten Autophagie. Beide Beobachtungen wirken besonders während der Ischämie kardioprotektiv. Aufgrund der signifikant verbesserten Herzfunktion wurde das therapeutische Potential von Fto auf den Myokardinfarktschaden mittels eines Inhibitors namens Rhein untersucht. Die präoperative Behandlung führte zu einer Reduktion der Infarktgröße und zu einer verbesserten Herzfunktion. Die postoperative Behandlung hatte hingegen keinerlei Einfluss auf den Heilungsprozess.

In einem abschließenden Versuch wurde untersucht ob der kardioprotektive Effekt des Fto-Verlustes auf die Kardiomyozyten zurückzuführen war. Dazu wurden Tiere verwendet bei denen ein Kardiomyozyten-spezifischer Fto-Verlust induziert wurde. Allerdings konnte in diesen Tieren keine Reduktion des Gewebeschadens, noch eine verbesserte Herzfunktion beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der globale Verlust von Fto, über die verminderte mTORC1-Aktivität und die Erhöhung der Autophagie, zu einer Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschaden führte.

7. Abstract

According to the World Health Organization (WHO), ischemic heart diseases are still a leading cause of death worldwide. Particularly obesity is one of the major risk factors that can lead to a myocardial infarction and negatively influence subsequent cardiac remodeling. The “fat mass and obesity associated gene” (*FTO*) is related to the development of obesity in mice and humans. In addition, it is known that *Fto* acts as a specific m^6A_m RNA demethylase, whereby it can influence mRNA stability and translation. Thereby it has a huge impact on the whole transcriptome. Therefore, the functional role of *Fto* on myocardial infarction was investigated in the present thesis. We used *Fto* deficient mice that undergo myocardial ischemia/reperfusion injury via coronary artery ligation. 24 h after myocardial ischemia the *Fto* negative mice exhibited a reduced cell apoptosis and infarct size. Furthermore, over the time of three weeks the *Fto* deficient mice had preserved heart function and a reduced scar size compared to the control mice. To further uncover the molecular relevance of *Fto* a microarray was performed. The pathway analysis revealed a reduction in the mTORC1 signaling. Further molecular analyses showed an increased protein expression of PRAS40 and TSC2, which consequently leads to a reduced mTORC1 complex activation but has no effect on mTORC2 signaling. Consequently, the decreased activity of the mTORC1 complex resulted in increased autophagy. Both processes are cardioprotective, especially during ischemia.

Due to the significantly improved cardiac function the therapeutic potential of *Fto* was analyzed using an inhibitor called Rhein. The pretreatment resulted in a reduction in infarct size and improved cardiac function. On the other hand the post-treatment had no influence on the healing process.

In an last experiment it was further investigated, if the protective effect of the *Fto* loss is locally attributable to the cardiomyocytes. Therefore animals were used, where a specific *Fto* loss in cardiomyocytes was induced by tamoxifen injection. However, these mice revealed no reduced infarct size neither preserved a heart function.

In summary, this study showed that a global *Fto* deficiency decreased the mTORC1 activity and simultaneously increased autophagy, thereby leading to a reduced ischemia/ reperfusion injury.

8. Literaturverzeichnis

Alpert, J.S., Thygesen, K., Jaffe, A., White, H.D., 2008. The universal definition of myocardial infarction: a consensus document: ischaemic heart disease. *Heart* 94, 1335-1341.

Ammirati, E., Cannistraci, C.V., Cristell, N.A., Vecchio, V., Palini, A.G., Tornvall, P., Paganoni, A.M., Miendlarzewska, E.A., Sangalli, L.M., Monello, A., Pernow, J., Bjornstedt Bennermo, M., Marenzi, G., Hu, D., Uren, N.G., Cianflone, D., Ravasi, T., Manfredi, A.A., Maseri, A., 2012. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circ Res* 111, 1336-1348.

Andreasen, C.H., Stender-Petersen, K.L., Mogensen, M.S., Torekov, S.S., Wegner, L., Andersen, G., Nielsen, A.L., Albrechtsen, A., Borch-Johnsen, K., Rasmussen, S.S., Clausen, J.O., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Hansen, L., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T., 2008. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57, 95-101.

Andres, A.M., Hernandez, G., Lee, P., Huang, C., Ratliff, E.P., Sin, J., Thornton, C.A., Damasco, M.V., Gottlieb, R.A., 2014. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid Redox Signal* 21, 1960-1973.

Atlas Writing, G., Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M., Wilkins, E., Wright, L., Vos, R., Bax, J., Blum, M., Pinto, F., Vardas, P., 2018. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J* 39, 508-579.

Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jimenez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C., Stroke Statistics, S., 2017. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146-e603.

Bezzarides, V.J., Platt, C., Lerchenmuller, C., Paruchuri, K., Oh, N.L., Xiao, C., Cao, Y., Mann, N., Spiegelman, B.M., Rosenzweig, A., 2016. CITED4 induces physiologic hypertrophy and promotes functional recovery after ischemic injury. *JCI Insight* 1.

Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhom, N., Etchevers, H.C., Saudek, V., Farooqi, I.S., Froguel, P., Lindahl, T., O'Rahilly, S., Munnich, A., Colleaux, L., 2009. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 85, 106-111.

Bravo-San Pedro, J.M., Kroemer, G., Galluzzi, L., 2017a. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 120, 1812-1824.

Bravo-San Pedro, J.M., Kroemer, G., Galluzzi, L., 2017b. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 120, 1812-1824.

Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.G., DePaoli-Roach, A.A., Robbins, J., Hewett, T.E., Bibb, J.A., Westfall, M.V., Kranias, E.G., Molkentin, J.D., 2004. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10, 248-254.

- Brodie, B.R., 2008. What anti-thrombotic therapy is best with primary PCI for acute ST elevation myocardial infarction: how should the HORIZONS trial change current practice? *Catheter Cardiovasc Interv* 71, 816-821.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., Schreiber, S.L., 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758.
- Buja, L.M., 2005. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 14, 170-175.
- Bujak, M., Dobaczewski, M., Chatila, K., Mendoza, L.H., Li, N., Reddy, A., Frangogiannis, N.G., 2008. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* 173, 57-67.
- Buss, S.J., Muenz, S., Riffel, J.H., Malekar, P., Hagenmueller, M., Weiss, C.S., Bea, F., Bekeredjian, R., Schinke-Braun, M., Izumo, S., Katus, H.A., Hardt, S.E., 2009. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54, 2435-2446.
- Castro, A.F., Rebhun, J.F., Clark, G.J., Quilliam, L.A., 2003. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem* 278, 32493-32496.
- Cecil, J.E., Tavendale, R., Watt, P., Hetherington, M.M., Palmer, C.N., 2008. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 359, 2558-2566.
- Chan, W., White, D.A., Wang, X.Y., Bai, R.F., Liu, Y., Yu, H.Y., Zhang, Y.Y., Fan, F., Schneider, H.G., Duffy, S.J., Taylor, A.J., Du, X.J., Gao, W., Gao, X.M., Dart, A.M., 2013. Macrophage migration inhibitory factor for the early prediction of infarct size. *J Am Heart Assoc* 2, e000226.
- Chen, B., Ye, F., Yu, L., Jia, G., Huang, X., Zhang, X., Peng, S., Chen, K., Wang, M., Gong, S., Zhang, R., Yin, J., Li, H., Yang, Y., Liu, H., Zhang, J., Zhang, H., Zhang, A., Jiang, H., Luo, C., Yang, C.G., 2012. Development of cell-active N6-methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor. *J Am Chem Soc* 134, 17963-17971.
- Chen, X., Zeng, S., Zou, J., Chen, Y., Yue, Z., Gao, Y., Zhang, L., Cao, W., Liu, P., 2014. Rapamycin attenuated cardiac hypertrophy induced by isoproterenol and maintained energy homeostasis via inhibiting NF-kappaB activation. *Mediators Inflamm* 2014, 868753.
- Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J.A., Lavandero, S., 2011. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* 2, e244.
- Chitnis, N., Vooturi, S., Hygriv Rao, B., 2014. Sudden cardiac death early after ST elevation myocardial infarction with and without severe left ventricular dysfunction. *Indian Heart J* 66, 569-573.
- Church, C., Lee, S., Bagg, E.A., McTaggart, J.S., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinovic, J., Quwailid, M.M., Schofield, C.J., Ashcroft, F.M., Cox, R.D., 2009. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet* 5, e1000599.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G.T., Teboul, L., Wells, S., Bruning, J.C., Nolan, P.M., Ashcroft, F.M., Cox, R.D., 2010. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet* 42, 1086-1092.
- Cornes, B.K., Lind, P.A., Medland, S.E., Montgomery, G.W., Nyholt, D.R., Martin, N.G., 2009. Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *Int J Obes (Lond)* 33, 75-79.

- Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J., 2001. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 89, 201-210.
- Dan, H.C., Cooper, M.J., Cogswell, P.C., Duncan, J.A., Ting, J.P., Baldwin, A.S., 2008. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev* 22, 1490-1500.
- Daoud, H., Zhang, D., McMurray, F., Yu, A., Luco, S.M., Vanstone, J., Jarinova, O., Carson, N., Wickens, J., Shishodia, S., Choi, H., McDonough, M.A., Schofield, C.J., Harper, M.E., Dymont, D.A., Armour, C.M., 2016. Identification of a pathogenic FTO mutation by next-generation sequencing in a newborn with growth retardation and developmental delay. *J Med Genet* 53, 200-207.
- Das, A., Salloum, F.N., Durrant, D., Ockaili, R., Kukreja, R.C., 2012. Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 53, 858-869.
- de Haan, J.J., Smeets, M.B., Pasterkamp, G., Arslan, F., 2013. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm* 2013, 206039.
- den Hoed, M., Westerterp-Plantenga, M.S., Bouwman, F.G., Mariman, E.C., Westerterp, K.R., 2009. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr* 90, 1426-1432.
- Desrosiers, R., Friderici, K., Rottman, F., 1974. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3971-3975.
- Dewald, O., Frangogiannis, N.G., Zoerlein, M.P., Duerr, G.D., Taffet, G., Michael, L.H., Welz, A., Entman, M.L., 2004. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 52, 305-311.
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L.H., Rollins, B.J., Entman, M.L., Frangogiannis, N.G., 2005. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 96, 881-889.
- Dhingra, R., Gang, H., Wang, Y., Biala, A.K., Aviv, Y., Margulets, V., Tee, A., Kirshenbaum, L.A., 2013. Bidirectional regulation of nuclear factor-kappaB and mammalian target of rapamycin signaling functionally links Bnip3 gene repression and cell survival of ventricular myocytes. *Circ Heart Fail* 6, 335-343.
- Di, R., Wu, X., Chang, Z., Zhao, X., Feng, Q., Lu, S., Luan, Q., Hemmings, B.A., Li, X., Yang, Z., 2012. S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem J* 441, 199-207.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J.C., Froguel, P., 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39, 724-726.
- Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C., Frangogiannis, N.G., 2010. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48, 504-511.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., Rechavi, G., 2012. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485, 201-206.
- Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L.E., Schoen, F.J., Kelly, R.A., Werb, Z., Libby, P., Lee, R.T., 2000. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-

9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 106, 55-62.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456-461.

Fasshauer, M., Bluher, M., 2015. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 36, 461-470.

Filippone, S.M., Samidurai, A., Roh, S.K., Cain, C.K., He, J., Salloum, F.N., Kukreja, R.C., Das, A., 2017. Reperfusion Therapy with Rapamycin Attenuates Myocardial Infarction through Activation of AKT and ERK. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 4619720.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147, 3815-3822.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Bruning, J.C., Rütther, U., 2009. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458, 894-898.

Frangogiannis, N.G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B.J., Entman, M.L., 2007. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584-592.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard, S., Groves, C.J., Knight, B., Patch, A.M., Ness, A.R., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Ring, S.M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.R., Sovio, U., Bennett, A.J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R.J., Barroso, I., Wareham, N.J., Karpe, F., Owen, K.R., Cardon, L.R., Walker, M., Hitman, G.A., Palmer, C.N., Doney, A.S., Morris, A.D., Smith, G.D., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.

Freathy, R.M., Timpson, N.J., Lawlor, D.A., Pouta, A., Ben-Shlomo, Y., Ruukonen, A., Ebrahim, S., Shields, B., Zeggini, E., Weedon, M.N., Lindgren, C.M., Lango, H., Melzer, D., Ferrucci, L., Paolisso, G., Neville, M.J., Karpe, F., Palmer, C.N., Morris, A.D., Elliott, P., Jarvelin, M.R., Smith, G.D., McCarthy, M.I., Hattersley, A.T., Frayling, T.M., 2008. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 57, 1419-1426.

Fredriksson, R., Hagglund, M., Olszewski, P.K., Stephansson, O., Jacobsson, J.A., Olszewska, A.M., Levine, A.S., Lindblom, J., Schioth, H.B., 2008. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149, 2062-2071.

Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.L., Fimia, G.M., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, J.W., Jaattela, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Munz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A.K., Simon, H.U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Kroemer, G., 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36, 1811-1836.

Gao, X.M., Liu, Y., White, D., Su, Y., Drew, B.G., Bruce, C.R., Kiriazis, H., Xu, Q., Jennings, N., Bobik, A., Febbraio, M.A., Kingwell, B.A., Bucala, R., Fingerle-Rowson, G., Dart, A.M., Morand, E.F., Du, X.J., 2011. Deletion of macrophage migration inhibitory factor protects the

heart from severe ischemia-reperfusion injury: a predominant role of anti-inflammation. *J Mol Cell Cardiol* 50, 991-999.

Gao, Y., Gartenhaus, R.B., Lapidus, R.G., Hussain, A., Zhang, Y., Wang, X., Dan, H.C., 2015. Differential IKK/NF-kappaB Activity Is Mediated by TSC2 through mTORC1 in PTEN-Null Prostate Cancer and Tuberous Sclerosis Complex Tumor Cells. *Mol Cancer Res* 13, 1602-1614.

Garami, A., Zwartkuis, F.J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S.C., Hafen, E., Bos, J.L., Thomas, G., 2003. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 11, 1457-1466.

Garcia-Martinez, J.M., Alessi, D.R., 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416, 375-385.

Gerczuk, P.Z., Kloner, R.A., 2012. An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 59, 969-978.

Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A.P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I.S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C.P., Ashcroft, F.M., O'Rahilly, S., Schofield, C.J., 2007. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469-1472.

Gordon, J.W., Shaw, J.A., Kirshenbaum, L.A., 2011. Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB. *Circ Res* 108, 1122-1132.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., Sabatini, D.M., 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11, 859-871.

Gulati, P., Cheung, M.K., Antrobus, R., Church, C.D., Harding, H.P., Tung, Y.C., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P.J., Ashcroft, F.M., Cox, R.D., Coll, A.P., O'Rahilly, S., Yeo, G.S., 2013. Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2557-2562.

Gwechenberger, M., Mendoza, L.H., Youker, K.A., Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., Michael, L.H., Entman, M.L., 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 99, 546-551.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-226.

Han, Z., Huang, N., Niu, T., Chai, J., 2010a. A loop matters for FTO substrate selection. *Protein Cell* 1, 616-620.

Han, Z., Niu, T., Chang, J., Lei, X., Zhao, M., Wang, Q., Cheng, W., Wang, J., Feng, Y., Chai, J., 2010b. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* 464, 1205-1209.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K., 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Matsumoto, K., Maruoka, S., Horie, T., 2001. Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 152-157.

- Haupt, A., Thamer, C., Staiger, H., Tschritter, O., Kirchhoff, K., Machicao, F., Haring, H.U., Stefan, N., Fritsche, A., 2009. Variation in the FTO gene influences food intake but not energy expenditure. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117, 194-197.
- Hausenloy, D.J., Botker, H.E., Engstrom, T., Erlinge, D., Heusch, G., Ibanez, B., Kloner, R.A., Ovize, M., Yellon, D.M., Garcia-Dorado, D., 2017. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations. *Eur Heart J* 38, 935-941.
- Hinney, A., Nguyen, T.T., Scherag, A., Friedel, S., Bronner, G., Muller, T.D., Grallert, H., Illig, T., Wichmann, H.E., Rief, W., Schafer, H., Hebebrand, J., 2007. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* 2, e1361.
- Hirohata, S., Kusachi, S., Murakami, M., Murakami, T., Sano, I., Watanabe, T., Komatsubara, I., Kondo, J., Tsuji, T., 1997. Time dependent alterations of serum matrix metalloproteinase-1 and metalloproteinase-1 tissue inhibitor after successful reperfusion of acute myocardial infarction. *Heart* 78, 278-284.
- Hochhauser, E., Cheporko, Y., Yasovich, N., Pinchas, L., Offen, D., Barhum, Y., Pannet, H., Tobar, A., Vidne, B.A., Birk, E., 2007. Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction. *Cell Biochem Biophys* 47, 11-20.
- Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M., Manning, B.D., 2008. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 28, 4104-4115.
- Huang, S., Frangogiannis, N.G., 2018. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol* 175, 1377-1400.
- Ikels, K., Kuschel, S., Fischer, J., Kaisers, W., Eberhard, D., Rütger, U., 2014. FTO is a relevant factor for the development of the metabolic syndrome in mice. *PLoS One* 9, e105349.
- Ikeuchi, M., Tsutsui, H., Shiomi, T., Matsusaka, H., Matsushima, S., Wen, J., Kubota, T., Takeshita, A., 2004. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res* 64, 526-535.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-657.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.Y., He, X., MacDougald, O.A., You, M., Williams, B.O., Guan, K.L., 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955-968.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., Hall, M.N., 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6, 1122-1128.
- Jacobsson, J.A., Danielsson, P., Svensson, V., Klovins, J., Gyllensten, U., Marcus, C., Schioth, H.B., Fredriksson, R., 2008a. Major gender difference in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 476-482.
- Jacobsson, J.A., Klovins, J., Kapa, I., Danielsson, P., Svensson, V., Ridderstrale, M., Gyllensten, U., Marcus, C., Fredriksson, R., Schioth, H.B., 2008b. Novel genetic variant in FTO influences insulin levels and insulin resistance in severely obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 32, 1730-1735.
- Jacobsson, J.A., Schioth, H.B., Fredriksson, R., 2012. The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene FTO. *Obes Rev* 13, 1096-1109.
- Jennings, R.B., Murry, C., Reimer, K.A., 1990a. Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion. *Adv Cardiol* 37, 7-31.

- Jennings, R.B., Murry, C.E., Steenbergen, C., Jr., Reimer, K.A., 1990b. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 82, 112-12.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G., He, C., 2011. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* 7, 885-887.
- Jia, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., He, C., 2008. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett* 582, 3313-3319.
- Kaikita, K., Hayasaki, T., Okuma, T., Kuziel, W.A., Ogawa, H., Takeya, M., 2004. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol* 165, 439-447.
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T., Mizushima, N., 2010. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem* 285, 20109-20116.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W.A., Sonnenblick, E.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., Anversa, P., 1996. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74, 86-107.
- Kamura, Y., Iwata, M., Maeda, S., Shinmura, S., Koshimizu, Y., Honoki, H., Fukuda, K., Ishiki, M., Usui, I., Fukushima, Y., Takano, A., Kato, H., Murakami, S., Higuchi, K., Kobashi, C., Tobe, K., 2016. FTO Gene Polymorphism Is Associated with Type 2 Diabetes through Its Effect on Increasing the Maximum BMI in Japanese Men. *PLoS One* 11, e0165523.
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Maruyama, R., Ono, K., Nagao, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Kawasaki, M., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Seishima, M., Minatoguchi, S., 2011. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H2261-2271.
- Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A.N., Katewa, S.D., Li, P.W., Thomas, E.L., Kockel, L., 2010. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* 11, 453-465.
- Kaptoge, S., Seshasai, S.R., Gao, P., Freitag, D.F., Butterworth, A.S., Borglykke, A., Di Angelantonio, E., Gudnason, V., Rumley, A., Lowe, G.D., Jorgensen, T., Danesh, J., 2014. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J* 35, 578-589.
- Kazlauskienė, L., Butnorienė, J., Norkus, A., 2015. Metabolic syndrome related to cardiovascular events in a 10-year prospective study. *Diabetol Metab Syndr* 7, 102.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11, 895-904.
- Kloner, R.A., Brown, D.A., Csete, M., Dai, W., Downey, J.M., Gottlieb, R.A., Hale, S.L., Shi, J., 2017. New and revisited approaches to preserving the reperfused myocardium. *Nat Rev Cardiol* 14, 679-693.
- Kowalak, J.A., Pomerantz, S.C., Crain, P.F., McCloskey, J.A., 1993. A novel method for the determination of post-transcriptional modification in RNA by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 21, 4577-4585.

- Labayan, I., Ruiz, J.R., Ortega, F.B., Dallongeville, J., Jimenez-Pavon, D., Castillo, M.J., De Henauw, S., Gonzalez-Gross, M., Bueno, G., Molnar, D., Kafatos, A., Diaz, L.E., Meirhaeghe, A., Moreno, L.A., 2011. Association between the FTO rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: a possible link with energy balance control. The HELENA study. *Int J Obes (Lond)* 35, 66-71.
- Laemmli, U.K., Mölbert, E., Showe, M., Kellerberger, E., 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *Journal of molecular biology* 49, 99-113.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19, R1046-1052.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2013. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 126, 1713-1719.
- Lee, P., Sata, M., Lefer, D.J., Factor, S.M., Walsh, K., Kitsis, R.N., 2003. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H456-463.
- Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H.W., 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323-335.
- Li, H., Ren, Y., Mao, K., Hua, F., Yang, Y., Wei, N., Yue, C., Li, D., Zhang, H., 2018. FTO is involved in Alzheimer's disease by targeting TSC1-mTOR-Tau signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 498, 234-239.
- Liehn, E.A., Piccinini, A.M., Koenen, R.R., Soehnlein, O., Adage, T., Fatu, R., Curaj, A., Popescu, A., Zerneck, A., Kungl, A.J., Weber, C., 2010. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Am Coll Cardiol* 56, 1847-1857.
- Liehn, E.A., Postea, O., Curaj, A., Marx, N., 2011. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines. *J Am Coll Cardiol* 58, 2357-2362.
- Linder, B., Grozhik, A.V., Olarerin-George, A.O., Meydan, C., Mason, C.E., Jaffrey, S.R., 2015. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods* 12, 767-772.
- Lindsey, M.L., Escobar, G.P., Dobrucki, L.W., Goshorn, D.K., Bouges, S., Mingoia, J.T., McClister, D.M., Jr., Su, H., Gannon, J., MacGillivray, C., Lee, R.T., Sinusas, A.J., Spinale, F.G., 2006. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H232-239.
- Liu, J., Wang, H., Li, J., 2016. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clin Med Insights Cardiol* 10, 79-84.
- Liu, P., Gan, W., Chin, Y.R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., Wang, B., Blenis, J., Cantley, L.C., Toker, A., Su, B., Wei, W., 2015. PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov* 5, 1194-1209.
- Lloyd-Jones, D.M., Hong, Y., Labarthe, D., Mozaffarian, D., Appel, L.J., Van Horn, L., Greenlund, K., Daniels, S., Nichol, G., Tomaselli, G.F., Arnett, D.K., Fonarow, G.C., Ho, P.M., Lauer, M.S., Masoudi, F.A., Robertson, R.M., Roger, V., Schwamm, L.H., Sorlie, P., Yancy, C.W., Rosamond, W.D., American Heart Association Strategic Planning Task, F., Statistics, C., 2010. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation* 121, 586-613.
- Loos, B., du Toit, A., Hofmeyr, J.H., 2014. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality. *Autophagy* 10, 2087-2096.

- Lopez-Bermejo, A., Petry, C.J., Diaz, M., Sebastiani, G., de Zegher, F., Dunger, D.B., Ibanez, L., 2008. The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1501-1505.
- Lu, Z., Xu, X., Hu, X., Fassett, J., Zhu, G., Tao, Y., Li, J., Huang, Y., Zhang, P., Zhao, B., Chen, Y., 2010. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 13, 1011-1022.
- Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K., Seishima, M., 2002. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J Am Coll Cardiol* 39, 1229-1235.
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2003. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 28, 573-576.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., Cantley, L.C., 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10, 151-162.
- Martin Carli, J.F., LeDuc, C.A., Zhang, Y., Stratigopoulos, G., Leibel, R.L., 2018. FTO mediates cell-autonomous effects on adipogenesis and adipocyte lipid content by regulating gene expression via modifications of DNA N6-methyldeoxyadenosine. *J Lipid Res*.
- Mathiyalagan, P., Adamiak, M., Mayourian, J., Sassi, Y., Liang, Y., Agarwal, N., Jha, D., Zhang, S., Kohlbrenner, E., Chepurko, E., Chen, J., Trivieri, M.G., Singh, R., Bouchareb, R., Fish, K., Ishikawa, K., Lebeche, D., Hajjar, R.J., Sahoo, S., 2018. FTO-Dependent m6A Regulates Cardiac Function During Remodeling and Repair. *Circulation*.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., Sadoshima, J., 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 100, 914-922.
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A.V., Patil, D.P., Linder, B., Pickering, B.F., Vasseur, J.J., Chen, Q., Gross, S.S., Elemento, O., DeBart, F., Kiledjian, M., Jaffrey, S.R., 2017. Reversible methylation of m(6)Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* 541, 371-375.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435-1455.
- McGaffin, K.R., Zou, B., McTiernan, C.F., O'Donnell, C.P., 2009. Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 83, 313-324.
- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., Jaffrey, S.R., 2012. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635-1646.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
- Myeku, N., Figueiredo-Pereira, M.E., 2011. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem* 286, 22426-22440.
- Nakamura, K., Fuster, J.J., Walsh, K., 2014. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol* 63, 250-259.
- Nicolas, P., Tod, M., Padoin, C., Petitjean, O., 1998. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 35, 347-359.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., Yonezawa, K., 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner,

raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 278, 15461-15464.

Osorio, J., 2014. Obesity. BMI-associated genetic variants in FTO mastermind IRX3 expression. *Nat Rev Endocrinol* 10, 313.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131-24145.

Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R., Rüther, U., 2002. The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome* 13, 186-188.

Peters, T., Ausmeier, K., Rüther, U., 1999. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 10, 983-986.

Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.

Phatharajaree, W., Phrommintikul, A., Chattipakorn, N., 2007. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction. *Can J Cardiol* 23, 727-733.

Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., Tallquist, M.D., 2016. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118, 400-409.

Potter, C.J., Pedraza, L.G., Xu, T., 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4, 658-665.

Prabhu, S.D., Frangogiannis, N.G., 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 119, 91-112.

Rainer, P.P., Hao, S., Vanhoutte, D., Lee, D.I., Koitabashi, N., Molkentin, J.D., Kass, D.A., 2014. Cardiomyocyte-specific transforming growth factor beta suppression blocks neutrophil infiltration, augments multiple cytoprotective cascades, and reduces early mortality after myocardial infarction. *Circ Res* 114, 1246-1257.

Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3116-3120.

Reuter, C.P., Burgos, M.S., Bernhard, J.C., Tornquist, D., Klinger, E.I., Borges, T.S., Renner, J.D., de Moura Valim, A.R., de Mello, E.D., 2016a. Association between overweight and obesity in schoolchildren with rs9939609 polymorphism (FTO) and family history for obesity. *J Pediatr (Rio J)* 92, 493-498.

Reuter, C.P., Rosane De Moura Valim, A., Gaya, A.R., Borges, T.S., Klinger, E.I., Possuelo, L.G., Franke, S.I., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Pra, D., Burgos, M.S., 2016b. FTO polymorphism, cardiorespiratory fitness, and obesity in Brazilian youth. *Am J Hum Biol* 28, 381-386.

Riquelme, J.A., Chavez, M.N., Mondaca-Ruff, D., Bustamante, M., Vicencio, J.M., Quest, A.F., Lavandero, S., 2016. Therapeutic targeting of autophagy in myocardial infarction and heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 14, 1007-1019.

Robbens, S., Rouze, P., Cock, J.M., Spring, J., Worden, A.Z., Van de Peer, Y., 2008. The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *J Mol Evol* 66, 80-84.

Rohde, D., Schon, C., Boerries, M., Didrihson, I., Ritterhoff, J., Kubatzky, K.F., Volkers, M., Herzog, N., Mahler, M., Tsoporis, J.N., Parker, T.G., Linke, B., Giannitsis, E., Gao, E., Peppel,

K., Katus, H.A., Most, P., 2014. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4. *EMBO Mol Med* 6, 778-794.

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., Snyder, S.H., 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.

Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., Abraham, R.T., 1995. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 270, 815-822.

Saldana-Alvarez, Y., Salas-Martinez, M.G., Garcia-Ortiz, H., Luckie-Duque, A., Garcia-Cardenas, G., Vicenteno-Ayala, H., Cordova, E.J., Esparza-Aguilar, M., Contreras-Cubas, C., Carnevale, A., Chavez-Saldana, M., Orozco, L., 2016. Gender-Dependent Association of FTO Polymorphisms with Body Mass Index in Mexicans. *PLoS One* 11, e0145984.

Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25, 903-915.

Sanchez-Pulido, L., Andrade-Navarro, M.A., 2007. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* 8, 23.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Satoh, M., Shimoda, Y., Maesawa, C., Akatsu, T., Ishikawa, Y., Minami, Y., Hiramori, K., Nakamura, M., 2006. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 109, 226-234.

Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 169, 361-371.

Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., Blenis, J., 2003. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol* 13, 797-806.

Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G., Sadoshima, J., 2018a. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res* 122, 489-505.

Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., Sadoshima, J., 2018b. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol* 80, 1-26.

Sciarretta, S., Volpe, M., Sadoshima, J., 2014. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res* 114, 549-564.

Sciarretta, S., Zhai, P., Shao, D., Maejima, Y., Robbins, J., Volpe, M., Condorelli, G., Sadoshima, J., 2012. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. *Circulation* 125, 1134-1146.

Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W.M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orru, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G.B., Fink, A.A., Weder, A.B., Cooper, R.S., Galan, P., Chakravarti, A., Schlessinger, D., Cao, A., Lakatta, E., Abecasis, G.R., 2007. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3, e115.

Seropian, I.M., Sonnino, C., Van Tassell, B.W., Biasucci, L.M., Abbate, A., 2016. Inflammatory markers in ST-elevation acute myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 5, 382-395.

Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., Walsh, K., 2005. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 11, 1096-1103.

Smemo, S., Tena, J.J., Kim, K.H., Gamazon, E.R., Sakabe, N.J., Gomez-Marin, C., Aneas, I., Credidio, F.L., Sobreira, D.R., Wasserman, N.F., Lee, J.H., Puviindran, V., Tam, D., Shen, M., Son, J.E., Vakili, N.A., Sung, H.K., Naranjo, S., Acemel, R.D., Manzanares, M., Nagy, A., Cox, N.J., Hui, C.C., Gomez-Skarmeta, J.L., Nobrega, M.A., 2014. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507, 371-375.

Speakman, J.R., Rance, K.A., Johnstone, A.M., 2008. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1961-1965.

Sun, H., Luo, G., Chen, D., Xiang, Z., 2016. A Comprehensive and System Review for the Pharmacological Mechanism of Action of Rhein, an Active Anthraquinone Ingredient. *Front Pharmacol* 7, 247.

Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, A., Uno, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., Fujiwara, H., 1998. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res* 82, 1130-1138.

Tal, M.C., Sasai, M., Lee, H.K., Yordy, B., Shadel, G.S., Iwasaki, A., 2009. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2770-2775.

Tanofsky-Kraff, M., Han, J.C., Anandalingam, K., Shomaker, L.B., Columbo, K.M., Wolkoff, L.E., Kozlosky, M., Elliott, C., Ranzenhofer, L.M., Roza, C.A., Yanovski, S.Z., Yanovski, J.A., 2009. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr* 90, 1483-1488.

Tao, L., Gao, E., Jiao, X., Yuan, Y., Li, S., Christopher, T.A., Lopez, B.L., Koch, W., Chan, L., Goldstein, B.J., Ma, X.L., 2007. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 115, 1408-1416.

Tarnavski, O., McMullen, J.R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S., Izumo, S., 2004. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 16, 349-360.

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., Blenis, J., 2003. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 13, 1259-1268.

Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Joint, E.S.C.A.A.H.A.W.H.F.T.F.f.t.R.o.M.I., 2007. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 50, 2173-2195.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., Hua, J., An, L.L., Audoly, L., La Rosa, G., Bierhaus, A., Naworth, P., Marshak-Rothstein, A., Crow, M.K., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Kiener, P.A., Coyle, A.J., 2007. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8, 487-496.

Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V.C., Arslan, F., Appelman, Y., de Kleijn, D.P., 2012. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 94, 276-283.

Timmers, L., Sluijter, J.P., van Keulen, J.K., Hofer, I.E., Nederhoff, M.G., Goumans, M.J., Doevendans, P.A., van Echteld, C.J., Joles, J.A., Quax, P.H., Piek, J.J., Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P., 2008. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 102, 257-264.

Tonjes, A., Zeggini, E., Kovacs, P., Bottcher, Y., Schleinitz, D., Dietrich, K., Morris, A.P., Enigk, B., Rayner, N.W., Koriath, M., Eszlinger, M., Kempainen, A., Prokopenko, I., Hoffmann, K., Teupser, D., Thiery, J., Krohn, K., McCarthy, M.I., Stumvoll, M., 2010. Association of FTO variants with BMI and fat mass in the self-contained population of Sorbs in Germany. *Eur J Hum Genet* 18, 104-110.

Torina, A.G., Reichert, K., Lima, F., de Souza Vilarinho, K.A., de Oliveira, P.P., do Carmo, H.R., de Carvalho, D.D., Saad, M.J., Sposito, A.C., Petrucci, O., 2015. Diacerein improves left ventricular remodeling and cardiac function by reducing the inflammatory response after myocardial infarction. *PLoS One* 10, e0121842.

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.G., Kyewski, B., Rüther, U., 1994. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development* 120, 2601-2607.

van Empel, V.P., Bertrand, A.T., Hofstra, L., Crijns, H.J., Doevendans, P.A., De Windt, L.J., 2005. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 67, 21-29.

Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., Kim, D.H., 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9, 316-323.

Vasan, S.K., Fall, T., Job, V., Gu, H.F., Ingelsson, E., Brismar, K., Karpe, F., Thomas, N., 2013. A common variant in the FTO locus is associated with waist-hip ratio in Indian adolescents. *Pediatr Obes* 8, e45-49.

Vasan, S.K., Karpe, F., Gu, H.F., Brismar, K., Fall, C.H., Ingelsson, E., Fall, T., 2014. FTO genetic variants and risk of obesity and type 2 diabetes: a meta-analysis of 28,394 Indians. *Obesity (Silver Spring)* 22, 964-970.

Verma, S., Fedak, P.W., Weisel, R.D., Butany, J., Rao, V., Maitland, A., Li, R.K., Dhillon, B., Yau, T.M., 2002. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 105, 2332-2336.

Volkers, M., Konstandin, M.H., Doroudgar, S., Toko, H., Quijada, P., Din, S., Joyo, A., Ornelas, L., Samse, K., Thuerauf, D.J., Gude, N., Glembotski, C.C., Sussman, M.A., 2013. Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation* 128, 2132-2144.

Wang, C.Y., Shie, S.S., Wen, M.S., Hung, K.C., Hsieh, I.C., Yeh, T.S., Wu, D., 2015. Loss of FTO in adipose tissue decreases Angptl4 translation and alters triglyceride metabolism. *Sci Signal* 8, ra127.

Wang, L., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr., 2008. Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 15619-15627.

Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., Lawrence, J.C., Jr., 2007. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 282, 20036-20044.

Wang, X., Huang, N., Yang, M., Wei, D., Tai, H., Han, X., Gong, H., Zhou, J., Qin, J., Wei, X., Chen, H., Fang, T., Xiao, H., 2017. FTO is required for myogenesis by positively regulating mTOR-PGC-1alpha pathway-mediated mitochondria biogenesis. *Cell Death Dis* 8, e2702.

Wardle, J., Llewellyn, C., Sanderson, S., Plomin, R., 2009. The FTO gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)* 33, 42-45.

Wu, X., Cao, Y., Nie, J., Liu, H., Lu, S., Hu, X., Zhu, J., Zhao, X., Chen, J., Chen, X., Yang, Z., Li, X., 2013a. Genetic and pharmacological inhibition of Rheb1-mTORC1 signaling exerts cardioprotection against adverse cardiac remodeling in mice. *Am J Pathol* 182, 2005-2014.

Wu, X., He, L., Cai, Y., Zhang, G., He, Y., Zhang, Z., He, X., He, Y., Zhang, G., Luo, J., 2013b. Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemiareperfusion injury. *Mol Med Rep* 8, 1824-1830.

Wu, X., He, L., Chen, F., He, X., Cai, Y., Zhang, G., Yi, Q., He, M., Luo, J., 2014. Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One* 9, e112891.

- Wu, X.Q., He, L.S., Cai, Y., Zhang, G.P., He, Y.L., Zhang, Z.J., He, X.E., He, Y.H., Zhang, G.S., Luo, J.D., 2013c. Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep* 8, 1824-1830.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Xie, M., Kong, Y., Tan, W., May, H., Battiprolu, P.K., Pedrozo, Z., Wang, Z.V., Morales, C., Luo, X., Cho, G., Jiang, N., Jessen, M.E., Warner, J.J., Lavandero, S., Gillette, T.G., Turer, A.T., Hill, J.A., 2014. Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation* 129, 1139-1151.
- Yan, X., Shichita, T., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, H., Ito, K., Anzai, A., Endo, J., Tamura, Y., Kimura, K., Fujita, J., Shinmura, K., Shen, W., Yoshimura, A., Fukuda, K., Sano, M., 2012. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 1, e004408.
- Yang, Z., Zingarelli, B., Szabo, C., 2000. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 101, 1019-1026.
- Yellon, D.M., Hausenloy, D.J., 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357, 1121-1135.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Bautista, L., Franzosi, M.G., Commerford, P., Lang, C.C., Rumboldt, Z., Onen, C.L., Lisheng, L., Tanomsup, S., Wangai, P., Jr., Razak, F., Sharma, A.M., Anand, S.S., Investigators, I.S., 2005. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366, 1640-1649.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., Investigators, I.S., 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364, 937-952.
- Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M., Sadoshima, J., 2011. Differential roles of GSK-3beta during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ Res* 109, 502-511.
- Zhang, W., Siraj, S., Zhang, R., Chen, Q., 2017. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial homeostasis and protects the heart from I/R injury. *Autophagy* 13, 1080-1081.
- Zhang, Y., Gao, X., Saucedo, L.J., Ru, B., Edgar, B.A., Pan, D., 2003. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 5, 578-581.
- Zhao, G., Wang, S., Wang, Z., Sun, A., Yang, X., Qiu, Z., Wu, C., Zhang, W., Li, H., Zhang, Y., Zhao, J., Zou, Y., Ge, J., 2013. CXCR6 deficiency ameliorated myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting infiltration of monocytes and IFN-gamma-dependent autophagy. *Int J Cardiol* 168, 853-862.
- Zhao, W., Lu, L., Chen, S.S., Sun, Y., 2004. Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 605-611.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y.J., Ping, X.L., Chen, Y.S., Wang, W.J., Jin, K.X., Wang, X., Huang, C.M., Fu, Y., Ge, X.M., Song, S.H., Jeong, H.S., Yanagisawa, H., Niu, Y., Jia, G.F., Wu, W., Tong, W.M., Okamoto, A., He, C., Rendtlew Danielsen, J.M., Wang, X.J., Yang, Y.G., 2014. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res* 24, 1403-1419.
- Zhou, P., Pu, W.T., 2016. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118, 368-370.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M.N., 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.

WHO (2018) Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva: World Health Organization

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3'-UTR	<i>untranslated region</i>
AAR	<i>Area at risk</i>
AAV9	<i>Adeno-associated virus serotype 9</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBM	Zytokin-bindendes Modul (<i>Cytokine-binding modules</i>)
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CTF	C-terminales Fragment
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
eIF4	<i>E74 like ETS transcription factor 4</i>
ESV	endsystolisches Volumen
f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FCS	Fötale Kälberserum
FS	<i>fractional shortening</i>
Ft	<i>Fused toes</i>
Fto	<i>fat mass and obesity associated</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
h	Stunde
HEK293T	<i>Human embryonic kidney</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoibosyltransferase 1</i>
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICD	Intrazelluläre Domäne (<i>Intracellular Domain</i>)
IFN β	Interferon β
Ig	Immunglobulin

IgG	IgG-ähnliche Domäne
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
i.p.	Intraperitoneal
IRX	<i>Iroquois</i>
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LAD	<i>left anterior descending</i>
LC3B	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
LIFR	LIF-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharide
LV	Linker Ventrikel
m	murine
m/V	Masse pro Volumen
m ⁶ A	(N(6)-methyl-2'-O-Methyladenosin)
m ⁶ A _m	N ⁶ ,2'-O-Diemethyladenosin
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1/chemokine</i>
MEFs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MI	Myokardinfarkt

min	Minuten
ml	Milliliter
mLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
mSin1	<i>Mammalian stress-activated protein kinase-interaction protein 1</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR complex1</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
OD	<i>Optical density</i>
p70S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCI	perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Phytoerythrin
pg	Picogramm
pH	<i>Potential Hydrogenic</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase

PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
POD	Peroxidase
PRAS40	<i>Proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RIN	<i>RNA integrity numbers</i>
Rpm	<i>Rotationen pro minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
sec	Sekunden
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1</i>
sIL-6R	Löslicher (soluble) Interleukin-6-Rezeptor
SNPs	<i>Single nucleotid polymorphisms</i>
ss	<i>Sinle-stranded</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>Tumour necrosis-α converting enzyme</i>

TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tel2	<i>Tel 2 interacting protein 1</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF- α	<i>Tumour necrosis factor-α</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis protein</i>
U	<i>Units</i>
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben
μ l	Mikroliter

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Rütter von der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für „Entwicklung und Molekularbiologie der Tiere“ zu absolvieren sowie für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine gute fachliche Betreuung sowie der Möglichkeit zur selbständigen Forschung.

Bei Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Für das Erlernen des I/R-Model und alle weiteren Hilfestellungen möchte ich mich bei Dr. Rianne Nederlof, Dr. Andre Heinen, Dominik Semmler und Dr. Simone Gorressen bedanken.

Für die Hilfe und Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Steffi K. bedanken. Danke für die ganzen Genotypisierungen.

Besonders möchte ich mich bei Toni, Christoph, Andre und Lisa Lu für die Zusammenarbeit, die motivierenden Gespräche und Hilfsbereitschaft vor allem in schwierigen Phasen bedanken. Und natürlich auch einen ganz großen Dank für die tollen Momente und Erlebnisse außerhalb des Instituts ;-)

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie Roswitha Pern, Uwe Wehmöller, Annelise Wehmöller, Inge Pern. Danke für eure Geduld und Rückhalt während des gesamten Studium und der Promotion. Besonders möchte ich auch Kurt Pern danken, der den Abschluss dieser Arbeit leider nicht miterleben durfte. Danke für deine große Unterstützung besonders auch in schwierigen Zeiten!

Mein größter Dank gilt abschließend Paul der mich während der Zeit fortwährend unterstützt hat. Danke für deine Geduld, Motivation und stetige Hilfsbereitschaft. Danke für die wunderschöne Zeit und die tollen Erlebnisse über wie unter Wasser ☺.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst zu haben. Bei dem im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Abbildungen handelt es sich um inhaltlich nicht veränderte Kopien von Originalaufnahmen.

Düsseldorf, Februar

Melanie Wehmöller