

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Molekulare Mechanismen kardialer Atrophie in induzierbaren  
kardiomyozytären AKT1/2 Knock-out Mäusen – Die Bedeutung von  
FOXO Transkriptionsfaktoren und PGC-1 Koaktivatoren

Dissertation

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

vorgelegt von  
Tim Appel  
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Altschmied

Meinen Eltern, Sabine Nordbruch-Appel und Jörg Appel.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die kardiale Atrophie auf Ebene des Organs kann als volumetrische oder numerische Atrophie verlaufen. Letztere ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Zellzahl, wohingegen die volumetrische Atrophie Folge der Imbalance zwischen Proteinsynthese und -abbau ist. Die molekularen Mechanismen kardialer Atrophie sind bislang unzureichend untersucht.

Zur Untersuchung der an der kardialen Atrophie beteiligten molekularen Prozesse wurde ein induzierbares kardiomyozyten-spezifisches AKT1 und AKT2 Doppel-knockout Mausmodell (iCMAKT1/2 KO) genutzt. Die Gendeletion von AKT1/2 infolge fünfmaliger Tamoxifeninjektion resultierte in einer ausgeprägten und anhaltenden Reduktion der AKT1/2 Proteinmenge der Herzen. Eine Restmenge von AKT1/2 wird durch nicht-kardiomyozytäres AKT erklärt. Weiterhin führte die Gendeletion beider AKT Isoformen zu einem Verlust myokardialer Masse durch eine Reduktion der Kardiomyozytengröße.

Unter der Kontrolle von AKT regulieren *Forkhead box O* (FOXO) Transkriptionsfaktoren u.a. den Proteinabbau durch Induktion der Autophagie und fördern die Atrophie von Kardiomyozyten. Mittels konfokalmikroskopisch erstellter Aufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Herzschnitte wurde eine zunehmende Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a detektiert. Zusätzlich zeigte sich in Western Blot Analysen eine Akkumulation Autophagie-assoziiierter Proteine. Es konnte eine anfänglich gesteigerte Autophagieaktivität gefolgt von einem gestörten Autophagieprozess geschlussfolgert werden.

Als weitere Ursache der Atrophie wurde ein Energiemangel der Kardiomyozyten durch eine mitochondriale Störung untersucht. Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen hatten eine reduzierte Expression kernkodierter Gene für mitochondriale Proteine ergeben. In dieser Arbeit wurde eine verminderte Expression des Enzyms CPT2 gezeigt. Als mögliche Ursache dieser Beobachtung wurden die Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha$  und PGC-1 $\beta$  untersucht, die als zentrale Regulatoren der mitochondrialen Biogenese und Energiehomöostase gelten. Bei fortgeschrittener Atrophie zeigten sich Expressionsunterschiede der Koaktivatoren, die auf eine Beteiligung an der mitochondrialen Störung hinweisen. Des Weiteren zeigten wir konfokalmikroskopisch die Kolokalisierung von mitochondrialen Bestandteilen und Lysosomen in isolierten Kardiomyozyten. Durch diese neue Methode ergaben sich Hinweise auf eine Zunahme der Mitophagie in den Kardiomyozyten.

Ferner wurden in durchflusszytometrischen Analysen keine Hinweise für eine Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die kardiale Atrophie vermutlich nicht wesentlich durch apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergang bedingt wird. Ein Anstieg von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und inflammatorischen Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten in iCMAKT1/2 KO-Hezen dagegen kann einen Hinweis für eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion darstellen.

Darüber hinaus wurde das fibrotische *Remodeling* im Atrophieprozess untersucht. In den iCMAKT1/2 KO-Hezen konnte durch Transkriptionsanalysen die Induktion eines profibrotischen Genprogramms nachgewiesen werden. Dies kann auf eine Zunahme der extrazellulären Matrix (ECM) hindeuten, für die auch histologisch Hinweise gefunden wurden.

Abschließend ist festzuhalten, dass AKT1/2 essenziell für die Funktion und Struktur des Herzens ist. Eine Gendeletion beider Isoformen führt zu einer Imbalance von Proteinsynthese und Proteindegradation der Kardiomyozyten.

## SUMMARY

Cardiac atrophy at the level of the organ may take the form of volumetric or numeric atrophy. The latter is characterized by a decrease in cell number, whereas volumetric atrophy is a consequence of the imbalance between protein synthesis and protein degradation. The molecular mechanisms of cardiac atrophy are poorly understood.

To investigate the molecular processes involved in cardiac atrophy, an inducible cardiomyocyte-specific AKT1 and AKT2 double-knockout mouse model was used. Gene deletion of AKT1/2 as a result of five tamoxifen injections resulted in a pronounced and sustained reduction of AKT1/2 protein levels in the hearts. A residual amount of AKT1/2 is explained by non-cardiomyocyte AKT. Furthermore, gene deletion of both AKT isoforms resulted in a loss of myocardial mass due to a reduction in cardiomyocyte size.

Under the control of AKT, *Forkhead box O* (FOXO) transcription factors regulate protein degradation by inducing autophagy and promote cardiomyocyte atrophy. Using confocal microscopy imaging of immunofluorescence-stained heart sections, increasing nuclear localization of the transcription factor FOXO3a was detected. In addition, western blot analyses revealed an accumulation of autophagy-associated proteins. It could be concluded that an initially increased activity of autophagy is followed by an impaired autophagy process.

Another cause of atrophy investigated in this work was cardiomyocyte energy deficiency due to mitochondrial dysfunction. Previous microarray RNA expression analyses had revealed reduced expression of nuclear-encoded genes for mitochondrial proteins. In this work the expression of the enzyme CPT2 was shown to be decreased. As a possible cause of this observation, the transcriptional coactivators PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$ , which are considered key regulators of mitochondrial biogenesis and energy homeostasis, were investigated. During advanced atrophy differences in expression of the coactivators were demonstrated, suggesting involvement in mitochondrial dysfunction. To further investigate the status of cardiomyocyte mitochondria, we showed by confocal microscopy the colocalization of mitochondrial components and lysosomes in isolated cardiomyocytes. This new method provided evidence for an increase in mitophagy in cardiomyocytes.

Furthermore, no evidence for infiltration of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes or neutrophil granulocytes was found in flow cytometric analyses. This suggests that cardiac atrophy is probably not substantially caused by apoptotic or necrotic cell death. In contrast, an increase in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and inflammatory Ly6C<sub>hi</sub> monocytes in iCMAKT1/2 KO hearts may be an indication of impaired cardiac function.

In addition, fibrotic remodeling during cardiac atrophy was investigated. In the iCMAKT1/2 KO hearts transcript analysis demonstrated the induction of a profibrotic gene program. This may indicate an increase in extracellular matrix (ECM), for which evidence was also found histologically.

In conclusion, AKT1/2 is essential for cardiac function and structure. Gene deletion of both isoforms leads to an imbalance of protein synthesis and protein degradation of cardiomyocytes.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>AFX</b>	<i>acute leukemia fusion gene</i>
<b>AIF</b>	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
<b>α-MHC</b>	<i>alpha myosin-heavy chain</i>
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell/Antigenpräsentierende Zelle</i>
<b>APS</b>	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
<b>AS160</b>	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
<b>ATG</b>	<i>autophagy-related</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<b>BAD</b>	<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>
<b>BCA</b>	<i>bicinchoninic acid</i>
<b>BCL-xL</b>	<i>B-Cell Lymphoma-extra-large</i>
<b>Bcl2</b>	<i>b-cell lymphoma family 2</i>
<b>BIM</b>	<i>BCL2-like 11</i>
<b>BNIP3</b>	<i>BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3</i>
<b>BNIP3L/NIX</b>	<i>BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 like</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>
<b>CBP/p300</b>	<i>CREB binding protein/p300</i>
<b>CoA</b>	<i>Coenzym A</i>
<b>Cpt2</b>	<i>Carnitin-O-Palmitoyltransferase 2</i>
<b>Cre</b>	<i>causes rekombination</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>C<sub>T</sub></b>	<i>threshold cycle</i>
<b>Ctgf</b>	<i>Connective tissue growth factor</i>
<b>d</b>	<i>Wanddicke</i>
<b>DAMP</b>	<i>danger-associated molecular patterns</i>
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNA-PK</b>	<i>DNA-abhängige Proteinkinase</i>
<b>DNMT3B</b>	<i>DNA Methyltransferase 3B</i>
<b>dNTP</b>	<i>Desoxyribonukloesidtriphosphat</i>
<b>DRIP</b>	<i>vitamin-D-receptor interacting protein</i>
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>ECM</b>	<i>extracellular matrix</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
<b>EER</b>	<i>estrogen-related receptor</i>
<b>ERα</b>	<i>Estrogenrezeptor α</i>
<b>eIF2Bε</b>	<i>eukaryotic translation initiation factor 2Bε</i>
<b>eIF-4E</b>	<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

<b>FKD</b>	<i>Forkhead domain</i>
<b>FKHR</b>	<i>forkhead in human rhabdomyosarcomas</i>
<b>FKHRL1</b>	<i>forkhead in rhabdomyosarcomas-like protein1</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead box O</i>
<b>FRE</b>	<i>Forkhead-responsive element</i>
<b>FUNDC</b>	<i>FUN14 domain containing 1</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>GABARAPL1</b>	<i>GABA Type A Receptor Associated Protein Like 1</i>
<b>GAP</b>	<i>Rab-GTPase-activating protein</i>
<b>GATA4</b>	<i>GATA Binding Protein 4</i>
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GLUT4</b>	Glucose Transporter 4
<b>GR</b>	Glucocorticoid-Rezeptor
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HAT</b>	Histonacetyltransferase
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	<i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	<i>hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>
<b>iCMAKT1/2 KO</b>	<i>inducible cardiomyocyte specific AKT1/2 knock-out</i>
<b>IE</b>	Internationale Einheit
<b>IGF1</b>	<i>Insulin like growth factor 1</i>
<b>IGF1-R</b>	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
<b>IKK<math>\beta</math></b>	<i>I kappaB kinase <math>\beta</math></i>
<b>IR</b>	Insulinrezeptor
<b>JNK</b>	<i>c-Jun kinase</i>
<b>K</b>	Wandspannung
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KO</b>	<i>knock-out</i>
<b>LAMP1</b>	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
<b>LC3</b>	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
<b>loxP</b>	<i>locus of crossing over P1</i>
<b>LVAD</b>	<i>left ventricular assist device</i>
<b>LVEDV</b>	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
<b>M</b>	molar
<b>MCD</b>	Malonyl-CoA Decarboxylase
<b>Mdm2</b>	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
<b>mer</b>	<i>mutated estrogen receptor</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>MMP</b>	<i>matrix metalloproteinases</i>
<b>Mmp3</b>	<i>Matrix-metalloproteinase 3</i>
<b>MnSOD</b>	Mangansuperoxiddismutase

<b>mPTP</b>	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger-RNA</i>
<b>MST1</b>	<i>mammalian Ste20-like kinase</i>
<b>mtDNA</b>	<i>mitochondriale DNA</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>mTORC1/2</b>	<i>mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2</i>
<b>mtROS</b>	<i>mitochondrial reactive oxygen species/mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies</i>
<b>MuRF</b>	<i>muscle RING-finger protein-1</i>
<b>NES</b>	<i>Nuclear export sequence</i>
<b>NFAT</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localization sequence</i>
<b>nm</b>	<i>Nanometer</i>
<b>NRF1/2</b>	<i>Nuclear Respiratory Factor-1/-2</i>
<b>NRF-2</b>	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet derived growth factor</i>
<b>PDK1</b>	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
<b>PDK4</b>	<i>Pyruvatdehydrogenasekinase 4</i>
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyd</i>
<b>PH</b>	<i>pleckstrin-homology</i>
<b>PHLPP</b>	<i>PH domain leucine-rich repeat phosphatase</i>
<b>PINK1</b>	<i>PTEN-induced putative kinase</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
<b>PIP2/PIP3</b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat/Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat</i>
<b>PKB</b>	<i>Proteinkinase B</i>
<b>PPAR<math>\alpha/\beta/\gamma</math></b>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha/\beta/\gamma</math></i>
<b>Ppargc1/PGC-1</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator-1</i>
<b>PP2</b>	<i>Protein-Phosphatase 2</i>
<b>PRC</b>	<i>PGC related coactivator</i>
<b>PTEN</b>	<i>phosphatase and tensin homology</i>
<b>P<sub>tm</sub></b>	<i>Transmuraler Druck</i>
<b>PTM</b>	<i>posttranslationale Modifikation</i>
<b>PUMA</b>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
<b>p38MAPK</b>	<i>p38-mitogenaktivierte Proteinkinase</i>
<b>qPCR</b>	<i>quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
<b>r</b>	<i>Radius</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>ROI</b>	<i>region of interest</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>RRM</b>	<i>RNA recognition motif,</i>
<b>RS</b>	<i>Arginin/Serin</i>
<b>RTK</b>	<i>Tyrosinkinase-Rezeptoren</i>
<b>SCF<sup>Cdc4</sup></b>	<i>Skp1/Cullin/F-box</i>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
<b>SOD2</b>	<i>Superoxiddismutase 2</i>



<b>SRC-1</b>	<i>steroid receptor coactivator-1</i>
<b>SQSTM1</b>	Sequestosom 1
<b>TA</b>	<i>Transactivation domain</i>
<b>TAC</b>	<i>transverse aortic constriction</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamin
<b>TFAM</b>	<i>mitochondrial transcription factor A</i>
<b>Tgfb2</b>	<i>Transforming growth factor beta 2</i>
<b>TIMP</b>	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
<b>Timp1</b>	<i>Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1</i>
<b>TIM23</b>	<i>translocase of the inner membrane 23</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like-receptor</i>
<b>TR</b>	Thyroidhormon-Rezeptor
<b>TRAP</b>	<i>thyroid hormone receptor- associated protein</i>
<b>T<sub>reg</sub></b>	regulatorischer T-Lymphozyt
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>TSC2</b>	<i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i>
<b>Txf</b>	Tamoxifen
<b>UbcH2</b>	<i>ubiquitin conjugating enzyme H2</i>
<b>UCP3</b>	<i>uncoupling protein 3</i>
<b>Ulk1</b>	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
<b>UPS</b>	Ubiquitin-Proteasom-System
<b>v/v</b>	<i>volume/volume</i>
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>w/v</b>	<i>weight/volume</i>
<b>4EBP1</b>	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die Proteinkinase AKT .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Der PI3K/AKT-Signalweg.....	1
1.1.2	Die Funktion von AKT im Herzen.....	2
1.1.3	Der induzierbare kardiomyozyten-spezifische AKT1/2 Knock-out (iCMAKT1/2 KO).....	6
1.2	<b>Kardiale Atrophie .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	Kardiale Plastizität.....	6
1.2.2	Proteinhomöostase im atrophierenden Herzen .....	9
1.2.3	Metabolischer Stress im atrophierenden Herzen .....	10
1.2.4	Autophagie und Mitophagie .....	11
1.2.5	Immunzellen im Atrophieprozess.....	12
1.3	<b>FOXO Transkriptionsfaktoren .....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Aufbau der FOXO Transkriptionsfaktoren .....	13
1.3.2	Regulation der FOXO Transkriptionsfaktoren durch den PI3K/AKT-Signalweg.....	14
1.3.3	Funktion von FOXO Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten.....	16
1.4	<b>PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren .....</b>	<b>18</b>
1.4.1	Struktur von PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren.....	18
1.4.2	Regulation der PGC-1 Aktivität.....	19
1.4.3	Funktion von PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren.....	20
1.4.4	Die Bedeutung von PGC-1 für die kardiale Mitochondrienfunktion .....	21
1.5	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>24</b>
2.1	<b>Laborgeräte .....</b>	<b>24</b>
2.2	<b>Allgemeine Chemikalien .....</b>	<b>25</b>
2.3	<b>Zubehör .....</b>	<b>26</b>
2.4	<b>Chemikalien für Färbungen.....</b>	<b>26</b>
2.5	<b>Puffer und andere Lösungen.....</b>	<b>27</b>
2.5.1	Lysispuffer pH7,4.....	27

2.5.2	PBS.....	27
2.5.3	PFA (4%) .....	27
2.5.4	SDS.....	27
2.5.5	TBS(T) .....	28
2.5.6	Tris-HCl .....	28
<b>2.6</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>28</b>
2.6.1	Primäre Antikörper.....	28
2.6.2	Sekundäre Antikörper .....	29
2.6.3	Antikörper für FACS-Analysen .....	29
<b>2.7</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8</b>	<b>Kits .....</b>	<b>31</b>
<b>2.9</b>	<b>Software .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Tierexperimentelle Untersuchungen am Knock-out Mausmodell .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Ablauf der Gewebeentnahme.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Proteinanalyse.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Proteinaufschluss aus Gewebe.....	33
3.3.2	BCA-Assay.....	33
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.3.4	Western Blot (WB).....	35
3.3.5	Immundetektion von Proteinen .....	35
<b>3.4</b>	<b>Histologie .....</b>	<b>36</b>
3.4.1	Kryokonservierung entnommener Herzen.....	36
3.4.2	Anfertigung histologischer Gewebeschnitte .....	36
3.4.3	Immunhistochemische Färbungen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	37
3.4.4	Konfokalmikroskopische Lokalisierung von FOXO3 Transkriptionsfaktor.....	38
3.4.5	Kolokalisierung von AIF und LAMP1 zur Detektion von Mitophagie in isolierten Kardiomyozyten .....	41
3.4.6	Masson Trichrom Färbung .....	41
<b>3.5</b>	<b>mRNA Expressionsanalyse .....</b>	<b>42</b>
3.5.1	mRNA Isolierung.....	42

3.5.2	cDNA Transkription .....	42
3.5.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion .....	43
3.5.4	Analyse .....	43
<b>3.6</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Gewebeaufbereitung .....	44
3.6.2	Zellisolation .....	44
3.6.3	Durchflusszytometrische Analysen .....	45
<b>3.7</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1	Untersuchung der AKT1/2 Knock-out Effizienz.....	46
4.2	Lokalisierung des FOXO3 Transkriptionsfaktors in Kardiomyozyten .....	47
4.3	Expressionsanalyse von FOXO3-Zielgenen .....	49
4.3.1	Transkriptionsanalyse Autophagie-assoziiierter Gene mittels qPCR.....	49
4.3.2	Quantifizierung von Autophagieproteinen .....	51
4.4	Mitochondriale Genexpression in iCMAKT1/2 KO-Herzen .....	53
4.4.1	Expressionsanalyse mitochondrialer Transkriptionskoaktivatoren mittels qPCR .....	53
4.4.2	Analyse der Proteinmenge mitochondrialer Transkriptionskoaktivatoren mittels Western Blot	55
4.4.3	Transkriptionsanalyse kernkodierter mitochondrialer Gene .....	57
4.4.4	Mitochondriale Masse und Mitophagie in iCMAKT1/2 Kardiomyozyten .....	58
4.5	Transkription weiterer Gene in iCMAKT1/2 KO-Herzen .....	61
4.5.1	Transkriptionsanalyse von <i>Sod2</i> mittels qPCR.....	61
4.5.2	Transkriptionsanalyse von c-myc mittels qPCR.....	62
4.5.3	Transkriptionsanalyse Fibrose-assoziiierter Gene mittels qPCR .....	63
4.6	Vergleich der Immunzellzahl in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen .....	66
4.6.1	Immunhistochemische Analyse von CD3 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Herzen .....	66
4.6.2	Durchflusszytometrische Analysen von Immunzellen.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
5.1	AKT1/2 Deletion in Kardiomyozyten.....	69
5.2	Erhöhte Proteindegradation als Ursache für die kardiale Atrophie.....	70

5.2.1	FOXO3 induziert Autophagie in iCMAKT1/2 KO-Herzen .....	70
5.2.2	Gestörte Autophagieaktivität in iCMAKT1/2 KO-Herzen.....	72
5.2.3	Mitophagie in Kardiomyozyten .....	74
<b>5.3</b>	<b>Zelluntergang als Ursache der kardialen Atrophie .....</b>	<b>76</b>
5.3.1	Identifizierung unterschiedlicher Immunzellsubpopulationen .....	76
5.3.2	Die Bedeutung von BNIP3 für die Induktion des Zelltodes in iCMAKT1/2 KO-Herzen .....	78
<b>5.4</b>	<b>Eingeschränkte Mitochondrienfunktion als Ursache atrophierender Herzen .....</b>	<b>79</b>
5.4.1	Energiedepletion durch mitochondriale Dysfunktion .....	79
5.4.2	Störung der Oxidation langkettiger Fettsäuren.....	80
5.4.3	Die Rolle von PGC-1 für die mitochondriale Dysfunktion.....	80
5.4.4	Auswirkungen auf das antioxidative System am Beispiel der SOD2 .....	82
<b>5.5</b>	<b>Die Rolle von c-Myc im atrophierenden Herzen.....</b>	<b>83</b>
<b>5.6</b>	<b>Bedeutung der Atrophie für die Herzfunktion - Hinweise auf fibrotisches <i>Remodeling</i> .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>

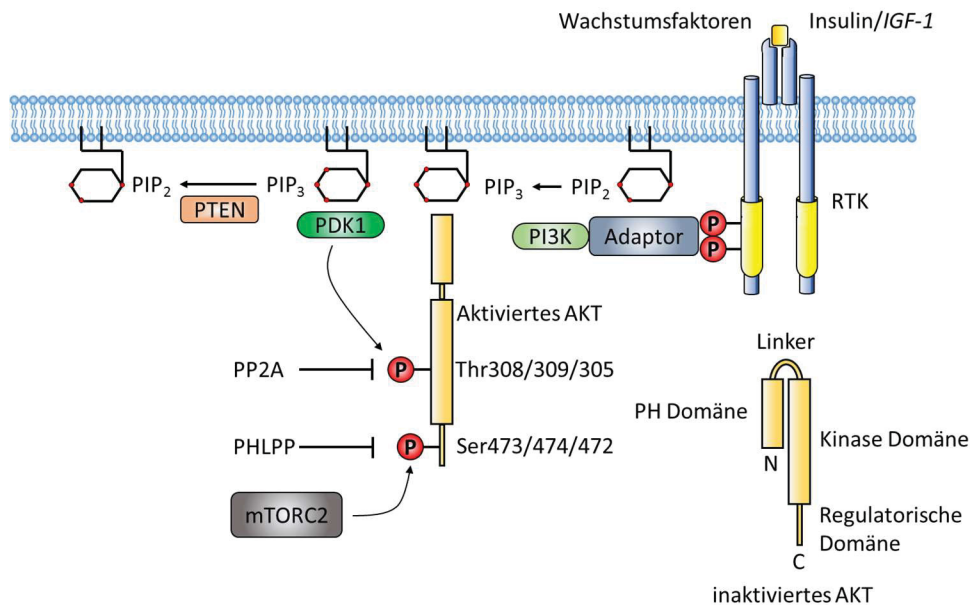
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Proteinkinase AKT

### 1.1.1 Der PI3K/AKT-Signalweg

Die Proteinkinase AKT, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Proliferation, Überleben, Wachstum und Metabolismus der Zelle ein. Erstmals wurde die Proteinkinase bei Untersuchungen von Adenokarzinomen des Magens als humanes Homolog des viralen Onkoproteins v-AKT von Staal (1987) identifiziert. Später klonierten drei Arbeitsgruppen AKT1 und beschrieben das Protein als 480 Aminosäuren umfassende Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (Bellacosa et al., 1991, Coffey and Woodgett, 1991, Jones et al., 1991). AKT wird in Form von drei hochgradig homologen Isoformen (AKT1/2/3 bzw. PKB $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ) exprimiert. Die drei Isoformen besitzen drei hochkonservierte Domänen, bestehend aus einer N-terminalen *pleckstrin-homology* (PH) Domäne, einer Kinase Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne mit einem hydrophoben Motiv (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000) (siehe Abb. 1). AKT stellt ein wichtiges Zielmolekül des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Signalwegs dar (Abb. 1). Die PI3-Kinase-Aktivität wird vor allem über Tyrosinkinase-Rezeptoren reguliert. Extrazelluläre Signale wie Zytokine, Insulin und die Wachstumsfaktoren IGF (*Insulin-like growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) und PDGF (*Platelet derived growth factor*) aktivieren die Rezeptoren und bewirken deren Konformationsänderung und Autophosphorylierung. PI3K bindet durch ein Adapterprotein (z.B. Insulin Rezeptor Substrat (IRS) -Proteine) vermittelt oder direkt an den Rezeptor (Tung O. Chan et al., 1999). Unter den drei Klassen (I, II und III) der PI3-Kinasen sind nur Klasse I PI3-Kinasen in der Lage, AKT in der Zelle zu aktivieren (Jean and Kiger, 2014). Das bevorzugte Substrat von Klasse I PI3K ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), aus dem an der Zellmembran durch Phosphorylierung Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) generiert wird (Hawkins et al., 2006). PIP<sub>3</sub> stellt einen Membrananker für die PH-Domänen von AKT und von der *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) dar. Hierüber werden AKT und PDK1 an die Zellmembran rekrutiert und eine für die Interaktion essentielle räumliche Nähe zwischen den Proteinkinasen geschaffen (Anderson et al., 1998). Durch eine Wechselwirkung zwischen PH- und katalytischer Domäne befindet sich AKT im Zytosol der Zellen in einem inaktivierten Zustand. PIP<sub>3</sub> induziert eine Konformationsänderung von AKT und ermöglicht so die Phosphorylierung des *activation loops* an Thr308 (AKT1) bzw. Thr309 (AKT2) oder Thr305 (AKT3) durch PDK1 (Calleja et al., 2007). Die Aktivität von AKT wird durch die Phosphorylierung erhöht und kann durch eine zweite Phosphorylierung eines Serinrestes (AKT1: Ser473, AKT2: Ser474, AKT3: Ser472) maximal gesteigert werden (Alessi et al., 1996). Für diese Phosphorylierung ist insbesondere der Komplex mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) verantwortlich (Sarbasov et al., 2005). Aber auch andere Proteinkinasen wie zum Beispiel die Desoxyribonukleinsäure (*engl.: deoxyribonucleic acid*, kurz: DNA)-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) bei DNA-Schäden können die Phosphorylierung vornehmen (Bozulic et al., 2008). Durch Phosphorylierung aktiviertes AKT transloziert in das Zytosol und den Nukleus, wo es diverse Substrate phosphoryliert und somit Signalwege aktiviert oder inhibiert.

Phosphatasen stellen ein regulierendes Element zur Inaktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs dar. Die membrangebundene Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homology*) hydrolysiert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> und inhibiert so die essenzielle Rekrutierung von AKT und PDK1 an die Plasmamembran (Maehama and Dixon, 1998, Stambolic et al., 1998). AKT wird auch direkt durch Dephosphorylierung an Thr308 von der Protein-Phosphatase 2 (PP2A) und an Ser473 von der PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) inaktiviert (Gao et al., 2005, Cazzoli et al., 2001).



**Abb. 1: Struktureller Aufbau von AKT und Aktivierung über den PI3K-Signalweg**

Die Proteinkinase AKT setzt sich aus drei Domänen zusammen. Vom N- zum C-Terminus gesehen sind das eine PH-Domäne, die über einen Linker mit der Kinase-Domäne verbunden ist, gefolgt von der regulatorischen Domäne. Liganden wie Wachstumsfaktoren binden an die Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK) und führen zu deren Aktivierung. Es kommt zur Konformationsänderung des Rezeptors und Autophosphorylierung. PI3K bindet über ein Adapter-Protein an den Rezeptor und katalysiert die Entstehung von PIP<sub>3</sub> aus PIP<sub>2</sub>. PIP<sub>3</sub> dient als Membrananker, an den PDK1 und inaktives AKT über ihre PH-Domäne aus dem Zytosol an die Plasmamembran rekrutiert werden. Durch Bindung der PH-Domäne induziert PIP<sub>3</sub> eine Konformationsänderung von AKT, wodurch die Phosphorylierung an Thr308 durch die PDK1 ermöglicht wird.

### 1.1.2 Die Funktion von AKT im Herzen

#### 1.1.2.1 Zellüberleben und Apoptose

Die Proteinkinase AKT wird in Form oben genannter dreier Isoformen mit zellspezifischem Verteilungsmuster exprimiert. In Kardiomyozyten findet man vor allem die Isoformen AKT1 und AKT2, die insbesondere nach Stimulation mit Insulin oder IGF1 aktiviert werden. Dabei ist in Kardiomyozyten AKT2 das bevorzugte Ziel IGF1/Insulin-abhängiger Phosphorylierung (Reinartz et al., 2014).

In adulten Kardiomyozyten ist die Fähigkeit zur Proliferation und Regeneration eingeschränkt. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, das Überleben der vorhandenen Kardiomyozyten sicher zu stellen. Der PI3K/AKT-Signalweg trägt zum Überleben differenzierter

Kardiomyozyten bei, indem er die Zellen vor Apoptose schützt (Matsui et al., 1999). Zum einen phosphoryliert AKT den proapoptotischen Faktor BAD (*Bcl2-associated agonist of cell death*) (Datta et al., 1997, Jonassen et al., 2001). Dies resultiert in einer zunehmenden Affinität von BAD zum Protein 14-3-3. Diese Interaktion hindert BAD an der Bindung und Inhibition von antiapoptotischen Zielproteinen der Bcl-2 Familie wie BCL-xL (*B-Cell Lymphoma-extra-large*) (Zha et al., 1996). Zum anderen ist auch die Initiatorcaspase Pro-Caspase 9 ein Substrat von AKT. Die AKT-vermittelte Phosphorylierung verhindert die proteolytische Aktivierung des Proenzym (Cardone et al., 1998). Folglich kann der intrinsische Weg zur Aktivierung der Apoptose durch die Initiatorcaspase nicht eingeleitet werden. Schließlich hemmt die AKT-abhängige Phosphorylierung der FOXO Transkriptionsfaktoren deren Bindung an Promotorelemente von proapoptotischen Zielgenen (Morris et al., 2005). An späterer Stelle wird im Detail auf diesen Mechanismus eingegangen (siehe Kapitel 1.3.3).

### 1.1.2.2 Wachstum und Kardiomyozytengröße

Während der Embryonalentwicklung wird das Wachstum des Herzens noch durch die Proliferation embryonaler Kardiomyozyten bestimmt. Doch, sobald Kardiomyozyten postnatal terminal differenziert sind, geht die Fähigkeit zur Zellteilung überwiegend verloren. Das weitere postnatale Wachstum des Herzens erfolgt dann vorwiegend durch Größenzunahme der Kardiomyozyten (Pasumarthi and Field, 2002, Olson and Schneider, 2003).

Im Prozess der postnatalen physiologischen Herzhypertrophie kommt dem Insulin/IGF1/PI3K/AKT-Signalweg eine entscheidende Rolle zu. Insulin und IGF1 regulieren als Initiatoren von AKT die Kardiomyozytengröße (Abb. 2). Stimuli wie das Nährstoffangebot modulieren insulinabhängig via AKT das Herzwachstum während der postnatalen Entwicklung (Shiojima et al., 2002). Weiter aktiviert auch muskuläre Belastung AKT und beeinflusst so die Herzgröße (Konhilas et al., 2005).

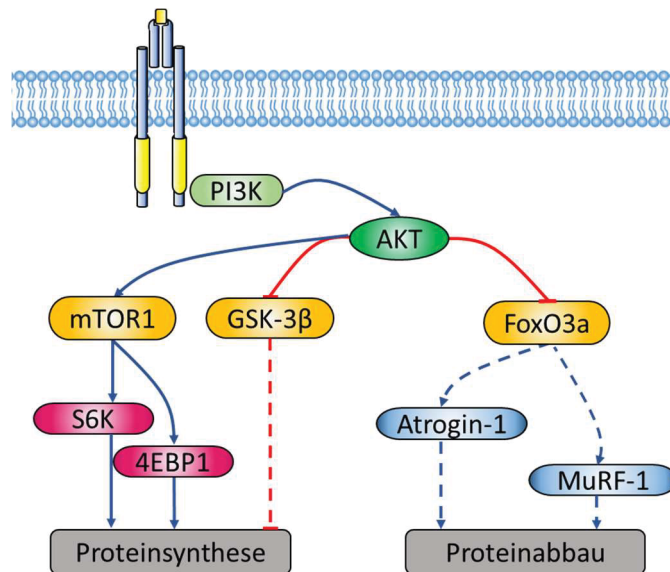
IGF1- und IGF1-Rezeptor (IGF1R) KO-Mäuse zeigen eine generelle Wachstumsverzögerung, was die Bedeutung von IGF1 als Wachstumssignal unterstreicht. Im Gegenzug führt eine kardiomyozyten-spezifische IGF1- und IGF1R-Überexpression zu physiologischer Hypertrophie der Kardiomyozyten durch verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT/S6K-Signalwegs (McMullen et al., 2004, Delaughter et al., 1999). In kardiomyozyten-spezifischen Insulinrezeptor (IR) KO-Mäusen wurden kleinere Herzvolumina und eine reduzierte Kardiomyozytengröße nachgewiesen (Belke et al., 2002). Dieser Effekt ist auf eine verminderte Aktivierung von AKT in den Herzen der IR KO-Mäuse zurückzuführen (Shiojima et al., 2002). In mehreren AKT-Überexpressionsmodellen wurde darüber hinaus die Bedeutung der Kinase für das Kardiomyozytenwachstum untersucht. Eine kardiomyozyten-spezifische, konstitutiv-aktive Form von AKT verursacht kardiale Hypertrophie, welche mit Größenzunahme der Kardiomyozyten und erhöhtem Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnis assoziiert ist (Condorelli et al., 2002, Matsui et al., 2002, Shioi et al., 2002). Die Überexpression einer induzierbaren, kardiomyozyten-spezifischen AKT1 Form zeigte außerdem, dass von der Dauer der AKT Aktivierung abhängig ist, ob eine physiologische oder pathologische Form der Herzhypertrophie resultiert. Zwei Wochen nach Induktion entwickelten die Mäuse eine reversible Zunahme des Herzgewichts, während die Mäuse nach sechs Wochen eine irreversible linksventrikuläre Dilatation und kontraktile Dysfunktion zeigten (Shiojima et al., 2005).



AKT reguliert das Kardiomyozytenwachstum unter anderem über die Aktivierung des *mammalian Target of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) -Signalwegs (Shioi et al., 2002). Indem AKT den *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2) phosphoryliert und inaktiviert, wird dessen inhibitorischer Effekt auf mTORC1 aufgehoben (Inoki et al., 2002). mTORC1 steigert in der Folge die Synthese von Ribosomen und die Translation mittels Regulation der S6-Kinase (S6K) (Dufner and Thomas, 1999). Zusätzlich wird durch die Phosphorylierung des *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4EBP1) der *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF-4E) freigesetzt, was in einer Steigerung der Translationsrate resultiert (Fingar et al., 2002). Die durch konstitutiv-aktive AKT induzierte Herzhypertrophie zeigt sich durch die Behandlung mit Rapamycin, einem mTORC1 Inhibitor, zum Teil reversibel. Daraus geht hervor, dass AKT seine hypertrophe Wirkung am Herzen zu einem wesentlichen Anteil abhängig von mTORC1 vermittelt (Shioi et al., 2002, Shiojima et al., 2005).

Die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) gilt als negativer Regulator des kardialen Wachstums (Antos et al., 2002, Haq et al., 2000). GSK-3 $\beta$  entwickelt antihypertrophe Aktivität durch den nukleären Export der wachstumsfördernden Transkriptionsfaktoren NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und GATA-4 (*GATA Binding Protein 4*) (Morisco et al., 2001, Beals et al., 1997). Außerdem inhibiert GSK-3 $\beta$  die Translation durch Phosphorylierung des *eukaryotic translation initiation factor 2B $\epsilon$*  (eIF2B $\epsilon$ ) (Hardt et al., 2004). AKT phosphoryliert die GSK-3 $\beta$  an Ser9 und inhibiert so deren antihypertrophe Aktivität (Haq et al., 2000). Dadurch entfällt der negativ regulierende Einfluss von GSK-3 $\beta$  auf die Transkriptionsfaktoren und den eIF2B $\epsilon$ , und hypertrophe Prozesse werden induziert.

Inwiefern AKT das Kardiomyozytenwachstum via FoxO Transkriptionsfaktoren beeinflusst, wird an späterer Stelle genauer ausgeführt (siehe Kapitel 1.3.3).



**Abb. 2: Regulation des Kardiomyozytenwachstums durch den PI3K/AKT-Signalweg**

*AKT reguliert das Kardiomyozytenwachstum durch Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen Proteinbiosynthese und Proteindegradation. Zum einen induziert die Proteinkinase die Proteinsynthese. AKT aktiviert mTOR1, einen positiven Regulator des kardialen Wachstums, der über die Effektoren S6K und 4EBP1 zur Steigerung der Translationsrate beiträgt. Durch Hemmung der GSK-3β entfällt u.a. der negativ regulierende Einfluss auf die Translation und hypertrophe Prozesse werden aktiviert. Zum anderen kontrolliert AKT die Proteindegradation. Indem AKT durch Phosphorylierung FOXO Transkriptionsfaktoren inhibiert, wird u.a. die Induktion der Zielgene Atrogen-1 und MuRF-1 zur Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems unterbunden.*

### 1.1.2.3 Glucosemetabolismus

Im Wesentlichen deckt das Herz seinen Energiedarf durch die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zu einem Anteil von ca. 50-60%, gefolgt von der Oxidation von Glucose anteilig mit ca. 30% und geringgradig durch Laktat zu einem Anteil von etwa 20% (Klinke et al., 2009). In Abhängigkeit von der arteriellen Substratkonzentration passt das Herz den Energiestoffwechsel an. Ein entscheidender Regulationsmechanismus hierbei ist der sogenannte Glucose/Fettsäure-Zyklus (alt.: Randle-Zyklus). Bei erhöhtem Angebot an freien Fettsäuren werden diese bevorzugt verstoffwechselt und die Aufnahme von Glucose gehemmt bzw. umgekehrt (Randle et al., 1963).

Während am Herzen die Isoform AKT1 insbesondere in Wachstumsprozesse involviert ist, kontrolliert die Isoform AKT2 die Regulation des Glucosemetabolismus. Dies zeigt sich bereits daran, dass, obwohl AKT1 die prädominante Isoform im Herzen ist, AKT2 das bevorzugte Ziel Insulin/IGF1-vermittelter Phosphorylierung ist (Reinartz et al., 2014). Außerdem konnte an globalen AKT2 KO-Mäusen demonstriert werden, dass AKT2 eine zentrale Position im Glucosemetabolismus einnimmt. Im Gegensatz zu den AKT1 und AKT3 Einzel-KOs entwickeln nur AKT2 KO Mäuse eine Insulinresistenz und einen diabetischen Phänotyp (Cho et al., 2001). AKT2 besitzt entscheidenden Einfluss auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Zelle, indem es die Translokation des Glucose Transporters 4 (GLUT4) an die Zellmembran steuert (Calera et al., 1998). Vermittelt wird dies durch die inaktivierende

Phosphorylierung des *Rab-GTPase-activating protein (GAP) Akt substrate of 160 kDa (AS160)*. Die Inhibition der GAP-Aktivität von AS160 verhindert die Umwandlung von Rab-Guanosintriphosphat (GTP) in Rab-Guanosindiphosphat (GDP). In der Folge akkumulieren des Rab-GTP unterstützt die Translokation von GLUT4-Vesikeln zur Zellmembran (Kane et al., 2002, Sano et al., 2003).

### 1.1.3 Der induzierbare kardiomyozyten-spezifische AKT1/2 Knock-out (iCMAKT1/2 KO)

Das übergeordnete Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der herzspezifischen Funktion von AKT in induzierbaren, kardiomyozyten-spezifischen AKT1/2 Doppel-KO Mäusen. Um die Funktion der Proteinkinase am adulten Herzen untersuchen zu können, nutzten wir durch Tamoxifen induzierbare kardiomyozyten-spezifische KO-Mäuse. Die embryonale Herzentwicklung bleibt somit unbeeinträchtigt. Die Aktivität des  $\alpha$ -MHC-Promotors erlaubt die Begrenzung der Gendeletion auf die Kardiomyozyten. Dies gelingt dadurch, dass das mer-Cre-mer-Fusionsprotein, welches die Tamoxifen induzierbare Rekombinase zur Exzision des gewünschten Genabschnittes darstellt, unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors steht (vgl. Kapitel 3.1).

Nach einem fünftägigen Induktionsprotokoll, auf das im Detail im Kapitel „Material und Methoden“ eingegangen wird, ist der KO ausgebildet. Während das Überleben von induzierbaren kardiomyozytären AKT1 (iCMAKT1) und AKT2 (iCMAKT2) Einzel-KO-Mäusen unbeeinträchtigt bleibt, führt der kombinierte kardiomyozyten-spezifische KO von AKT1 und AKT2 (iCMAKT1/2) nach 3-4 Wochen zum Tod der Mäuse. Die Herzen verlieren über einen Zeitraum von ca. 3-4 Wochen an Gewicht und Größe, das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis nimmt progredient ab. Histologische Färbungen und echokardiographische Analysen der Doppel-KO Herzen zeigen im Zeitverlauf eine Ausdünnung des linksventrikulären Myokards ohne eine Dilatation des Ventrikels. Die Ejektionsfraktion der Herzen nimmt kontinuierlich ab und resultiert in einem terminalen kardialen Pumpversagen. Die kardiale Atrophie des iCMAKT1/2 KOs ist mit einer Abnahme der Größe isolierter Kardiomyozyten assoziiert (Goedecke et al., 2017).

Außerdem konnte durch Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse gezeigt werden, dass die Expression zahlreicher Gene für mitochondriale Proteine in den KO-Hezen reduziert wird. Funktionelle Messungen zeigten weiter einen Verlust der respiratorischen Mitochondrienfunktion.

Zusammengefasst ist der AKT-Signalweg essenziell für die Struktur und Funktion des Herzens. Das iCMAKT1/2 KO-Mausmodell eignet sich somit neben der Charakterisierung der herzspezifischen Funktion von AKT1/2 auch zur Untersuchung der molekularen Mechanismen kardialer Atrophie.

## 1.2 Kardiale Atrophie

### 1.2.1 Kardiale Plastizität

Kardiale Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Myokards, morphologisch und funktionell auf wechselnde physiologische Anforderungen und pathologische Bedingungen zu reagieren, um den Erhalt einer normalen Herzfunktion zu gewährleisten. Im Rahmen eines

*Remodelings* adaptiert das Myokard durch anabole, hypertrophe oder katabole, atrophe Mechanismen. Während die Vorgänge kardialer Hypertrophie gut untersucht sind, ist bisher wenig bekannt über die molekularen Prozesse kardialer Atrophie. Im Allgemeinen wird Atrophie definiert als Rückgang von Gewebe durch Abnahme der Zellzahl (numerische Atrophie) oder Abnahme der Zellgröße (volumetrische Atrophie). Die physiologische kardi-ale Atrophie ist gekennzeichnet durch den Verlust kardialer Muskelmasse als Folge abnehmender Kardiomyozytengröße (Harvey et al., 2014). Eine Reduktion der Zellzahl durch Zell-tod trägt unwesentlich dazu bei. Das bedeutet, dass es sich um einen potenziell umkehrba-ren Prozess handelt (Schena et al., 2004, Welsh et al., 2001). Kardiale Atrophie wird ausge-löst als Antwort auf verschiedene pathologische Stimuli, wie reduzierte Vorlast, so im Rah-men von Implantationen linksventrikulärer Herzunterstützungssysteme (*engl.: left ventri-cular assist device, LVAD*) (Kinoshita et al., 1988), Immobilisation während Bettruhe und Schwerelosigkeit (Perhonen et al., 2001), chronischen Erkrankungen mit Inflammation (Casper et al., 2012), Hungern (Gottdiener et al., 1978) und tumorinduzierte Kachexie (Burch et al., 1968). Auch unter physiologischen Bedingungen, wie etwa nach einer Schwangerschaft, kann es zu atrophischen Prozessen am Herzen kommen (Maillet et al., 2013). Dabei handelt es sich um die Rückbildung einer physiologischen Hypertrophie, die sich während der Schwangerschaft entwickelt.

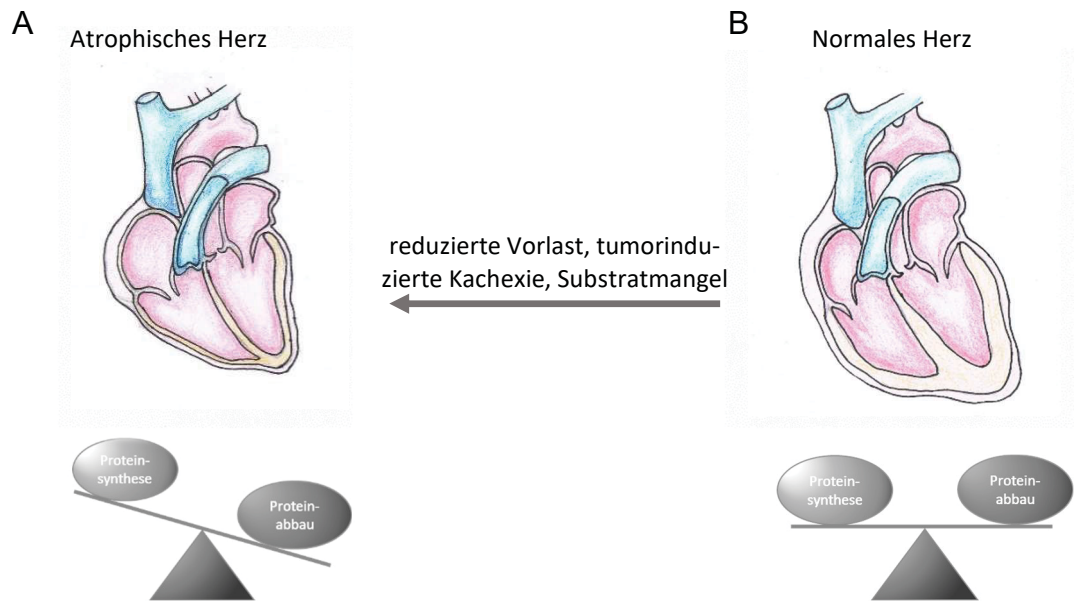
Zum Verständnis der morphologischen Plastizität des Myokards kann modellhaft das La-Place-Gesetz herangezogen werden:

Gleichung nach LaPlace: $K = P_{tm} * r / 2 * d$
K= Wandspannung, $P_{tm}$ = transmuraler Druck, r= Radius, d= Wanddicke

Unter der vereinfachenden Annahme, dass das Herz geometrisch einer Kugel entspricht, beschreibt die LaPlace-Gleichung folgende Gesetzmäßigkeit der Herzmechanik: Die Wandspannung, d.h. die Kraft/Wandquerschnitt, nimmt proportional mit dem transmura-len Druck (auch Innendruck) und dem Innenradius zu und verhält sich umgekehrt proporti-onal zur Dicke der Ventrikelwand (Klinke et al., 2009).

Der Prozess der Herzhypertrophie, der abhängig vom Stimulus in physiologischer oder pa-thologischer Hypertrophie resultiert, folgt dem Gesetz nach LaPlace. Es gilt hierbei die kon-zentrische von der exzentrischen Herzhypertrophie zu unterscheiden. Infolge einer chroni-schen Druckbelastung kann folgendes abgeleitet werden: Steigt der Innendruck bei gleich-bleibendem Radius durch Erhöhung der Nachlast (*engl.: afterload*), dann ergibt sich eine Zunahme der Wandspannung. Durch Ausbildung einer Hypertrophie mit Zunahme der Wanddicke bei gleichbleibendem Innenradius wird nach dem LaPlace Gesetz die Wandspannung gesenkt, sodass die Aktivierung der kardiomyozytären Hypertrophie im Sinne einer Kompensation erfolgt, da die Kraft/Muskelquerschnitt gesenkt wird. Bei chro-nischer Volumenbelastung kommt hinzu, dass der Ventrikel dilatiert. Der Radius nimmt zu, was neben einem erhöhten Innendruck zu einer erhöhten Wandspannung beiträgt. Als An-passung hypertrophiert das Kammermyokard, diesmal jedoch durch den dilatierenden Ein-fluss exzentrisch. Kehrt man den Hypertrophieprozess -sofern möglich- infolge einer LVAD-Implantation um, bedeutet das eine Reduktion des Innendrucks. Folglich nimmt die Wandspannung ab, wodurch der Wachstumsstimulus reduziert wird und das Myokard atrophiert.

Kardiomyozyten können also an Zustände verschiedener Wandspannung adaptieren. Die Extrazellulärmatrix (*engl.: extracellular matrix*, ECM) fungiert dabei als entscheidender Vermittler. Sie überträgt Längenänderungen der Kardiomyozyten via Protein-Protein-Interaktion mit dem Zytoskelett und wirkt so als Krafttransmitter. Infolgedessen werden Änderungen kardialer Belastung in biochemische Signale umgesetzt, die zur Änderung der Genexpression und somit funktionellen Anpassung des Kardiomyozyten beiträgt (Harvey et al., 2014). Auch die ECM unterliegt dynamischen Umbauvorgängen, die ihrerseits als Antwort auf wechselnde kardiale Beanspruchung zu werten sind. Eine Anpassung der ECM ist beispielsweise notwendig, wenn Änderungen in der Kardiomyozytengröße das Verhältnis zwischen Zellen und ECM verschieben (Harvey et al., 2014). Die Adaptation erfolgt dann durch den Abbau und die anschließende Neusynthese von ECM Bestandteilen. Dieses Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese wird insbesondere von MMPs (*matrix metalloproteinases*) und TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) reguliert. MMPs sind eine Gruppe in der ECM oder Zellmembran verankerter metallionabhängiger Proteasen, die Proteinbestandteile der ECM degradieren. Ihre Transkription wird vor allem dehnungsabhängig reguliert (Tyagi et al., 1998). TIMPs modulieren als negative Regulatoren die Aktivität der MMPs, indem sie deren katalytisches Zentrum besetzen. Ein gestörtes Gleichgewicht aktiver MMPs und TIMPs bedeutet ein dysreguliertes *Remodeling* der ECM. Während ein Überschuss der MMPs zu verstärktem Verlust von ECM führen kann, resultiert eine Dominanz an TIMPs in übermäßiger ECM-Produktion (Leco et al., 2006). In Atrophiemodellen wurde gezeigt, dass die Expression zahlreicher TIMP-Isoformen hochreguliert und MMP-Isoformen größtenteils herunterreguliert waren. Außerdem erwies sich das TIMP/MMP Verhältnis als erhöht (Wang et al., 2012). In diesem Zusammenhang ist die kardiale Atrophie mit einer Zunahme des interstitiellen Volumens assoziiert (Kent et al., 1985).



**Abb. 3: Kardiale Atrophie resultiert aus einer Imbalance von Proteinsynthese und -abbau**

(A) Der Atrophieprozess ist geprägt von einer Abnahme der kardialen Muskelmasse durch die Reduktion der Kardiomyozytengröße. Die Proteindegradation überwiegt die Proteinsynthese. (B) Im gesunden Herzen ist das Gleichgewicht von Proteinsynthese und -degradation erhalten. Reduzierte Vorlast, tumorinduzierte Kachexie und Hungerperioden stellen u.a. Trigger für das atrophische Remodeling dar.

### 1.2.2 Proteinhomöostase im atrophierenden Herzen

Bekannt ist, dass während der kardialen Atrophie die Abnahme der Kardiomyozytengröße Folge einer Imbalance von anabolen und katabolen Prozessen ist. Die Balance von Proteinsynthese und -abbau zugunsten des Abbaus verlagert (Abb. 3). Die Proteindegradation in Kardiomyozyten wird durch drei verschiedene proteolytische Systeme, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die Autophagie und das Calpain-System gewährleistet (Harvey et al., 2014). Vorrangig vermittelt das UPS die intrazelluläre Proteolyse (Powell, 2006). Im Rahmen einer durch hämodynamische Entlastung induzierten kardialen Atrophie wurde nachgewiesen, dass das UPS vorzugsweise durch die gesteigerte Expression von Ubiquitin B und des *ubiquitin conjugating enzyme H2 (UbcH2)* aktiviert wird (Razeghi et al., 2006a). Die E3 Ubiquitinligasen Atrogin1 und MURF1 (*muscle RING-finger protein-1*), welche essenziell für die Skelettmuskelatrophie sind, sind hingegen herunterreguliert (Sharma et al., 2006, Razeghi et al., 2006a). Was zunächst widersprüchlich wirkt, ist vermutlich durch die vermehrte Expression von IGF1 in hämodynamisch entlasteten Herzen zu erklären. Der IGF1/AKT Signalweg inhibiert indirekt die Expression von Atrogin1 und MURF1 durch Reduktion der Aktivität von FOXO3, einem Induktor der beiden Ligasen (Skurk et al., 2005, Sharma et al., 2006). Dies kann einen Mechanismus zum Schutz des Myokards vor überschießender proteolytischer Aktivität darstellen (Razeghi et al., 2006a). Während das atrophische *Remodeling* insbesondere mit einer Induktion der proteolytischen Systeme assoziiert ist, sind gleichzeitig auch Signalkaskaden zur Aktivierung der Proteinsynthese gesteigert. So bedeutet die AKT-unabhängige Hochregulation von mTOR in atrophischen Herzen eine Steigerung der Proteintranslation. Diese Aktivierung von mTOR dient als Feedback Mechanismus, um übermäßige Atrophie zu vermeiden. Eine Inhibition mit Rapamycin forciert die Atrophie zusätzlich (Razeghi et al., 2003).



Kardiale Atrophie durch tumorinduzierte Kachexie wurde weitreichend in Mäusen untersucht, die Colon-26 (C26) Tumore tragen. Die Gewichtung hierbei involvierter proteolytischer Systeme bleibt allerdings umstritten. Zum einen wurde die zytokinvermittelte gesteigerte Expression der E3 Ubiquitinligasen Atrogin1 und MURF1 gezeigt, was eine Aktivierung des UPS bekräftigt (Tian et al., 2011). Cosper and Leinwand (2011) hingegen berichteten keine solche Hochregulierung von Atrogin1, MURF1 und der Proteasom-Aktivität. Im Gegenzug wiesen sie insbesondere eine gesteigerte Expression von LC3 und erhöhte Proteinspiegel von LC3-II nach. Sie schlussfolgerten, dass tumorinduzierte kardiale Atrophie nicht mit der Aktivierung des UPS assoziiert ist, sondern hauptsächlich durch Autophagie vermittelt wird (Cosper and Leinwand, 2011).

Das Calpain-System umfasst calciumabhängige Proteasen, die in Kardiomyozyten die Degradation von Myofilamenten katalysieren (Lim et al., 2004). Es wurde eine Kooperation von Calpain-System und UPS gezeigt. Erst die Destabilisierung der Myofilamente, zum Beispiel durch Calpaine, macht sie zugänglich für die Ubiquitinylierung und proteasomale Degradation (Galvez et al., 2007). Allerdings ist die Inhibition der Calpain-Proteasen nicht im Stande, eine kardiale Atrophie zu verhindern. Das zeigt, dass die Calpain-Proteasen als Proteolysesystem für den Atrophieprozess nur eine untergeordnete Rolle spielen (Razeghi et al., 2007).

### 1.2.3 Metabolischer Stress im atrophierenden Herzen

Die kardiale Atrophie mit Reduktion der Kardiomyozytengröße erfordert zum Erhalt der Pumpfunktion auch metabolische Anpassung. Insbesondere Hungerperioden und tumorinduzierte Kachexie verdeutlichen die schnelle Atrophie als Antwort auf einen Substratmangel. Die induzierte Proteindegradation durch die Autophagie und das UPS dient in diesem Zusammenhang der Substratbereitstellung für die Energiegewinnung. Besonders vom Proteinabbau betroffen sind die Myofibrillen, die einen wesentlichen Anteil der Proteinmenge in Kardiomyozyten ausmachen (Samarel et al., 1987, Harvey et al., 2014).

Während der Atrophie erfolgt im Myokard ein Wechsel der Substratpräferenz von Fettsäuren hin zu Glucose (Doenst et al., 2001). Die Nutzung von Glucose anstelle der Fettsäure-Oxidation zur ATP-Gewinnung ist für die Kardiomyozyten bioenergetisch effektiver durch eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs (Hütter et al., 1984, Burkhoff et al., 1991). Dieser Substratwechsel spiegelt sich in der Transkriptionsänderung von drei Schlüsselenzymen des mitochondrialen Stoffwechsels wider. Die Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK4) phosphoryliert und inaktiviert den Pyruvatdehydrogenasekomplex, wodurch die Umsetzung von Glucose zu Acetyl-CoA und dessen Nutzung im Citratzyklus inhibiert wird. Die Malonyl-CoA Decarboxylase (MCD) fördert den Abbau langkettiger Fettsäuren und das *uncoupling protein 3* (UCP3) setzt die Effizienz der ATP-Gewinnung herab, indem es die Atmungskette entkoppelt (Taegtmeyer et al., 2002). Die Transkription aller drei Enzyme ist bei Atrophie herunterreguliert, was in einer effizienteren ATP-Gewinnung aus Glucose und weniger Fettsäure-Oxidation resultiert. Reguliert wird die Transkription der drei Enzyme durch den *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ), welcher in atrophierenden Herzen herunterreguliert ist (Taegtmeyer et al., 2002).

Eine chronische Reduktion der Vorlast führt in Rattenherzen zu einer Einschränkung der respiratorischen Kapazität durch Herunterregulation von Genen, die für Komplexe der

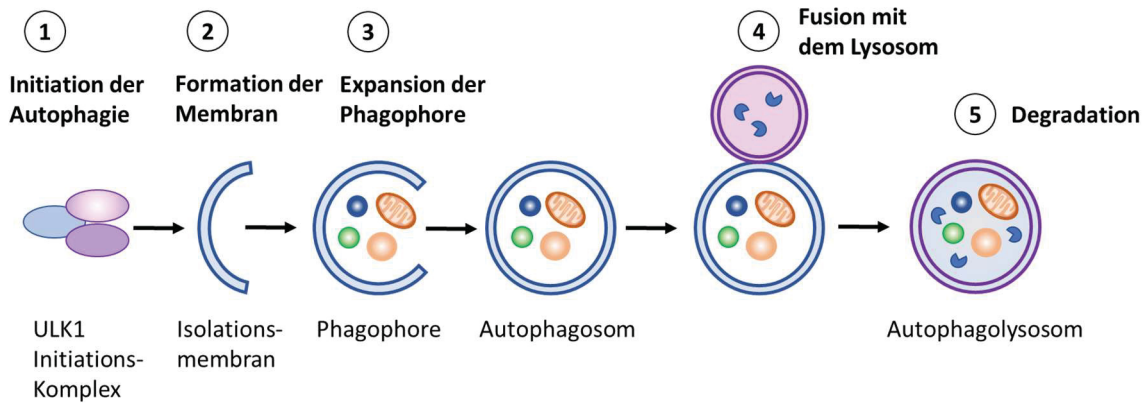
Atmungskette codieren. Außerdem ist die Expression zahlreicher weiterer mitochondrialer Proteine vermindert, was bedeutet, dass die Zahl an Mitochondrien abnimmt und/oder die Gesamtheit der Mitochondrien weniger Enzymausstattung besitzt. Insgesamt ist so von einer reduzierten mitochondrialen Biogenese auszugehen. Dies ist wiederum vereinbar mit der beobachteten Expressionsminderung des zentralen Regulators der mitochondrialen Biogenese PGC-1 $\alpha$ . Die Entwicklung einer mitochondrialen Dysfunktion mit reduzierter oxidativer Kapazität wird als die Quelle einer Energiedeprivation durch reduzierte ATP-Produktion in atrophierenden Herzen vermutet (Bugger et al., 2006).

### 1.2.4 Autophagie und Mitophagie

Die Autophagozytose oder auch Autophagie ist ein Prozess zur lysosomalen Degradation und zum *Recycling* intrazellulärer Komponenten. Sie dient neben der Entfernung defekter oder überflüssigen Zellmaterials im Sinne intrazellulärer Qualitätskontrolle der Bereitstellung von Substrat zur Energiegewinnung. Drei Formen der Autophagie werden unterschieden: Makroautophagie, Mikroautophagie und chaperonvermittelte Autophagie. Während der chaperonvermittelten Autophagie werden ausgewählte Proteine von Chaperonen über die lysosomale Membran transportiert. Die Makro- und Mikroautophagie stellen dagegen Massenprozesse dar, wobei größere Mengen an intrazellulärem Material den Lysosomen zugeführt werden. Im Zuge der Mikroautophagie erfolgt die Aufnahme von Bestandteilen im Zytoplasma durch Invagination der Lysosomenmembran. Bei der Makroautophagie wird zytosolisches Material vesikulär verpackt in die Lysosomen transportiert (Parzych and Klionsky, 2014). Ein schematischer Ablauf der Makroautophagie wird in Abbildung 4 dargestellt. Die Makroautophagie besitzt eine basale Aktivität und kann durch Substratmangel, Hypoxie und reaktive Sauerstoffspezies, DNA-Schäden, beschädigte Zellorganellen und intrazelluläre Pathogene induziert werden (Kroemer et al., 2010). Weiterhin unterliegt die Makroautophagie u.a. der Regulation durch den IGF1/PI3K/AKT-Signalweg. Die AKT-vermittelte Aktivierung von mTOR resultiert in einer Inhibition der Autophagie. Die Aktivität von mTOR führt durch Phosphorylierung zu einer Inaktivierung des ULK1 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*)-Initiationskomplexes, der essenziell zur Ausbildung des Autophagosoms beiträgt (Levine and Kroemer, 2008, Hosokawa et al., 2009).

Eine selektive Variante der Makroautophagie ist die Mitophagie, über die dysfunktionale Mitochondrien abgebaut werden und ihre Anzahl reguliert wird. Die Mitophagie kann durch verschiedene Mechanismen eingeleitet werden. Zum einen ist eine Akkumulation von PINK1 (*PTEN-induced putative kinase*) in beschädigten Mitochondrien eine Markierung für die E3 Ubiquitinligase Parkin, die die Ubiquitylierung des Mitochondriums vermittelt. Via Autophagierezeptoren wie SQSTM1 (Sequestosom 1)/p62, die an LC3-II (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) binden, wird das Ubiquitin-markierte Mitochondrium an die Phagophore rekrutiert (Youle and Narendra, 2011). Hierbei handelt es sich um eine Doppelmembran zur Isolierung der Zellbestandteile. Eine alternative Markierung zur Degradation des Mitochondriums kann über NIX/BNIP3L, BNIP3 oder FUNDC1 erfolgen. Sie können unmittelbar mit LC3-II oder GABARAPL1 (*GABA Type A Receptor Associated Protein Like 1*) interagieren und das Mitochondrium an die Phagophore binden (Ding and Yin, 2012). Die Phagophore reift zu einem Autophagosomen, indem sie sich zu einem Vesikel schließt. Schließlich fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, dessen Enzyme die Degradation des Mitochondriums vermitteln.





**Abb. 4: Schematischer Ablauf der Makroautophagie**

Als wesentliches Unterscheidungsmerkmal zur chaperonvermittelten Autophagie und Mikroautophagie erfolgt bei der Makroautophagie zunächst die Formierung eines Doppelmembranvesikels zum Transport der zytosolischen Bestandteile zum Lysosom. Daran sind zahlreiche ATG (autophagy-related) -Proteine beteiligt, die in Komplexen organisiert den fünfschrittigen Prozess regulieren: (1) Initiation (2) Formation der Membran (3) Expansion der Phagophore (4) Fusion mit dem Lysosom (5) Degradation. Abbildung nach Hansen et al. (2018).

### 1.2.5 Immunzellen im Atrophieprozess

Eine kardiale Atrophie kann auch durch Zelluntergang im Sinne einer numerischen Atrophie, etwa im Rahmen einer myokardialen Ischämie, bedingt sein. Bei einer Myokardschädigung setzen nekrotische Kardiomyozyten Mediatoren zur Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems frei, um Zelltrümmer zu entfernen und den Defekt zu reparieren (Frangogiannis, 2015). Diese ausgeschütteten *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) dienen der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die zunächst das Ausmaß der Schädigung steigern können (Arslan et al., 2011, Vinten-Johansen, 2004). Um die proinflammatorische Immunantwort zu terminieren und weiteren Schaden vom Myokard abzuwenden, wird von Phagozyten nach Entfernung der Zelltrümmer ein antiinflammatorisches Milieu geschaffen (Wan et al., 2013). Auch die Rekrutierung bestimmter Lymphozytensubpopulationen, wie regulatorischer T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ), dient der negativen Regulation der inflammatorischen Antwort (Tang et al., 2011). Weiterhin sind verschiedene Subpopulationen kardialer Makrophagen an der Organisation der reparativen Vorgänge am Myokard beteiligt. Infolge myokardialer Schädigung erfolgt primär eine Infiltration des Myokards durch Makrophagen, die  $Ly6C_{hi}$ -Monozyten entstammen. Sie vermitteln ein proinflammatorisches Milieu. Im weiteren Heilungsprozess differenzieren aus den  $Ly6C_{hi}$ -Monozyten die Subpopulation der  $Ly6C_{low}$ -Monozyten. Unter ihrem Einfluss dominieren antiinflammatorische Mediatoren und reparative Vorgänge (Hilgendorf et al., 2014b).

### 1.3 FOXO Transkriptionsfaktoren

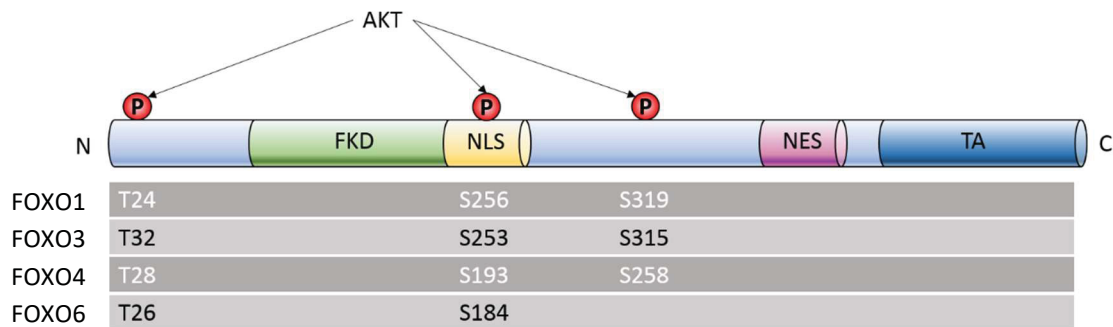
#### 1.3.1 Aufbau der FOXO Transkriptionsfaktoren

Die *Forkhead box O* (FOXO) Transkriptionsfaktoren gehören als Subfamilie zur Gruppe der *Fox* (***Forkhead box***) Transkriptionsfaktoren. Diese Proteinfamilie zeichnet sich durch die namensgebende *Forkhead box* aus, einen hochkonservierten Genabschnitt. Dieser codiert für eine etwa 110 Aminosäuren umfassende Sequenz, die eine monomere DNA-Bindedomäne formt, die *Forkhead domain*. Erstmals wurde diese DNA-Bindungsdomäne im *forkhead gene* von *Drosophila melanogaster* identifiziert (Clark et al., 1993, Weigel et al., 1989). Es gilt als namensgebender erster FOX-Transkriptionsfaktor. Die Transkriptionsfaktoren werden entsprechend einer Klassifikation in Unterklassen von FOX-A bis FOX-R eingeteilt (Kaestner et al., 2000).

Aus der Untergruppe der FOXO Transkriptionsfaktoren werden in Zellen von Säugetieren die vier Isoformen FOXO1 (früher FKHR: *forkhead in human rhabdomyosarcomas*), FOXO3 (früher: FKHL1: *forkhead in rhabdomyo-sarcomas-like protein1*), FOXO4 (früher AFX: *acute leukemia fusion gene*) und FOXO6 exprimiert. Die Isoformen FOXO2 und FOXO5 erwiesen sich als identisch mit FOXO3 bzw. als dessen Homolog in Fischen (Carter and Brunet, 2007, Rudd et al., 2003). Obwohl die Transkriptionsfaktoren FOXO1, 3 und 4 ubiquitär vorkommen, gibt es zellspezifische Verteilungsunterschiede. FOXO1 kommt vermehrt in braunem und weißem Fettgewebe vor, FOXO3 im Herzen und Gehirn, FOXO4 im Herzen und Skelettmuskel (Furuyama et al., 2000). Dagegen ist FOXO6 insbesondere in bestimmten ZNS-Regionen nachweisbar (Jacobs et al., 2003a).

Die vier FOXO Transkriptionsfaktoren unterscheiden sich zwar in der Länge ihrer Aminosäuresequenz (Maus: FOXO1: 652 AS, FOXO3: 672 AS, FOXO4: 505 AS, FOXO6: 559 AS), jedoch verfügen die vier Isoformen über vier gemeinsame konservierte funktionelle Domänen (Abb. 5). Zur Bindung an Promotoren von Zielgenen dient die N-terminal lokalisierte *Forkhead domain*. Sie erkennt Zielgene an der Konsensus-DNA-Sequenz 5'-TTGTTTAC-3', die auch FRE (*Forkhead-responsive element*, *Forkhead*-Bindungsstelle) genannt wird (Furuyama et al., 2000). Es folgen ein Kernlokalisationsmotiv (NLS, *Nuclear localization sequence*) sowie ein Kernexportmotiv (NES, *Nuclear export sequence*), die den nukleozytoplasmatischen Austausch der Transkriptionsfaktoren steuern. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TA, *Transactivation domain*) induziert die transkriptionale Aktivierung der Zielgene (van der Heide et al., 2004, van der Horst and Burgering, 2007).

Ramaswamy et al. (2002) konnten anhand einer FOXO Mutante zeigen, dass die FOXO Transkriptionsfaktoren auch unabhängig von der *Forkhead domain* die Transkription von Zielgenen regulieren können. Es wird angenommen, dass der zugrundeliegende Mechanismus in einer Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren besteht. So konnten weitere Arbeiten zahlreiche Koaktivatoren identifizieren, darunter auch PGC-1 $\alpha$  (van der Vos and Coffey, 2008). Die FOXO Transkriptionsfaktoren werden hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität und subzellulären Lokalisation durch posttranslationale Modifikation (PTM) wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitylierung reguliert (Brunet et al., 1999, Matsuzaki et al., 2003, Daitoku et al., 2004).



**Abb. 5: Schematische Struktur der FOXO Isoformen und Phosphorylierungsstellen durch AKT**

Alle vier FOXO Isoformen besitzen vier Domänen. Vom N- bis zum C-Terminus sind dies die DNA-Bindungsdomäne (FKD), die Kernlokalisationssequenz (NLS), die Kernexportsequenz (NES) und die Transaktivierungsdomäne (TA). Weiter dargestellt sind die AKT-spezifischen Phosphorylierungsstellen an Serin- und Threoninresten der jeweiligen Isoformen. FKD, Forkhead domain, NLS, Nuclear localization sequence, NES, Nuclear export sequence, TA, Transactivation domain. Modifiziert nach van der Heide et al. (2004), van der Horst and Burgering (2007).

### 1.3.2 Regulation der FOXO Transkriptionsfaktoren durch den PI3K/AKT-Signalweg

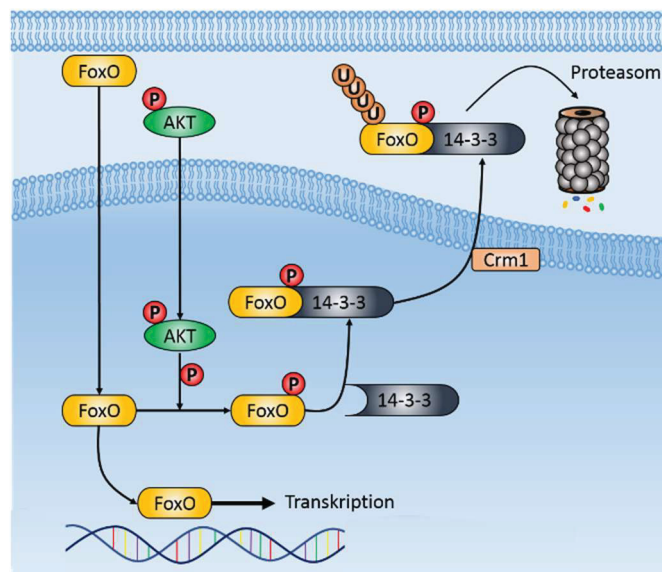
Die FOXO Transkriptionsfaktoren werden durch zahlreiche Stimuli reguliert. Dazu gehören Insulin und IGF1, die über den Insulin/IGF1/PI3K/AKT-Signalweg wirken, das Nährstoffangebot, Zytokine und oxidativer Stress. Sie nehmen Einfluss durch posttranslationale Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierung, (De-)Acetylierung, Ubiquitynylierung und Methylierung oder modulieren direkt die transkriptionelle Aktivität der FOXOs (Daitoku et al., 2011).

PTM beeinflussen insbesondere den nukleozytoplasmatischen Transport der FOXO Transkriptionsfaktoren und regulieren somit indirekt ihre transkriptionelle Aktivität. Besondere Bedeutung kommt dabei der Phosphorylierung durch AKT zu (Abb. 6). Durch Phosphorylierung aktiviertes AKT transloziert in den Nucleus, wo es FOXO1, 3 und 4 an drei verschiedenen Positionen und FOXO6 an zwei Stellen phosphoryliert (van der Heide et al., 2004). Abbildung 5 verdeutlicht die AKT-spezifischen Phosphorylierungsstellen der Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung (an T32 und S253 in FOXO3) induziert eine Konformationsänderung, wodurch die Kernlokalisierungssequenz unzugänglich wird und Bindungsstellen für die Interaktion mit dem regulatorischen Bindeprotein 14-3-3 geschaffen werden (Brunet et al., 1999). Die Bindung von 14-3-3 wiederum legt die Kernexportsequenz (NES) frei. Sowohl die Phosphorylierung und Bindung von 14-3-3 als auch das Vorhandensein der Kernexportsequenz sind notwendige Bedingungen für den effektiven Export der Transkriptionsfaktoren (Brunet et al., 2002). Das Exportprotein CRM1 vermittelt die Ausschleusung des FOXO-14-3-3-Komplexes aus dem Nukleus (Biggs et al., 1999). Ein Wiedereintritt von FOXO in den Nukleus wird verhindert, indem 14-3-3 Proteine die Kernlokalisierungssequenz (NLS) maskieren (Rena et al., 2001, Brownawell et al., 2001).

Neben dem Ausschluss von FOXO aus dem Nukleus senkt auch die Degradation über den Ubiquitin-Proteasom-Weg die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors. Nach Polyubiquitynylierung im Zytosol wird der FOXO -14-3-3-Komplex proteasomal abgebaut. Die Phosphorylierung durch AKT und die subzelluläre Lokalisation von FOXO sind

Voraussetzung für diesen Schritt (Matsuzaki et al., 2003, Plas and Thompson, 2003). Auch die Phosphorylierung von FOXO3 durch die IKK $\beta$  (*I kappaB kinase beta*) und ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) führt zum Export des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern und führt FOXO3 der proteasomalen Degradation zu (Hu et al., 2004, Yang et al., 2008).

Doch Phosphorylierungen können auch zur Aktivierung der FOXOs beitragen. Stressabhängige Kinasen wie AMPK (*AMP-activated protein kinase*), JNK (*c-Jun kinase*), MST1 (*mammalian Ste20-like kinase*) und p38MAPK sind Beispiele dafür. Als Reaktion auf Energiedepression aktiviert die AMPK FOXO3 durch spezifische Phosphorylierung. Dadurch erfolgt eine Expressionssteigerung ausgewählter FOXO-Zielgene, ohne die Lokalisation des Transkriptionsfaktors zu beeinflussen (Greer et al., 2007). Die spezifische Phosphorylierung FOXOs durch die Kinasen JNK und MST1 folgt als Antwort auf oxidative Stressstimuli. Sie fördern die transkriptionelle Aktivität von FOXO, indem eine Relokalisierung von FOXO in den Nucleus induziert wird, und antagonisieren somit die AKT vermittelte Inhibition des Transkriptionsfaktors (Calnan and Brunet, 2008, Essers et al., 2004, Lehtinen et al., 2006). Acetylierung und Deacetylierung stellen weitere Regulationsmechanismen der *FoxO* Transkriptionsfaktoren dar (Brunet et al., 2004, Daitoku et al., 2004, Motta et al., 2004).



**Abb. 6: Nukleozytoplasmatische Verschiebung des FOXO Transkriptionsfaktors**

*FOXO* erkennt an Promotoren das *FRE* (*Forkhead responsive element*) oder *IRE* (*Insulin responsive element*) und bindet über die *FHD* (*Forkhead domain*). Aktiviertes AKT transloziert aus dem Zytoplasma in den Nucleus, wo es *FOXO* phosphoryliert. Infolge einer Konformationsänderung von *FOXO* lagert sich das Protein 14-3-3 an. Das Exportprotein *CRM1* schleust den Komplex aus dem Nucleus in das Zytoplasma, wo es sich von dem Komplex wieder löst. Dort wird *FOXO* nach Polyubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt. P = Phosphatrest, U = Ubiquitin.

### 1.3.3 Funktion von FOXO Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten

FOXO Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, die in Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion, Regulation der Zellgröße, Glucose- und Lipidmetabolismus sowie Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.: reactive oxygen species*, ROS) involviert sind. Im Herzen werden die Isoformen FOXO1, FOXO3 und FOXO4 exprimiert, wobei FOXO1 und FOXO3 als die beiden prädominanten Formen beschrieben sind (Hannenhalli et al., 2006).

FOXOs tragen in neonatalen Kardiomyozyten zum Zellzyklusarrest bei und wirken anti-proliferativ. Indem sie die *Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren* (*engl.: cyclin-dependent kinase inhibitor*, CDKI) p27<sup>kip1</sup> und p21<sup>cip1</sup> und das Pocketprotein p130 hochregulieren, induzieren sie einen Arrest in der G1 Phase und versetzen die Zelle in einen reversiblen Ruhezustand, die Quieszenz (Medema et al., 2000, Kops et al., 2002b, Seoane et al., 2004). Unter der Kontrolle von AKT werden FOXOs inaktiviert, was wiederum zur Zellzyklusprogression während der Herzentwicklung beiträgt (Evans-Anderson et al., 2008).

Als einen weiteren Wirkmechanismus vermitteln die FOXO Transkriptionsfaktoren Apoptose, indem sie das Verhältnis der Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen modulieren. Die proapoptotische Funktion wird u.a. durch die Expression der Zielgene *FasI* und *Trail* herbeigeführt, die den extrinsischen Weg der Apoptose einleiten (Brunet et al., 1999, Modur et al., 2002). Auch die Proteine der *Bcl2*-Familie (*b-cell lymphoma family 2*) BIM (*BCL2-like 11*), BNIP3 (*BCL2 Interacting Protein 3*) und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) sind Ziele der FOXOs zur Induktion der Apoptose (Gilley et al., 2003, Dijkers et al., 2000, You et al., 2006). Sie fördern die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und aktivieren so auf intrinsischem Weg den programmierten Zelltod.

FOXOs spielen darüber hinaus eine entscheidende Rolle für den Erhalt von Zellorganell- und Proteinhomöostase. Diesbezüglich sind FOXO-Zielgene in zwei zellulären *Clearance*-Prozessen involviert, der Autophagie und dem Ubiquitin-Proteasom-System. Bisher konnte für die Isoformen FOXO1/3 die Aktivierung der Autophagie in folgenden Zelltypen beschrieben werden: Neurone, Myozyten, Kardiomyozyten, renale Tubulus Zellen und hämatopoetische Stammzellen (Webb and Brunet, 2014). Sie induzieren die Autophagie durch die Regulation der Transkription Autophagie-assoziiierter Gene wie *Gabrapl1*, *Lc3*, *Bnip3*, *Sqstm1/p62*, *Autophagy-related genes (Atgs)* und *Beclin* (Sengupta et al., 2009, Zhao et al., 2007). Die FOXOs besitzen einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierung der Proteindegradation durch das UPS. Die Isoformen FOXO1/3 stimulieren die Expression der E3 Ubiquitinligasen Atrogin1 und MURF1, zwei essenziellen Mediatoren der Skelettmuskelatrophie (Sandri et al., 2004). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass FOXOs die Steigerung der Proteasomaktivität durch vermehrte Expression der Proteasomuntereinheit PSMD11 (*Proteasome 26S Subunit Non-ATPase 11*) induzieren (Vilchez et al., 2012). Die Expression der Ubiquitinligasen und die proteolytische Aktivität unterliegen der negativen Kontrolle des IGF1/PI3K/AKT-Signalwegs, der somit antiatrophische Wirkung durch Inhibition von FOXO vermittelt (Stitt et al., 2004). FOXO Transkriptionsfaktoren aktivieren so insgesamt ein Genprogramm zur Anpassung des Gewebes an Energiedeprivation (Sengupta et al., 2009, Martins et al., 2016, Zhao et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass FOXOs an der Regulation der Zellgröße von Kardiomyozyten beteiligt sind. Die Kardiomyozytengröße ist abhängig von der Balance aus Proteinsynthese



und -abbau. FOXOs können diese Balance hin zu vermehrter Proteindegradation verschieben, indem sie das Ubiquitin-Proteasom-System aktivieren und Autophagie induzieren (Schips et al., 2011).

Bei der Untersuchung eines FOXO3 Überexpressionsmodells beschrieb Skurk et al. (2005) eine AKT/FOXO-Signalkaskade in Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo*. Er konnte zeigen, dass FOXO3 Überexpression zu einer signifikanten Reduktion der Kardiomyozytengröße an Mäuseherzen *in vivo* führte. Außerdem identifizierte er die E3 Ubiquitin-Ligasen ATROGIN1 und MURF1 als FOXO3-Zielgene am Herzen, deren Expression durch FOXO3 induziert wird. Diese Ligasen aktivieren das Ubiquitin-Proteasom-System, indem sie die Markierung von spezifischen kardiomyozytären Proteinen mit Ubiquitin vermitteln.

Transgene Mäuse mit einem kardiomyozyten-spezifischen, konstitutiv-aktiven FOXO3 Transkriptionsfaktor entwickeln eine reversible Herzatrophie. Sowohl die gesamte Herzmasse als auch die Kardiomyozytengröße der Tiere ist reduziert. Eine Induktion der Autophagie in den Kardiomyozyten konnte anhand der hochregulierten Genexpression von *Lc3-II*, *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Ulk1* nachgewiesen werden (Schips et al., 2011). Eine Überexpression von FOXO1 und FOXO3 in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten führt zu einer erhöhten Expression der Autophagie-assoziierten Gene *Lc3b*, *Gabarapl1* und *Atg12* und reduziert die Kardiomyozytengröße (Sengupta et al., 2009). FOXO1/3 induzieren auch Mitophagie, eine spezielle Form der Autophagie, bei der Mitochondrien selektiv degradiert werden. Es wurde gezeigt, dass durch *Bnip3* als FOXO-Zielgen die Fragmentierung von Mitochondrien in Kardiomyozyten induziert werden kann (Hamacher-Brady et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus zur Modulation der Kardiomyozytengröße umfasst die Regulation wachstumsfördernder Signalwege. Ein solcher Signalweg ist der Calcineurin/NFAT-Signalweg, welcher bei Überexpression in pathologischer myokardialer Hypertrophie resultiert (Molkentin et al., 1998). Die Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalwegs durch FOXO1/3 bzw. den Wegfall der repressiven Kontrolle von FOXO1/3 durch AKT reprimiert das kardiale Wachstum (Ni et al., 2006).

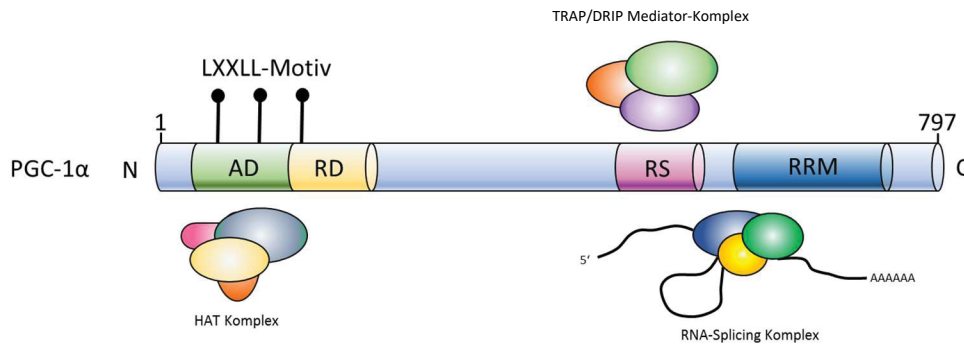
Zusammenfassend bewirkt eine erhöhte Aktivität von FOXO3 eine Abnahme der Kardiomyozytengröße durch Aktivierung des UPS und der Autophagie. Umgekehrt führt ein Verlust der FOXO Aktivität zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße und Entwicklung einer Herzhypertrophie.

Im Rahmen der zellulären Antwort auf oxidativen Stress kommt den FOXOs eine weitere wichtige Aufgabe zu. Sie regulieren die Transkription von Genen, deren Produkte Schlüsselenzyme zur Entgiftung von ROS darstellen. Die induzierte Expression von Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) und Katalase trägt in diesem Sinne zur Resistenz gegenüber oxidativem Stress bei (Kops et al., 2002a, Nemoto and Finkel, 2002). In Kardiomyozyten bewirkt eine ROS-abhängige Expressionssteigerung von FOXO1/3 die Induktion von Superoxiddismutase 2 (SOD2). Durch die antioxidativen Enzyme vermittelt FOXO eine kardioprotektive Wirkung und trägt zum Zellüberleben während oxidativer Bedingungen bei (Sengupta et al., 2011).

### 1.4 PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren

#### 1.4.1 Struktur von PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren

*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) Coactivator-1 (Ppargc1 oder PGC-1)* fasst eine Gruppe von Transkriptionskoaktivatoren zusammen. Als Transkriptionskoaktivatoren werden Proteine bezeichnet, die durch Protein-Protein-Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren und nukleären Rezeptoren deren transkriptionelle Aktivität regulieren. Die PGC-1 Familie besteht aus den drei Isoformen PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  und PGC-1 $\gamma$  (oder auch *PGC related coactivator; PRC*). Als erste Isoform wurde PGC-1 $\alpha$  als Transkriptionskoaktivator in Zusammenhang mit kälteinduzierter Thermogenese in braunem Fettgewebe identifiziert (Puigserver et al., 1998). Zwischen den drei Mitgliedern der PGC-1 Familie besteht eine hohe Homologie im Bereich des N- und C-Terminus sowie in der Organisation der funktionellen Domänen (Abb. 7). PGC-1 Koaktivatoren besitzen selbst keine DNA-Bindungsdomäne, vielmehr dienen sie als Ankerpunkt für andere Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Komplexe. Eine hochkonservierte N-terminale Aktivierungsdomäne besitzt Leucin-reiche Sequenzabschnitte (*LXXLL* und *LLXXL* Motive), die Ligandenbindungsdomänen anderer nukleärer Rezeptoren binden (Knutti et al., 2000). Darüber interagieren die PGC-1 Proteine mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und nukleären Rezeptoren, wie *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR $\alpha$ )*, PPAR $\gamma$ , Thyroidhormon-Rezeptor (TR), Glucocorticoid-Rezeptor (GR), Östrogen-Rezeptor (*estrogen-related receptor, EER*), FOXO1, *hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$*  (HNF4 $\alpha$ ) und *Nuclear Respiratory Factor-1* und -2 (NRF1, NRF2) und regulieren ihre Aktivität (Vega et al., 2000, Yoon et al., 2001, Puigserver et al., 2003, Wu et al., 1999, Huss et al., 2002). Über die Aktivierungsdomäne werden weiter Histonacetyltransferasen (HAT) wie das *cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein/p300 (CBP/p300)* und der *steroid receptor coactivator-1 (SRC-1)* rekrutiert (Puigserver et al., 1999). An die Aktivierungsdomäne anschließend folgt eine inhibitorische Domäne, über die Repressoren die Aktivität des Koaktivators modulieren (Fan et al., 2004). Die C-terminal gelegene Domäne interagiert mit dem Mediator-Komplex TRAP/DRIP (*thyroid hormone receptor-associated protein/vitamin-D-receptor interacting protein*), wodurch der Transkriptionsinitiationskomplex gebunden wird (Wallberg et al., 2003). Weiter existiert in der C-terminalen Hälfte ein RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif, RRM*) zur Bindung an RNA und eine Arginin-Serin-reiche (RS) Domäne, die in Zusammenhang mit *Splicing*-Prozessen gebracht wird (Monsalve et al., 2000).



**Abb. 7: Schematischer Aufbau des Transkriptionskoaktivators PGC-1 $\alpha$  und assoziierte Komplexe**

Beispielhaft für die PCG-1 Familie ist die murine Isoform PGC-1 $\alpha$  dargestellt, ein 797 AS langes Protein mit hochkonservierten Domänen. Die C-terminale Aktivierungsdomäne (AD) bindet den HAT-Komplex und über Leucin-reiche Sequenzabschnitte andere Transkriptionsfaktoren. Es folgt eine inhibitorische Domäne (Repression domain, RD). Über eine Arginin-Serin (RS)-reiche Domäne und ein RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif, RRM) erfolgt die Bindung und Prozessierung von RNA. Weiter interagiert die C-terminale Hälfte mit dem TRAP/DRIP Mediator-Komplex.

#### 1.4.2 Regulation der PGC-1 Aktivität

Die Aktivität von PGC-1 ist zum einen abhängig von der Genexpression und *de novo* Synthese des Transkriptionskoaktivators. Physiologische Stimuli, die einen erhöhten Energiebedarf signalisieren, kontrollieren via verschiedener Signalwege die Transkription von PGC-1. Zum anderen regulieren posttranslationale Modifikationen die transkriptionelle Aktivität und die Proteinstabilität.

Die p38MAPK steigert durch dreifache Phosphorylierung (an Thr262, Ser265 und Thr298) die transkriptionelle Aktivität des Koaktivators. Indem die Phosphorylierung das PGC-1 Protein gegenüber einer Degradation stabilisiert, wird dessen Halbwertszeit von ursprünglich 2,28 h um das Dreifache verlängert (Puigserver et al., 2001). In Skelettmuskelzellen wurde darüber hinaus gezeigt, dass unter andauernder Energiedepression die AMPK zur Expression von PGC-1 $\alpha$  beiträgt und durch dessen Phosphorylierung ein PGC-1 $\alpha$  abhängiges Genprogramm induziert (Zong et al., 2002, Jäger et al., 2007). Auch die S6 Kinase (S6K) ist im Stande, PGC-1 $\alpha$  direkt zu phosphorylieren und dadurch eine selektive Genexpression zu induzieren (Lustig et al., 2011).

Während die zuvor beschriebenen Phosphorylierungen zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität führen, bewirkt die Phosphorylierung von PGC-1 $\alpha$  an Ser570 durch AKT eine Inhibition der PGC-1 $\alpha$  Aktivität, indem eine Bindung an die Promoterregion verhindert wird (Li et al., 2007). Ferner vermitteln FOXOs die Transkription von *Ppargc1*. Insulin wiederum inhibiert durch AKT-abhängige Phosphorylierung die FOXO1 stimulierte *Ppargc1* Promotoraktivität (Daitoku et al., 2003).

Als weiterer Regulationsmechanismus führt die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse infolge spezifischer Phosphorylierungen zur Degradation von PGC-1. Obwohl die oben beschriebene Phosphorylierung durch die p38MAPK eine Stabilisierung von PGC-1 vermittelt, führt eine gemeinsame Phosphorylierung spezifischer Motive durch GSK3 $\beta$ - und p38MAPK zu einer Markierung von PGC-1 für die E3 Ubiquitinligase SCF<sup>Cdc4</sup> (Skp1/Cullin/F-box). Auf diese



Weise reduziert SCF<sup>Cdc4</sup> die PGC-1 $\alpha$  abhängige Transkription durch Polyubiquitinylierung und proteasomale Degradation (Olson et al., 2008).

Neben Phosphorylierungen modulieren auch Acetylierung und Deacetylierung die Funktion von PGC-1. Die Acetylierung des Koaktivators PGC-1 $\alpha$  durch die GCN5 Acetyltransferase induziert eine veränderte subnukleäre Verteilung und reprimiert darüber dessen transkriptionelle Aktivität (Lerin et al., 2006). Als Gegenstück reaktiviert die Deacetylase *Sirtuin-1* (SIRT1) PGC-1 $\alpha$  durch Deacetylierung und fördert über Interaktion mit PGC-1 $\alpha$  eine selektive Expression von PGC-1 $\alpha$ -regulierten Genen (Rodgers et al., 2005). Schließlich bewirkt auch die Methylierung von Argininresten des PGC-1 $\alpha$  Proteins durch die *protein arginine methyltransferase 1* (PRMT1) die Induktion von Zielgenen der mitochondrialen Biogenese (Teyssier et al., 2005).

### 1.4.3 Funktion von PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren

Die Isoformen PGC-1 $\alpha$  und PGC-1 $\beta$  zeigen das gleiche gewebsspezifische Expressionsmuster. Sie werden insbesondere in Geweben mit hohem Energiebedarf und hohem Mitochondriengehalt wie im Herzmuskel, Skelettmuskel, Leber, Niere, Hirn und braunem Fettgewebe exprimiert (Esterbauer et al., 1999). PRC dagegen wird zwar ubiquitär exprimiert, scheint jedoch im Wesentlichen eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Biogenese proliferierender Zellen zu spielen (He et al., 2012, Andersson and Scarpulla, 2001).

Die gewebsspezifische Expression des Transkriptionskoaktivators wird durch verschiedene physiologische Stimuli reguliert, die einen erhöhten Energiebedarf signalisieren. So wird PGC-1 $\alpha$  in der Leber und im Myokard durch Substratmangel (Yoon et al., 2001, Lehman et al., 2000), in braunem Fettgewebe durch Kälte und im Skelettmuskel durch verstärkte Muskelaktivität induziert (Baar et al., 2002, Goto et al., 2000). Die Expression der Isoform PGC-1 $\beta$  hingegen gilt als weniger induzierbar (Lin et al., 2002, Meirhaeghe et al., 2003).

Signale eines erhöhten Energiebedarfs induzieren die Expression von PGC-1 Koaktivatoren, die wiederum Gene zur Erhaltung der Energiehomöostase regulieren. In diesem Sinne fungieren PGC-1 Koaktivatoren als zentrale Regulatoren der mitochondrialen Biogenese. Die mitochondriale Biogenese erfordert sowohl die Transkription nukleärer Gene wie auch des mitochondrialen Genoms und dessen Replikation. PGC-1 reguliert direkt die Expression kernkodierter Gene und moduliert auch indirekt die Expression mitochondrialer Gene. Eine Brücke von nukleärem zu mitochondrialem Genom schlägt PGC-1, indem es mit den nukleären Transkriptionsfaktoren NRF-1 und NRF-2 interagiert (Wu et al., 1999). Zum einen regulieren die NRFs die Expression nukleärer Gene für die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (Evans and Scarpulla, 1990, Virbasius and Scarpulla, 1991). Zum anderen wird über die NRFs auch die Expression von *mitochondrial transcription factor A* (TFAM) vermittelt, wodurch die Replikation von mitochondrialer DNA (mtDNA), deren Transkription und Erhalt reguliert wird (Virbasius and Scarpulla, 1994, Larsson et al., 1998). Damit kommt ihnen eine Schlüsselposition im Rahmen der mitochondrialen Biogenese und Erhaltung der basalen Mitochondrienfunktion zu.

### 1.4.4 Die Bedeutung von PGC-1 für die kardiale Mitochondrienfunktion

Das Myokard besitzt einen hohen energetischen Grundumsatz, um Kontraktion und strukturerhaltende Prozesse zu gewährleisten. Substrate zur Energiegewinnung sind dabei vorzugsweise Fettsäuren, Glucose und Lactat. Die notwendige Energie in Form von ATP wird hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien generiert. Die Dichte an Mitochondrien ist im Myokard entsprechend hoch. Analog zu dieser hohen oxidativen Kapazität werden die Isoformen PGC-1 $\alpha$  und PGC-1 $\beta$  im Myokard stark exprimiert (Villena, 2015).

Die kardiomyozytäre Expression von PGC-1 $\alpha$  wird erstmals während der postnatalen Entwicklung hochreguliert, sobald ein Wechsel der bevorzugten Substrate zur Energiegewinnung von Glucose hin zu Fettsäuren stattfindet. PGC-1 $\alpha$  agiert in diesem Zusammenhang als Induktor zahlreicher Gene des Citratzyklus, der Fettsäure-Oxidation, der Elektronentransportkette und oxidativen Phosphorylierung (Lehman et al., 2000).

Als weitere physiologische Stimuli für die Expression von PGC-1 $\alpha$  in Kardiomyozyten wurden Zustände erhöhten Energiebedarfs wie gesteigerte Muskelarbeit und Substratmangel identifiziert (Lehman et al., 2000, Watson et al., 2007). Um die Energiebereitstellung unter diesen Konditionen aufrecht erhalten zu können, induziert PGC-1 $\alpha$  die Expression von Genen der Fettsäure-Oxidation und mitochondrialen Biogenese (Lehman et al., 2000).

Durch kardiomyozytenspezifische Überexpression von PGC-1 $\alpha$  wurde gezeigt, dass der Transkriptionskoaktivator die mitochondriale Biogenese in neonatalen Kardiomyozyten fördert. In adulten Mäuseherzen bewirkt die Überexpression von PGC-1 $\alpha$  dagegen nur eine mäßige mitochondriale Proliferation. Ein Erklärungsversuch dieses entwicklungsabhängigen Effekts ist, dass in adulten Kardiomyozyten andere Komponenten des an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Genprogramms inaktiviert sind. (Russell et al., 2004).

In zwei *loss-of-function* Mausmodellen wurde untersucht, welche Auswirkung ein globaler PGC-1 $\alpha$  KO für die mitochondriale Funktion und kardiale Kontraktion hat. Zwar wurde in isolierten Herzen nachgewiesen, dass ein globaler KO von PGC-1 $\alpha$  eine verminderte Expression von Genen der Fettsäure-Oxidation, des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung bewirkt. Es wurden jedoch keine Unterschiede der mitochondrialen Masse zwischen KO und WT Mäusen gefunden. Auch entwickelten die Mäuse unter basalen Bedingungen echokardiographisch keine bzw. nur eine moderate altersabhängige kardiale Dysfunktion. Erst unter Stressbedingungen demaskierte sich eine verminderte Anpassung der Herzfrequenz bzw. kontraktile Defizite auf den Stimulus. Beide Arbeiten schlussfolgerten, dass PGC-1 $\alpha$  für sich nicht essenziell für die fetale Entwicklung oder die mitochondriale Biogenese adulter Kardiomyozyten ist (Leone et al., 2005, Arany et al., 2005).

Ebenso resultiert der globale Verlust der Isoform PGC-1 $\beta$  in einem nur gering ausgeprägten kardialen Phänotyp. Während Lelliott et al. (2006) eine Abnahme mitochondrialer Masse in Kardiomyozyten und verminderte Reaktion der Herzfrequenz auf chronotrope Stimulation der PGC-1 $\beta$  KO-Mäuse beschreibt, berichten zwei weitere PGC-1 $\beta$  KO-Modelle von keinen kardialen Veränderungen. (Vianna et al., 2006, Sonoda et al., 2007). Auch anhand eines PGC-1 $\alpha/\beta$  Doppel-knockout Mausmodell wurde gezeigt, dass PGC-1 nicht notwendig für den Erhalt mitochondrialer Funktion in adulten Kardiomyozyten ist. Obwohl zahlreiche Gene mitochondrialer Signalwege herunterreguliert sind, sind keine kardialen

Funktionseinschränkungen zu beobachten (Martin et al., 2014). Im Gegensatz zu den Einzel-KOs und dem Doppel-KO in adulten Kardiomyozyten ist ein Verlust beider PGC-1 Isoformen früh postnatal letal (Lai et al., 2008). Das Zusammenspiel beider PGC-1 Isoformen ist somit wichtig für den postnatalen Reifungsprozess des Herzens und zeigt, dass PGC-1 $\alpha$  den Verlust von PGC-1 $\beta$  kompensieren und ein überlappendes Genprogramm induzieren kann (Lai et al., 2008). Dies deutet auf redundante Funktionen der beiden Isoformen hin.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Pathophysiologische Prozesse, die zur Herzhypertrophie beitragen, sind viel beschrieben. Umgekehrt sind die molekularen Ursachen der kardialen Atrophie bisher nicht genau verstanden. Bekannt ist aber, dass bei einer kardialen Atrophie die Balance von Proteinsynthese und -abbau zugunsten des Abbaus verlagert sein muss.

Das induzierbare kardiomyozyten-spezifische AKT1/2 Doppel-knockout Mausmodell stellt ein geeignetes kardiales Atrophie-Modell dar, um die an der Herzatrophie beteiligten zellulären Prozesse zu untersuchen. Inaktivierung beider AKT Isoformen in Kardiomyozyten adulter Mäuse führt zu einem massiven Gewichtsverlust des Herzens, Verkleinerung der Kardiomyozyten, und zu einer weitreichenden Funktionseinschränkung.

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasst die Bewertung der folgenden Fragen:

Zu Beginn dieser Arbeit soll die Effizienz und Beständigkeit des KOs von AKT1/2 in Kardiomyozyten der Mäuse gezeigt werden, was die grundlegende Voraussetzung für die folgenden Versuche bildet.

Ein wesentliches Augenmerk legt die Arbeit dann auf die Fragestellung, wie sich die subzelluläre Lokalisation des FOXO3 Transkriptionsfaktors nach Induktion des KOs verschiebt. Hierfür wird die zelluläre Verteilung des Transkriptionsfaktors histologisch mittels Konfokalmikroskopie untersucht.

Daran anschließend wird die Induktion von Autophagie-assoziierten FOXO3 Zielgenen untersucht, um die Bedeutung der Autophagie für die kardiale Atrophie zu charakterisieren. Die Induktion der Zielgene wird transkriptionell und auf Ebene der Proteine analysiert. Um eine Entwicklung des Prozesses zu verfolgen, werden Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des KOs vorgenommen.

Die mitochondriale Dysfunktion der iCMAKT1/2 KO-Herzen wird ergänzend mittels Transkriptionsanalysen des kernkodierten mitochondrialen Enzyms CPT2 und Quantifizierung zugehöriger Proteinmenge charakterisiert. Um weiterführend Hinweise auf die Ursache der dysregulierten Mitochondrienfunktion zu erhalten, werden Untersuchungen der Transkription und Proteinmenge der Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha$  und PGC-1 $\beta$  vorgenommen. Ferner sollen Hinweise für eine Beteiligung der Mitophagie gefunden werden.

Weiter wird die Frage geklärt, ob eine Invasion von Immunzellen am Atrophieprozess des Herzens beteiligt ist. Hierfür erfolgen FACS (engl.: *Fluorescence-activated cell sorting*) Analysen zur Identifikation von Immunzellsubpopulationen.

Außerdem wird die Rolle des fibrotischen *Remodelings* im Atrophieprozess untersucht. In diesem Zusammenhang werden Transkriptionsanalysen Fibrose-assoziiierter Gene und histologische Färbungen angefertigt.

Insgesamt soll in dieser Arbeit ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der Herzatrophie geschaffen werden.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller (Produktname)
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese-Netzgerät	Biometra (Standard Power Pack P25)
ELISA- Auslesegerät	Packard (Spectra Count)
FACS	BD Biosciences (BD FACSCanto™ II Flow Cytometry System)
Feinwaage	Sartorius (BP121S)
Fluoreszenzmikroskop	Keyence (Keyence BZ 9000)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Comfort NoFrost)
Gefrierschrank (-80°C)	Revco
Gel-Bildgebungssystem	Bio-Rad (Molecular Imager Gel Doc XR+)
Homogenisator	Qiagen (TissueRaptor II)
Infrarot-Bildgebungssystem	Licor (Odyssey)
Inkubator	Heraeus Instruments (Typ B6120)
Konfokalmikroskope	Leica (TCS SP8 STED) Zeiss (LSM 880 Airyscan)
Kryostat	Leica (CM 1850)
Kühlschrank	Liebherr (Comfort NoFrost)
Laborschüttler	neoLab (ST5 CAT)
Langendorff-Apparatur	Eigenbau
Lichtmikroskop	Leica (DM E)
Magnetrührer	IKA, Janke & Kunkel (IKAmag RCT)
pH-Meter	Mettler (MP 220)
Pipetten	Gilson (PIPETMAN 10 – 1000 µl)
Reagenzglasschüttler	Heidolph (REAX top)
Realtime PCR System	Applied Biosystems (StepOnePlus)
SDS-PAGE Laufkammer	Bio-Rad (Mini Protean 3 Cell)
Spektralphotometer	Peqlab, VWR (Nanodrop, ND-1000 Spectrometer)
Temperier- und Mischgerät	Eppendorf (Thermomixer Comfort)
Western Blot Transfersystem	Thermo Fisher Scientific (Pierce G2 Fast Blotter)
Waage	Kern (EMB 200-2)
Wasserreinigungssystem	Millipore (Milli-Q plus)
Zentrifuge	Eppendorf (Centrifuge 5415R)

Tabelle 1: Laborgeräte

2.2 Allgemeine Chemikalien

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller, Ort
Albumin Fraktion V	1.120.180.100	Merck KGaA, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	7727-54-0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	60-24-2	Sigma-Aldrich Co., USA
DNase I	3.1.21.1	Hoffmann-La Roche, Schweiz
EDTA	60-00-4	Sigma-Aldrich Co., USA
Ethanol 99,5%	64-17-5	VWR International, USA
Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100x)	78442	Thermo Fisher Scientific, USA
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	14025-092	Thermo Fisher Scientific, USA
Heparin-Natrium, 5000 IE/ml	15782698	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Isopropanol 99,5%	67-63-0	VWR International, USA
Kollagenase Typ I	LS0004194	Worthington Biochemical Corporation, USA
Methylbutan	78-78-4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Normal Goat Serum	S-1000-20	Vector Laboratories, USA
Odyssey Blocking Buffer (TBS)	927-50000	LICOR, USA
Paraformaldehyd (PFA)	16005	Sigma-Aldrich Co., USA
Proteinase K	39450-01-6	Sigma-Aldrich Co., USA
Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder)	#26616	Thermo Scientific, USA
Rotiphorese Gel 40	T802.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Saponin	9622.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Stickstoff	7727-37-9	Linde AG, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	110-18-9	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	77-86-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Triton X-100	9002-93-1	Sigma-Aldrich Co., USA
Tween-20	9005-64-5	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien

2.3 Zubehör

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Deckgläser	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Deutschland
Deckgläser High Precision	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Einblockmedium (Tissue Tec O.C.T. Compound)	Sakura Finetek, Niederlande
Feuchtkammer	Eigenbau
Filter (EASYstrainer 40 µm/100 µm)	Greiner Bio-One, Österreich
Filterpapier (gel blotting paper, Grade GB:003)	Whatman, Großbritannien
Glasküvette	DWK Life Sciences, Deutschland
Inkubationsbox (schwarz)	LI-COR, USA
Mikrotiterplatte (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL))	Thermo Fisher Scientific, USA
Nitrozellulosemembran (Protan BA85, 0,45 µm Porengröße)	Whatman, Großbritannien
Objektträger (Art. - Nr. 0810000)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Deutschland
Fettstift Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

Tabelle 3: Zubehör

2.4 Chemikalien für Färbungen

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller, Ort
Bouin-Lösung	HT10132-1L	Sigma-Aldrich Co., USA
DAPI Fluoromount-G	0100-20	Southern Biotech, USA & Kanada
Entellan Neu	107961	Merck, Deutschland
Essigsäure 1%	10180	Morphisto, Deutschland
Hämatoxylin nach Masson	11717	Morphisto, Deutschland
Lichtgrün – Goldner III	10267	Morphisto, Deutschland
Phosphormolybdänsäure-Orange G	11195	Morphisto, Deutschland
ProLong Diamond Antifade Mountant	P36961	Thermo Fisher Scientific, USA
Säurefuchsin-Ponceau (Goldner I)	10366	Morphisto, Deutschland
Toluidinblau O	SA198161-25G	Sigma-Aldrich Co., USA
Xylol (Isomere)	4436.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien für Färbungen

## Material

### 2.5 Puffer und andere Lösungen

#### 2.5.1 Lysispuffer pH7,4

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Tris	10 mM	77-86-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumchlorid	100 mM	1.04936.1000	Merck KGaA, Deutschland
IGEPAL CA-630	1%	9002-93-1	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		

Tabelle 5: Lysispuffer

#### 2.5.2 PBS

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Natriumchlorid	8 g	3957.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kaliumchlorid	0,2 g	60130	Sigma-Aldrich Co., USA
Kaliumdihydrogenphosphat	0,24 g	60220	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,78g	1.06580.0500	Merck KGaA, Deutschland
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	-	-

Tabelle 6: PBS

#### 2.5.3 PFA (4%)

Unter Erwärmen bis zu 60°C wird die angegebene Menge Paraformaldehyd in 100 ml PBS gelöst. Der pH-Wert wird durch Hinzugabe von HCl / NaOH auf einen Zielwert von 7,5 eingestellt. Die PFA-Lösung wird anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Paraformaldehyd	4 g	16005	Sigma-Aldrich Co., USA

Tabelle 7: PFA (4%)

#### 2.5.4 SDS

Der pH-Wert wird durch Hinzugabe von HCl / NaOH auf einen Zielwert von 7,5 eingestellt. Die SDS-Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.



## Material

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Natriumdodecylsulfat	80 g	4390	Sigma-Aldrich Co., USA
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	-	-

Tabelle 8: SDS

### 2.5.5 TBS(T)

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Natriumchlorid	160 g	3957.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris	48,4 g	77-86-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml	-	-
Tween 20	0,1%	9005-64-5	Sigma-Aldrich Co., USA

Tabelle 9: TBS(T)

### 2.5.6 Tris-HCl

Chemikalie	Menge/Volumen	Produktnummer	Hersteller, Ort
Tris	121,1 g	77-86-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
HCl	ad pH8		
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	-	-

Tabelle 10: Tris-HCl

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Produktnummer	Verdünnung	Hersteller, Ort
AIF (D39D2) XP Rabbit mAb	Kaninchen	#5318	1: 400 (IHC)	Cell Signaling, USA
Akt1 (2H10) Mouse mAb	Maus	#2967	1:1000 (WB)	Cell Signaling, USA
Akt2 (D6G4) XP rabbit mAb	Kaninchen	#3063	1:1000 (WB)	Cell Signaling, USA
Anti-CD3 Rabbit pAb	Kaninchen	PC630	1:200 (IHC)	Merck - Calbiochem, Deutschland
FoxO3a (D19A7) Rabbit mAb	Kaninchen	#12829	1:800 (IHC)	Cell Signaling, USA

## Material

<b>Anti-PGC1 alpha antibody</b>	Kaninchen	ab54481	1:1000 (WB)	Abcam, Großbritannien
<b>Anti-PGC-1 Antibody</b>	Kaninchen	AB3242	1:1000 (WB)	Millipore, USA
<b>Anti-PGC1 beta antibody [EPR12370]</b>	Kaninchen	ab176328	1:1000 (WB)	Abcam, Großbritannien
<b>Anti-Mouse CD107a (LAMP-1)</b>	Ratte	#553792	1:500 (IHC)	BD Biosciences, USA

Tabelle 11: Primäre Antikörper

### 2.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Produktnummer	Verdünnung	Hersteller, Ort
<b>Anti-Rabbit-IgG-Abberior STAR 635P</b>	Ziege	53399	1:1000 (IHC)	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
<b>AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Cy3-labeled</b>	Ziege	111-165-144	1:600 (IHC)	Jackson, USA
<b>AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) Rhodamine Red-labeled</b>	Ziege	112-295-167	1:600 (IHC)	Jackson, USA
<b>WGA - Alexa 488 - labeled</b>	Weizen	W11261	1:300 (IHC)	Molecular Probes, USA
<b>Goat anti-rat IgG Alexa Fluor® 488</b>	Ziege	ab150165	1:500 (IHC)	Abcam, Großbritannien
<b>AntiMouseIR Dye®680</b>	Ziege	926-32220	1:10000 (WB)	LI-COR, USA
<b>AntiRabbitIR Dye®800</b>	Ziege	926-32211	1:10000 (WB)	LI-COR, USA

Tabelle 12: sekundäre Antikörper

### 2.6.3 Antikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Produktnummer	Verdünnung	Hersteller, Ort
<b>7AAD</b>	559925	1,3:100	BD Biosciences, USA
<b>Anti CD3</b>	1003412	1:100	BioLegend, USA
<b>Anti CD4 Pacific Blue Clone RM4-5</b>	558107	1:100	BD Biosciences, USA
<b>Anti CD8a</b>	100766	1:100	BioLegend, USA
<b>Anti CD11b APC Clone M1/70</b>	553312	1:100	BD Biosciences, USA

## Material

Anti CD16/32 Clone 93	101302	8:100	BD Biosciences, USA
Anti CD19 PE Clone ID3	557399	1:100	BD Biosciences, USA
Anti CD45 BV510 Clone 30F11	563891	1:200	BD Biosciences, USA
F4/80 BV421 Clone BM8	123131	1:100	BioLegend, USA
Ly6C APC/Fire 750 Clone HK1.4	128045	1:100	BioLegend, USA
Ly6G PE-Cy7 Clone 1A8	560601	1:100	BD Biosciences, USA
MHCII Alexa Fluor 488 Clone M5	107615	1:100	BioLegend, USA

Tabelle 13: Antikörper für FACS-Analysen

## 2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid		Sequenz (5'-3')
<b><i>Bnip3</i></b>	Fwd	ACCACAAGATACCAACAGAG
	Rev	AATCTTCCTCAGACAGAGTG
<b><i>Cdkn1a</i></b>	Fwd	ACCTGATAGTACCCAACTAC
	Rev	CTGTGGCACCTTTTATTCTG
<b><i>c-myc1</i></b>	Fwd	TGAAGTTCACGTTGAGGGG
	Rev	AGAGCTCCTCGAGCTGTTT
<b><i>Cpt2</i></b>	Fwd	ACCATGAAGAGATACCTCAG
	Rev	CTTACACAACACTTCTGTCTTC
<b><i>Ctgf</i></b>	Fwd	GAGGAAAACATTAAGAAGGGC
	Rev	AGAAAGCTCAAACCTTGACAG
<b><i>Gabarapl1</i></b>	Fwd	CCAGTTCTACTTCTTAATCCG
	Rev	CTGCCTCATTTTCCATAGAC
<b><i>Kdelr1</i></b>	Fwd	CATTTCAAGGAAGAGCCAAGT
	Rev	CTTCATGCAGGTGTTGTAGAGT
<b><i>Mmp3</i></b>	Fwd	CAAATACTGGAGGTTTGATGAG
	Rev	CTCTTCAATATGTGGGTCAC
<b><i>Ppargc1a</i></b>	Fwd	TCCTCTTCAAGATCCTGTTAC
	Rev	CACATACAAGGGAGAATTGC
<b><i>Ppargc1b</i></b>	Fwd	AAGAACTTCAGACGTGAGAG
	Rev	TCAAAGCGCTTCTTTAGTTC
<b><i>Sod2</i></b>	Fwd	CAGACCTGCCTTACGACTATGG
	Rev	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
<b><i>Sqstm1</i></b>	Fwd	AATGTGATCTGTGATGGTTG
	Rev	GAGAGAAGCTATCAGAGAGG
<b><i>Tfam</i></b>	Fwd	GACCTCGTTCAGCATATAAC
	Rev	ACAAGCTTCAATTTCCCTG

## Material

<b>Tfgeb2</b>	Fwd	GAGATTTGCAGGTATTGATGG
	Rev	CAACAACATTAGCAGGAGATG
<b>Timp1</b>	Fwd	CTAGAGACACACCAGAGATAC
	Rev	CCCATGAATTTAGCCCTTATG
<b>Trmt10c</b>	Fwd	TGTCCTCCAAAGCACCTTCTT
	Rev	TGAATGCTCGACTTCATTGTAGC

Tabelle 14: Oligonukleotide

## 2.8 Kits

Kit	Hersteller, Ort
<b>RNeasy Fibrous Tissue Kit</b>	Qiagen, Deutschland
<b>QuantiTect Reverse Transcription Kit</b>	Qiagen, Deutschland
<b>Maxima SYBR Green</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>Pierce BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>TGX StainFree Fast Cast Acrylamid Kit 10%</b>	Bio-Rad, USA

Tabelle 15: Kits

## 2.9 Software

Name	Urheber
<b>BZ-II-Analyzer 2.2 Software</b>	Keyence, Deutschland
<b>BZ-II-Viewer</b>	Keyence, Deutschland
<b>Endnote X</b>	Thomson Reuters Corp., Deutschland
<b>Fiji</b>	Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012)
<b>GraphPad Prism Version 6</b>	GraphPad Software, USA
<b>Image Lab</b>	BioRad, USA
<b>JASP</b>	JASP Team (2018). JASP (Version 0.9)
<b>Leica Application Suite X</b>	Leica Biosystems, USA
<b>Microsoft Excel, PowerPoint, Word 2013</b>	Microsoft Corporation, USA
<b>NanoDrop 1000 Operating Software</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>Odyssey 3.0</b>	Licor Biosciences, USA
<b>Plate Reader V3.0</b>	Packard Bioscience/Perkin Elmer, USA
<b>StepOne Software v2.1</b>	Applied Biosystems, USA
<b>ZEN 3.2 (ZEN lite)</b>	Zeiss, Deutschland
<b>ZEN black edition</b>	Zeiss, Deutschland

Tabelle 16: Software

### 3 Methoden

#### 3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen am Knock-out Mausmodell

Um die konditionalen iCMAKT1/2 KO-Mäuse zu erzeugen wurde das Cre/loxP-Rekombinase System angewandt. Das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammende System wird zum gezielten Entfernen von Abschnitten der DNA aus dem Genom in bestimmten Zell- oder Gewebetypen eingesetzt. Die Rekombinase Cre (engl.: *causes recombination*) katalysiert die Exzision derjenigen DNA-Sequenzen, die von zwei Seiten durch 34 Basenpaare große palindromische Sequenzen, sogenannte loxP-Stellen (engl.: *locus of crossing over P1*), in gleicher Orientierung flankiert sind (Sternberg and Hamilton, 1981). Die Markierung ausgewählter Sequenzen mit loxP-Stellen wird auch als *floxen* (engl.: *floxed* = flankiert) bezeichnet. Da ein globaler KO von AKT1/2 kurze Zeit nach Geburt letal ist, wurde die gezielte Aktivierung der Rekombinase ausschließlich in Kardiomyozyten zur Untersuchung der herzspezifischen Funktion von AKT vorgenommen (Peng et al., 2003). Zur kontrollierten Expression der Rekombinase wurde daher der Genabschnitt der Cre-Rekombinase mit dem kardiomyozyten-spezifischen Promotor  $\alpha$ -MHC (engl.: *alpha myosin-heavy chain*) fusioniert (Sohal et al., 2001). Die Rekombinase wird zusätzlich von zwei modifizierten Ligandenbindungsdomänen des Östrogen-Rezeptors (engl.: *mutated estrogen receptor (mer)*) flankiert, sodass ein Fusionsprotein (mer-Cre-mer) entsteht. Körpereigenes Östrogen ist nicht mehr im Stande, die mutierten Rezeptoren zu binden. Tamoxifen hingegen bindet an den Rezeptoren und bewirkt so die Translokation der Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo sie ihre Aktivität entfaltet (Littlewood et al., 1995). Indem den Tieren von außen Tamoxifen zugeführt wird, wird eine zeitliche Steuerung der Induktion des KOs möglich.

Zur Generierung der iCMAKT1/2 KO-Mäuse wurden AKT1/2<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase ( $\alpha$ -MHC-mer-Cre-mer Element) exprimieren. Es handelt sich um Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6. Zur Induktion des KOs wurden den Mäusen im Alter von 12 Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 50  $\mu$ g 4-OH-Tamoxifen (0,5 mg/ml in Erdnussöl) intraperitoneal injiziert.

Die Experimente wurden an adulten, gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen vorgenommen. Die Untersuchungen verglichen dabei stets iCMAKT1/2 KO-Mäuse und als wildtypisch bezeichnete Mäuse, die nur loxP-Elemente (für AKT1 oder AKT2 oder beide Isoformen), jedoch keine Cre-Rekombinase besaßen und nach gleichem Protokoll mit 4-OH-Tamoxifen behandelt wurden. Die Mäuse wurden bei Temperaturen von 20-22°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12h in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) untergebracht. Wasser und Futterpellets standen ihnen ad libitum zur Verfügung.

Die Tierversuche waren nach behördlicher Prüfung genehmigt (LANUV, Recklinghausen, AZ: 84-02.04.2014.A308, G308/14). Organentnahmen erfolgten gemäß der Organisationsnummer O16\04 der ZETT der Heinrich-Heine-Universität. Der Versuchstierkudkurs wurde am 08.09.2017 mit dem FELASA-Zertifikat (ID: F048/16\_#\_0170) an der ZETT abgeschlossen.

### 3.2 Ablauf der Gewebeentnahme

Für die Gewebeentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Sie wurden in Rückenlage an den Extremitäten und am Schwanz auf einem Präparationstisch fixiert. Um den Thorax zu eröffnen, wurde der Zugang von subxiphoidal gewählt. Mit einem Schnitt wurde zunächst das Fell unterhalb des Rippenbogens horizontal zur Körperlängsachse durchtrennt. Durch das Zwerchfell wurde der Thorax eröffnet und anschließend die Rippen zu beiden Seiten in Richtung der Axillae durchschnitten. Zur freien Sicht auf die Organe wurde der mobilisierte Rippenkorb mit einer Klemme fixiert. Durch einen Scherenschnitt wurde schließlich das Herz unmittelbar am Abgang bzw. der Einmündung von zu- und abführenden Gefäßen getrennt. Zusätzlich wurden für Proteinanalysen und mRNA Expressionsanalysen beide Atrien entfernt. Durch Schwenken des Gewebes in eiskaltem PBS wurde verbliebenes Blut aus den Herzkammern weitgehend entfernt.

### 3.3 Proteinanalyse

#### 3.3.1 Proteinaufschluss aus Gewebe

Nachdem der Tod der Tiere durch zervikale Dislokation herbeigeführt wurde, erfolgte die Organentnahme. Das entnommene Gewebe für den Proteinaufschluss wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mithilfe des Homogenisators (TissueRaptor II, Qiagen) wurde das Gewebe in Lysispuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, pH 7,4) zusammen mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail, Thermo Fisher Scientific) für 20-30 sec homogenisiert. Die Proben wurden 5-10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand für die folgenden Schritte abgenommen.

#### 3.3.2 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bicinchoninsäure Test (engl.: *bicinchoninic acid*, *BCA*) nach Smith (Smith et al., 1985) angewandt. Dieser wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumin*, *BSA*) in aufsteigender Konzentration (12,5 - 2000 µg/ml) angesetzt. Analog zu dieser Standardreihe wurden die Proben, verdünnt mit Lysispuffer und H<sub>2</sub>O (3 µl Probe, 25 µl H<sub>2</sub>O), in Zweifachbestimmung auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 200 µl der Reagenzlösung (*BCA working reagent*) wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption der Proben bei 577 nm wurde im Elisa-Reader SpectraCount (Packard, USA) gemessen. Die Auswertung wurde mit dem Programm PlateReader V3.0 (Packard Bioscience/Perkin Elmer, USA) vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der erstellten Eichgerade ermittelt und darauf basierend eine bestimmte Proteinkonzentration der Probe eingestellt (0,5 oder 1,0 µg/µl).

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse im Bereich von 5 bis 250 kDa innerhalb eines elektrischen Feldes.

Zur Vorbereitung der Proteinseparation wurden die Proben mit 4x Laemmli-Puffer versetzt. Das enthaltene anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: *sodium dodecyl sulfate*) überlagert die ursprüngliche Proteinladung und ermöglicht so die Aufteilung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Zugefügtes Dithiothreitol (DTT) reduziert Disulfidbrücken der Tertiärstruktur. Durch Erhitzen auf 95 – 99°C für 5 min wurden die Proteingemische unter Aufhebung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur denaturiert.

Für die Gelelektrophorese wurden ein Sammel- und ein Trenngel gefertigt. Über das Sammelgel wurde eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteine vorgenommen, im Trenngel erfolgte deren endgültige Auftrennung. Für das 10%-ige Trenngel wurden *TGX Stain-Free FastCast Acrylamidlösungen (TGX StainFree Fast Cast Acrylamid Kit 10%, Bio-Rad)* verwendet. In mit einem Kamm vorgeformte Geltaschen wurden dann jeweils 10 – 30 µl Proteingemisch hineinpipettiert. Zur Überwachung der Auftrennung und Größenordnung der Proteinbanden im Bereich von 10 – 170 kDa wurde der Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)* benutzt. Die Elektrophorese wurde in entsprechenden Kammern (*Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad*), befüllt mit Elektrophoresepuffer, unter Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V innerhalb von 60 – 90 min durchgeführt. Kurz bevor die Lauffront aus dem Gel austrat, wurde die Elektrophorese beendet.

#### 4x Laemmli-Puffer:

250 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
10% (w/v)	SDS
100 mM	DTT
20% (v/v)	Glycerol
0,005% (w/v)	Bromophenol Blau

#### Sammelgel (2 Stück):

3,7 ml	H <sub>2</sub> O
625 µl	40% Acrylamid I
625 µl	1 M Tris (pH 6,8)
50 µl	10% SDS
15 µl	10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)
10 µl	TEMED

#### Trenngel (2 Stück) 10%:

2,5 ml	40% Acrylamid
2,5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
100 µl	10% SDS
20 µl	TEMED
25 µl	10% APS
5 ml	H <sub>2</sub> O



### Elektrophoresepuffer:

250 mM	Tris
2 M	Glycin
1 %	SDS
	H <sub>2</sub> O

### 3.3.4 Western Blot (WB)

Nach dem Prinzip des Elektrotransfers werden beim Western Blot Proteine vom Trägergel auf eine Membran transferiert. Dies gelingt durch Anlegen eines elektrischen Feldes, in dem die Proteine, welche mit SDS und somit negativ beladen sind, in Richtung der Anode bewegt werden.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Bestrahlung im Gel-Bildgebungssystem (Molecular Imager Gel Doc XR+, Bio-Rad, USA) angeregt. An Tryptophan angelagerte Trihalogen-Verbindungen der TGX Stain-Free Gele produzieren unter UV-Strahlung Fluorophore. Diese Fluorophore binden kovalent an Proteine. Sie bleiben auch nach Übertragung vom Gel auf eine Membran an diese gebunden und können visualisiert werden (siehe Protokoll: *Mini-PROTEAN Precast Gels Instruction Manual and Application Guide*). Sie erfüllen die Funktion einer Referenz zur Ladungskontrolle und Vergleichbarkeit des Proteingehalts der Banden. Die Proteine wurden mit Hilfe des Western Blot Transfersystems Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific, USA) bei voreingestelltem Programm (Mixed Range MW 25 – 150 kDa, 25V, 1,3 A, 7 min) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protan BA85, 0,45 µm Porengröße, Whatman, Großbritannien) übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen für die eingesetzten Antikörper zu blockieren, wurden die Membranen nach dem Transfer für 1 h bei Raumtemperatur verschlossen in einer lichtdichten Inkubationsbox (LI-COR, USA) auf einem Schüttler (ST5 CAT, neoLab, Deutschland) mit einer PBS/Blockier-Lösung (Odyssey Blocking Buffer (TBS), LI-COR, USA) (1:2) behandelt.

### Anodenpuffer:

300 mM	Tris HCl
100 mM	Tricin
	pH 8,8

### Kathodenpuffer:

300 mM	Aminocaprinsäure
30 mM	Tris HCl
	pH 8,7

### 3.3.5 Immundetektion von Proteinen

Die Methode der Immundetektion dient der Visualisierung ausgewählter Proteine auf der Nitrozellulosemembran, indem spezifische Antikörper zu deren Identifikation genutzt werden.

Die geblottete Membran wurde über Nacht in einer Lösung aus primärem Antikörper in 5% BSA in TBST auf einem Kippschüttler (ST5 CAT, neoLab, Deutschland) bei 4°C inkubiert. Die

Konzentration des primären Antikörpers wurde in Anlehnung an die Herstellerempfehlung gewählt. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 min mit TBST, um unspezifisch gebundene und überschüssige Antikörper zu entfernen. Zur Markierung der Primärantikörper wurden mit Alexa Fluor®680 und Alexa Fluor®800 Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. In Abhängigkeit von der tierischen Herkunft der primären Antikörper handelte es sich dabei um anti ( $\alpha$ )-Maus- oder  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper. Die Membran wurde in einer Lösung aus sekundärem Antikörper verdünnt in Blockier-Lösung (Odyssey Blocking Buffer (TBS), LI-COR, USA) (1:10 000) für 45 – 60 min bei Dunkelheit inkubiert. Wie zuvor erfolgte die dreimalige Reinigung der Membran für je 10 min mittels TBST und im letzten Schritt mit TBS, um das Detergenz auszuwaschen.

Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte im Odyssey Scanner (Licor Biosciences, USA), welcher im Infrarotbereich bei einer Wellenlänge von 700 und 800 nm zeitgleich zwei fluoreszierende Sekundärantikörper registriert. Die Bildakquisition und weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Odyssey 3.0 (Licor Biosciences, USA) und Image Lab (BioRad, USA). Das proportionale Verhältnis zwischen detektierter Fluoreszenz und Proteinmenge ermöglicht deren semiquantitative Analyse. Ergänzend wurde eine Normierung des Proteingehaltes vorgenommen, um eine genauere Vergleichbarkeit zu schaffen. Hierfür wurden die Gesamtproteinmengen je Probe durch Detektion der kovalent gebundenen Fluorophore aus den TGX Stain-Free Gelen auf der Membran bestimmt (s.o.). Wurde diese in Relation gesetzt zu den ermittelten Fluoreszenzwerten je Probe, konnten Beladungen der Geltaschen mit unterschiedlicher Proteinmenge relativiert werden.

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Kryokonservierung entnommener Herzen

Die Kryokonservierung der entnommenen Herzen schaffte die Voraussetzung, diese am Mikrotom bearbeiten zu können. Nach erfolgter Organentnahme wurde das verbliebene Blut in Petrischalen mit eisgekühltem PBS gefüllt unter leichtem Druck durch die Pinzette aus den Herzen herausgewaschen. Die Herzen wurden vorsichtig abgetrocknet und paarweise (KO und WT zusammen) in vorgefertigte Formen aus Aluminiumfolie mit Einblockmedium (Tissue Tec O.C.T. Compound, Sakura, Deutschland) eingebracht. Dabei wurde darauf geachtet, die Herzen in vergleichbarer Höhe und in gleicher anatomischer Orientierung zu platzieren. Die eingebetteten Herzen wurden langsam bis zum Gefrieren des Einblockmediums in -30 - -40°C gekühltes Methylbutan (Roth, Deutschland) getaucht. Ein zu rasches Einfrieren durch initiales Eintauchen der Formen in vollem Umfang wurde zum unversehrten Erhalt der Herzen vermieden. Anschließend konnten die Herzen längerfristig bei -80°C gelagert werden oder bei -20°C aufbewahrt werden, wenn die weitere Bearbeitung in den folgenden 24 h erfolgte.

#### 3.4.2 Anfertigung histologischer Gewebeschnitte

Die kryokonservierten Herzen wurden im Kryostat (Kryostat, Leica CM1850, Deutschland) ca. 30 min an eine Temperatur von -22 bis -24°C angepasst. Mittels Einblockmedium wurde das Herz auf einer vorgekühlten Objektplatte mit der Apex noch oben positioniert und festgefroren. Nach Einspannen in den Objektkopf wurden die ersten Schnitte verworfen, bis

eine Ebene mittig im Herzen mit Darstellung des linken und rechten Ventrikels erreicht wurde. Ab dieser Ebene wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 8  $\mu\text{m}$  erzeugt. Jeweils zwei konsekutive Gewebeschnitte wurden auf einen Objektträger (Marienfeld, Deutschland) aufgebracht und unter einem Föhn für ca. 1min getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden in einer Box mit Trockenglasperlen und abgedichtet mit Klebeband zum Ausschluss von Feuchtigkeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.4.3 Immunhistochemische Färbungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Gewebeschnitte wurden über Nacht auf  $+4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und 1h vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur gebracht. Mit einem Fettstift (Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services) wurden die Schnitte umrandet, um den Verlust eines zugegebenen Mediums zu verhindern.

Im Folgenden ist der Ablauf der Färbung dargestellt:

- 10 min mit 250  $\mu\text{l}$  4% Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich, USA) pro Gewebeschnitt fixieren
- Objektträger einmal kurz, anschließend zweimal 10 min in einer Glasküvette (DWK Life Sciences, Deutschland) mit PBS auf dem Schüttler waschen
- 100  $\mu\text{l}$  der Lösung aus 10% Normalserum (Ziege) (engl.: *Normal Goat Serum*, NGS) (Vector Laboratories, USA) in PBS/Saponin 0,2% auf den Objektträger geben und für 2h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren
- Den verwendeten primären Antikörper in PBS/Saponin 0,2% und 2% NGS verdünnen, 90  $\mu\text{l}$  der Lösung pro Schnitt pipettieren und über Nacht in feuchter Kammer bei  $+4^{\circ}\text{C}$  inkubieren
- Objektträger einmal kurz, anschließend zweimal 10 min in einer Glasküvette mit PBS/Saponin 0,2% auf dem Schüttler waschen
- Den sekundären Antikörper und WGA (Molecular Probes, USA) in PBS/Saponin 0,2% und 2% NGS verdünnen, 90  $\mu\text{l}$  der Lösung pro Schnitt verwenden und 3 h in feuchter Kammer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- Objektträger einmal kurz, anschließend dreimal 15 min in einer Glasküvette im Dunklen mit PBS auf dem Schüttler waschen
- Objektträger mit 40  $\mu\text{l}$  Fluoromount G mit DAPI (Southern Biotech, USA & Kanada) und Deckglas (Engelbrecht, Deutschland) eindecken und 1 h bei  $+4^{\circ}\text{C}$  trocknen lassen
- Für konfokalmikroskopische Aufnahmen Hochpräzisionsdeckgläser verwenden (Marienfeld, Deutschland)
- Nach 24 h Deckglas mit Nagellack fixieren und Objektträger bei  $+4^{\circ}\text{C}$  im Dunklen lagern

Für die immunhistochemische Färbung isolierter Kardiomyozyten wurde das Protokoll folgendermaßen modifiziert:

- Runde Hochpräzisionsdeckgläser werden mit Laminin beschichtet und in 24-well-Mikrotiterplatte positioniert

- Zellen nach Präparation für 1 h bei 37°C auf den Deckgläsern in der Mikrotiterplatte inkubieren und absitzen lassen
- Kulturmedium entfernen
- Deckgläser in Mikrotiterplatte zweimal mit PBS waschen
- 15 min mit 250 µl 4% PFA fixieren
- einmal kurz, anschließend zweimal 10 min mit PBS waschen
- Zellen 20 min mit 1% Triton/PBS permeabilisieren
- einmal kurz, anschließend zweimal 10 min mit PBS waschen
- Deckgläser aus der Mikrotiterplatte in Petrischale überführen
- 10% NGS in PBS/Tween 0,2% hinzugeben und für ½ h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- Mit dem Primär- und Sekundärantikörper verfahren wie oben (als Medium PBS/Tween 0,2% nutzen)
- Deckgläser auf Objektträger mit ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific, USA) eindecken und 24 h bei Raumtemperatur aushärten lassen

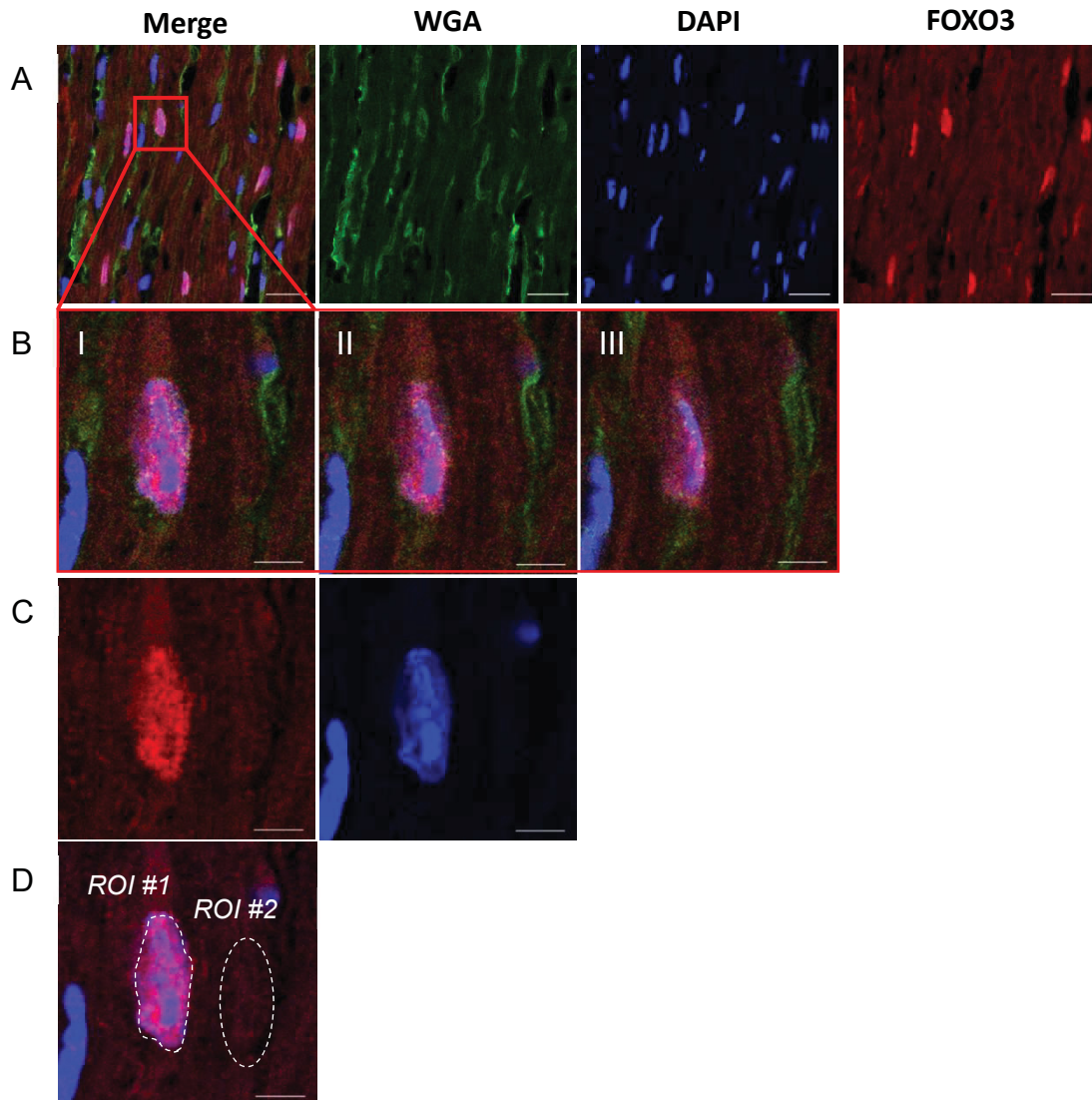
### 3.4.4 Konfokalmikroskopische Lokalisierung von FOXO3 Transkriptionsfaktor

Um die Lokalisierung des FOXO3 Transkriptionsfaktors zu analysieren, wurden 8 µm dünne Gefrierschnitte paarweise eingeblockter Herzen (jeweils KO und WT gemeinsam) angefertigt. Pro experimenteller Gruppe wurden 4 KO und 4 WT Mäuse untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte gemäß dem oben dargestellten Protokoll unter Verwendung des primären Antikörpers FOXO3a (D19A7, #12829, Cell Signaling, USA) in einer Verdünnung von 1:800. Dieser wurde mittels des sekundären Antikörpers Anti rabbit CY3 (111-165-144, Jackson, USA) in einer 1:600 Verdünnung markiert. WGA Alexa488 (W11261, Molecular Probes, USA) in einer Verdünnung von 1:300 und DAPI Fluoromount-G (0100-20, Southern-Biotech, USA & Kanada) dienten zusätzlich zur Kennzeichnung von Zellgrenzen bzw. Kernen. Für eine optimale Abbildungsqualität bei Nutzung der Konfokalmikroskopie wurden Präzisionsdeckgläser (Marienfeld, Deutschland) eingesetzt.

Das Prinzip der Konfokalmikroskopie ist auf den Mathematiker Marvin Minsky zurückzuführen. Als Anregungslichtquelle des Mikroskops werden Laser verwendet (hier: mit der Wellenlänge 405 nm, 499 nm und 554 nm). Das vom angeregten Objekt emittierte Fluoreszenzlicht wird auf einen Detektor geleitet. In diesen Strahlengang sind Lochblenden eingebracht, die Licht ausblenden, das sich nicht in der Brennebene des Lasers befindet. Somit wird verhindert, dass Lichtsignale aus höheren oder tieferen Ebenen, die ihren Fokus nicht auf Höhe Lochblendenöffnung besitzen, den Detektor erreichen. Dies ermöglicht eine Akquisition kontrastreicherer Bilder der angeregten Ebene mit höherer Auflösung im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie insbesondere bei dickeren Präparaten (Minsky, 1988).

Mit Hilfe des Konfokalmikroskops (Leica TCS SP8 STED, Leica, Deutschland) wurden pro Schnitt eine Übersichtsaufnahme und Detailaufnahmen mit einem 100-fach vergrößerndem Ölimmersionsobjektiv erstellt. Dabei wurden Ausschnitte des linken Ventrikel- und des Septummyokards gewählt, in denen Kardiomyozyten langgestreckt dargestellt werden konnten. Je Detailaufnahme wurden drei Ebenen im Abstand von 0,6 µm zueinander erfasst, um die Kardiomyozytenkerne möglichst in ihrer größten Ausdehnung abzubilden. Für

die Bildakquisition und weitere Auswertung wurde das Programm Leica Application Suite X (LASX, Leica Biosystems, Deutschland) verwendet. Die Kardiomyozytenkerne wurden manuell umfahren und so als interessierende Bildbereiche (*engl: region of interest*, kurz: ROI) markiert. Zur präzisen Umrandung diente die Kernfärbung mittels DAPI als Orientierung. Dem gegenübergestellt wurden vergleichbare Bildbereiche im Zytoplasma eines jeweiligen Kardiomyozyten ausgewählt. Das methodische Vorgehen ist in Abbildung 8 zusammengefasst. Um die nukleäre Verteilung des FOXO3a Transkriptionsfaktors im Vergleich zur zytoplasmatischen Verteilung zu quantifizieren, wurde die mittlere Intensität/Pixel der gekennzeichneten Bildbereiche im roten Farbkanal für die drei Ebenen erfasst. Die jeweils höchste gemessene Intensität wurde zur weiteren Analyse ausgewählt. Kerne und Zytoplasmabereiche von etwa 50 Zellen wurden pro mikroskopiertem Herzen vermessen.



**Abb. 8: Methodisches Vorgehen zur Analyse der Verteilung von FOXO3**

Aus der Übersichtsaufnahme des Herzens wurde ein Bereich bestehend aus langgestreckten Kardiomyozyten ausgewählt. A: Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit WGA (grün), DAPI (blau) sowie mit primären Antikörpern gegen FOXO3a (rot) gerichtet. B: Je Bildakquisition wurden drei Ebenen im Abstand von 0,6  $\mu\text{m}$  zueinander erfasst. Diejenige Ebene, in der die Kerne am großflächigsten darstellbar waren, wurde zur Markierung der Kerne gewählt. C, D: Durch Überlagerung von Aufnahmen mit Kernfärbung (DAPI, blau) und Färbung von FOXO3a (rot) konnten kardiomyozytäre Kerne identifiziert und als ROI gekennzeichnet werden (hier: ROI #1). Für den späteren Vergleich wurden Bildbereiche ähnlicher Maße im Zytoplasma markiert (hier: ROI #2). Der Maßstabsbalken in A entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ , in B, C, D 5  $\mu\text{m}$ . Für die Aufnahmen wurde eine 100er Vergrößerung gewählt.



### 3.4.5 Kolokalisierung von AIF und LAMP1 zur Detektion von Mitophagie in isolierten Kardiomyozyten

Für die Analyse der Kolokalisierung von AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) und LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) wurden zunächst Kardiomyozyten aus 2 KO und 2 WT Herzen isoliert. Die Isolation erfolgte gemäß dem *AfCS Procedure Protocol PP00000125* (Version 1, 11.05.02) nach O'Connell et al. (2003). Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung der isolierten und fixierten Kardiomyozyten erfolgte unter Verwendung der primären Antikörper *rabbit anti-mouse* AIF (D39D2) XP (#5318, Cell Signaling, USA) in einer Verdünnung von 1:400 und *rat anti-mouse* CD107a (LAMP-1) (#553792, BD Biosciences, USA) in einer Verdünnung von 1:500. Diese wurden mittels der sekundären Antikörper *goat anti-rabbit* IgG Abberior STAR 635P (Sigma-Aldrich, Deutschland) in einer 1:1000 Verdünnung bzw. *goat anti-rat* IgG Alexa Fluor® 488 (ab150165, Abcam, Großbritannien) in einer 1:500 Verdünnung markiert. Das modifizierte Protokoll zur immunhistochemischen Färbung ist im Kapitel 3.4.3 detailliert beschrieben.

Die Kolokalisierung von immunfluoreszenz-markiertem AIF und LAMP1 wurde zur Detektion von Mitophagolysosomen genutzt. Mit Hilfe des Konfokalmikroskops Zeiss LSM 880 Airyscan wurden mit einem 100-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv Aufnahmen der isolierten Kardiomyozyten erstellt. Die Wellenlänge der genutzten Laser betrug 458 nm, 488 nm und 514 nm. Dabei wurden Stapelaufnahmen (*engl.: stacks*) mit einem Abstand der Ebenen von 182 nm zueinander erzeugt. Zur Bildakquisition wurden je 5 Zellen von 2 KO und 2 WT Herzen untersucht. Pro untersuchte Zelle wurden in den erstellten *stacks* 25 Lysosomen erfasst, die eindeutig durch eine kreisrunde Struktur (LAMP1) mit zentraler Ausparung abzugrenzen waren. Es wurde ein 2D Profil der lysosomalen Struktur erstellt, indem die Signalintensität der Fluoreszenzfärbung über einen Querschnitt der Struktur dargestellt wurde. Das Profil diente zur Diskriminierung von Lysosomen mit und ohne mitochondrialem Inhalt, also solchen Lysosomen mit bzw. ohne AIF-Fluoreszenzsignal im Zentrum (Kapitel 4.4.4, Abb. 18). Der Anteil der Lysosomen mit mitochondrialem Inhalt an allen 25 identifizierten Lysosomen wurde prozentual dargestellt.

Für die Bildakquisition wurde das Programm ZEN black (Zeiss) verwendet. Die Auswertung wurde mit dem Programm ZEN 3.2 (ZEN lite, Zeiss) vorgenommen und die Daten graphisch mit dem Programm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter T-Test angewendet.

### 3.4.6 Masson Trichrom Färbung

Herzgewebeschnitte wurden über Nacht auf +4°C aufgetaut und 1h vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur gebracht. Die Färbung wurde gemäß den folgenden Schritten durchgeführt:

- Fixieren der Schnitte in Bouin-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) für 15 min
- 5 min Waschen unter fließendem Leitungswasser
- 5 min Färben der Kerne mit Hämatoxylin nach MASSON (Morphisto, Deutschland)
- 10 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser
- 2 min Färben des Zellplasmas mit Säurefuchsin-Ponceau (Goldner I) (Morphisto, Deutschland)



- Zweimal für je 30 Sekunden Spülen mit Aqua dest.
- 2 min Beizen und Färben mit Phosphomolybdänsäure-Orange-G (Morphisto, Deutschland)
- Zweimal für je 30 Sekunden mit Aqua dest. spülen
- 20 min Färben der extrazellulären Matrix mit Lichtgrün (Goldner III) (Morphisto, Deutschland)
- Kurz in Leitungswasser spülen
- Kurz in Essigsäure 1% (Morphisto, Deutschland) tauchen
- Kurz in Aqua dest. spülen
- Zweimal kurz in Ethanol 96% entwässern
- Kurz in Isopropanol entwässern
- Zweimal je 5 min in Xylol (Roth, Deutschland) entwässern
- Schnitte mit Entellan (Merck, Deutschland) eindecken

Die durch Lichtgrün grün angefärbte Fläche repräsentiert die Extrazellulärmatrix. Diese Fläche wurde als Parameter zur qualitativen Auswertung der interstitiellen Fibrose herangezogen.

### 3.5 mRNA Expressionsanalyse

#### 3.5.1 mRNA Isolierung

Zur Isolierung von Boten-Ribonucleinsäure (*engl. messenger-RNA*, mRNA) aus Herzgewebe wurden in flüssigem Stickstoff gefrorene Gewebestücke von Herzen mit einem Gewicht von minimal 10 mg und maximal 30 mg verwendet. Die Gewebestücke wurden in Lysispuffer versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA) mithilfe des Homogenisators (Tissue-Raptor II, Qiagen, Deutschland) 30 sec zerkleinert. Es wurde darauf geachtet, dass das Gewebe rasch aus flüssigem Stickstoff in Lysispuffer überführt wurde, um die Degradation der mRNA durch Auftauen zu vermeiden. Die weiteren Schritte der Isolation erfolgten gemäß den Herstellerangaben nach dem Protokoll des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen (#74104).

Der Gehalt an mRNA in den Eluaten wurde mittels Spektralphotometer (Nanodrop ND-1000, Peqlab, VWR International, USA) bestimmt. Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurden im Weiteren nur Proben verwendet, deren Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260/280}$ )  $\sim 2,0$  betrug. Die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder unmittelbar nach Isolierung zur Transkription von komplementärer DNA (cDNA) genutzt.

#### 3.5.2 cDNA Transkription

Für die Synthese von cDNA aus isolierter mRNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205313, Qiagen, Deutschland) verwendet und dem Herstellerprotokoll gefolgt. Insgesamt wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA pro Transkriptionsreaktion eingesetzt und auf ein Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  verteilt. In einem ersten Schritt wird genomische DNA eliminiert. Bei  $42^{\circ}\text{C}$  wird die Probe 15 min mit einem Mix aus reverser Transkriptase, zugehörigen Primern und Puffer inkubiert. Die reverse Transkription wird durch Inkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 3 min beendet.

Das Transkript wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt zur quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) weiterverwendet.

### 3.5.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Um eine quantitative Aussage über die Menge an mRNA-Transkripten eines betrachteten Gens treffen zu können, wird das Prinzip der qPCR genutzt.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert zwischen die entstehenden DNA-Doppelstränge, wodurch die Intensität der Fluoreszenz zunimmt. Je mehr Doppelstrang-Amplifikate entstehen, desto stärker ist die emittierte Fluoreszenz. Indem nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenz vorgenommen wird, kann auf die Menge der amplifizierten DNA rückgeschlossen werden.

Zur Detektion der cDNA wurde der Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (#K0223, Thermo Scientific, USA) verwendet. Diesem Master Mix (MM) mit Maxima Hot Start Taq-DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden die synthetisierte cDNA und Primer hinzugefügt.

Ansatz für eine qPCR Reaktion:

SybrGreen MM [2x]	10,0 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	7,2 $\mu\text{l}$
cDNA	1,0 $\mu\text{l}$
Fwd Primer	0,9 $\mu\text{l}$
Rev Primer	0,9 $\mu\text{l}$
<hr/>	
TOTAL	20,0 $\mu\text{l}$

Die Experimente wurden mittels des StepOnePlus™ Real-Time PCR Detection Systems (Applied Biosystems) unter folgenden Einstellungen durchgeführt. Im ersten Zyklus wurde bei einer Temperatur von  $95^{\circ}\text{C}$  für eine Dauer von 10 min die Taq-DNA-Polymerase aktiviert. Für die weiteren Zyklen erfolgte bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 15 sec die Denaturierung der DNA-Doppelhelix und bei anschließenden  $60^{\circ}\text{C}$  für 1 min die Primerhybridisierung an die DNA-Einzelstränge sowie die Elongation. Zur Amplifizierung der verwendeten cDNA wurden 40 Zyklen durchlaufen. Im Anschluss wurden die Schmelzkurven ermittelt. Dafür wurden die Ansätze zuerst 15 sec lang auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und danach für 1 min auf  $60^{\circ}\text{C}$  gehalten. Schließlich wurde die Temperatur alle 15 sec um  $0,3^{\circ}\text{C}$  erhöht, bis eine Zieltemperatur von  $95^{\circ}\text{C}$  erreicht war.

### 3.5.4 Analyse

Zur Auswertung musste zunächst der  $C_T$ -Wert (engl.: *threshold cycle*, Schwellenwert-Zyklus) bestimmt werden. Dieser Wert definiert den Zyklus, in dem ein frei gewählter Schwellenwert der detektierten Fluoreszenz erreicht wird. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass er im logarithmischen Verlauf der Amplifikationskurven erreicht wurde. Aus den zwei bis drei technischen Replikaten eines jeden biologischen Replikates wird der Mittelwert der  $C_T$ -Werte gebildet ( $C_{T\text{ mean}}$ ). Die weitere Auswertung erfolgte dann mit der  $X_0$ -Methode, die der  $2(-\Delta\Delta C_t)$ -Methode vorgezogen wurde. Während die  $2(-\Delta\Delta C_t)$ -Methode nur einen relativen Veränderungsfaktor berechnet, erlaubt die  $X_0$ -Methode die Kalkulation von

Standardabweichungen und gibt Auskunft über die Menge des Ausgangsmaterials (Thomsen et al., 2010). Der  $X_0$ -Wert wurde wie folgt errechnet:

$$X_0 = 0,5^{Ct(\text{mean})}$$

Pro Gruppe wurden anschließend die  $X_0$ -Werte der biologischen Replikate zu einem Mittelwert zusammengefasst ( $X_{0\text{ mean}}$ ). Die  $X_0$ -Werte der untersuchten Zielgene wurden in Verhältnis zu den  $X_0$ -Werten eines Referenzgens der gleichen Probe gesetzt. Die Referenzgene blieben unbeeinflusst von Expressionsänderungen durch die Induktion des KO. Die Referenzgene wurden so gewählt, dass die Differenz der  $C_T$ -Werte von Ziel- und Referenzgenen möglichst gering war.

### 3.6 Durchflusszytometrie

#### 3.6.1 Gewebeaufbereitung

Den Mäusen wurde 10 min vor ihrer Tötung 250 IU Heparin (B. Braun Melsungen, Deutschland) injiziert. Nach zervikaler Dislokation wurde das Herz unter Erhalt der *Aorta ascendens* aus dem Thorax präpariert. In PBS überführt wurde bei leichtem Druck mit der Pinzette residuelles Blut aus den Herzen ausgewaschen, damit Immunzellen aus dem Blutkreislauf nicht in die folgenden Analysen miteinbezogen wurden. Es wurde das Herzgewicht bestimmt und notiert. Im Anschluss wurde das Herz an der Aorta kanüliert und an die Langendorff-Apparatur (Eigenbau) angeschlossen. Es folgte die retrograde Perfusion erst mit PBS/Heparin für 3 min und danach mit Kollagenaselösung (Worthington Biochemical Corporation, USA) für 3 min. Die Vorhöfe sowie zu- und abführende Gefäße wurden entfernt und das angedaute Herz mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert.

Kollagenaselösung – Ansatz für ein Herz:

HBSS	25 ml
Kollagenase Typ I	450 U/ml
DNase I	60 U/ml

PEB (Protein Extraction Buffer) – Ansatz für ein Herz:

PBS	20ml
BSA	0,5 %
EDTA	2 mM

#### 3.6.2 Zellisolation

Das behandelte Herz wurde zusammen mit der perfundierten Kollagenaselösung für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PEB gelöst. Die Zellsuspension wurde durch einen Filter (EASYstrainer, Greiner Bio-One, Österreich) mit einer Porengröße von 100 µm gesiebt und bei 50 g für 1 min und Raumtemperatur zentrifugiert, um Kardiomyozyten von anderen Zelltypen zu trennen. Das Sediment mit der Kardiomyozytenfraktion wurde für weitere Versuche bei -20°C eingefroren. Der Überstand enthielt die Nicht-Kardiomyozytenfraktion und wurde erneut durch einen Filter mit

der Porengröße von 40 µm selektiert. Der filtrierte Überstand wurde wiederum bei 300 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in PEB resuspendiert. Pro Ansatz wurden je 100 µl der Suspension verwendet. Durch Inkubation für 10 min bei 4°C mit Anti-CD16/32-Antikörper (101302, BD Biosciences, USA) in einer Verdünnung von 8:100 wurden die Fc-Rezeptoren von Antikörpern in den Proben besetzt, um unspezifische Bindungen mit den eingesetzten Antikörpern zu verhindern. Die Zellen wurden mit folgenden Farbstoffen bzw. Antikörpern gefärbt: 7AAD (BD Bioscience), anti-CD45 - BV510, 30-F11 (BD Bioscience), anti-CD11b - APC, M1/70 (BD Bioscience), anti-CD8a - APC-Cy7, 53-6.7 (BioLegend), anti-Ly6C - APC/Fire 750, HK1.4 (BioLegend), anti-CD3 - APC, 145-2C11 (BioLegend), anti-CD4 - Pacific Blue, RM4-5 (BD Bioscience), anti-Ly6G - PE-Cy7, 1A8 (BD Bioscience), anti-F4/80 - BV421, BM8 (BioLegend), MHCII - Alexa Fluor 488, M5/114.15.2 (BioLegend). Anhand der Färbeeigenschaften der Zellen gelang die Differenzierung verschiedener Subpopulationen.

### 3.6.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrischen Messungen und *Gating*-Strategien wurden durch Frau Dr. rer. nat. Rianne Nederlof mit dem Gerät FACSCanto™ II Flow Cytometry System (BD Biosciences, USA) am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

### 3.7 Statistische Analyse

Die Daten wurden graphisch mit dem Programm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) als Mittelwerte ± Standardabweichungen oder Box-Whisker-Plots dargestellt. Wenn die Darstellung als Box-Whisker-Plot erfolgte, repräsentieren die Begrenzungen der Box die 25. und 75. Perzentile, die Linie innerhalb der Box den Median und die Linien außerhalb der Box die 10. und 90. Perzentile. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem Student's T-Test durchgeführt. Wenn die Daten keiner Normalverteilung folgten, erfolgte die Testung mittels Mann-Whitney-U-Test. Für die weitere statistische Analyse multipler Gruppen im Zeitverlauf wurden zweifaktorielle Varianzanalysen (*engl.: two way ANOVA*) gefolgt von einem Bonferroni Post-hoc-Test angewendet. Bei fehlender Normalverteilung der Daten wurden Unterschiede mit Hilfe des non-parametrischen Kruskal Wallis Tests bestimmt. In den jeweiligen Legenden der Abbildungen sind die angewandten statistischen Tests noch einmal beschrieben. Unterschiede mit einem  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angenommen (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

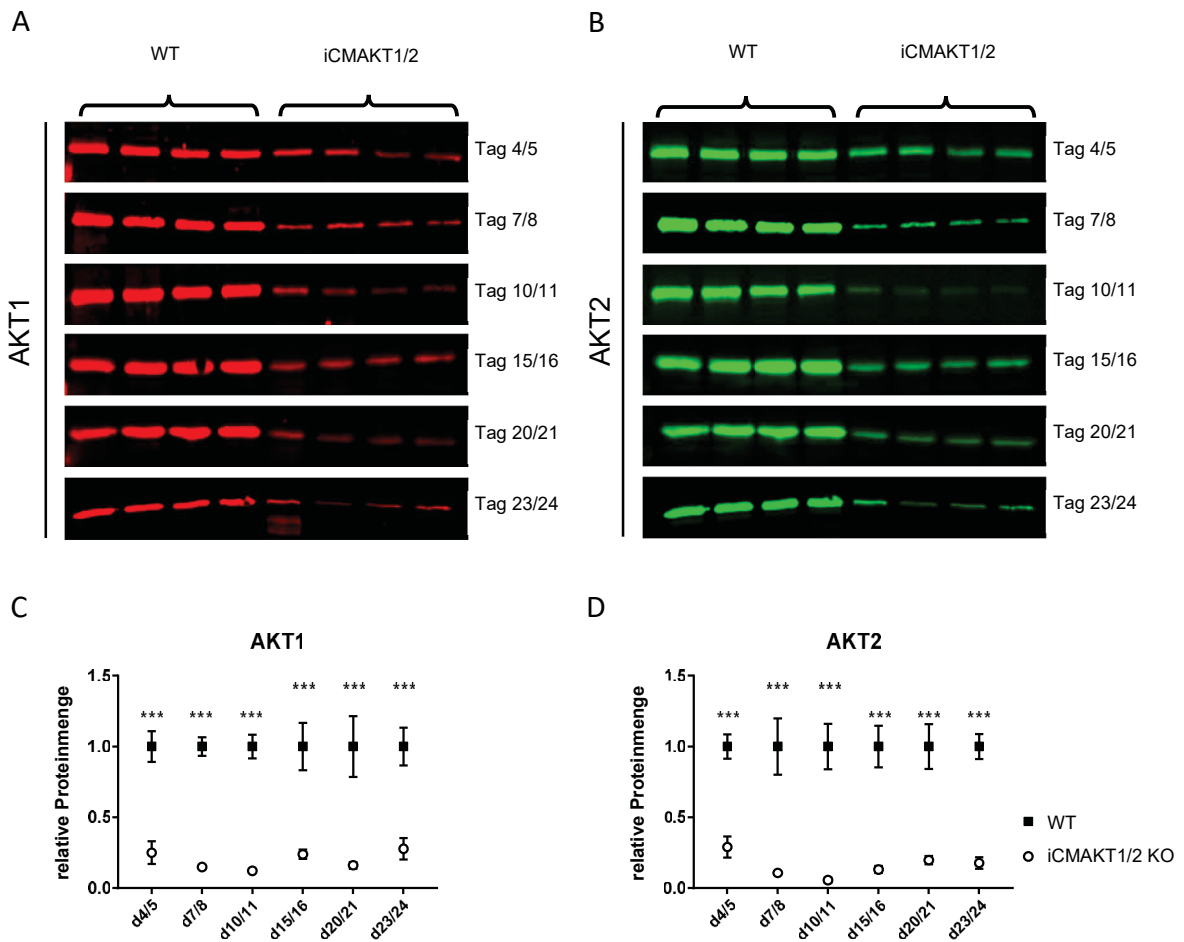
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der AKT1/2 Knock-out Effizienz

Um die Effizienz und Stabilität der induzierten Deletion von AKT1/2 in Herzen der iCM-AKT1/2 KO-Mäuse zu überprüfen, wurden Herzextrakte der iCMAKT1/2 KO- und WT-Mäuse hinsichtlich ihres AKT1/2 Proteingehalts durch Western Blot Analyse verglichen. Abb. 9 (A) und (B) zeigen die gruppenweise Gegenüberstellung der Proteinmenge von AKT1 bzw. AKT2 zu den Zeitpunkten 4/5, 7/8, 10/11, 15/16, 20/21 und 23/24 Tage nach der ersten Txf-Injektion.

Zur Quantifizierung und Vergleichbarkeit der AKT Proteinmenge erfolgte eine Normierung und graphische Darstellung (Abb. 9 C, D). Alle gemittelten Signalintensitäten wurden in Relation zur gemittelten Signalintensität der WT-Kontrollgruppe des jeweiligen Zeitpunktes normiert. Diese wurde jeweils mit 1,0 als Referenzwert angesetzt. Bereits ab Tag 4/5 nach noch nicht vollendetem fünftägigen Txf-Injektionsprotokoll war sowohl die AKT1- ( $0,25 \pm 0,08$ ) als auch die AKT2-Proteinmenge ( $0,29 \pm 0,07$ ) der iCMAKT1/2 KO-Herzen wesentlich reduziert. Die Reduktion der Proteinmenge von AKT1 und AKT2 blieb über die Untersuchungszeitpunkte hinweg stabil. Zu jedem Zeitpunkt war die Signalintensität der AKT1 bzw. AKT2 Bande der iCMAKT1/2 KO-Herzextrakte signifikant schwächer als die der WT-Herzextrakte. Eine Restmenge von AKT1/2 von ca. 0,1 bis 0,25 war an allen untersuchten Zeitpunkten nachweisbar. Ab Tag 15/16 nach erster Txf-Applikation deutet sich zudem ein leichter Anstieg der AKT1/2 Proteinmenge an. Diese Restmenge könnte auf nicht kardiomyotäres AKT zurückzuführen sein.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die durch fünfmalige Txf-Injektion induzierte Gendeletion von AKT1/2 in Kardiomyozyten zu einer wesentlichen Abnahme der AKT1/2 Proteinmenge in untersuchten Herzextrakten führte, nach 10/11 Tagen ein Minimum erreichte und über einen Zeitraum von mindestens 20 Tagen eine andauernde Reduktion bewirkte.



**Abb. 9: Die Gendelektion von AKT1/2 im Herzgewebe führt zur Abnahme der AKT1/2 Proteinmenge**

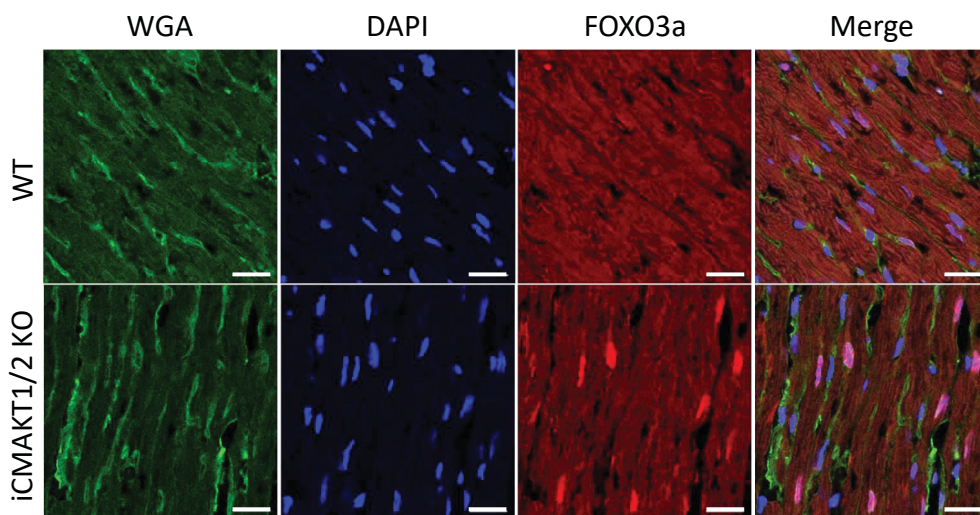
Die Inaktivierung von AKT1 und AKT2 im Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen wurde verglichen mit Kontroll-Mäusen (WT). A/B: Western Blot Analysen von Herzextrakten 4/5, 7/8, 10/11, 15/16, 20/21 und 23/24 Tage nach der ersten Txf-Injektion. Gegenüberstellung der Signalintensität der AKT1- (A) bzw. AKT2-Banden (B) von iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzextrakten. C/D: Die dargestellten Werte der iCMAKT1/2 KO-Herzextrakte von Tag 4/5 bis 23/24 sind als relatives Vielfaches der WT-Werte des jeweiligen Zeitpunktes zu betrachten. Die Werte von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und WT-Mäusen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt (d4/5, d7/8 usw.) miteinander verglichen. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Sidak's multiple comparison test: \*\*\*:  $p < 0.001$  (WT vs. iCMAKT1/2 KO).

#### 4.2 Lokalisierung des FOXO3 Transkriptionsfaktors in Kardiomyozyten

Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert in murinen Kardiomyozyten den nukleozytoplasmatischen Austausch (*Shuttling*) des Transkriptionsfaktors FOXO3 und beeinflusst unter anderem auf diesem Weg die Kardiomyozytengröße (Skurk et al., 2005). Phosphorylierung von FOXO3 durch AKT an T32 und S253 resultiert in nukleärem Export des Transkriptionsfaktors und reduzierter transkriptioneller Aktivität (Brunet et al., 1999). In der Annahme, dass infolge der Deletion von AKT1/2 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO3 ausbleibt, sollte der Transkriptionsfaktor in iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten insbesondere nukleär anstatt zytoplasmatisch nachzuweisen sein. Um einen möglichen Einfluss des Transkriptionsfaktors FOXO3 auf den Prozess der Herzatrophy bei Deletion von AKT1/2 am



Herzen zu untersuchen, wurde die subzelluläre Verteilung von FOXO3 in Kardiomyozyten immunhistologisch analysiert. Es erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung 8  $\mu\text{m}$  dünner Gefrierschnitte paarweise in Medium eingebetteter Herzen (iCMAKT1/2 KO und WT) mit WGA Alexa488 (Molecular Probes, USA) zur Färbung von extrazellulären Glycoproteinen, DAPI (DAPI Fluoromount-G, Southern Biotech, USA & Kanada) als Kernfärbung und dem spezifischen  $\alpha$ -FOXO3-Antikörper (FoxO3a (D19A7) rabbit mAb, Cell Signaling, USA). In konfokal-mikroskopisch erstellten Aufnahmen des linksventrikulären Myokards und des Septummyokards wurden Kardiomyozyten bei 100-facher Vergrößerung in der Längsebene geschnitten dargestellt. Durch Überlagerung der Aufnahmen aus blauem (DAPI, Kernfärbung) und rotem Kanal (FOXO3) wurden die Zellkerne identifiziert. In zusammengeführten Aufnahmen (*Merge*) konnten durch die Markierung der Zellgrenzen mit WGA Alexa488 die Kerne von Kardiomyozyten von denen der Fibroblasten und anderer Zellen morphologisch differenziert werden. Abb. 10 zeigt beispielhaft eine Gegenüberstellung von Aufnahmen der WT- und iCMAKT1/2 KO-Herzschnitte am Tag 23/24 in verschiedenen Farbkanälen. Während das FOXO3-Signal in WT-Herzschnitten diffus im Zytoplasma der Kardiomyozyten verteilt ist, konzentriert sich das Signal in iCMAKT1/2 KO -Kardiomyozyten insbesondere auf die kardiomyozytären Zellkerne.



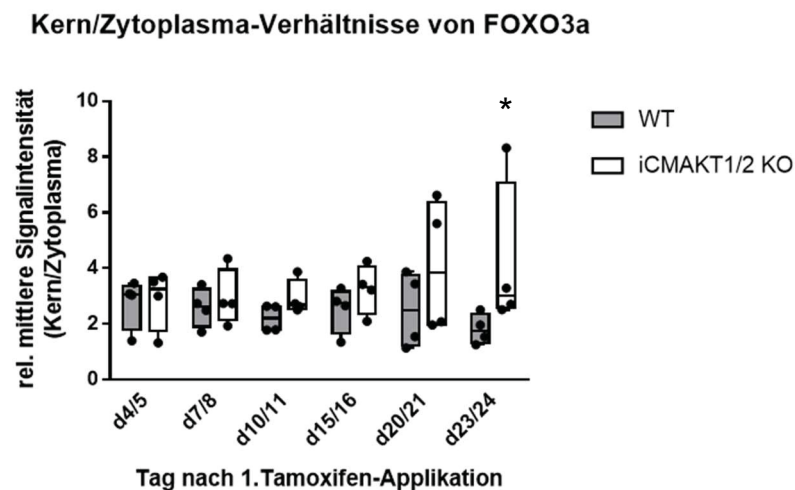
**Abb. 10: AKT1/2 Inaktivierung führt zur Kernlokalisierung von FOXO3a in Kardiomyozyten**

*Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten Herzschnitten (8  $\mu\text{m}$  Dicke) von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und Kontroll-Mäusen (WT) am Tag 23/24 nach erster Txf-Injektion. Die Zellgrenzen sind mit WGA Alexa488 (grün) markiert, für die Kernfärbung wurde DAPI (blau) verwendet und FOXO3a wurde mit Cy3-markierten Antikörpern (rot) dargestellt. Die Bildakquisition erfolgte bei 100-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .*

Im nächsten Schritt wurde die Verteilung von FOXO3 in iCMAKT1/2 KO- und WT-Kardiomyozyten quantitativ verglichen. Hierfür wurden zunächst Kardiomyozytenkerne und vergleichbar große Flächen im Zytoplasma als Regionen markiert und ihre Signalintensität pro Fläche bei einer Wellenlänge von 554 nm gemessen (*Leica Application Suite X*, Leica Biosystems). Das Verhältnis von nukleärer zu zytoplasmatischer mittlerer Intensität pro Fläche wurde ermittelt und im Weiteren als Kern/Zytoplasma-Verhältnis bezeichnet. Die Kern/Zytoplasma-Verhältnisse von jeweils mindestens 50 Kardiomyozyten pro biologischem Replikat wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Verhältnisse von jeweils vier biologischen Replikaten pro Zeitpunkt wurden als eine Gruppe definiert. Zum Vergleich wurden



die iCMAKT1/2 KO-Gruppen den wildtypischen Kontrollen eines jeweiligen Zeitpunktes graphisch gegenübergestellt (Abb. 11). Zu den Zeitpunkten Tag 4/5 und 7/8 der Untersuchung unterscheidet sich das Kern/Zytoplasma-Verhältnis des Transkriptionsfaktors in iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten nicht signifikant von dem in WT-Kardiomyozyten. Das Kern/Zytoplasma-Verhältnis der iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten steigt dann im Verhältnis zu den Kontrollgruppen an den Tagen 10/11, 15/16 und 20/21 an. Das bedeutet, dass sich die Verteilung des FOXO3 Transkriptionsfaktors zunehmend vom Zytoplasma in den Nukleus verschiebt. Non-parametrisch getestet ist der Unterschied zum Zeitpunkt Tag 23/24 signifikant und zeigt eine zunehmende Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors in Kardiomyozyten der iCMAKT1/2 KO-Mäuse.



**Abb. 11: Zunahme der Kern/Zytoplasma-Verhältnisse von FOXO3a in iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten**

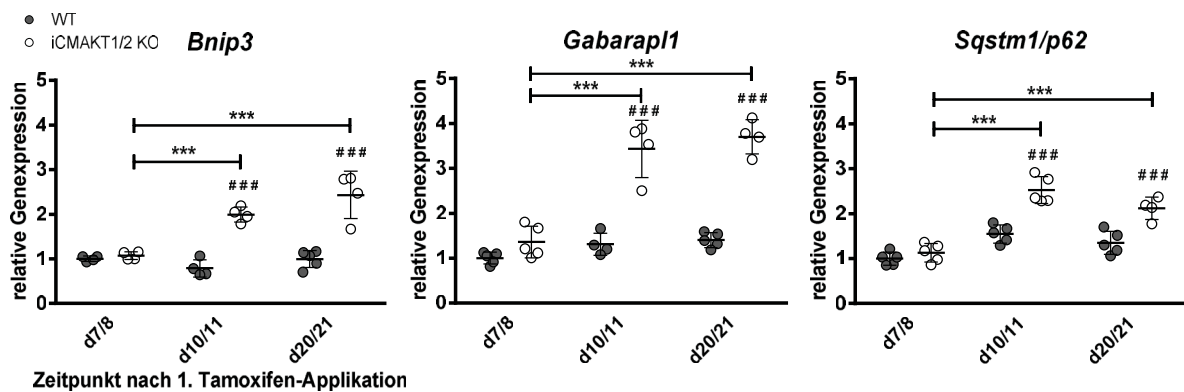
Vergleich von Kern/Zytoplasma-Verhältnissen der mittleren FOXO3a-Signalintensität in iCMAKT1/2 KO- und WT-Kardiomyozyten ( $n=4$  pro Gruppe). Es zeigt sich eine Tendenz zugunsten zunehmender Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors in den iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten, die jedoch (nach non-parametrischer Testung mittels Kruskal Wallis Test) nicht signifikant ist. Im Einzelvergleich ist das Kern/Zytoplasma-Verhältnis in iCMAKT1/2 KO- gegenüber WT-Kardiomyozyten zum Zeitpunkt Tag 23/24 signifikant erhöht. \*:  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test ohne Korrektur für Mehrfachvergleiche.

### 4.3 Expressionsanalyse von FOXO3-Zielgenen

#### 4.3.1 Transkriptionsanalyse Autophagie-assoziiierter Gene mittels qPCR

Sengupta et al. (2009) konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor FOXO3 in murinen Kardiomyozyten die Expression von Autophagie-assoziierten Genen reguliert. In Zusammenschau mit der histologisch beobachteten zunehmenden Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors FOXO3 in iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten und den Ergebnissen der Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse (Goedecke et al., 2017) führte dies zu der Hypothese, dass in iCMAKT1/2 KO Herzen ein verändertes Expressionsmuster von Autophagie-assoziierten Genen vorliegt. In der Annahme, dass FOXO3 infolge der Deletion von AKT1/2 disinhibiert wird, wirkt FOXO3 verstärkt als Aktivator von Autophagie-assoziierten Genen. Um zu überprüfen, inwiefern diese Zielgene nun beeinflusst werden, wurde die mRNA-Menge der drei Gene *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Sqstm1* in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzgewebe zu den Zeitpunkten 7/8, 10/11 und 20/21 Tage nach erster Txf-Injektion mittels *SybrGreen*

basierter qPCR untersucht (siehe Abb. 12). Die Transkription der drei Gene verhält sich untereinander ähnlich. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt Tag 7/8 unterscheidet sie sich zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzgewebe nicht. Zum folgenden Zeitpunkt Tag 10/11 übersteigt die relative Expression von *Bnip3* ( $2,0 \pm 0,2 \uparrow$ ), *Gabarapl1* ( $3,4 \pm 0,6 \uparrow$ ) und *Sqstm1* ( $2,5 \pm 0,3 \uparrow$ ) in den iCMAKT1/2 KO-Herzen die der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant. Auch zum letzten Zeitpunkt der Reihe (Tag 20/21) ist die Expression von *Bnip3* ( $2,4 \pm 0,5 \uparrow$ ) *Gabarapl1* ( $3,7 \pm 0,4 \uparrow$ ) *Sqstm1* ( $2,1 \pm 0,2 \uparrow$ ) signifikant erhöht. Ebenfalls ist in allen drei Fällen der Anstieg der Expression zwischen den Zeitpunkten Tag 7/8 und 10/11 sowie zwischen Tag 7/8 und 20/21 signifikant. Die Genexpression erreicht bereits an Tag 10/11 ein Maximum und steigt bis zum Tag 20/21 nicht mehr signifikant an. Dahingegen zeigen die WT-Kontrollgruppen keine wesentlichen Expressionsänderungen über die Zeitpunkte hinweg. Zusammenfassend ist in iCMAKT1/2 KO-Herzgewebe eine Transkriptionssteigerung der drei untersuchten Autophagie-assoziierten Gene um das zwei- bis dreieinhalbfache zu beobachten. Diese beginnt zwischen den Zeitpunkten Tag 7/8 und 10/11, ist am Tag 10/11 maximal und bleibt bis zum Tag 20/21 stabil. Sie könnte eine Konsequenz der Translokation von FOXO3 sein.



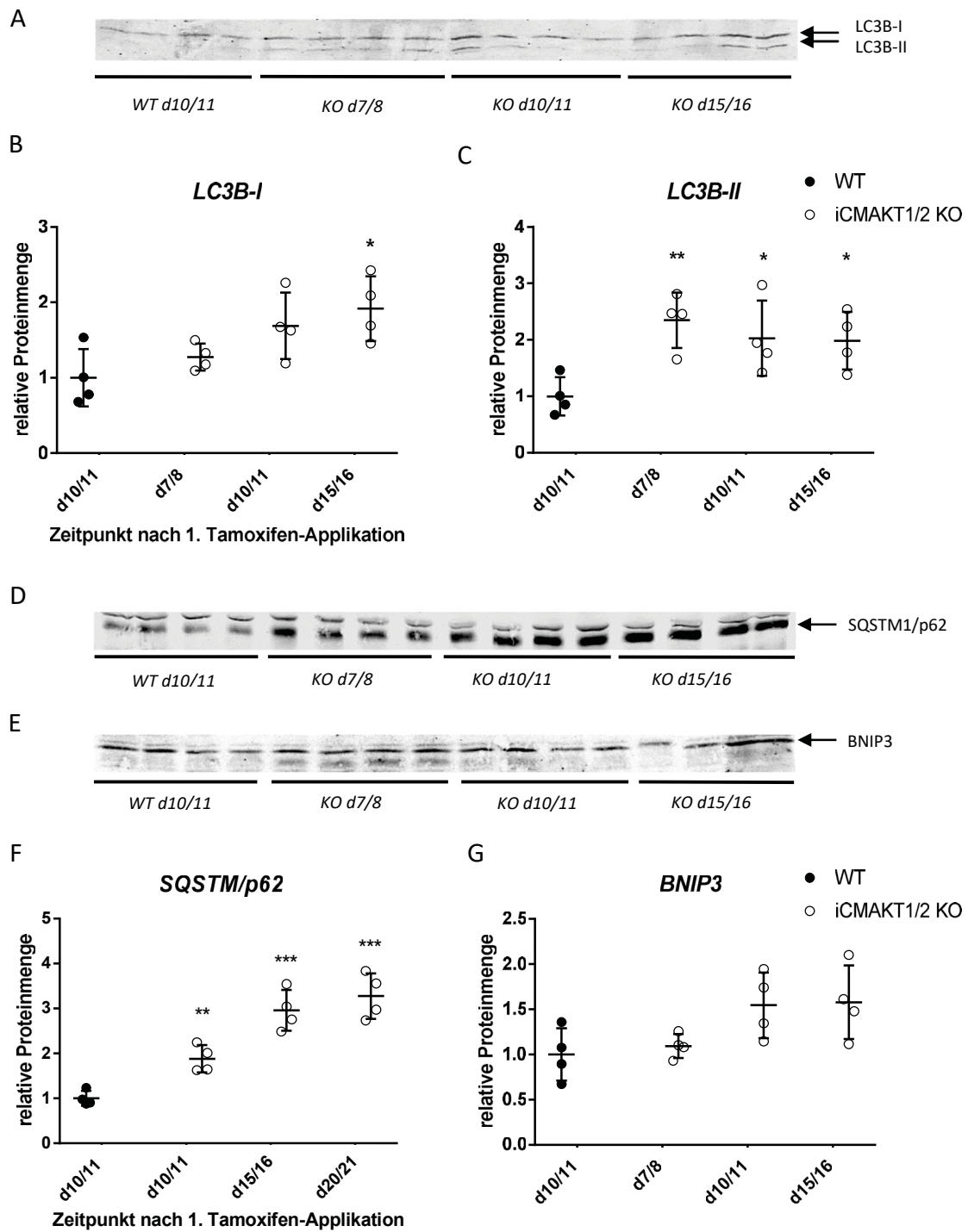
**Abb. 12: Die Deletion von AKT1/2 resultiert in einer erhöhten Transkription FOXO3a-regulierter pro-autophagischer Gene in Herzgewebe**

Die Transkription Autophagie-assoziiierter Gene (*Bnip3*, *Gabarapl1*, *Sqstm1*) in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 7/8, 10/11 und 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Kontroll-Herzen (graue Symbole) verglichen. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 7/8 wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung gewählt. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt ( $n= 4-5$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse. Für Vergleiche der iCMAKT1/2 KO-Gruppen zwischen verschiedenen Zeitpunkten: \*\*\*  $p < 0,001$ ; für Vergleiche zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt: ###:  $p < 0,001$

### 4.3.2 Quantifizierung von Autophagieproteinen

Um zu bestimmen, ob einer erhöhten mRNA-Expression von Autophagie-assoziierten Genen auch eine erhöhte Menge an Autophagieproteinen folgt, wurden iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzextrakte hinsichtlich ihres Proteingehalts an SQSTM1 und BNIP3 in Western Blot Analysen verglichen (Abb. 13). Als Vergleichspunkt diente die Proteinmenge aus WT-Herzextrakten zum Zeitpunkt Tag 10/11 nach erster Txf-Applikation. Es zeigte sich, dass analog zum Anstieg des *Sqstm1*- bzw. *Bnip3*-Transkripts auch auf Proteinebene eine Zunahme messbar war. Die relative Proteinmenge von SQSTM1 in iCMAKT1/2 KO-Herzextrakten stieg über die Zeitpunkte Tag 7/8, 10/11, 15/16 bis Tag 20/21 ( $3,3 \pm 0,4 \uparrow$ ) stetig (Abb. 13 D, F). Sie war bereits ab Tag 7/8 signifikant gegenüber der Proteinmenge aus WT-Herzextrakten erhöht. Die gleiche Tendenz ließ sich für BNIP3 zeigen, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen (Abb. 13 E, G). Zusätzlich wurden auch die Proteinmengen der Autophagiemarker LC3B-I und LC3B-II bestimmt (Abb. 13 A, B, C). Während sich für LC3B-I eine langsame Zunahme bis hin zu einem signifikanten Unterschied an Tag 15/16 entwickelte, erreichte die Menge an LC3B-II schon an Tag 7/8 ein Maximum und war zu allen Zeitpunkten signifikant gegenüber der WT-Kontrolle erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Transkriptionssteigerung auch zu einer erhöhten Proteinmenge der Autophagie-assoziierten Gene *Sqstm1* und *Bnip3* in iCMAKT1/2 KO-Herzextrakten führt. Zusätzlich ist auch die Menge der Autophagieproteine *LC3B-I* und *LC3B-II* erhöht.



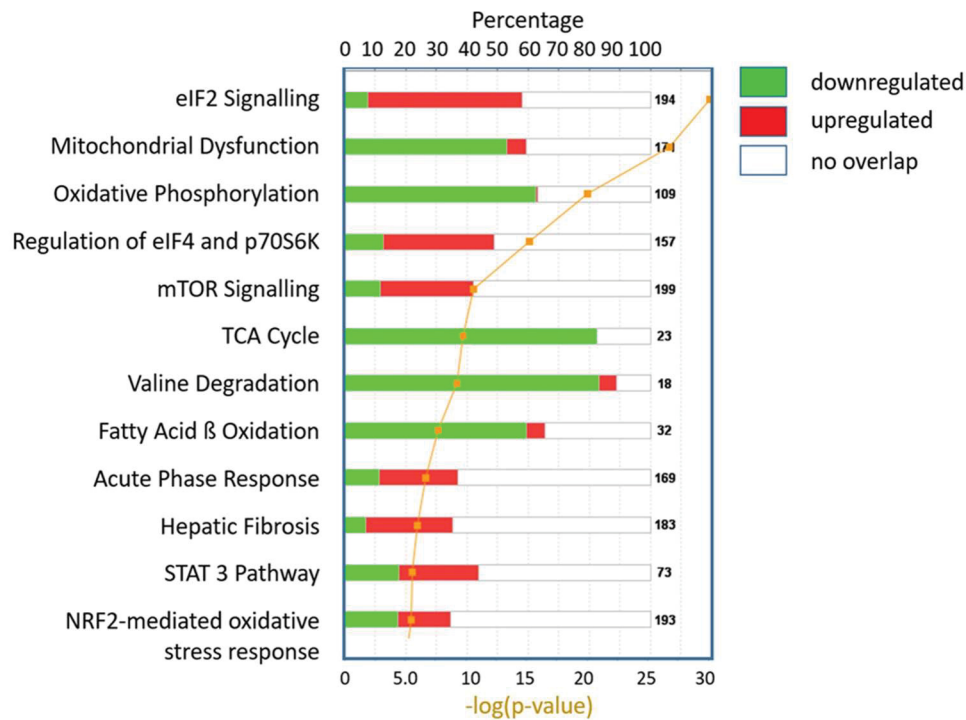
**Abb. 13:** Der iCMAKT1/2 KO führt zu einer gesteigerten Expression von Autophagiefaktoren

A, D, E: Western Blots für LC3B-I, LC3B-II, Sqstm1 und Bnip3 aus iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzextrakten. B, C, F, G: Quantifizierung der Proteinmenge von LC3B-I (B), LC3B-II (C), Sqstm1 (F) und Bnip3 (G) zu den Zeitpunkten 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach erster Txf-Applikation. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 10/11 wurde jeweils als Referenzwert (1,0) zur Normierung angenommen. Für Sqstm1 sind die Messungen zum Zeitpunkt Tag 7/8 für die iCMAKT1/2 KO-Herzextrakte ergänzend auf einem separaten Gel erhoben worden (hier nicht gezeigt). Sie wurden ebenfalls in Relation zu WT-Herzextrakten am Tag 10/11 gesetzt. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt (n=4). Ungepaarter T-Test: \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001; iCMAKT1/2 KO (weiße Symbole) vs. WT Tag 10/11 (schwarze Symbole).

#### 4.4 Mitochondriale Genexpression in iCMAKT1/2 KO-Herzen

##### 4.4.1 Expressionsanalyse mitochondrialer Transkriptionskoaktivatoren mittels qPCR

Durch Untersuchungen mittels Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse zum Zeitpunkt Tag 21 wurde gezeigt, dass die Expression zahlreicher Gene für mitochondriale Proteine in den iCMAKT1/2 KO-Herzen reduziert wird. Zum Zeitpunkt Tag 10 waren dahingegen noch keine Veränderungen dieser Gene nachweisbar. Die Ingenuity Pathway Analyse der mRNA Array Daten an Tag 21 veranschaulicht die veränderte Regulation von Genen, die zu bestimmten Signalwegen zusammengefasst wurden (Abb. 14) (Goedecke et al., 2017). Stoffwechselwege wie die Oxidative Phosphorylierung, die  $\beta$ -Oxidation, der Citratzyklus und die Valin-degradation, die im Wesentlichen in Mitochondrien stattfinden, sind signifikant verändert und überwiegend herunterreguliert. Auch Zusammenschlüsse von Genen, deren Dysregulation mitochondriale Dysfunktion zur Folge hat, sind signifikant herunterreguliert. Außerdem konnten funktionelle Messungen eine Beeinträchtigung der respiratorischen Mitochondrienfunktion zeigen (Goedecke et al., 2017).



**Abb. 14: Ingenuity Pathway Analyse basierend auf mRNA Array Daten an Tag 21 in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen**

Die Ingenuity Pathway Analyse gruppiert die untersuchten Gene gemäß ihrer Zugehörigkeit zu Stoffwechselwegen und Signalwegen. Für jeden Pathway ist der prozentuale Anteil herunterregulierter, hochregulierter und unveränderter Gene farblich gekennzeichnet. Die Zahlen hinter den Balken beschreiben die Gesamtzahl der Gene, die zum jeweiligen Pathway zusammengefasst wurden. Es wurden n=4 iCMAKT1/2 KO- und n=4 WT-Herzen untersucht. Dargestellt ist die veränderte Genregulation in iCMAKT1/2 KO-Herzen verglichen mit WT-Herzen. Die p-Werte für die Vergleiche sind als  $-\log(p\text{-Wert})$  aufgetragen und geben die Wahrscheinlichkeit an, dass aufgrund der mRNA Array Daten der jeweilige Pathway verändert ist. So wurden z.B. 18 Gene der Valindegredation zugeordnet, von denen 15 Gene herunterreguliert, zwei Gene unverändert sind und ein Gen hochreguliert ist. Mit Genehmigung durch S. Gödecke.

Die Transkriptionaskoaktivatoren PGC-1 $\alpha$  und - $\beta$  sind zentrale Regulatoren kernkodierter mitochondrialer Gene, während TFAM die mitochondrial kodierte Genexpression reguliert. Um zu untersuchen, ob eine verminderte Expression dieser an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Transkriptions(ko)aktivatoren für die beobachteten Veränderungen der mitochondrialen Transkription in iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten verantwortlich ist, wurde im Folgenden die Transkription von *Ppargc1a/b* und *Tfam* quantifiziert. Die Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse an Tag 10 zeigte keine Veränderung der Expression o.g. Transkriptions(ko)aktivatoren in iCMAKT1/2 KO-Herzen verglichen mit WT-Herzen. Dahingegen wurde an Tag 21 eine signifikante Verminderung der relativen Expression von *Ppargc1b* (0,53) und *Tfam* (0,68) in iCMAKT1/2 KO-Herzen gefunden (Tabelle 1) (Goedecke et al., 2017).

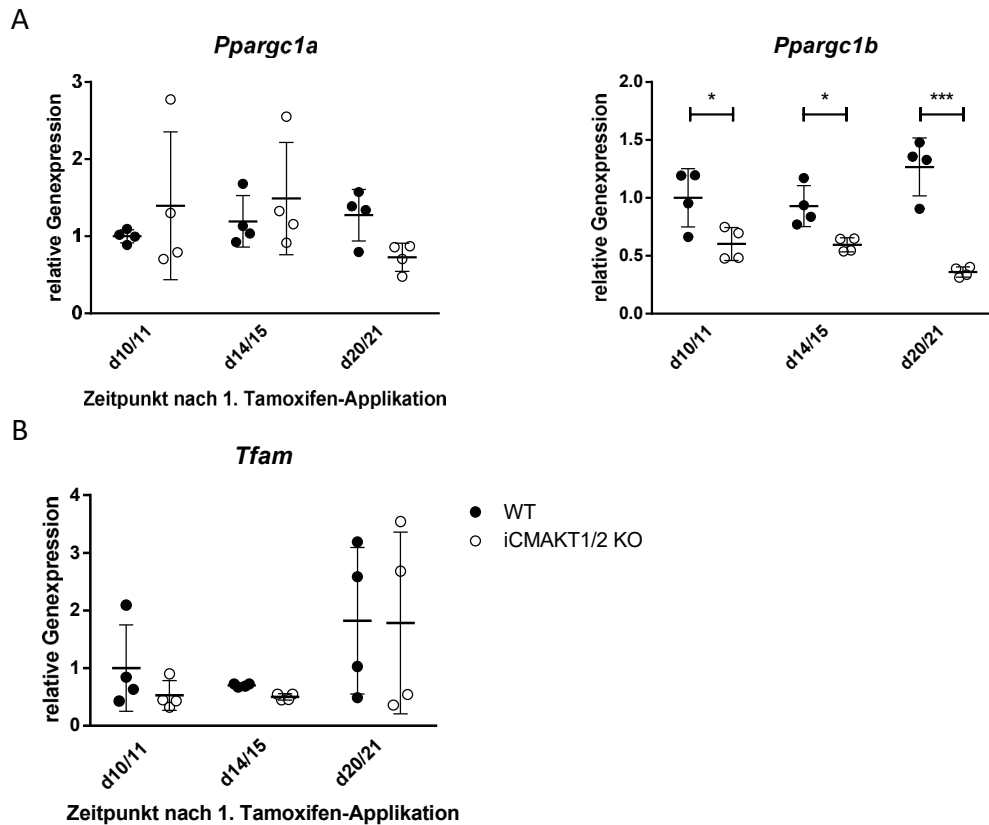
In dieser Arbeit wurden die Mikroarray-Daten mittels qPCR in einer unabhängigen Analyse mit anderen Tieren überprüft sowie um den Untersuchungszeitpunkt Tag 14/15 nach erster Txf-Applikation ergänzt. Die Transkriptionsanalysen bestätigten die Ergebnisse der Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen und konnten für *Ppargc1a* zu keinem der Untersuchungszeitpunkte Unterschiede zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen nachweisen (siehe Abb. 15 A). Zum Zeitpunkt Tag 20/21 zeigte sich allerdings eine tendenzielle Herunterregulation von *Ppargc1a* in den iCMAKT1/2 KO-Herzen. Weiterhin erbrachten die qPCR-Analysen zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der mRNA Menge von *Ppargc1b* in den iCMAKT1/2 KO-Herzen verglichen mit WT-Herzen mit. Die qPCR-Messungen für *Tfam* zeigten eine transiente Abnahme der Transkription an Tag 15/16 in den iCMAKT1/2 KO-Herzen, konnten die Herunterregulation zum Zeitpunkt Tag 21 in den Mikroarray-Analysen allerdings nicht bestätigen (Abb. 15 B).

Abschließend zeigten die Mikroarray-Daten Transkriptomveränderungen der Transkriptionskoaktivatoren, die durch qPCR-Messungen reproduzierbar waren.

Gene/Messzeitpunkte	Tag 10	Tag 21
<b><i>Ppargc1a</i></b>	↔	↔
<b><i>Ppargc1b</i></b>	↔	0,53*
<b><i>Tfam</i></b>	↔	0,68*
		*: p<0,05

**Tabelle 17: Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse mitochondrialer Transkriptions(ko)aktivatoren in Herzgewebe**

*Die Transkription der Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  und des Transkriptionsfaktors TFAM wurde in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und WT Mäusen mittels Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse an den Tagen 10 und 21 nach 1. Txf-Applikation verglichen. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression der iCMAKT1/2 KO-Mäuse bezogen auf die Werte der WT Mäuse. An Tag 10 finden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, während an Tag 21 die mRNA-Menge der Transkriptionsfaktoren PGC-1 $\beta$  und TFAM in iCMAKT1/2 KO-Herzen signifikant geringer ist als in WT Herzen. Mit Genehmigung durch S. Gödecke.*



**Abb. 15: Transkription von *Ppargc1a*, *Ppargc1b* und *Tfam* in Herzgewebe**

Die Transkription der Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha$  und PGC-1 $\beta$  (A) sowie des Transkriptionsfaktors TFAM (B) in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 10/11, 14/15 und 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Kontroll-Mäusen (schwarze Symbole) verglichen. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 10/11 wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung gewählt. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt (n= 4). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse: \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001.

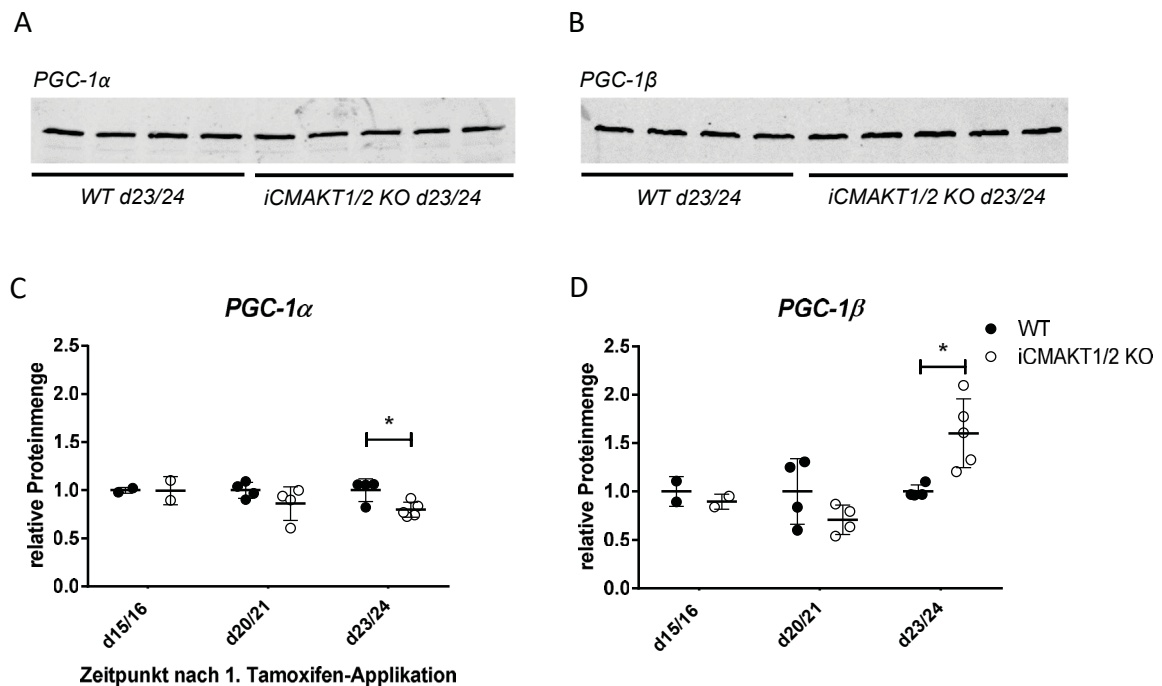
#### 4.4.2 Analyse der Proteinmenge mitochondrialer Transkriptionskoaktivatoren mittels Western Blot

Zwar unterschieden sich die PGC-Transkriptionskoaktivatoren in der Expressionsanalyse in Teilen bezüglich der mRNA-Menge zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Mäusen. Doch korreliert die mRNA Menge nicht zwangsläufig mit einer vergleichbaren Proteinmenge. Um Unterschiede auf Proteinniveau nachzuweisen, wurden Herzextrakte von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und WT-Kontroll-Mäusen hinsichtlich des Proteingehalts an PGC-1 Transkriptionskoaktivatoren zu drei Zeitpunkten (Tag 15/16, 20/21 und 23/24 nach erster Txf-Injektion) in Western Blot Analysen verglichen (Abb. 16). Die Untersuchung zeigte erst an Tag 23/24 eine signifikante Änderung in der Proteinmenge der Transkriptionskoaktivatoren. Für PGC-1 $\alpha$  war zwar eine Tendenz abnehmender Proteinmenge in iCMAKT1/2 KO-Proben am Tag 20/21 messbar. Im Vergleich zu den WT-Herzextrakten zeigte sich jedoch erst zum Zeitpunkt Tag 23/24 eine signifikante Reduktion um 20%. Die Proteinmenge des Transkriptionskoaktivators PGC-1 $\beta$  zeigte eine entgegengesetzte Entwicklung. An Tag 23/24 konnte in



## Ergebnisse

den iCMAKT1/2 KO-Herzextrakten eine signifikante Zunahme der PGC-1 $\beta$  Proteinmenge um 60% nachgewiesen werden.



**Abb. 16: Quantifizierung der Proteinmenge der PGC-1-Transkriptionskoaktivatoren mittels Western Blot**

Die Proteinmenge von PGC-1 $\alpha$  (A) und PGC-1 $\beta$  (B) im Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und WT-Kontroll-Mäusen wurde mittels Western Blot Analysen verglichen. Herzextrakte der Zeitpunkte Tag 15/16, 20/21 und 23/24 nach erster Txf-Injektion wurden untersucht. Die WT-Kontrollgruppen (schwarz) wurden zum jeweiligen Zeitpunkt als Referenzpunkt (1,0) zur Normierung der verglichenen iCMAKT1/2 KO-Gruppe (weiß) gewählt. Pro Gruppe wurden n=2-5 Tiere gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Ungepaarter T-Test: \*:  $p < 0.05$



### 4.4.3 Transkriptionsanalyse kernkodierter mitochondrialer Gene

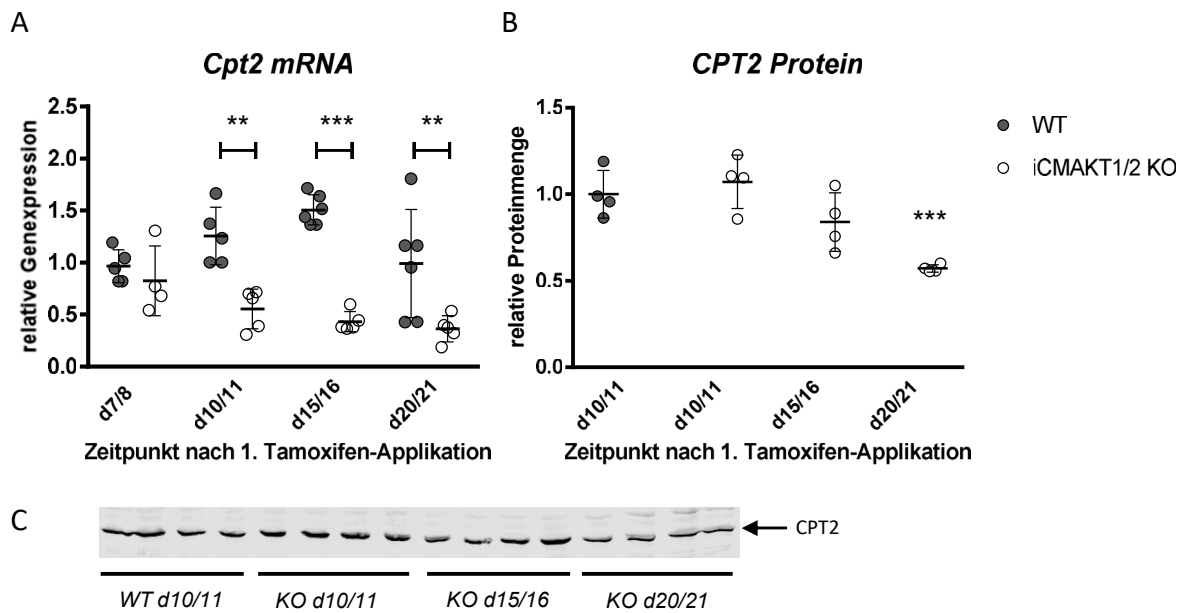
Durch Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse zu den Zeitpunkten 10 und 21 Tage nach erster Txf-Applikation wurde eine Herunterregulation zahlreicher kernkodierter mitochondrialer Gene in iCMAKT1/2 KO Herzen an Tag 21 gezeigt, während die Genexpression an Tag 10 weitgehend unverändert war (Goedecke et al., 2017).

Zur Überprüfung der festgestellten Transkriptionsveränderungen kernkodierter mitochondrialer Gene wurde in dieser Arbeit exemplarisch die Transkription der *Carnitin-O-Palmitoyltransferase 2 (Cpt2)* mittels qPCR in einer unabhängigen experimentellen Serie untersucht (Abb. 17). Für die CPT2 wurden in Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen an Tag 10 eine nicht signifikante Reduktion der relativen Genexpression im KO verglichen mit dem WT um das 1,42-fache und an Tag 21 eine signifikante Reduktion um das 4,95-fache nachgewiesen (Goedecke et al., 2017). In der unabhängigen experimentellen Serie wurde die Transkriptionsanalyse um die Zeitpunkte Tag 7/8 und Tag 15/16 ergänzt (Abb. 17 A).

Die qPCR-Messungen konnten eine signifikant verminderte Transkription von *Cpt2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen an Tag 10/11 und 20/21 bestätigen (vgl. Abb. 17 A). Zum Untersuchungszeitpunkt Tag 7/8 zeigten sich keine Expressionsunterschiede zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzgewebe. Zusätzlich wurde eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge an Tag 15/16 in iCMAKT1/2 KO-Herzen gezeigt. Weder zwischen den iCMAKT1/2 KO- noch zwischen den WT-Gruppen konnte eine signifikante Interaktion nachgewiesen werden. Zusammenfassend ergibt sich ab Tag 10/11 eine kontinuierliche Reduktion der Transkription von *Cpt2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen.

Um zu beantworten, ob diese Änderung auf mRNA Ebene auch zu Änderungen der Proteinmenge führt, wurden iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzextrakte hinsichtlich ihres Proteingehalts an CPT2 in Western Blot Analysen verglichen (Abb. 17 B, C). Die Proteinmenge aus WT-Herzextrakten zum Zeitpunkt Tag 10/11 diente als Referenzpunkt des Vergleichs. Während sich die CPT2 Proteinmenge an Tag 10/11 in iCMAKT1/2 KO-Herzen nicht von der WT-Kontrollgruppe unterschied, deutete sich eine Abnahme zum Zeitpunkt Tag 15/16 an. An Tag 20/21 war die Proteinmenge schließlich signifikant um den Faktor  $0,57 \pm 0,02$  gegenüber der Referenz reduziert.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass eine frühzeitig einsetzende Reduktion der Transkription von *Cpt2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen in einer verzögerten Abnahme des mitochondrialen Proteins resultiert.



**Abb. 17: Die AKT1/2 Deletion führt zu einer reduzierten Expression von CPT2**

(A) Die Transkription von *Cpt2* in Herzgewebe von *iCMAKT1/2* KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach der ersten Tx-f-Applikation mit WT-Kontroll-Mäusen (graue Symbole) verglichen. (B, C) Zusätzlich wurde mittels Western Blot Analysen im Herzgewebe von *iCMAKT1/2* KO-Mäusen verglichen mit WT-Kontroll-Mäusen die Proteinmenge von CPT2 zu den Zeitpunkten Tag 10/11, 15/16 und 20/21 bestimmt. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 7/8 (A) bzw. Tag 10/11 (B) wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung angenommen. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt ( $n=4-6$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (A) und ungepaartem T-Test (B): \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

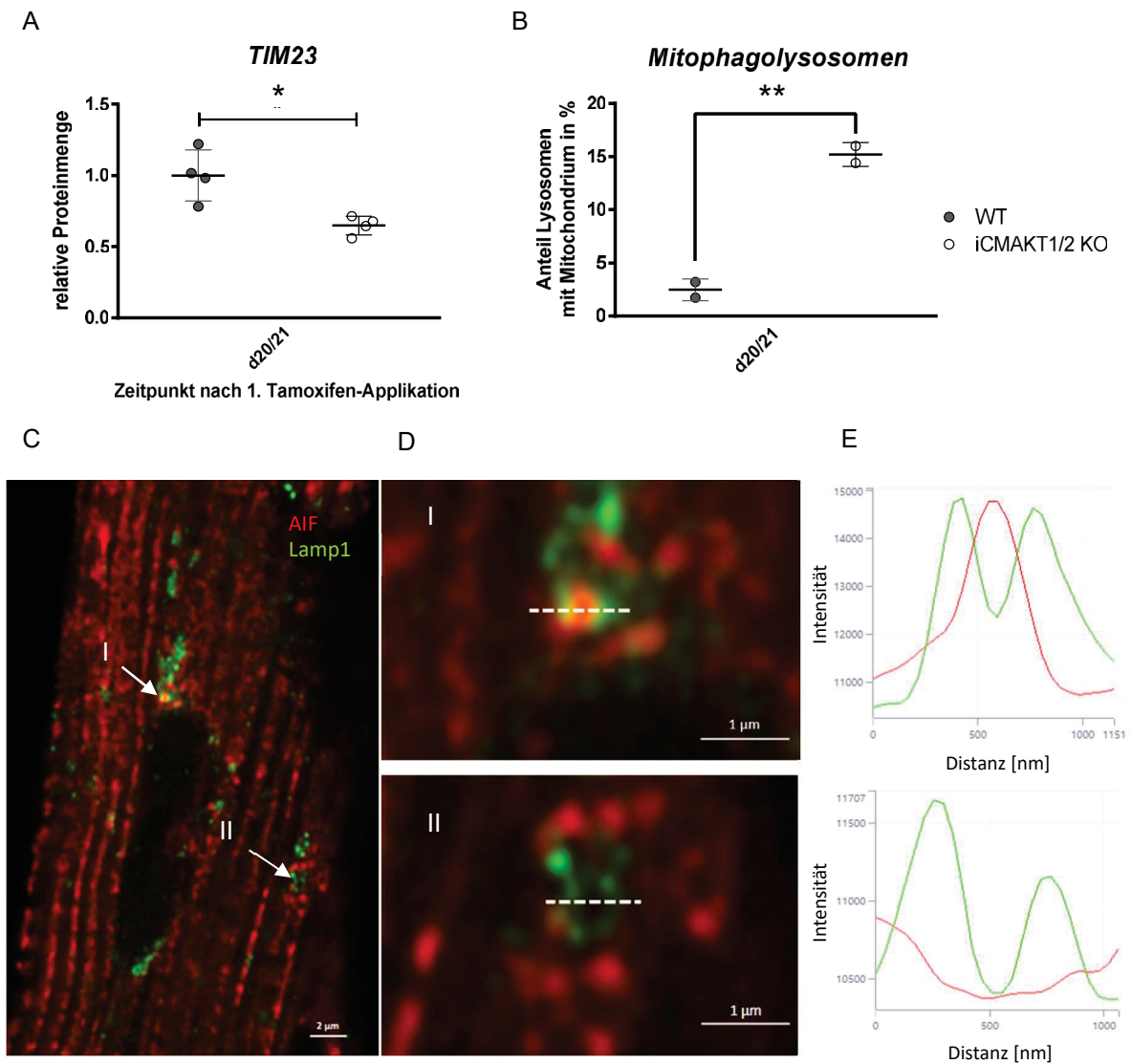
#### 4.4.4 Mitochondriale Masse und Mitophagie in *iCMAKT1/2* Kardiomyozyten

Das Protein TIM23 (*translocase of the inner membrane 23*) ist eine essenzielle Untereinheit des TIM23 Komplexes, der für einen Proteintransport über die innere Mitochondrienmembran verantwortlich ist. TIM23 wurde als Marker für Mitophagie zur Bestimmung der mitochondrialen Masse benutzt (Gao et al., 2020). Am Beispiel von CPT2 hatten wir bereits zeigen können, dass die mitochondriale Enzymausstattung infolge der Gendeletion von AKT1/2 abnimmt. Um einen weiteren Hinweis über den Zustand der mitochondrialen Masse zu erhalten, verglichen wir die Proteinmenge von TIM23 in *iCMAKT1/2* KO- und WT- Herzen an Tag 20/21 durch Western Blot-Analysen. Die Proteinmenge von TIM23 war in *iCMAKT1/2* KO signifikant um ca. 40% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert, was auf eine Abnahme der Mitochondrienmasse hindeuten könnte (Abb. 18 A).

Wir untersuchten isolierte Kardiomyozyten aus *iCMAKT1/2* KO- Herzen verglichen mit WT Kontrollen zum Zeitpunkt Tag 20/21 durch immunhistochemische Kolokalisierung eines mitochondrialen Proteins (AIF) mit einem lysosomalen Protein (LAMP1) wie unter 3.4.5 beschrieben. Die Immunfluoreszenzfärbung der Kardiomyozyten erfolgte mit spezifischen  $\alpha$ -AIF- und  $\alpha$ -LAMP1-Antikörpern. Während sich AIF im mitochondrialen Intermembranraum

befindet, ist LAMP1 ein Bestandteil der Lysosomenmembran. Ein geschädigtes Mitochondrium wird im Rahmen der Mitophagie entfernt, indem es durch ein Autophagosom umhüllt wird, welches anschließend mit einem Lysosomen zu einem sog. Mitophagolysosomen fusioniert. Die Kollokalisierung von AIF und LAMP1 bzw. der Nachweis von AIF innerhalb einer lysosomalen Membran ist folglich ein Hinweis für die Formation eines Mitophagolysosomen.

Mit der Kollokalisierung von AIF und LAMP1 erprobten wir eine bislang nicht vorbeschriebene Methode zum Nachweis von Mitophagolysosomen (Abb. 18 C, D, E). Deshalb wurde zunächst nur eine geringe n-Zahl von 2 iCMAKT1/2 KO und 2 WT Mäusen untersucht. Pro Herz wurden fünf isolierte Kardiomyozyten betrachtet. Es wurden 25 Lysosomen/Zelle zur Auswertung erfasst. Während in den wildtypischen Kardiomyozyten nur etwa  $2,5 \pm 0,7$  % der identifizierten Lysosomen mitochondrialen Inhalt zeigten, wurden in iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten signifikant mehr solcher Lysosomen ( $15,2 \pm 0,8$  %,  $6,15 \times \uparrow$ ) detektiert (Abb. 18 B). Dies kann als eine mögliche Zunahme mitophagischer Aktivität in iCMAKT1/2 KO-Herzen interpretiert werden.



**Abb. 18: Anzeichen für zunehmende Mitophagie in iCMAKT1/2 KO-Herzen**

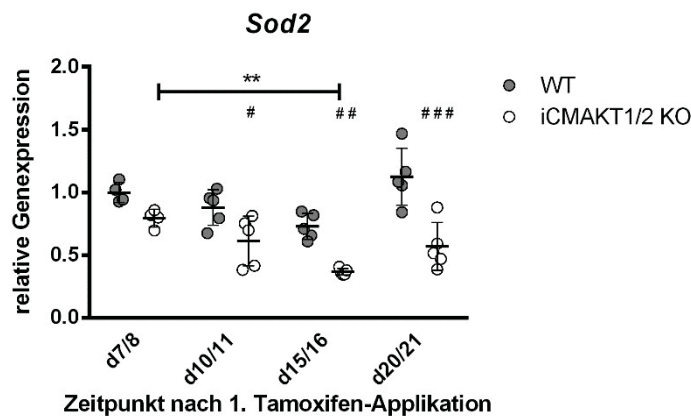
(A) Die Proteinmenge von TIM23 in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Kontroll-Mäusen (graue Symbole) mittels Western Blot Analysen verglichen. Der Wert der Kontrollgruppe wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung angenommen; n=4. (B) In isolierten Kardiomyozyten von iCMAKT1/2 KO-Mäusen und WT-Kontroll-Mäusen wurde an Tag 23/24 der Anteil von Mitophagolysosomen mittels Kolokalisierung von AIF und LAMP1 in der Fluoreszenzmikroskopie verglichen. Pro Gruppe wurden 2 Tiere à 5 Kardiomyozyten à 25 Lysosomen analysiert. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem T-Test: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . (C) In der Übersichtsaufnahme eines Kardiomyozytenausschnitts sind Lysosomen (LAMP1) grün- und Mitochondrien (AIF) rotfluoreszent markiert. (D) Herausvergrößert sind ein Lysosom mit (I) und ein Lysosom ohne AIF-Fluoreszenzsignal im Zentrum (II). (E) Die Signalintensität der Fluoreszenzfärbung über den Querschnitt der ausgewählten lysosomalen Strukturen wird als 2D Profil dargestellt. Die Länge der Maßstabsbalken betragen in (C) 2  $\mu$ m und in (D) 1  $\mu$ m.

#### 4.5 Transkription weiterer Gene in iCMAKT1/2 KO-Herzen

##### 4.5.1 Transkriptionsanalyse von *Sod2* mittels qPCR

Die Mikroarray Daten und die *Ingenuity Pathway* Analyse weisen auf eine verminderte Transkription kernkodierter mitochondrialer Gene, Western Blot Analysen zusätzlich auf die Abnahme mitochondrialer Proteine in iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten hin. In Zusammenschau dieser Untersuchungen ist von dysfunktionalen Mitochondrien in den iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten auszugehen. Eine dysregulierte Transkription von Genen mit Funktion für die oxidative Phosphorylierung, wie in der *Ingenuity Pathway* Analyse gezeigt, könnte in der Folge zu einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*ROS*) und damit zu gesteigertem oxidativen Stress führen (Turrens, 1997). Einen Mechanismus zur Reduktion oxidativen Stresses bietet die mitochondriale Superoxiddismutase 2 (*Sod2*), ein Zielgen des Transkriptionsfaktors FOXO3 in Kardiomyozyten (Kops et al., 2002a). Neben FOXO3 spielt auch PGC1- $\alpha$  eine wichtige Rolle für die Expression von *Sod2* am Herzen (Lu et al., 2010). Anhand *Sod2* sollte untersucht werden, inwiefern der iCMAKT1/2 KO *ROS*-eliminierende Mechanismen beeinflusst.

Mittels qPCR wurde die mRNA von *Sod2* in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzextrakten zu den Zeitpunkten Tag 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 nach erster Txf-Applikation analysiert (Abb. 19). Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von *Sod2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen im Vergleich zu den WT-Kontrollen zu allen Zeitpunkten verringert ist. Ab Tag 10/11 waren die Unterschiede signifikant. Zudem zeigte sich im Zeitverlauf eine signifikante Abnahme der relativen Expression von *Sod2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen. An Tag 15/16 erreichte die Expression ein Minimum ( $0,37 \pm 0,02$ ) und blieb bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt (Tag 20/21) erniedrigt.



**Abb. 19:** Der iCMAKT1/2 KO resultiert in einer reduzierten Transkription von *Sod2* in Herzgewebe

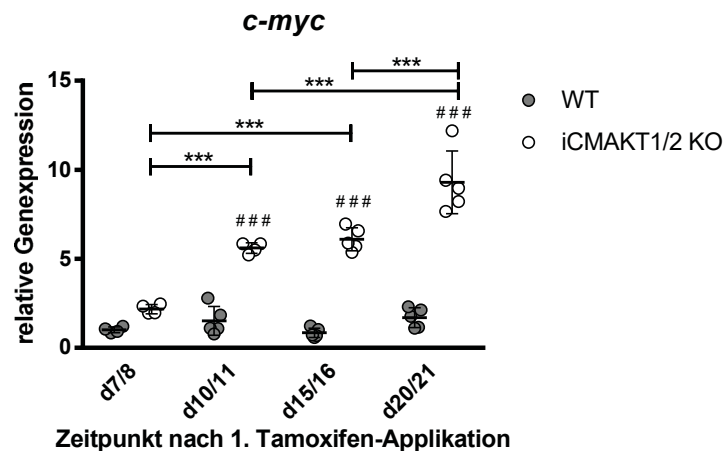
Die Transkription von *Sod2* in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Kontroll-Mäusen (graue Symbole) verglichen. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 7/8 wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung gewählt. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt ( $n=4-5$ ). Für Vergleiche der iCMAKT1/2 KO-Gruppen zwischen verschiedenen Zeitpunkten: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; für Vergleiche zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse.

In der Annahme dysfunktionaler Mitochondrien wird in den iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten signifikant weniger *Sod2* exprimiert, was als ein indirekter Hinweis auf eine Belastung der Herzen durch ROS und damit oxidativen Stress gewertet werden kann.

### 4.5.2 Transkriptionsanalyse von *c-myc* mittels qPCR

Infolge verschiedenster pathologischer Stresssignale wird der Transkriptionsfaktor *c-myc* im Herzen hochreguliert. So wird er im geschädigten bzw. gestressten Herzen vermehrt exprimiert und im Allgemeinen als Marker für pathologische Veränderungen im Myokard angesehen (Izumo et al., 1988, Brand et al., 1992). Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression von *c-myc* als Stressantwort in iCMAKT1/2 KO-Herzen hochreguliert ist.

Um Expressionsveränderungen von *c-myc* in iCMAKT1/2 KO-Herzen zu überprüfen, wurde die mRNA-Menge in iCMAKT1/2 KO- mit WT-Herzgewebe zu den Zeitpunkten 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach erster Txf-Injektion mittels qPCR verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass an allen Untersuchungszeitpunkten die mRNA-Expression von *c-myc* in iCMAKT1/2 KO-Herzen die der WT-Kontrollherzen übersteigt (Abb. 20). An Tag 10/11 ist die Expression erstmals signifikant erhöht. Die Transkription in den iCMAKT1/2 KO-Herzen steigt im Untersuchungszeitraum von Tag 7/8 bis 20/21 stetig. Mit Ausnahme des Vergleichs von Tag 10/11 nach Tag 15/16 ist die Steigerung über die Zeitpunkte hinweg signifikant. Es wird ein Maximum an Tag 20/21 mit einer relativen Expressionssteigerung um das  $9,3 \pm 1,6$ -fache gegenüber der Referenzgruppe erreicht.



**Abb. 20:** Die Deletion von AKT1/2 führt zu einer gesteigerten Transkription von *c-myc* in Herzgewebe

Die Transkription von *c-myc* in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 7/8, 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Kontroll-Mäusen (graue Symbole) verglichen. Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 7/8 wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung angenommen. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt ( $n=4-5$ ). Für Vergleiche der iCMAKT1/2 KO-Gruppen zwischen verschiedenen Zeitpunkten gilt: \*\*\*  $p < 0,001$ ; für Vergleiche zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt gilt: ###:  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse.



### 4.5.3 Transkriptionsanalyse Fibrose-assoziiierter Gene mittels qPCR

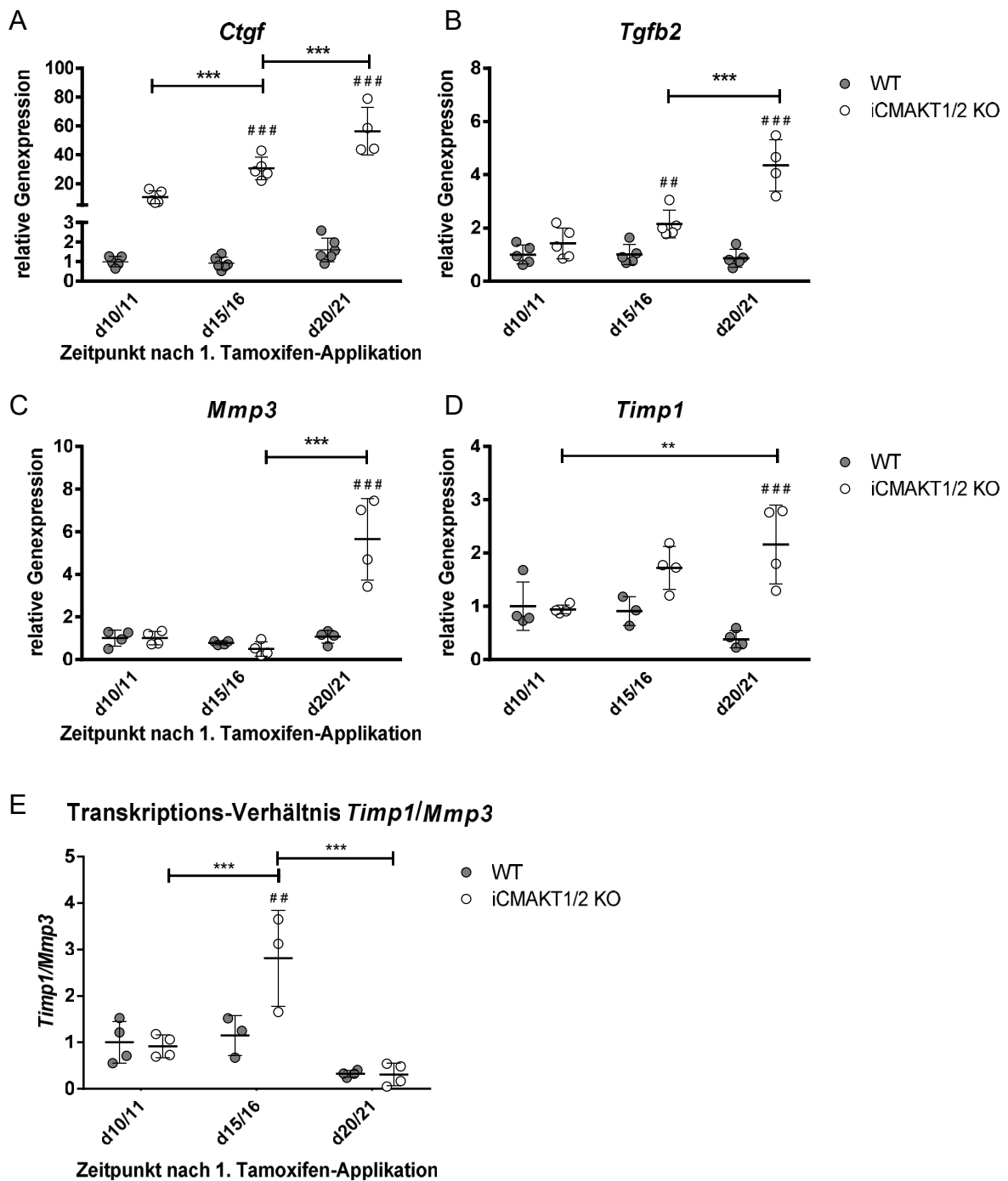
Im Rahmen zunehmender Herzatrophie der iCMAKT1/2 KO-Mäuse wurden histologisch und echokardiographisch abnehmende Dicken der LV-Wände gemessen. Das enddiastolische linksventrikuläre Füllungsvolumen (LVEDV) der Herzen blieb jedoch stabil und eine ventrikuläre Dilatation blieb aus (Goedecke et al., 2017). Dieser Gegensatz führte zu der Annahme, dass ein fibrotischer Umbauprozess der Dilatation entgegenwirken könnte. Anhand der *Ingenuity Pathway* Analyse (vgl. Abb. 14, Kapitel 4.4.1) konnte bereits gezeigt werden, dass der *Pathway* „hepatische Fibrose“ signifikant verändert ist. Ca. 25% der hierunter zusammengefassten 183 Gene ist in iCMAKT1/2 KO-Herzen hochreguliert.

Um weitere Anzeichen auf eine zunehmende Fibrosierung des Myokards zu finden, wurde die Transkription von vier Fibrose-assoziierten Genen (*Ctgf*: *Connective tissue growth factor*, *Tgfb2*: *Transforming growth factor beta 2*, *Mmp3*: *Matrix-metalloproteinase 3*, *Timp1*: *Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1*) in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzgewebe zu den Zeitpunkten Tag 10/11, 15/16 und 20/21 nach erster Txf-Applikation mittels qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass die relative Transkription der Gene *Ctgf* ( $30,5 \pm 7,8 \uparrow$ ) und *Tgfb2* ( $2,1 \pm 0,5 \uparrow$ ) bereits zum Zeitpunkt Tag 15/16 in den iCMAKT1/2 KO-Herzen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht war (siehe Abb. 21 A, B). Die Expression von *Ctgf* nahm sogar schon ab Tag 10/11 zu und stieg über die Zeitpunkte stetig. Die Genexpression von *Mmp3* ( $5,6 \pm 1,7 \uparrow$ ) und *Timp1* ( $2,2 \pm 0,6 \uparrow$ ) waren erst zum Zeitpunkt Tag 20/21 signifikant erhöht (Abb. 21 C, D). Für alle Kontrollgruppen ergaben sich keine Änderungen im Vergleich der drei Zeitpunkte.

Um Hinweise auf eine Störung des Gleichgewichts der Protease und des Inhibitors herauszustellen, verglichen wir die Transkriptionsänderungen von *Timp1* und *Mmp3*, indem wir das *Timp1/Mmp3* Verhältnis berechneten (Abb. 21 E). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass insbesondere das Verhältnis des Paares *Timp1/Mmp3* pathogenetische Bedeutung besitzt (Fontani et al., 2014, Letra et al., 2012). Das Verhältnis der Transkription von *Timp1* zu *Mmp3* in iCMAKT1/2 KO Herzen unterschied sich an Tag 10/11 nicht von der wildtypischen Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch im KO ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses am Tag 15/16, gefolgt von einer signifikanten Abnahme am Tag 20/21. Die Änderungen des Verhältnisses innerhalb der WT-Kontrollgruppe über die Zeit waren nicht signifikant. Der Quotient *Timp1/Mmp3* war zum Zeitpunkt Tag 15/16 signifikant erhöht gegenüber den WT-Herzen ( $2,8 \pm 0,8$  vs.  $1,1 \pm 0,4$ ). Diese Entwicklung impliziert eine transiente Dominanz des Transkripts von Proteaseinhibitor gegenüber der Metalloproteinase in iCMAKT1/2 KO-Herzen. Das Gleichgewicht wird anschließend durch eine ausgeprägte Steigerung der Transkription von *Mmp3* wieder hergestellt.

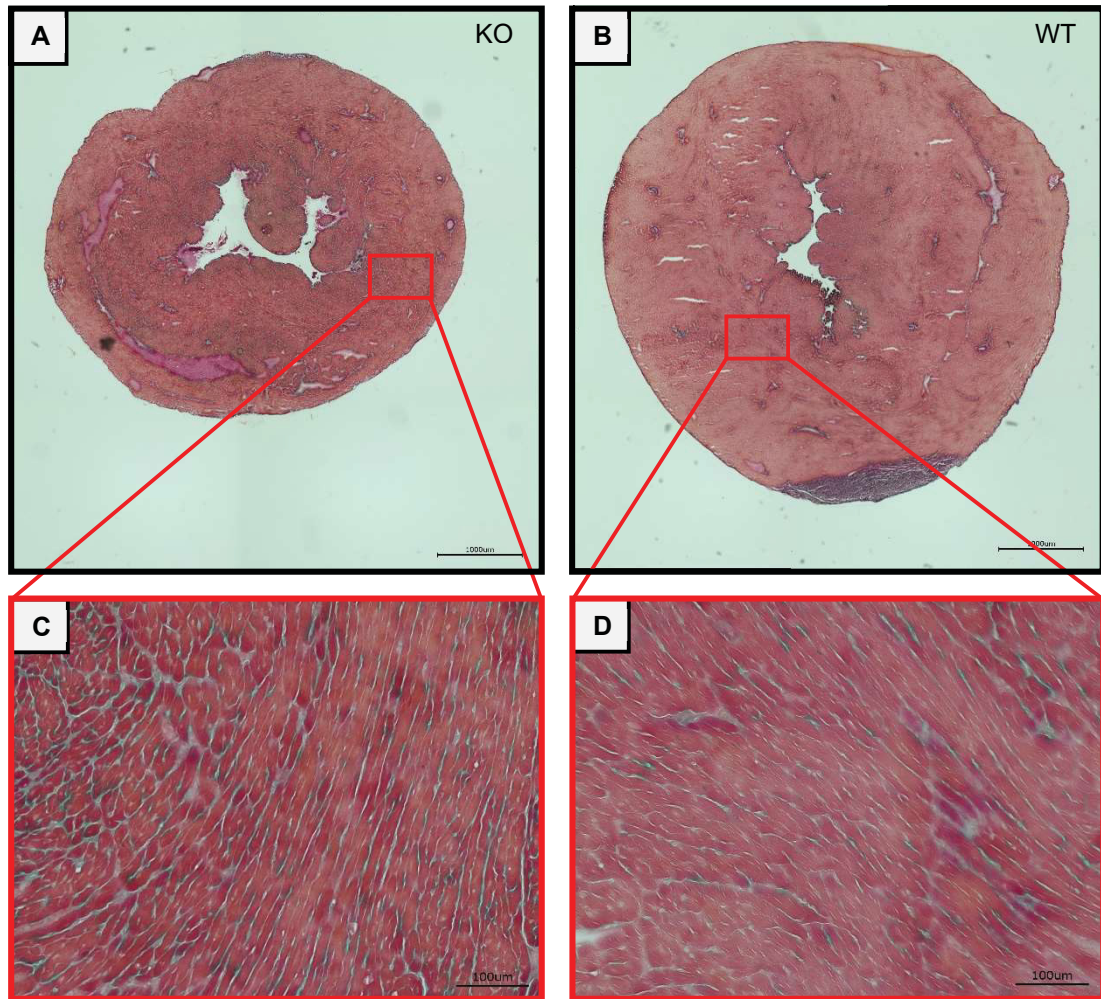
Um mit einer weiteren Methode fibrotische Umbauprozesse untersuchen zu können, wurden Masson Trichrome Färbungen von Herzschnitten der iCMAKT1/2 KO- und WT-Mäuse angefertigt (Abb. 22). Exemplarische Schnittbilder am Tag 20/21 zeigen eine diffuse Färbung, die in iCMAKT1/2 KO-Herzen stärker erscheint und ein Hinweis auf erhöhte Fibrosierung sein könnte. Für eine Quantifizierung ist jedoch eine Erhöhung der n-Zahl und automatisierte Auswertung nötig. Diese Daten zugrunde gelegt, kann der Hinweis auf ein fibrotisches *Remodeling* im Myokard abgeleitet werden, das allerdings erst bei fortgeschrittener Atrophie einsetzt.





**Abb. 21:** AKT1/2 Inaktivierung führt zu einer gesteigerten Transkription Fibrose-assoziiierter Gene in Herzgewebe

Die Transkription Fibrose-assoziiierter Gene (A) *Ctgf*, (B) *Tgfb2*, (C) *Mmp3* und (D) *Timp1* in Herzgewebe von iCMAKT1/2 KO-Mäusen (weiße Symbole) wurde 10/11, 15/16 und 20/21 Tage nach der ersten Txf-Applikation mit WT-Mäusen (schwarze Symbole) verglichen. Außerdem wurde das Verhältnis der Transkription von *Timp1* und *Mmp3* zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt gebildet und zwischen iCMAKT1/2 KO und WT verglichen (E). Der Wert der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 10/11 wurde als Referenzwert (1,0) zur Normierung angenommen. Es sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt (n=4-5). Ausreißer wurden definiert als Werte  $>Q3+1,5 \cdot IQR$  bzw.  $<Q1-1,5 \cdot IQR$  und wurden von der Berechnung ausgenommen (hier max. ein Ausreißer pro Gruppe). Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse. Für Vergleiche der iCMAKT1/2 KO-Gruppen zwischen verschiedenen Zeitpunkten: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; für Vergleiche zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt: ##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ .



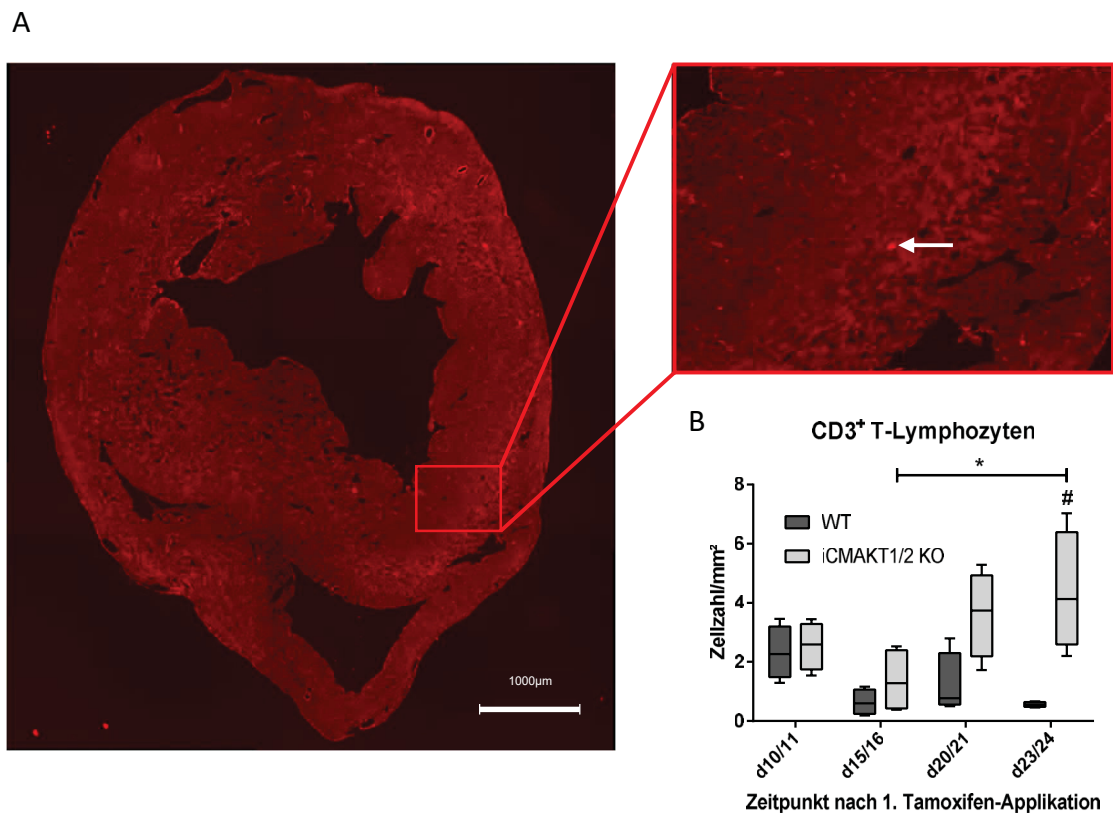
**Abb. 22: Histologische Schnitte von iCMAKT1/2 KO-Herzen zeigen eine intensivere Färbung des Interstitiums nach Masson Trichrome Färbung**

*Exemplarisch sind Querschnitte eines iCMAKT1/2 KO-Herzens (A) und eines WT-Herzens (B) an Tag 20/21 gezeigt. Bei etwa gleicher Schnitthöhe durch die Herzen wird die Atrophie des iCMAKT1/2 KO-Herzens deutlich. Die Detailaufnahmen aus dem jeweils linken Ventrikel zeigen Bereiche rotgefärbter langgestreckter Kardiomyozyten und grün angefärbter extrazellulärer Matrix (C, D). Die Übersichtsaufnahmen (A, B) wurden bei vierfacher, die Detailaufnahmen (C, D) bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 1000 µm (A, B) bzw. 100 µm (C, D).*

#### 4.6 Vergleich der Immunzellzahl in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen

##### 4.6.1 Immunhistochemische Analyse von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Herzen

Nekrose und Apoptose stellen Prozesse dar, die unter Einwirkung von Immunzellen ablaufen und durch Gewebeuntergang zur Atrophie eines Organs beitragen können. Inwieweit die Invasion von Immunzellen den kardialen Phänotyp der iCMAKT1/2 KO-Mäuse mitbedingt, wurde zunächst durch immunhistochemische Analyse von Immunzellen in Herzschnitten untersucht. Zunächst wurden T-Lymphozyten, Zellen des adaptiven Immunsystems, die den Oberflächenrezeptor CD3 tragen, untersucht. Durch manuelle Zählung spezifisch angefärbter CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurde die CD3<sup>+</sup>-Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Herzgewebe zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gewebeschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Abb. 23 zeigt eine beispielhafte immunhistochemische Färbung (A) sowie das Ergebnis der Quantifizierung (B).



**Abb. 23:** Zunahme CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Gewebeschnitten

(A) Die Aufnahme zeigt einen repräsentativen Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitt (8 μm Dicke) eines iCMAKT1/2 KO-Herzens am Tag 23/24 nach erster Txf-Injektion bei 4-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1000 μm. Herausvergrößert ist beispielhaft ein Ausschnitt mit markierter CD3<sup>+</sup> Zelle (weißer Pfeil). (B) Im nebenstehenden Diagramm ist die manuell bestimmte CD3<sup>+</sup>-Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Herzgewebe dargestellt. Zu den Zeitpunkten Tag 10/11, 15/16, 20/21 und 23/24 erfolgte jeweils der Vergleich der CD3<sup>+</sup>-Zellzahl zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Gewebeschnitten. Pro Gruppe wurden n=4 Herzen untersucht. Die iCMAKT1/2 KO- und WT-Gruppen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Man-Whitney-U Tests (#: p<0,05) und über die Zeitpunkte hinweg mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests (\*: p<0,025 korrigiert) verglichen.

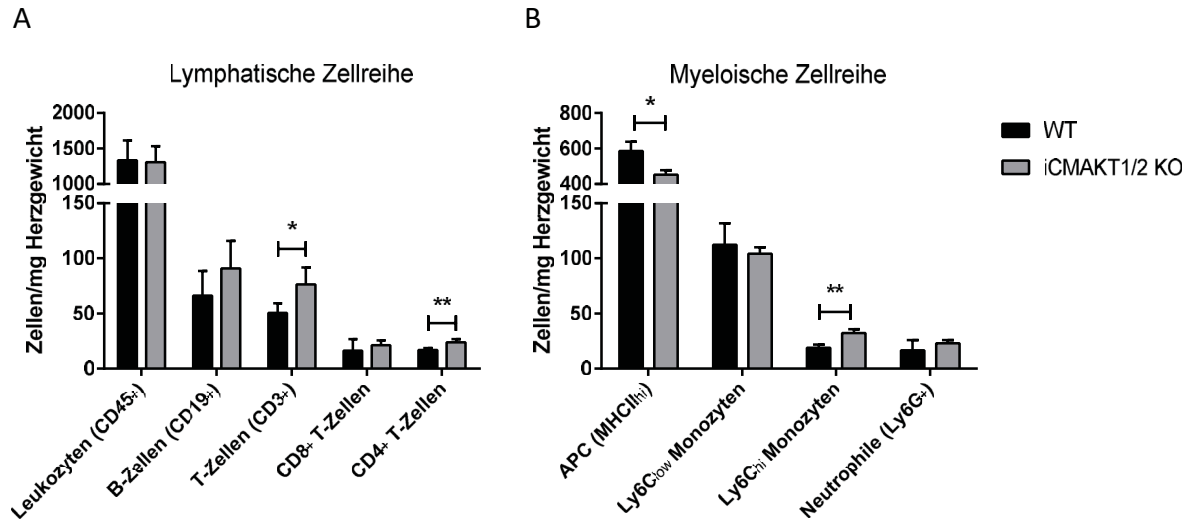
Die geringe CD3<sup>+</sup> Zellzahl variierte bei den WT-Gewebeschnitten nur wenig, und die Änderung im Vergleich der Untersuchungszeitpunkte war nicht signifikant. Dahingegen ergab sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl innerhalb der iCMAKT1/2 KO-Gruppen von Tag 15/16 nach 23/24. Ab Tag 15/16 waren tendenziell mehr CD3<sup>+</sup> Zellen in iCMAKT1/2 KO- als in WT-Gewebeschnitten vorhanden. Zum Zeitpunkt Tag 23/24 konnten signifikant mehr CD3<sup>+</sup> Zellen in den iCMAKT1/2 KO-Gewebeschnitten bestimmt werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Zahl der CD3<sup>+</sup> Zellen im Herzen von iCMAKT1/2 KO-Mäusen zunimmt und die Zahl in der WT-Kontrollgruppe übersteigt.

### 4.6.2 Durchflusszytometrische Analysen von Immunzellen

Der immunhistochemische T-Zell-Nachweis in Herzschnitten hatte erste Hinweise auf eine veränderte Immunzellzahl in iCMAKT1/2 KO-Hezen erbracht. Im Folgenden wurde die Analyse der Immunzellzahl erweitert. Zur Beurteilung immunologischer Vorgänge am Myokard wurden kardinale Immunzellen nach enzymatischer Dissoziation von Herzgewebe via Durchflusszytometrie identifiziert und quantifiziert (in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. R. Nederlof, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die Differenzierung von Subpopulationen erfolgte anhand ausgewählter Oberflächenmarker (vgl. Kapitel 3.6.2) dargestellt. Dabei erfolgte die Gruppierung in Zellen der lymphatischen (A) und der myeloischen (B) Zellreihe (Abb. 24). Basierend auf dem zuvor beschriebenen Experiment konnte angenommen werden, dass Änderungen der Immunzellzahl erst zu späten Untersuchungszeitpunkten zu erwarten sind. Deshalb wurden Herzen von Mäusen 23/24 Tage nach der ersten Txf-Injektion untersucht.

Die Gesamtmenge an Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) unterschied sich zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Mäusen nicht, wohingegen aber Verschiebungen einzelner Subpopulationen zu beobachten waren. Innerhalb der lymphatischen Zellreihe war die T-Zellzahl in iCMAKT1/2 KO-Myokard signifikant erhöht. Weiter wurde unterschieden in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auf dieser Ebene zeigten sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls signifikant erhöht (24±2,2 vs. 17±1,6). Die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen dagegen waren zwar erhöht, jedoch war hier der Unterschied nicht signifikant (p=0,07). Eine ähnliche Tendenz, aber ohne Signifikanz, wies die Population der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) auf. Zur Untersuchung der myeloiden Zellreihe erfolgte die Einteilung in neutrophile Granulozyten (Ly6G<sup>+</sup>), antigenpräsentierende Zellen (APC, MHCII<sub>hi</sub>) und Ly6C<sub>low</sub>-bzw. Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten. Die Anzahl letzterer pro mg Herzgewebe war in iCMAKT1/2 KO-Hezen (32,3±2,9) signifikant höher als in der WT-Vergleichsgruppe (18,8±2,6). Dagegen waren signifikant weniger myeloide APC in iCMAKT1/2 KO-Hezgewebe (454±19,6 vs. 586,5±46,0) nachweisbar. Die Ly6C<sub>low</sub>-Monozytenzahl und die Zahl neutrophiler Granulozyten erschien in den iCMAKT1/2 KO-Hezen und im WT gleich ausgeprägt. Zusammenfassend beruhen die Unterschiede des immunologischen Phänotyps auf Unterschieden in der Zusammensetzung der Subpopulationen, anstatt auf der Gesamtleukozytenzahl. Insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten sind in größerer Zahl und APC in geringerer Menge in den iCMAKT1/2 KO-Hezen an Tag 23/24 vertreten.



**Abb. 24: Durchflusszytometrische Analysen von Immunzellen in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen**

Die Zahl an Immunzellen pro mg Herzgewicht wurde durchflusszytometrisch zwischen iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen zum Zeitpunkt Tag 23/24 nach erster Txf-Injektion verglichen. Durch Färbung mit spezifischen Antikörpern wurde in Subpopulationen differenziert. Eine Gruppierung erfolgte in Zellen der lymphatischen (A) und der myeloischen (B) Zellreihe. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte + Standardabweichungen (n=4-5). Ungepaarter T-Test: \*: p<0,05; \*\*: p<0,01 (iCMAKT1/2 KO vs. WT).



## 5 Diskussion

### 5.1 AKT1/2 Deletion in Kardiomyozyten

Zur Untersuchung der herzspezifischen Funktion der Isoformen AKT1 und AKT2 wurde ein Tamoxifen-induzierbares kardiomyozyten-spezifisches AKT1/2 KO-Mausmodell generiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die induzierte Gendeletion von AKT1/2 in Kardiomyozyten der iCMAKT1/2 KO-Mäuse infolge einer fünfmaligen Txf-Applikation bereits vor der letzten Txf-Gabe in einer beträchtlichen Abnahme der AKT1-Proteinmenge auf  $25\pm 8\%$  bzw. der AKT2-Proteinmenge auf  $29\pm 7\%$  in den Herzen resultierte. Der KO erwies sich über den Untersuchungszeitraum von 20 Tagen als stabil. Trotz der effizienten Reduktion der AKT1/2 Proteinmenge verblieb stets eine Restmenge nachweisbaren AKTs.

Obwohl Kardiomyozyten etwa 70-80% des Herzvolumens ausmachen, repräsentieren sie nur 30-40% der gesamten Zellen im Herzgewebe (Nag, 1980, Vliegen et al., 1991). Nicht-kardiomyozytäre Zelltypen, darunter insbesondere Fibroblasten sowie Endothelzellen, glatte Muskelzellen der Gefäße und Immunzellen, stellen den Großteil der Zellzahl im Herzgewebe dar und gingen wie auch das epikardiale Fettgewebe in die Messungen mit ein. Da die Induktion des KO an die Aktivität des kardiomyozyten-spezifischen Promotors  $\alpha$ -MHC gebunden ist, sind die übrigen Zelltypen nicht von der Gendeletion betroffen. Im Rahmen der Gewebszusammensetzung impliziert das Zellverhältnis im Herzen, dass die Restmenge an AKT1/2 wahrscheinlich auf nicht-kardiomyozytäres AKT zurückzuführen ist. Die relative Restmenge von AKT1/2 korreliert dabei nicht mit dem numerischen Anteil der nicht-kardiomyozytären Zellen. Folglich ist der Gehalt von AKT1/2 in Kardiomyozyten und den anderen Zelltypen nicht gleich, sondern korreliert vermutlich mit der Expressionsstärke von AKT1/2 in den verschiedenen Zelltypen.

Die Western Blot Analysen deuten darüber hinaus an, dass ab Tag 15/16 nach erster Txf-Applikation ein leichter Anstieg der AKT1/2 Proteinmenge erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Herzen bereits atrophisch verändert, sie verlieren an Gewicht und Größe (Goedecke et al., 2017). Das Verhältnis von Kardiomyozytenmasse zu der Masse nicht-kardiomyozytärer Zelltypen verändert sich. Schena et al. (2004) zeigten, dass im Rahmen der Atrophie zwar kein wesentlicher Zellverlust erfolgt und das numerische Verhältnis der Zelltypen sich unwesentlich ändert, doch der Volumenanteil der Zelltypen sich verschiebt. Der tendenzielle Anstieg der AKT1/2 Proteinmenge kann daher ein Effekt des verschobenen Volumenverhältnisses von Kardiomyozyten und nicht-kardiomyozytären Zellen durch die myokardiale Atrophie sein. Der relative Anteil nicht-kardiomyozytären AKTs bezogen auf die Gesamtproteinmenge könnte also zunehmen.

Denkbar ist auch, dass die Proteinmenge an AKT1/2 durch einwandernde Zellen ansteigt. Hierbei ist die Invasion von Immunzellen in Betracht zu ziehen. Durch durchflusszytometrische Analysen konnten wir jedoch zeigen, dass kein Unterschied der Gesamtleukozytenzahl in Relation zum Herzgewicht zwischen wildtypischen und iCMAKT1/2 KO-Heerden messbar war. Eine Zunahme der AKT1/2 Restmenge ist folglich nicht auf einwandernde Immunzellen zurückzuführen.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die induzierte kardiomyozyten-spezifische Gendeletion von AKT1/2 effizient und der KO stabil ist. Eine Restmenge von AKT1/2 stammt wahrscheinlich aus nicht-kardiomyozytären Zellen.

### 5.2 Erhöhte Proteindegradation als Ursache für die kardiale Atrophie

#### 5.2.1 FOXO3 induziert Autophagie in iCMAKT1/2 KO-Herzen

Die beobachtete Atrophie der iCMAKT1/2 KO-Herzen könnte durch eine Abnahme des Zellvolumens aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen Proteinsynthese und Proteindegradation bedingt sein. Die Balance von Proteinsynthese und -abbau kann durch die Prozesse der Autophagie und Proteolyse zugunsten des Abbaus verlagert werden. Diese Arbeit setzt einen Schwerpunkt auf die Bedeutung des Transkriptionsfaktors FOXO3a für die Autophagieinduktion in den Kardiomyozyten als möglichen Mechanismus für die kardiale Atrophie.

Der Mechanismus des nukleozytoplasmatischen Austauschs der FOXO Transkriptionsfaktoren, auch als *Shuttling* bezeichnet, unterliegt im Wesentlichen der Regulation durch den Insulin/IGF1/PI3K/AKT-Signalweg (Jacobs et al., 2003b, Kops and Burgering, 1999). Die AKT-abhängige Phosphorylierung von FOXO3 an zwei Aminosäureresten (T32, S253) resultiert in einem Export des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern und führt zu einer Abnahme dessen transkriptioneller Aktivität (Brunet et al., 1999).

Hier wurde untersucht, ob infolge der Deletion von AKT1/2 in Kardiomyozyten der negativ regulierende Einfluss der Proteinkinase entfällt und eine Änderung der subzellulären Verteilung von FOXO3 eintritt. Anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen immunfluoreszenz-gefärbter Herzschnitte konnte gezeigt werden, dass sich infolge der Gendeletion von AKT1/2 die Verteilung des Transkriptionsfaktors FOXO3 zunehmend vom Zytoplasma in den Nukleus der Kardiomyozyten verschiebt. Auch Singh et al. (2010) konnten das *Shuttling* des Transkriptionsfaktors mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisieren. Sie detektierten mittels eines GFP-FOXO3a Fusionsproteins (GFP, engl.: *green fluorescent protein*) in HeLa Zellen, die zuvor mit spezifischen AKT1- und AKT2-Inhibitoren behandelt wurden, die Translokation von FOXO3 vom Zytoplasma in den Nukleus. Zuvor wurde dies auch für die Isoform FOXO1 gezeigt (Zhao et al., 2004).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Translokation von FOXO3 in den Zellkern mit einer Expressionssteigerung der Autophagie-assoziierten Gene *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Sqstm1/p62* in den iCMAKT1/2 KO-Herzen korreliert. Andere Studien zeigten bisher, dass FOXO1/3 in Kardiomyozyten potente Induktoren der Autophagie darstellen. *In vivo* wurde eine FOXO1/3-abhängige Expressionssteigerung der Gene *Lc3b*, *Bnip3*, *Bnip3/Nix*, *Gabarapl1*, *Ulk1* und *Atg12* nachgewiesen (Sengupta et al., 2009, Schips et al., 2011). Die untersuchten Gene *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Sqstm1/p62* sind essenzielle Mediatoren der Autophagie und wurden als Zielgene von FOXO3 identifiziert (Mammucari et al., 2007, Audesse et al., 2019).

Die induzierte Genexpression und die Kernlokalisierung scheinen allerdings zeitlich versetzt. Die Transkriptionssteigerung der Autophagie-assoziierten Gene *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Sqstm1/p62* erreicht bereits an Tag 10/11 nach der ersten Txf-Applikation ihr Maximum. Erst ab Tag 10/11 ist die Kernlokalisierung von FOXO3 nachweisbar. Zudem ist keine



weitere Transkriptionssteigerung trotz zunehmender Kernlokalisierung nachweisbar. Diese Diskrepanz könnte durch eine geringere Sensitivität des immunhistochemischen Messverfahrens zustande kommen. Durch die höhere Sensitivität detektiert die qPCR Transkriptionsänderungen genauer als die Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisierung des Transkriptionsfaktors zulässt (Sinn et al., 2017). Die Kernlokalisierung von FOXO3 könnte also aufgrund der geringeren Sensitivität der Nachweismethode auch schon früher einsetzen. Denkbar ist jedoch auch, dass möglicherweise nur ein geringer Anteil der FOXO3 Gesamtmenge im Kern notwendig ist, um eine maximale Expression der Zielgene zu bewirken.

Die verschiedenen Regulationsmechanismen von FOXO lassen noch andere mögliche Erklärungen zu. Als eine mögliche posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors gilt die Phosphorylierung durch die AMPK bei Energiemangel. Sie führt zu einer Expressionssteigerung von FOXO Zielgenen, sogar ohne Einfluss auf die Lokalisation des FOXO Transkriptionsfaktors zu nehmen. Die transkriptionelle Aktivität von FOXO könnte also unabhängig vom nukleozytoplasmatischen *Shuttling* durch Regulation der DNA-Bindungsaffinität oder der Stabilität von FOXO moduliert werden (Greer et al., 2007).

Die Aktivität von FOXO wird zwar wesentlich durch posttranslationale Modifikationen moduliert, doch auch die Expression des Transkriptionsfaktors unterliegt Regulationsmechanismen. Durch Energiedepression, vermittelt durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 $\alpha$  (engl.: *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* , HIF-1 $\alpha$ ) bei Hypoxie, E2F-1, p53, und im Rahmen einer positiven Rückkopplung kann die Transkription von FOXO gesteigert werden (Klotz et al., 2015). Sanchez et al. (2012) zeigten in Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen, dass AMPK über eine Expressionssteigerung von FOXO3 Autophagie-assoziierte Gene positiv reguliert. Infolge einer gesteigerten Expression könnte sich insgesamt mehr FOXO Protein in den Kardiomyozyten sowohl zytoplasmatisch wie auch nukleär befinden, sodass das Kern/Zytoplasma-Verhältnis zunächst unverändert bleibt, aber die transkriptionelle Aktivität erhöht ist. Diesen Umstand kann die Fluoreszenzmikroskopie nicht erfassen. Allerdings ist die Transkription von FOXO3a in den Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen an Tag 21 im KO nicht gesteigert (Goedecke et al., 2017).

Denkbar ist auch, dass FOXO3 nicht allein für die Transkriptionszunahme verantwortlich ist. Es sind weitere Faktoren bekannt, die die Transkription der drei untersuchten Autophagie-assoziierten Gene regulieren. So wird zum Beispiel SQSTM1/p62 durch oxidativen Stress, vermittelt durch den Transkriptionsfaktor NRF-2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), induziert (Jain et al., 2010). GABARAPL1 wird außerdem noch durch Estrogen über den Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) exprimiert (Jain et al., 2010, Vernier-Magnin et al., 2005). Die Expression von BNIP3 wird in Kardiomyozyten Hypoxie-induziert durch HIF-1 $\alpha$  und durch den Zellzyklusfaktor E2F-1 moduliert (Bellot et al., 2009, Guo et al., 2001, Yurkova et al., 2008).

Zusammenfassend resultiert der iCMAKT1/2 KO in einer zunehmenden Translokation des Transkriptionsfaktors FOXO3 in den Nukleus. Die Expression der Autophagie-assoziierten Gene *Bnip3*, *Gabarapl1* und *Sqstm1/p62* steigt frühzeitig an. Neben der vermehrten Kernlokalisierung von FOXO3 können andere posttranslationale Modifikationen oder auch eine Expressionssteigerung von FOXO3 selbst die transkriptionelle Aktivität von FOXO3 steigern und die frühzeitige Induktion der Zielgene erklären. Vor dem Hintergrund der Energiedepression, die infolge des iCMAKT1/2 KO zu beobachten ist, könnte FOXO3 im Sinne eines *Rescue*-Programmes eine Steigerung der Autophagie zur Substratbereitstellung

für die Energiegewinnung vermitteln. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Grad der AMPK-spezifischen Phosphorylierung von FOXO3 weiter zu untersuchen.

### 5.2.2 Gestörte Autophagieaktivität in iCMAKT1/2 KO-Herzen

Bekanntlich inhibiert AKT in verschiedenen Zellsystemen via mTOR und ULK1 sowie FOXO die Autophagie (Levine and Kroemer, 2008, Mammucari et al., 2007). Um die Autophagieaktivität in den iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die Autophagieassoziierten Proteine LC3B, SQSTM1/p62 und BNIP3 quantifiziert. Western Blot Analysen zeigten eine Steigerung und Akkumulation der Proteinmenge der drei Autophagiemarker in iCMAKT1/2 KO-Herzen. Diese Entwicklung kann entweder eine gesteigerte Autophagie bedeuten oder aber als Hinweis auf einen gestörten Ablauf der Autophagie gewertet werden.

Die Detektion von LC3 ist eine weit verbreitete Methode zum Monitoring der Autophagie. Durch proteolytische Prozessierung des Vorläuferproteins LC3 entsteht das zytoplasmatische LC3-I. Im Rahmen weiterer posttranslationaler Modifikationen wird LC3-I mit Phosphatidylethanolamin konjugiert. Die Lipid-modifizierte Form LC3-II wird schließlich in die Membran von Autophagosomen rekrutiert (Kabeya et al., 2000). Infolge der Verschmelzung von Lysosom und Autophagosom werden intra-autophagosomale Bestandteile degradiert, darunter auch LC3-II (Tanida et al., 2005). Damit korreliert die Proteinmenge von LC3-II mit der Autophagosomenzahl (Klionsky et al., 2016). LC3 wird in Form verschiedener Isoformen (LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C) mit zellspezifischem Verteilungsmuster exprimiert (He et al., 2003, Shpilka et al., 2011). Für die Beurteilung der Autophagie wird insbesondere die Isoform LC3B nachgewiesen.

In den iCMAKT1/2 KO-Herzen steigt die Proteinmenge von LC3B-I im Vergleich zu wildtypischen Herzen stetig an. Die Menge an LC3B-II erreicht dagegen bereits früh an Tag 7/8 ein Maximum und bleibt gegenüber den WT-Kontrollen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse weisen zunächst einmal darauf hin, dass wahrscheinlich eine Akkumulation von Autophagosomen auftritt. Es lässt keine Aussage über die Effektivität der autophagischen Degradation zu. So kann die Akkumulation von LC3B-II entweder eine Steigerung der Autophagieaktivität oder einen gestörten Autophagieprozess in iCMAKT1/2 KO-Herzen bedeuten. Zwar wird für die Klärung dieser Fragestellung häufig die Proteinmenge von LC3B-I oder das Verhältnis von LC3B-I zu LC3B-II bestimmt. Dieses Vorgehen wird jedoch wegen einer geringeren Sensitivität der Detektion von LC3B-I in Western Blot Analysen nicht empfohlen (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Eine alternative und oft kombinierte Methode zur Bestimmung der Autophagieaktivität ist die Quantifizierung der SQSTM1/p62 Proteinmenge. SQSTM1/p62 markiert als ein Autophagierezeptor ubiquitinylierte Proteine und Zellorganellen zur Degradation. Dabei interagiert SQSTM1/p62 mit Bestandteilen der Autophagiemaschinerie wie LC3 und GABARAPL und vermittelt die Bindung des Substrates an die Autophagosomenmembran (Shvets et al., 2008). SQSTM1/p62 wird im Zuge der Autophagie selbst degradiert. Eine Induktion der Autophagie reduziert folglich dessen Proteinmenge. Umgekehrt steigen die SQSTM1/p62 Level, wenn der Autophagieprozess inhibiert wird (Bjørkøy et al., 2005). Deshalb wird SQSTM1/p62 auch als Marker genutzt, um den Autophagieumsatz im Zusammenhang mit LC3-II zu messen (Aryal et al., 2014, Klionsky et al., 2016). Die Proteinmenge von

SQSTM1/p62 in iCMAKT1/2 KO-Herzen nimmt allerdings nicht ab, sondern akkumuliert. Die Akkumulation von SQSTM1/p62 könnte demnach als Hinweis auf eine attenuierte Autophagie in iCMAKT1/2 KO-Herzen interpretiert werden. Genau wie LC3B wird SQSTM1/p62 aber auch transkriptionell reguliert, was die Interpretation erschweren kann (Mizushima et al., 2010). So wurde für kardiale Proteinopathien eine Expressionssteigerung und ein Anstieg der Proteinmenge von SQSTM1/p62 gezeigt, die mit einer gesteigerten Autophagieaktivität assoziiert waren (Zheng et al., 2011). Auch in den iCMAKT1/2 KO-Herzen zeigten wir sowohl eine Transkriptionssteigerung wie auch einen Anstieg der SQSTM/p62 Proteinmenge. Allerdings steigt die Proteinmenge stärker als die mRNA-Menge. Zusammenfassend deutet die Akkumulation der LC3-II und SQSTM/p62 Proteinmenge auf einen gestörten Ablauf des Autophagieprozesses in den iCMAKT1/2 Herzen hin.

Auch der Anstieg der Proteinmenge von BNIP3 kann Ausdruck höherer autophagischer Aktivität in den iCMAKT1/2 KO-Herzen sein. Insbesondere für die FOXO induzierte Autophagie in Kardiomyozyten ist BNIP3 ein essenzieller Effektor. In FOXO3 überexprimierenden Kardiomyozyten wurde eine Akkumulation von Autophagosomen nachgewiesen. Es wurden zudem Autophagosomen im Prozess der Mitophagie beobachtet. Eine gleichzeitige Deletion von *Bnip3* in den FOXO3 überexprimierenden Kardiomyozyten reduzierte die Zahl an Autophagosomen und bewahrte die Herzen vor Atrophie (Cao et al., 2013). Doch eine Zunahme von BNIP3 kann auch einen gestörten Autophagieprozess bedeuten. In Anwesenheit hoher BNIP3 Mengen, gezeigt in BNIP3 exprimierenden neonatalen Kardiomyozyten von Ratten, konnte zwar eine Akkumulation von Autophagosomen nachgewiesen werden, doch zeigte sich die weitere Prozessierung zu Autophagolysosomen gestört (Ma et al., 2012). In Zusammenschau mit der Zunahme der LC3B-II und SQSTM/p62 Proteinmenge, stützt die Akkumulation von BNIP3, die Hypothese, dass einer anfänglich gesteigerten Autophagieaktivität in den iCMAKT1/2 KO-Herzen eine Störung der Autophagie folgt.

Zur besseren Beurteilung der Autophagieaktivität sollte die Messung der LC3-II, SQSTM/p62 und BNIP3 Proteinmenge um eine weitere unabhängige Methode ergänzt werden (Mizushima et al., 2010). In weiteren sich anschließenden Studien könnte ein sogenannter *LC3 Turnover Assay* unter Verwendung von lysosomalen Inhibitoren durchgeführt werden. Die Bestimmung der LC3-II Proteinmenge in Gegenwart bzw. Abwesenheit von lysosomalen Proteaseinhibitoren ermöglicht eine Differenzierung zwischen gesteigerter Autophagieaktivität und attenuierter Autophagie. Während ein Anstieg der LC3-II Proteinmenge in Anwesenheit von lysosomalen Inhibitoren einen erhöhten Autophagieumsatz bedeutet, zeigen unveränderte LC3-II Mengen, dass bereits eine Blockierung der Autophagie die Degradation einschränkt. Anstelle eines transienten Anstiegs von LC3-II wird damit der lysosomale *Turnover* als ein verlässlicher Marker für die Autophagieaktivität betrachtet (Mizushima and Yoshimori, 2007, Tanida et al., 2005). In FOXO3 überexprimierenden Kardiomyozyten zeigten Schips et al. (2011) neben einem Anstieg der LC3-II Proteinmenge, dass eine Behandlung mit lysosomalen Inhibitoren die Akkumulation der LC3-II Level verstärkt, was eine Aktivierung der Autophagie anstatt eines gestörten Autophagieumsatzes impliziert.

Neben der Autophagie stellt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ein weiteres proteolytisches System dar. Zwar zeigt das UPS in iCMAKT1/2 KO-Herzen ab Tag 14/15 eine deutliche Aktivitätszunahme. Die zelluläre Atrophie ist dann aber schon nahezu maximal. Damit kommt dem UPS vermutlich kein wesentlicher Anteil an der kardialen Atrophie zu (Goedecke et al., 2017).

Es handelt sich im Falle der iCMAKT1/2 KO-Herzen tatsächlich um eine zelluläre Atrophie, da gezeigt werden konnte, dass das Zellvolumen der Kardiomyozyten insbesondere zwischen Tag 7/8 und Tag 14/15 abnimmt und dann nahezu ein Minimum erreicht (Goedecke et al., 2017). Eine Attenuierung der Autophagie ab Tag 14/15 könnte die Erklärung dafür sein, dass die zelluläre Atrophie nicht noch weiter zunimmt. Zwar steigen in diesem Zeitraum auch die Expression FOXO3-induzierter Autophagie-assoziiierter Gene und die angeführten Studien zur kardialen Atrophie durch kardiomyozytäre FOXO3 Überexpression bieten weitere Evidenz für eine gesteigerte Autophagieaktivität. Doch die im Verlauf zunehmende Akkumulation der Proteine LC3-II, SQSTM1/p62 und BNIP3 ist ein Hinweis auf einen gestörten Ablauf der Autophagie in den iCMAKT1/2 KO-Herzen. Abschließend ist zu vermuten, dass in den iCMAKT1/2 KO-Herzen eine anfängliche Steigerung der autophagischen Aktivität gefolgt von einer Akkumulation von Autophagosomen durch attenuierte Autophagie auftritt. Im Verlauf könnte damit eine Bereitstellung von Substraten zur Energiegewinnung durch die Autophagie beeinträchtigt sein. Dies könnte den Energiemangel der iCMAKT1/2 KO-Herzen verstärken.

Um genauere Aussagen zur Aktivität der Autophagie zu treffen, sind weitere Untersuchungen von iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten z.B. mit lysosomalen Proteaseinhibitoren nötig. Ergänzend kann auch eine mikroskopische Beurteilung von Autophagosomen und Lysosomen Aufschluss über die Stadien der Autophagie bringen.

### 5.2.3 Mitophagie in Kardiomyozyten

In dieser Arbeit konnten bisher eine Induktion von Autophagie-assoziierten Genen, Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion und eine dysregulierte Expression von PGC-1 $\beta$  in iCMAKT1/2 KO-Herzen gezeigt werden. Zusammengenommen wird dadurch die Frage aufgeworfen, ob defekte Mitochondrien in den Kardiomyozyten vermehrt durch Mitophagie degradiert werden. Um Hinweise auf möglicherweise stattfindende Mitophagie zu erhalten, wurden zum einen die Proteinmenge von TIM23 bestimmt und zum anderen eine Methode entwickelt, um fluoreszenzmikroskopisch den lysosomalen Abbau von Mitochondrien darzustellen.

Zum Zeitpunkt Tag 20/21 nach Induktion des KOs nahm die relative Proteinmenge von TIM23 in den iCMAKT1/2 KO-Herzen im Vergleich zum WT signifikant ab. Außerdem konnte in isolierten Kardiomyozyten ein signifikant höherer Anteil von Mitophagolysosomen detektiert werden.

Das Protein TIM23, das den Import von Proteinen in die Mitochondrien vermittelt, wurde als Marker für die mitochondriale Masse quantifiziert. Die Abnahme der relativen Proteinmenge von TIM23 in den iCMAKT1/2 KO-Herzen lässt verschiedene Schlussfolgerungen zu. Entweder nimmt die Proteinausstattung der Mitochondrien ab und/oder die Gesamtmasse an Mitochondrien ist reduziert. TIM23 eignet sich als Protein, das in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, besser für den Mitophagienachweis als Proteine der äußeren Membran. Die Degradation der Proteine der äußeren Mitochondrienmembran geschädigter Mitochondrien erfolgt nämlich eher Proteasom-vermittelt als durch die Mitophagie (Yoshii et al., 2011, Ding and Yin, 2012). Allerdings weisen die Mikroarray-mRNA-Expressionsanalysen an Tag 21 auf eine moderat verminderte Transkription von *Tim23* hin (Goedecke et al., 2017).

Für eine Abnahme der Mitochondrienzahl durch gesteigerte mitophagische Aktivität spricht die zuvor nachgewiesene Erhöhung von BNIP3 in iCMAKT1/2 KO-Herzen, welches mit der Mitophagie in Kardiomyozyten assoziiert ist (Quinsay et al., 2010, Hamacher-Brady et al., 2007). Es vermittelt die selektive Autophagie der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums. Als Homodimer interagiert es dabei mit dem auf der Autophagosomenmembran gebundenen LC3 (Hanna et al., 2012). Somit fördert BNIP3 den *Turnover* der Mitochondrien durch Mitophagie (Gustafsson, 2011). Schips et al. (2011) zeigten in kardiomyozytenspezifischen FOXO3 überexprimierenden Herzen einen Anstieg von BNIP3 und detektierten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zunehmend degenerierte sowie in der Mitophagie befindliche Mitochondrien. Eine weitere Arbeit stellte den gleichen Zusammenhang dar (Cao et al., 2013). Allerdings ist dieser Mechanismus nicht auf jedes Atrophiemodell übertragbar. So zeigt eine tumorinduzierte kardiale Atrophie keinen Verlust des Mitochondriengehalts und auch keine Erhöhung von BNIP3 (Lee et al., 2020).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten untersuchten wir die Kolokalisierung von Lysosomen und Mitochondrien, um so Mitophagolysosomen zu detektieren. In isolierten iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten zeigte sich hierbei ein signifikant höherer Anteil markierter Mitophagolysosomen zum Zeitpunkt Tag 20/21 nach Induktion des KOs. Zur Anwendung kam eine bisher nicht beschriebene Methode, bei der das *Lysosomal-associated membrane protein-1* (LAMP1) als Marker für Lysosomen und der *Apoptosis-inducing factor* (AIF) als Marker für Mitochondrien mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung kolokalisiert wurden. LAMP1 ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in der Membran von Lysosomen verankert ist und u.a. die Fusion von Lysosom und Autophagosom reguliert (Eskelinen et al., 2004, Saftig and Klumperman, 2009). AIF ist ein Protein mit enzymatischer Aktivität aus dem mitochondrialen Intermembranraum, das Caspase-unabhängig die Apoptose induzieren kann (Sevrioukova, 2011).

Durch konfokalmikroskopische Stapelaufnahmen konnten lysosomale Strukturen und deren Kolokalisierung mit mitochondrialen Bestandteilen über mehrere Ebenen dargestellt werden. Die Größe von Lysosomen in ventrikulären Myozyten bemisst sich in der langen Achse im Median auf 414 nm (325-598 nm) und in der kurzen Achse im Median auf 320 nm (248-483 nm) (Aston et al., 2017). Der Abstand der Stapelaufnahmen zueinander wurde mit 182 nm an die Größe der Lysosomen angepasst.

Die Methode orientiert sich an anderen Verfahren zum Nachweis von Mitophagie, die für fixierte Zellen die Kolokalisierung von GFP-LC3 markierten Autophagosomen oder LAMP1/2 markierten Lysosomen und mitochondrialen Proteinen wie TOM20 oder COX IV nutzen. Allerdings ist nicht sicher, ob das nachzuweisende AIF wirklich noch im mitochondrialen Intermembranraum verortet ist. AIF kann als Induktor des programmierten Zelltods aus dem Intermembranraum über Membranporen freigesetzt werden, um die Kondensation von Chromatin und Degradation von DNA auf Caspase-unabhängige Weise auszulösen (Sevrioukova, 2011). Freigesetztes AIF könnte folglich in den Lysosomen abgebaut werden. Ein Marker aus der inneren Matrix könnte sich daher besser für den methodischen Nachweis eignen.

Die Kolokalisierung von LAMP1 und AIF stellt eine potenzielle Methode zum Nachweis von Mitophagie dar und könnte als Alternative zu anderen Kolokalisierungsverfahren oder den Einsatz von Mito-/LysoTracker und Elektronenmikroskopie angewandt werden. Die Aussagekraft der angewandten Methode ist durch das Fehlen einer Positivkontrolle jedoch



eingeschränkt. Um die Methode zu etablieren, braucht es den Nachweis, dass Mitophagolysosomen dargestellt werden können. Dafür könnte der Einsatz von Doxorubicin erwogen werden, das seine kardiotoxische Wirkung u.a. durch Induktion der Mitophagie vermittelt (Yin et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde infolge der Gendeletion von *Akt1/2* zwar eine Induktion der Autophagie nachgewiesen, allerdings ist nicht auszuschließen, dass die Autophagieaktivität attenuiert ist. Wenn die Autophagie in den *iCMAKT1/2* KO-Herzen beeinträchtigt ist, könnte es auch zu einem gestörten Ablauf der Mitophagie kommen.

Auch der Transkriptionskoaktivator PGC-1 $\alpha$  nimmt Einfluss auf die Mitophagie. Für PGC-1 $\alpha$  konnte im Skelettmuskel eine regulatorische Rolle für den mitochondrialen *Turnover* gezeigt werden. Ein KO von PGC-1 $\alpha$  resultierte in einem verminderten Mitochondriengehalt und attenuierter Mitophagie (Vainshtein et al., 2015). Die reduzierte Proteinmenge von PGC-1 $\alpha$  in *iCMAKT1/2* KO-Herzen zum Zeitpunkt Tag 23/24 könnte zu einer Störung der Mitophagie beitragen.

Zusammenfassend bleibt ungeklärt, ob die Mitochondrienfunktion durch eine Abnahme der Proteinausstattung und/oder der gesamten Mitochondrien gestört ist. Weiterführende Studien können durch die Kolokalisierung von Autophagosomen und Lysosomen oder die Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen zur Detektion der Mitochondrien in den Kardiomyozyten wichtige Hinweise zur Rolle der Mitophagie in *iCMAKT1/2* KO-Herzen liefern. Auch die Quantifizierung der mtDNA kann weitere Informationen zur Menge der Mitochondrien liefern.

### 5.3 Zelluntergang als Ursache der kardialen Atrophie

#### 5.3.1 Identifizierung unterschiedlicher Immunzellsubpopulationen

Neben der Verminderung des Zellvolumens kann auch eine Abnahme der Zellzahl durch Zelluntergang eine Ursache der kardialen Atrophie des *iCMAKT1/2* KOs sein. Mechanismen wie die Apoptose und Nekrose könnten dazu beitragen. In dieser Arbeit erfolgten daher Untersuchungen zu möglichen Anzeichen für einen vermehrten Zelluntergang. Hierfür wurden FACS Analysen von Immunzellsubpopulationen und die Bestimmung der Expression und der Proteinmenge von BNIP3 durchgeführt.

Bislang ist wenig bekannt über den Einfluss von Zellen des Immunsystems auf den Prozess der kardialen Atrophie. In dieser Arbeit wurden Hinweise auf die Beteiligung immunologischer Vorgänge im späten Stadium der atrophierenden Herzen gefunden. Exemplarische immunhistochemische Analysen von Herzschnitten zeigten in *iCMAKT1/2* KO-Herzen erst ab Tag 20/21 eine Invasion von Immunzellen. Anschließende FACS Analysen wurden deshalb an Tag 23/24 durchgeführt, um möglichst deutliche Veränderungen der Immunzellzahlen zu detektieren.

Die Gesamtzahl der Leukozyten bezogen auf das Herzgewicht blieb unverändert, obwohl das Herzgewicht der *iCMAKT1/2* KO-Herzen abnahm. Insgesamt waren die detektierten Immunzellzahlen in den FACS Untersuchungen der wildtypischen Herzen konform mit den zu erwartenden Relationen der Subpopulationen im ungestressten murinen Herzen (Bönner

et al., 2012). Die Zusammensetzung der Immunzellsubpopulationen zwischen WT und KO variierte jedoch.

Durch immunhistochemische Analyse von Immunzellen in Herzschnitten wurde eine Zunahme von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Herzen ab Tag 20/21 nach erster Txf-Applikation deutlich. Erweiterte Untersuchungen der Immunzellzahl durch FACS Analysen zum Zeitpunkt Tag 23/24 bestätigten dieses Ergebnis. Allerdings war der Faktor, um den die Zellzahl in iCMAKT1/2 KO-Herzen im Vergleich zum WT verändert war, in der immunhistochemischen Untersuchung um ein Vielfaches höher als in den FACS Analysen. Diese Diskrepanz kann in der Ungenauigkeit der immunhistochemischen Methode begründet liegen. Die Zellzahl wurde in einem Querschnitt durch das Herz quantifiziert, sodass nur wenig Gewebe erfasst wurde. Die Zahlen könnten zwischen den Ebenen variieren. Eine FACS-Analyse des gesamten Myokards ermöglicht eine genauere Bestimmung der Zellzahl.

Die Zunahme der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Herzen wurden im Wesentlichen durch CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bestimmt, während sich kein Unterschied der CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl ergab. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten können direkt myokardialen Schaden verursachen, indem sie die Apoptose oder auch die Lyse von Kardiomyozyten induzieren (Ilatovskaya et al., 2019, Varda-Bloom et al., 2000, Woodley et al., 1991). Dass keine CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten das Myokard der iCMAKT1/2 KO-Mäuse infiltrieren, weist darauf hin, dass ein CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten-induzierter Zelltod eine untergeordnete Rolle für die kardiale Atrophie spielt.

Eine T-Zell-Invasion des Herzens wird mit einem negativen Effekt auf die kardiale Funktion in Zusammenhang gebracht. Eine Vielzahl von Studien beschreibt dabei Infektionen, Herztransplantationen, Myokardinfarkte und Herzinsuffizienz als Pathologien, die infolge eines Verlusts der Selbsttoleranz gegenüber myokardialen Antigenen eine Autoimmunität entwickeln und mit einer prognoseverschlechternden Invasion von T-Lymphozyten assoziiert sind (Smith and Allen, 1991, Abbate et al., 2004, Nevers et al., 2015). Eine ähnliche Entwicklung wurde bisher in Hypertrophie-Modellen infolge einer transversen Aortenverengung (engl.: *transverse aortic constriction, TAC*) beobachtet. Durch gezielte Ausschaltung der T-Zellfunktion wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten den Übergang von kompensierter Herzhypertrophie zur Herzinsuffizienz und kontraktile Dysfunktion forcierte. Außerdem war mit einer Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine zunehmende Fibrosierung assoziiert. CD8<sup>+</sup> Lymphozyten waren nicht an diesem Prozess beteiligt. Weiter wurde eine Akkumulation von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) gefunden (Laroumanie et al., 2014). Die Rekrutierung von T-Lymphozyten trug zu einem schädlichen *Remodeling* des linken Ventrikels und zur Progredienz der Herzinsuffizienz bei (Nevers et al., 2015). Obwohl pathologische Hypertrophie und Atrophie augenscheinlich entgegengesetzte Vorgänge sind, gibt es pathophysiologische Gemeinsamkeiten. Dies wird insbesondere ersichtlich durch gleiche fetale Genexpressionsmuster, die während beider Prozesse nachgewiesen wurden (Baskin and Taegtmeyer, 2011). Eine T-Lymphozyten-vermittelte Progression der kardialen Atrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz könnte also in Analogie zum *Remodeling* während der kardialen Hypertrophie stattfinden. In anderen Gewebetypen hingegen wurde ein gegensätzlicher Einfluss von T-Lymphozyten beschrieben. Während tumorinduzierter Kachexie fungieren T-Lymphozyten in der Skelettmuskulatur als Gegenspieler eines Atrophieprozesses (Wang et al., 2008). In den iCMAKT1/2 KO-Herzen jedoch könnte eine Zunahme von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten an Tag 23/24 zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion beitragen.



Nach Deletion von AKT1/2 wurden weiterhin signifikant weniger APC im Myokard nachgewiesen. APC präsentieren Antigene, die zuvor internalisiert wurden, über MHCII Moleküle und vermitteln die Aktivierung von T-Lymphozyten über die Interaktion mit *Toll-like-receptors* (TLR) (Vyas et al., 2008). Eine Myokardschädigung kann dazu führen, dass Herz-spezifische Antigene über APC präsentiert werden und eine CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten vermittelte autoimmune Inflammation induziert wird (Eriksson et al., 2003). Eine Abnahme von APC in iCMAKT1/2 KO-Herzen suggeriert folglich, dass Autoimmunität für die Pathophysiologie der kardialen Atrophie nicht oder nur wenig von Bedeutung ist.

Ferner resultierte der iCMAKT1/2 KO in einer Zunahme von Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten im Herzgewebe. Monozyten gelten als zirkulierende Vorläuferzellen von Makrophagen. Bisher wurden verschiedene Subpopulationen identifiziert. Darunter wird die Gruppe der Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten an Entzündungsherden rekrutiert (Sunderkötter et al., 2004). Auch eine Myokardschädigung ist mit einer Infiltration von Monozyten assoziiert. Insbesondere in der frühen Phase nach einem Myokardinfarkt dominiert die Ly6C<sub>hi</sub>-Subpopulation. Die Funktion dieser Monozyten besteht in der Phagozytose, Proteolyse und Förderung eines inflammatorischen Milieus (Nahrendorf et al., 2007, Hilgendorf et al., 2014a). Ein Anstieg der Ly6C<sub>hi</sub>-Monozyten in iCMAKT1/2 KO-Herzen könnte also als Zeichen einer Inflammation zu werten sein, die möglicherweise als Folge von Myokardschädigung und Zelltod auftritt. Allerdings zeigen sich keine Unterschiede in der Zahl der neutrophilen Granulozyten. So sind es im Wesentlichen Neutrophile, die zum Beispiel in der frühen Postinfarktphase Zelltrümmer beseitigen, aber auch das Ausmaß der Schädigung initial steigern können (Yan et al., 2013). Da die FACS Analysen nur den Tag 23/24 erfassen, könnte eine transiente Infiltration von Neutrophilen bereits wieder abgeklungen sein.

Insgesamt sind die Veränderungen der Immunzelltypen in iCMAKT1/2 KO-Herzen gering ausgeprägt. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein immunologischer Phänotyp den Atrophieprozess maßgeblich beeinflusst. Trotzdem können die in einem späten Stadium einwandernden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten an einer finalen Dekompensation der Herzen beteiligt sein.

Die FACS Analysen zeigen nur eine Momentaufnahme des Zeitpunktes 23/24 Tage nach erster Txf-Applikation. Deshalb bieten sich weiterführende Untersuchungen in früheren Stadien an, um eine Entwicklung der Immunzellinvasion nachvollziehen zu können. Diesbezüglich sollte auch die Rolle regulatorischer T-Zellen miteinbezogen werden, die nicht gesondert quantifiziert wurden und deshalb mit den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erfasst wurden. Interessant ist außerdem, ob eine Deletion von T-Zellen eine Verbesserung der kardialen Funktion in iCMAKT1/2 KO-Mäusen bewirken oder sogar einen lebensverlängernden Effekt haben könnte.

### 5.3.2 Die Bedeutung von BNIP3 für die Induktion des Zelltodes in iCMAKT1/2 KO-Herzen

Das Protein BNIP3 besitzt eine doppelte Funktion im Myokard. Zum einen reguliert es den Zelltod von Kardiomyozyten auf zwei verschiedenen Wegen, denen gemeinsam eine Störung der mitochondrialen Integrität zu Grunde liegt (Gustafsson, 2011). Durch Steigerung der Permeabilität der Mitochondrienmembran verursacht BNIP3 eine mitochondriale Dysfunktion. Dadurch wird der Zelltod entweder mittels Apoptose oder Nekrose herbeigeführt. Dies geschieht durch die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose,

indem BAX/BAK eine Pore formen und die Freisetzung von Cytochrom C bewirken (Kubli et al., 2007). Andererseits kann BNIP3 eine Nekrose durch die Öffnung einer unspezifischen Pore, der mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), in der inneren Mitochondrienmembran induzieren, was in einer Schwellung der Mitochondrien und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran resultiert (Vande Velde et al., 2000). Zum anderen wurde BNIP3 als potenter Induktor der Autophagie in Kardiomyozyten identifiziert (Quinsay et al., 2010, Hamacher-Brady et al., 2007).

Für die iCMAKT1/2 KO-Herzen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *Bnip3*-Transkript und Proteinmenge im Vergleich zu den wildtypischen Herzen zunehmen. Im Hinblick auf die duale Aktivität von BNIP3 in Kardiomyozyten sind verschiedene Schlussfolgerungen denkbar. Zum einen kann der Anstieg von BNIP3 Protein im Sinne der proapoptotischen Funktion einen gesteigerten kontrollierten Zelltod bedeuten. Ebenso lässt das Ergebnis die Vermutung zu, dass ein vermehrter Zelluntergang durch Nekrose resultieren könnte.

In neonatalen Mäuseherzen wurde gezeigt, dass die Überexpression von BNIP3 die Apoptoserate der Kardiomyozyten erhöht (Diwan et al., 2007). Cao et al. (2013) hingegen untersuchten gezielt die Rolle von BNIP3 für die kardiale Atrophie in adulten Herzen durch Expression einer konstitutiv-aktiven Form von FOXO3. Sie konnten trotz einer FOXO3 induzierten Expressionssteigerung von BNIP3 keine Hinweise auf einen gesteigerten apoptotischen Zelltod finden. Bislang konnte im Atrophieprozess des adulten Herzens keine Reduktion der Zellzahl als Ursache für die Abnahme der kardialen Masse identifizieren werden (Skena et al., 2004). Auch eine induzierte FOXO1/3 Überexpression zeigt keine vermehrte apoptotische Aktivität in Kardiomyozyten (Sengupta et al., 2009, Skurk et al., 2005).

Während die Apoptose insbesondere im embryonalen Herzen eine Rolle spielt, besitzt sie im adulten Herzen keinen wesentlichen Stellenwert (Knaapen et al., 2001). Dies hängt damit zusammen, dass zahlreiche proapoptotische Proteine postnatal im murinen Herzen herunterreguliert werden. So ist auch die Expression der Effektorcaspase Caspase-3 in adulten Herzen der Maus gering bis kaum vorhanden und es ist praktisch keine Caspase-3-Aktivität nachweisbar (Khalil et al., 2012, Shi et al., 2012). Dementsprechend konnte auch in den Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen an Tag 21 kein Hinweis auf eine Induktion der Caspase-3 gefunden werden (Goedecke et al., 2017).

Um genauer zu untersuchen, ob die Apoptose eine Rolle in den iCMAKT1/2 KO-Herzen spielt, könnte die *TUNEL*-Methode (*TUNEL Assay*) angewandt werden. Eine wesentliche Relevanz der Apoptose für die Atrophie infolge der Gendeletion von AKT1/2 ist jedoch aus oben genannten Gründen eher unwahrscheinlich.

### 5.4 Eingeschränkte Mitochondrienfunktion als Ursache atrophierender Herzen

#### 5.4.1 Energiedepletion durch mitochondriale Dysfunktion

Ursächlich für die kardiale Atrophie kann eine verminderte Proteinneusynthese sein. Der Grund dafür könnte wiederum ein Energiemangel der Zellen aufgrund einer eingeschränkten Mitochondrienfunktion sein. Vor diesem Hintergrund erfolgten Untersuchungen des Schlüsselenzyms der Oxidation langkettiger Fettsäuren CPT2, der Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha/\beta$  und der mitochondrial lokalisierten SOD2 in Kardiomyozyten.

### 5.4.2 Störung der Oxidation langkettiger Fettsäuren

Im Vorfeld hatten sich Hinweise auf eine gestörte Mitochondrienfunktion der iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten gefunden. Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen an Tag 21 nach erster Txf-Applikation und die darauf basierende *Ingenuity Pathway* Analyse zeigten eine signifikant reduzierte Expression zahlreicher mitochondrialer Gene, deren Produkte unterschiedliche zentrale Schaltstellen des mitochondrialen Stoffwechsels darstellen, vorzugsweise für die oxidative Phosphorylierung und die Fettsäureoxidation. Insbesondere zeigten isolierte Mitochondrien eine Einschränkung in der Palmitatverwertung. Funktionelle Messungen hatten zudem eine beeinträchtigte respiratorische Mitochondrienfunktion gezeigt (Goedecke et al., 2017).

Zur Validierung der Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen wurde exemplarisch die Expression von *Cpt2* mittels qPCR untersucht (vgl. Kapitel 4.4.3). CPT2 gilt als Schlüsselenzym für die Oxidation langkettiger Fettsäuren. In den qPCR Messungen konnte die in Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen reduzierte Expression von *Cpt2* in unabhängigen iCMAKT1/2 KO- Herzen nachgewiesen werden. Eine Expressionsänderung bedeutet nicht zwangsläufig eine gleichzeitige oder gleichsinnige Entwicklung der Proteinmenge. Insbesondere mitochondriale Proteine im Herzen weisen eine lange Halbwertszeit auf (Chan et al., 2015). Der verminderten Transkription von *Cpt2* in iCMAKT1/2 KO- Herzen folgte jedoch auch in Western Blot Analysen eine zeitversetzte Reduktion der Proteinmenge.

Die Reduktion der Transkription und der Proteinmenge von *Cpt2* könnte also eine Ursache für die beobachtete mitochondriale Dysfunktion sein. Die CPT2 ist in ihrer Expression durch PGC-1 $\alpha$  reguliert (Arany et al., 2005). Eine verminderte Aktivität des Transkriptionskoaktivators könnte die Ursache der Expressionsminderung der CPT2 sein.

### 5.4.3 Die Rolle von PGC-1 für die mitochondriale Dysfunktion

Die Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha/\beta$  und ihr Effektor TFAM gelten als zentrale Regulatoren der mitochondrialen Biogenese und Energiehomöostase und unterliegen der Kontrolle von AKT. AKT fungiert als Inhibitor von PGC-1 $\alpha$  durch direkte Phosphorylierung des Koaktivators (Li et al., 2007). Durch die Deletion von AKT1/2 könnte eine Disinhibition von PGC-1 $\alpha$  und folglich eine gesteigerte mitochondriale Genexpression und Biogenese zu erwarten sein. Tatsächlich ergeben sich allerdings Hinweise auf eine gestörte mitochondriale Funktion und verminderte mitochondriale Genexpression (vgl. Kapitel 5.4.1). In diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass der iCMAKT1/2 KO zu Transkriptionsänderungen der Transkriptionskoaktivatoren PGC-1 $\alpha/\beta$  und des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM sowie zu Verschiebungen der Proteinmenge von PGC-1 $\alpha/\beta$  führt (vgl. Kapitel 4.4.1 und 4.4.2).

Die Transkription und die Proteinmenge von PGC-1 $\alpha$  in den iCMAKT1/2 KO- Herzen waren vermindert. Während qPCR- und Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen für die Transkription von *Ppargc1a* nur eine tendenzielle Herunterregulation zeigten, konnte eine signifikante Abnahme der PGC-1 $\alpha$  Proteinmenge an Tag 23/24 nachgewiesen werden. Der zunehmende Einfluss der FOXO3 Aktivität infolge einer Deletion von AKT1/2 lässt eigentlich eine Expressionssteigerung von PGC-1 $\alpha$  erwarten. FOXO3 bindet nämlich den Promoter von *Ppargc1a* und dient als positiver Regulator der Transkription von PGC-1 $\alpha$  (Olmos et al.,

2009, Borniquel et al., 2010). Während zahlreiche Mechanismen zur Expressionssteigerung von PGC-1 $\alpha$  berichtet sind, insbesondere via p38MAPK und AMPK, sind bislang nur wenige zur negativen Regulation der *Ppargc1a*-Promoteraktivität bekannt (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011). Eine Methylierung des Promoters durch die DNA-Methyltransferase 3B (DNMT3B) beispielsweise reduziert die Transkription von *Ppargc1a* (Barrès et al., 2009). Relevanter für den AKT1/2 KO scheint der Zusammenhang zwischen p53 und PGC-1 $\alpha$ . Infolge der AKT1/2 Deletion entfällt die aktivierende Phosphorylierung von Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) durch AKT, wodurch der Eintritt von Mdm2 in den Nukleus und die Ubiquitylierung von p53 ausbleiben (Mayo and Donner, 2001). Eine erhöhte Aktivität von p53 könnte dann zu einer reduzierten Transkription von *Ppargc1a* und mitochondrialer Dysfunktion führen (Li et al., 2020).

Zwar ist die Menge von PGC-1 $\alpha$  im iCMAKT1/2 KO nur moderat vermindert, nichtsdestotrotz ist eine stärker veränderte PGC-1 $\alpha$  Aktivität nicht ausgeschlossen. Eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen regulieren die Aktivität und Stabilität des Koaktivators. Als Folge des Wegfalls der inhibitorischen Phosphorylierung von PGC-1 $\alpha$  durch AKT ist mit einer Steigerung der mitochondrialen Genexpression zu rechnen. Dieser Effekt ist sogar unabhängig vom Proteinlevel von PGC-1 $\alpha$ . Jedoch zeigten die Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen eine globale Abnahme der Expression mitochondrialer Zielgene von PGC-1 (vgl. Kapitel 4.4.3). Weitere posttranslationale Modifikationen an PGC-1 $\alpha$  können die Ursache der verminderten mitochondrialen Genexpression sein. So kann die Proteinmenge von PGC-1 $\alpha$  beispielsweise durch eine verkürzte Halbwertszeit und proteolytische Spaltung reduziert werden. Durch ausbleibenden negativ regulierenden Einfluss von AKT1/2 könnte die GSK-3 $\beta$  vermehrt zur Phosphorylierung von PGC-1 $\alpha$  beitragen. Diese Phosphorylierung stellt eine Markierung für eine E3 Ubiquitinligase dar, die PGC-1 $\alpha$  der proteasomalen Degradation zuführt (Olson et al., 2008). Die Reduktion der PGC-1 $\alpha$  Proteinmenge könnte schließlich zu der Abnahme der mitochondrialen Proteine und der mitochondrialen Dysfunktion beitragen.

Die Rolle von PGC-1 $\alpha/\beta$  für die kardiale Atrophie ist in der Literatur bislang wenig beschrieben. In einem murinen Atrophiemodell infolge hämodynamischer Entlastung des Herzens untersuchten die Autoren die kernkodierte mitochondriale Genexpression. Sie zeigten, dass insbesondere die Expression von Komplexen der Atmungskette reduziert war und begründeten dies mit einer verminderten Aktivität von PGC-1 $\alpha$  (Bugger et al., 2006). Analog könnte die beeinträchtigte Funktion von PGC-1 $\alpha$  der Mechanismus zur Auslösung der mitochondrialen Dysfunktion und des Energiemangels in iCMAKT1/2 KO-Herzen sein. Es muss allerdings bedacht werden, dass in den hier verglichenen Atrophiemodellen zwei grundlegend unterschiedliche Stimuli den Atrophieprozess bedingen. Folglich müssen nicht zwangsläufig die gleichen molekularen Mechanismen für den jeweiligen Atrophievorgang eine Rolle spielen.

In zwei weiteren murinen kardialen Atrophiemodellen wurden Hinweise dafür gefunden, dass PGC-1 $\alpha$  keine führende Rolle während des Atrophievorgangs einnimmt. Zum einen findet in murinen Kardiomyozyten während tumorinduzierter kardialer Atrophie bei unveränderter PGC-1 $\alpha$  Proteinmenge keine mitochondriale Biogenese statt (Lee et al., 2020). Und zum anderen konnten in FOXO3 überexprimierenden Kardiomyozyten trotz reduzierter Expression von Proteinen der mitochondrialen Biogenese und des mitochondrialen Stoffwechsels keine Veränderungen von PGC-1 $\alpha$  festgestellt werden (Schips et al., 2011). Es werden allerdings keine Angaben dazu gemacht, ob die Transkription oder die

Proteinspiegel untersucht wurden und zu welchem Zeitpunkt. Die Änderungen der PGC-1 Proteinmengen müssen somit nicht zwangsläufig der entscheidende Auslöser für eine einsetzende mitochondriale Dysfunktion in den iCMAKT1/2 KO-Kardiomyozyten sein.

Darüber hinaus ergeben sich erst an Tag 23/24 nach erster Txf-Applikation signifikante Verschiebungen der Proteinlevel der PGC-1 Isoformen. Die mitochondriale Dysfunktion und Energiedepression der iCMAKT1/2 KO-Herzen tritt allerdings schon an Tag 15 in Erscheinung, früher als die nachgewiesenen Veränderungen der PGC-1 $\alpha/\beta$  Proteinmenge.

Die Transkriptionsverminderung von *Ppargc1b* in den Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen waren in unabhängigen Analysen mittels qPCR nachweisbar. Die Mikroarray Daten hatten eine Reduktion der mRNA Menge von PGC-1 $\beta$  an Tag 21 nach erster Txf-Applikation ergeben. qPCR Analysen detektierten sogar eine signifikante Abnahme der Transkription ab Tag 10/11. Während die Transkription von *Ppargc1b* sich als vermindert erwies, stieg die Proteinmenge an Tag 23/24 an. Dass die PGC-1 $\beta$  Proteinmenge zunimmt, kann durch den Atrophieeffekt bedingt sein. Bei einer Abnahme des Kardiomyozytenvolumens steigt der Proteinanteil aus nicht kardiomyozytären Zelltypen an der Gesamtproteinmenge an, sodass erhöhte PGC-1 $\beta$  Proteinmengen gemessen werden könnten. Auch die Relation von *de novo* Synthese und Abbau von PGC-1 $\beta$  könnte von Relevanz sein. So könnte trotz verringerter Neusynthese eine Verlängerung der Halbwertszeit zu anhaltend stabilen Proteinleveln von PGC-1 $\beta$  führen. Die gegensätzliche Entwicklung der Proteinmenge der beiden Isoformen könnte auch in den unterschiedlichen Funktionen der beiden PGC-1 Isoformen begründet liegen. Bekanntlich induzieren die Isoformen kein vollständig redundantes Genprogramm. Es wird angenommen, dass PGC-1 $\beta$  den Erhalt der basalen Mitochondrienfunktion reguliert, wohingegen PGC-1 $\alpha$  die Erhöhung der mitochondrialen Masse vermittelt (Villena, 2015). Während eines Atrophieprozesses, in dem die Autophagie eine zentrale Rolle einnimmt, ist ein Erhalt der Mitochondrien energetisch günstiger, da Ressourcen und Energie für eine *de novo* Synthese von Mitochondrien fehlen. Somit könnte eine Aktivitätssteigerung von PGC-1 $\beta$  bei Energieverarmung einen Erhalt der Mitochondrien sichern.

Posttranslationale Modifikationen könnten eine weitere Ursache der diskrepanten Entwicklung von Transkript und Proteinmenge darstellen. Da es bislang keine Untersuchungen zu der Isoform PGC-1 $\beta$  in kardialen Atrophie modellen gibt, ist eine Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich.

Zusammenfassend finden sich Hinweise für eine Dysregulation von PGC-1 $\alpha/\beta$  in iCMAKT1/2 KO-Herzen, die möglicherweise zur Ausprägung des Phänotyps beiträgt. Es bleibt offen, inwiefern die PGC-1 $\alpha/\beta$  Funktion durch posttranslationale Modifikationen modifiziert wird. Es wäre interessant in über diese Arbeit hinausgehenden weiteren Studien zu untersuchen, ob posttranslationale Modifikationen die Funktion der Transkriptionskoaktivatoren regulieren. Weitere Untersuchungen u.a. zum Phosphorylierungszustand sollten erfolgen, um die Rolle der PGC-1 Kofaktoren für den Atrophievorgang detaillierter zu charakterisieren.

### 5.4.4 Auswirkungen auf das antioxidative System am Beispiel der SOD2

Metabolischer Stress, insbesondere durch eine mitochondriale Dysfunktion, konnte als Auslöser für kardiale Atrophie identifiziert werden (Baskin and Taegtmeyer, 2011, Harvey and Leinwand, 2014). Eine damit verbundene Störung der oxidativen Phosphorylierung wiederum führt zur Bildung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (*mtROS*).



Superoxiddismutasen (SOD) sind wichtige antioxidative Enzyme, indem sie die Umwandlung von reaktiven Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid katalysieren. Die Isoform SOD2 ist in der Mitochondrienmatrix lokalisiert und besitzt daher besondere Bedeutung für die Reduktion mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (Li et al., 2013). In dieser Arbeit wurden anhand von Expressionsanalysen der mitochondrialen *Sod2* Hinweise über den Zustand des mitochondrialen antioxidativen Systems gewonnen.

Wir konnten zeigen, dass signifikant weniger *Sod2* in iCMAKT1/2 KO-Herzen transkribiert wird. Die Transkription ist schon an Tag 10/11 signifikant reduziert und nimmt kontinuierlich ab. Widersprüchlich ist, dass *Sod2* ein Zielgen von FOXO3 ist, bei dessen zunehmender Kernlokalisierung eine Transkriptionssteigerung von *Sod2* zu erwarten gewesen wäre (Kops et al., 2002a). Es wurde insbesondere für Kardiomyozyten gezeigt, dass FOXO3 *Sod2* induziert und in der Folge ROS antagonisiert werden (Sengupta et al., 2011). Doch neben FOXO3 induziert auch PGC-1 $\alpha$  die Expression von *Sod2* (Lu et al., 2010). PGC-1 $\alpha$  und FOXO3 interagieren sogar direkt und regulieren Gene zur Reduktion von oxidativem Stress (Olmos et al., 2009, Sun et al., 2014). Insofern kann eine eingeschränkte Aktivität von PGC-1 $\alpha$  Ursache verminderter *Sod2* Expression sein. Jedoch zeigen sich Transkriptionsänderungen und veränderte Proteinspiegel von PGC-1 in den iCMAKT1/2 KO-Herzen erst zu einem späteren Zeitpunkt.

In weiterführenden Untersuchungen könnte die Proteinmenge von SOD2 quantifiziert werden, da vom Transkript nicht gleichsinnig auf das Proteinlevel geschlossen werden kann und bei langer Halbwertszeit mitochondrialer Proteine eine zeitlich versetzte Abnahme der SOD2 Menge erwartet werden könnte. Die verminderte Transkription von *Sod2* ist nur ein indirekter Hinweis auf eine Belastung der Mitochondrien durch ROS. Deshalb wäre in diesem Zusammenhang auch die Bestimmung der ROS-Last in den Kardiomyozyten interessant, um die Gewichtung des oxidativen Stresses als Stressor einschätzen zu können. Neben SOD2 existieren noch weitere Enzyme mit antioxidativer Funktion, wie z.B. die SOD1, die Katalase, die Glutathionperoxidase und Peroxiredoxine. Um eine genauere Aussage zum Zustand des antioxidativen Systems machen zu können, sind daher weitere Untersuchungen dieser Enzyme notwendig.

Zusammenfassend kann die verminderte Expression von *Sod2* in den iCMAKT1/2 KO-Herzen ein Hinweis für eine verminderten Schutz gegen oxidativen Stress in den Mitochondrien sein.

### 5.5 Die Rolle von c-Myc im atrophierenden Herzen

c-Myc wird unter physiologischen Umständen im adulten Herzen kaum exprimiert, jedoch infolge zahlreicher pathologischer Stimuli hochreguliert (Lee et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-Myc während des Atrophieprozesses in den iCMAKT1/2 KO-Herzen bereits an Tag 7/8 hochreguliert ist und stetig ansteigt.

Eine gesteigerte Expression von c-Myc wurde schon bei kardiomyozytärer Hypertrophie beobachtet (Starksen et al., 1986). Xiao et al. (2001) zeigten, dass c-Myc selbst als Induktor von kardialer Hypertrophie fungiert. Weil die Herzen infolge induzierter c-Myc Expression hypertrophierten, ohne eine Störung der Pumpfunktion zu entwickeln, postulierten sie, dass c-Myc im Rahmen adaptiver Hypertrophie einen potenziellen Reparaturmechanismus darstellen könnte. Übertragen auf den iCMAKT1/2 Doppel-KO könnte die c-Myc

Expressionssteigerung ein möglicher Mechanismus zur Gegenregulation des Atrophievorgangs sein. Gestützt wird diese Hypothese durch eine Studie zur Bedeutung von c-Myc in einem Atrophiemodell. Razeghi et al. (2006b) untersuchten die Expression von c-Myc in Rattenherzen, die infolge heterotoper Herztransplantation atrophierten. Sie zeigten eine zunehmende Aktivität von c-Myc und eine gesteigerte Expression c-Myc regulierter Gene während des atrophischen *Remodelings*. Das induzierte Genprogramm umfasste Transkriptionsregulatoren der Proteinsynthese. Die Autoren schlussfolgerten, dass c-Myc im atrophierenden Herzen als Induktor der Proteinsynthese fungiert und so zur Regeneration von Schäden an der Sarkomerstruktur dienen könnte. Doch eine Induktion von c-Myc im Herzen kann auch zu einer reduzierten Genexpression von Enzymen der Fettsäureoxidation durch Inhibition der PGC-1 $\alpha$  Expression führen (Ahuja et al., 2010). Auf diese Weise könnte die gesteigerte Expression von c-Myc in den iCMAKT1/2 KO-Herzen zur Energieverarmung der Kardiomyozyten beitragen.

Um den Einfluss von c-Myc auf die Proteinsynthese genauer zu beurteilen, wäre weiterführend eine Untersuchung der Effektoren von c-Myc aufschlussreich.

### 5.6 Bedeutung der Atrophie für die Herzfunktion - Hinweise auf fibrotisches *Remodeling*

Die kardiomyozyten-spezifische Gendeletion von AKT1/2 führt zu einer Abnahme myokardialer Masse und Ausdünnung des linken Ventrikels infolge einer Verkleinerung der Kardiomyozyten. Wenn der Kardiomyozytendurchmesser reduziert wird und somit der Wanddurchmesser sinkt, führt dies bei gleichbleibendem Radius zu einer erhöhten Wandspannung, für die das Myokard vermehrt Energie aufwenden muss. Der iCMAKT1/2 KO resultiert allerdings in einem Energiemangel für die Kardiomyozyten. Wenn die iCMAKT1/2 KO-Herzen wegen des Energiemangels die erforderliche Wandspannung nicht mehr aufbringen können, resultiert eine Pumpschwäche. Das echokardiographische Korrelat hierfür bildet die verminderte Ejektionsfraktion.

Die atrophierenden iCMAKT1/2 KO-Herzen zeigen histologisch und echokardiographisch eine Abnahme der Ventrikeldicke, ohne dass die Ventrikel dilatieren (Goedecke et al., 2017). Dadurch wird die Frage nach einem den Ventrikel stabilisierenden fibrotischen *Remodeling* des Myokards aufgeworfen. Die Erhöhung der Steifigkeit könnte schließlich die Dilatation der Ventrikel verhindern. Eine *Ingenuity Pathway* Analyse hatte im Vorfeld eine Überexpression Fibrose-assoziiierter Gene gezeigt. Durch die Expressionsanalyse der pro- bzw. antifibrotischen Gene *Ctgf* (*Connective tissue growth factor*), *Tgf $\beta$ 2* (*Transforming Growth Factor Beta 2*), *Timp1* und *Mmp3* mittels qPCR wurden die Ergebnisse der *Ingenuity Pathway* Analyse validiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in iCMAKT1/2 KO-Herzen ein spezifisches Genprogramm induziert wird, das mit Fibrosierung und dem *Remodeling* der ECM assoziiert ist. Die Expression der Fibrosemarker TGFB2 und CTGF ist ebenso hochreguliert wie die Expression der ECM-modulierenden Proteinase MMP3 und des Proteinaseinhibitors TIMP1.

TGFB2 ist eine von drei Isoformen der TGFB Subfamilie (Sporn and Roberts, 1992). Es handelt sich um Zytokine mit pleiotropen Effekten wie der Regulation von Zellwachstum, Inflammation, ECM-Synthese und Apoptose (Taipale et al., 1998, Annes et al., 2004). TGFB wird in kardialen Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen und Makrophagen



synthetisiert und als inaktiver Proteinkomplex in der ECM gebunden (Shi et al., 2011). Proteolytisch freigesetzt aktiviert TGFB Fibroblasten und stimuliert die Differenzierung zu Myofibroblasten, die Bestandteile der ECM sezernieren (Thannickal et al., 2003, Sime et al., 1997). Unter anderem entfaltet das Zytokin profibrotische Wirkung, indem es ECM-spezifische Genexpression induziert und die ECM-Produktion durch Hochregulierung der Expression von TIMPs und Inhibition von MMPs fördert (Leask, 2010).

CTGF ist ein matricelluläres Protein, das heißt, es ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das nicht strukturgebend ist, sondern vielmehr Zell-Matrix-Interaktionen moduliert und an der Signaltransduktion teilnimmt. Indem es die Proliferation von Fibroblasten und die ECM-Produktion induziert, dient CTGF als wichtiger Vermittler des *Geweberemodelings* und der Fibrose (Lipson et al., 2012). Außerdem vermittelt CTGF über die Aktivierung von AKT auch einen hypertrophen Effekt (Hayata et al., 2008).

Zahlreiche Studien bringen eine erhöhte Expression von CTGF am Herzen in Verbindung mit zunehmender Fibrosierung des Gewebes (Matsui and Sadoshima, 2004, Ohnishi et al., 1998, Dean et al., 2005). Diesen Studien liegen allerdings hypertrophe Stimuli oder Infarktgeschehen zu Grunde. Auch eine Expressionssteigerung von TGFB wurde vor allem in Modellen zu Myokardinfarkten und kardialer Hypertrophie sowie bei Patienten mit DCM nachgewiesen. Bislang gibt es nur wenige Studien, die die Expression von CTGF und TGFB in Atrophie-Modellen untersuchten. Brinks et al. (2014) wiesen in gesunden Mäusen nach heterotoper Herztransplantation einen nicht signifikanten Anstieg von CTGF und unveränderte Level von TGFB nach. Transgene Mäuse und Ratten mit kardiomyozyten-spezifischer CTGF Überexpression zeigten keine vermehrte Fibrose oder gesteigerte Expression von Fibrosemarkern. Panek et al. (2009) schlussfolgerten, dass CTGF für sich betrachtet kein Fibroseinduktor im Herzen ist. Das profibrotische Potential von CTGF bedarf wahrscheinlich kostimulatorischer Signale wie etwa TGFB (Brigstock, 2010).

Während die Expression von CTGF ab Tag 10/11 gesteigert ist, nimmt die Menge des *Tgfb2* Transkripts zeitlich versetzt ab Tag 14/15 zu. Der zeitlich versetzte Anstieg der Expression von TGFB2 ist unerwartet, da TGFB2 als wesentlicher Induktor von *Ctgf* in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten gilt (Grotendorst, 1997, Blom et al., 2002, Chen et al., 2000). Im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife ist allerdings auch CTGF im Stande, die Expression von TGFB2 zu induzieren (Yang et al., 2010).

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass, obwohl CTGF nicht als Fibroseinduktor gilt, CTGF zumindest als Fibrosemarker dient. Zusammen mit der Expressionssteigerung von TGFB2 ergeben sich Hinweise auf eine mögliche synergistische profibrotische Wirkung in iCMAKT1/2 KO-Hezen.

Die Transkription der Matrix-Metalloproteinase *Mmp3* und des Inhibitors *Timp1* nimmt in iCMAKT1/2 KO-Hezen zu. Dabei erfolgt der Transkriptionsanstieg von *Timp1* früher als der von *Mmp3*. Das Verhältnis der Transkription von *Timp1* zu *Mmp3* ist daher transient erhöht gegenüber dem WT. Es folgt eine Transkriptionssteigerung von *Mmp3*, was das Verhältnis TIMP1/MMP3 dem Gleichgewicht im WT wieder angleicht. Zusätzlich zeigen die Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen an Tag 21 einen Anstieg der Expression der Kollagen-Gene *Col1a1*, *Col1a2* und *Col6a1* (Goedecke et al., 2017).

Die Transkriptionsänderungen der untersuchten Gene implizieren eine Veränderung der ECM. Dass Proteinase und Proteinase-Inhibitor nicht identisch verändert sind, weist auf

eine Verschiebung des Gleichgewichts aus Abbau und Neusynthese der ECM hin. Ein zumindest transientes Überwiegen des Proteinase-Inhibitors suggeriert einen Matrixerhalt bzw. zunehmende Fibrosierung. Dieses Ergebnis deckt sich mit Aussagen anderer Studien. So wurden in Atrophie-Modellen, die durch heterotope Herztransplantation oder Implantation von LVAD eine mechanische Entlastung der Herzen simulierten, erhöhte TIMP/MMP-Verhältnisse nachgewiesen (Li et al., 2001, Wang et al., 2012). Auch die erhöhte Expression der Kollagen-Gene weist auf eine Zunahme der ECM hin.

Ferner wurde die Auswirkung der profibrotischen Genexpression in den iCMAKT1/2 KO-Herzen untersucht. Zum Zeitpunkt Tag 20/21 zeigte sich in Masson-Trichrom-gefärbten iCMAKT1/2 KO-Herzschritten das Bild einer diffusen, interstitiell betonten Färbung, die ein Hinweis auf erhöhte Fibrosierung sein könnte. Bei geringer n-Zahl konnte jedoch keine Quantifizierung vorgenommen werden.

Es wurde bislang für verschiedene atrophische Stimuli untersucht, ob eine zunehmende Fibrose resultiert. Unter anderem wiesen Kent et al. (1985) eine Zunahme der Fibrose im atrophierenden Myokard nach. Durch Trennen einer rechtsventrikulären Chorda tendinea simulierten sie eine mechanische Entlastung für das Papillarymyokard von Katzen. In der Folge atrophierte das Papillarymyokard und das Interstitium nahm um ein Vielfaches an Volumen zu. Auch tumorinduzierte kardiale Kachexie ist mit einer Fibrosierung assoziiert (Springer et al., 2014). Brinks et al. (2009) machten darüber hinaus die Beobachtung, dass eine zunehmende interstitielle Fibrose infolge ventrikulärer Entlastung nicht zwangsläufig ein aktiver Prozess sein muss. Vielmehr führten sie die Fibrose auf eine dysproportionale Reduktion von kardiomyozytärem und interstitiellem Volumen zurück. Relativ betrachtet verschiebt sich so das Verhältnis von Kardiomyozyten zu Interstitium zugunsten des Interstitiums (Brinks et al., 2009).

Zusammenfassend resultiert die Gendeletion von AKT1/2 in den Herzen in einer gesteigerten profibrotischen Genexpression. Das Resultat dieser Arbeit ist damit konform mit den Ergebnissen der *Ingenuity Pathway* Analyse auf der Basis von Mikroarray-RNA-Expressionsanalysen, die eine überwiegende Transkriptionssteigerung Fibrose-assoziiierter Gene zeigte. Die Arbeit kann die Frage nach einem einsetzenden fibrotischen *Remodeling* in den iCMAKT1/2 KO-Herzen jedoch nicht abschließend klären. In Folgeprojekten muss nun genauer der Anteil der ECM am Gesamtvolumen der Herzen quantifiziert werden, wobei die Bestimmung der Kollagenmenge eine Möglichkeit darstellt.

### 6 Schlussfolgerung

Die kardiale Atrophie kann als volumetrische und/oder numerische Atrophie auftreten. Eine volumetrische Atrophie entsteht durch ein Ungleichgewicht von Proteinsynthese und Proteindegradation, sodass das Zellvolumen abnimmt, während die numerische Atrophie durch vermehrten Zelluntergang vermittelt wird.

Die kardiomyozyten-spezifische Gendeletion von AKT1/2 führt zu einer Abnahme myokardialer Masse und Ausdünnung des linken Ventrikels infolge einer Verkleinerung der Kardiomyozyten. Zwar vermittelt FOXO3a zunächst eine Induktion der Autophagie zur Substratbereitstellung. Dennoch finden sich mit der im Verlauf zunehmenden Akkumulation Autophagie-assoziiierter Proteine Hinweise auf eine attenuierte Autophagieaktivität. Die Bereitstellung von Substraten zur Energiegewinnung durch die Autophagie scheint beeinträchtigt.

Ein vermehrter Zelluntergang als Ursache der kardialen Atrophie wurde durch Analysen inflammatorischer Immunzellen untersucht. Weder eine Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten noch von neutrophilen Granulozyten als indirekte Marker für einen apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergang konnte nachgewiesen werden. Die kardiale Atrophie wird daher vermutlich nicht durch einen vermehrten Zelluntergang vermittelt. Nichtsdestotrotz könnten einwandernde CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und inflammatorische Monozyten die Herzfunktion negativ beeinflussen.

Der iCMAKT1/2 KO resultiert weiter in einem Energiemangel für die Kardiomyozyten. Diese wiederum wird durch unterschiedliche Mechanismen bedingt. Einerseits ergeben sich Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion, welche u.a. gekennzeichnet ist durch eine verminderte Expression des Fettstoffwechsel-Schlüsselenzyms CPT2 in den Mitochondrien. Eine vermutete Dysregulation des zentralen Regulators der mitochondrialen Biogenese PGC-1 könnte ebenso wie zunehmender mitochondrialer *Turnover* durch Mitophagie dazu beitragen.

Funktionell führt der sinkende Durchmesser und der Energiemangel der Kardiomyozyten zu einer Pumpschwäche der Herzen. Ein unverändertes EDV zeigt, dass der Ventrikel während des Atrophieprozesses nicht dilatiert. Die Ursache könnte die Fibrose-assoziierte Erhöhung der Ventrikelsteifigkeit sein. Ein profibrotisches Genprogramm in den iCMAKT1/2 KO-Hezen impliziert eine Zunahme der ECM. Doch auch eine dysproportionale Abnahme von Kardiomyozyten im Vergleich zur ECM oder Fibroblasten kann die Ursache für eine relative Fibrosierung sein.

Abschließend ist festzuhalten, dass AKT1/2 essenziell für die Funktion und Struktur des Herzens ist. Eine Gendeletion beider Isoformen führt zu einer Imbalance von Proteinsynthese und Proteindegradation der Kardiomyozyten.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen:

Abb. 1:	Struktureller Aufbau von AKT und Aktivierung über den PI3K-Signalweg	2
Abb. 2:	Regulation des Kardiomyozytenwachstums durch den PI3K/AKT-Signalweg	5
Abb. 3:	Kardiale Atrophie resultiert aus einer Imbalance von Proteinsynthese und -abbau	9
Abb. 4:	Schematischer Ablauf der Makroautophagie	12
Abb. 5:	Schematische Struktur der FOXO Isoformen und Phosphorylierungsstellen durch AKT	14
Abb. 6:	Nukleozytoplasmatische Verschiebung des FOXO Transkriptionsfaktors	15
Abb. 7:	Schematischer Aufbau des Transkriptionskoaktivators PGC-1 $\alpha$ und assoziierte Komplexe	19
Abb. 8:	Methodisches Vorgehen zur Analyse der Verteilung von FOXO3	40
Abb. 9:	Die Gendelektion von AKT1/2 im Herzgewebe führt zur Abnahme der AKT1/2 Proteinmenge	47
Abb. 10:	AKT1/2 Inaktivierung führt zur Kernlokalisierung von FOXO3a in Kardiomyozyten	48
Abb. 11:	Zunahme der Kern/Zytoplasma-Verhältnisse von FOXO3a in iCMAKT1/2 KO Kardiomyozyten	48
Abb. 12:	Die Deletion von AKT1/2 resultiert in einer erhöhten Transkription FOXO3a-regulierter pro-autophagischer Gene in Herzgewebe	50
Abb. 13:	Der iCMAKT1/2 KO führt zu einer gesteigerten Expression von Autophagiefaktoren	52
Abb. 14:	Ingenuity Pathway Analyse basierend auf mRNA Array Daten an Tag 21 in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen	53
Abb. 15:	Transkription von <i>Ppargc1a</i> , <i>Ppargc1b</i> und <i>Tfam</i> in Herzgewebe	55
Abb. 16:	Quantifizierung der Proteinmenge der PGC-1-Transkriptionskoaktivatoren mittels Western Blot	56
Abb. 17:	Die AKT1/2 Deletion führt zu einer reduzierten Expression von CPT2	58
Abb. 18:	Anzeichen für zunehmende Mitophagie in iCMAKT1/2 KO-Herzen	60
Abb. 19:	Der iCMAKT1/2 KO resultiert in einer reduzierten Transkription von <i>Sod2</i> in Herzgewebe	61
Abb. 20:	Die Deletion von AKT1/2 führt zu einer gesteigerten Transkription von <i>c-myc</i> in Herzgewebe	62
Abb. 21:	AKT1/2 Inaktivierung führt zu einer gesteigerten Transkription Fibrose-assoziiierter Gene in Herzgewebe	64
Abb. 22:	Histologische Schnitte von iCMAKT1/2 KO-Herzen zeigen eine intensivere Färbung des Interstitiums nach Masson Trichrome Färbung	65
Abb. 23:	Zunahme CD3 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in iCMAKT1/2 KO-Gewebeschnitten	66
Abb. 24:	Durchflusszytometrische Analysen von Immunzellen in iCMAKT1/2 KO- und WT-Herzen	68

**Tabellen:**

Tabelle 1: Laborgeräte	24
Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien	25
Tabelle 3: Zubehör	26
Tabelle 4: Chemikalien für Färbungen	26
Tabelle 5: Lysispuffer	27
Tabelle 6: PBS	27
Tabelle 7: PFA (4%)	27
Tabelle 8: SDS	28
Tabelle 9: TBS(T)	28
Tabelle 10: Tris-HCl	28
Tabelle 11: Primäre Antikörper	29
Tabelle 12: sekundäre Antikörper	29
Tabelle 13: Antikörper für FACS-Analysen	30
Tabelle 14: Oligonukleotide	31
Tabelle 15: Kits	31
Tabelle 16: Software	31
Tabelle 17: Mikroarray-RNA-Expressionsanalyse mitochondrialer Transkriptions(ko)- aktivatoren in Herzgewebe	54

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ABBATE, A., BONANNO, E., MAURIELLO, A., BUSSANI, R., BIONDI-ZOCCAI, G. G. L., LIUZZO, G., LEONE, A. M., SILVESTRI, F., DOBRINA, A., BALDI, F., PANDOLFI, F., BIASUCCI, L. M., BALDI, A., SPAGNOLI, L. G. & CREA, F. 2004. Widespread myocardial inflammation and infarct-related artery patency. *Circulation*, 110, 46-50.
- AHUJA, P., ZHAO, P., ANGELIS, E., RUAN, H., KORGE, P., OLSON, A., WANG, Y., JIN, E. S., JEFFREY, F. M., PORTMAN, M. & MACLELLAN, W. R. 2010. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 1494-1505.
- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMING, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*, 15, 6541-6551.
- ANDERSON, K. E., COADWELL, J., STEPHENS, L. R. & HAWKINS, P. T. 1998. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Current Biology*, 8, 684-691.
- ANDERSSON, U. & SCARPULLA, R. C. 2001. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 21, 3738-49.
- ANNES, J. P., CHEN, Y., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2004. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of cell biology*, 165, 723-734.
- ANTOS, C. L., MCKINSEY, T. A., FREY, N., KUTSCHKE, W., MCANALLY, J., SHELTON, J. M., RICHARDSON, J. A., HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2002. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 907-12.
- ARANY, Z., HE, H., LIN, J., HOYER, K., HANDSCHIN, C., TOKA, O., AHMAD, F., MATSUI, T., CHIN, S., WU, P. H., RYBKIN, II, SHELTON, J. M., MANIERI, M., CINTI, S., SCHOEN, F. J., BASSEL-DUBY, R., ROSENZWEIG, A., INGWALL, J. S. & SPIEGELMAN, B. M. 2005. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*, 1, 259-71.
- ARSLAN, F., DE KLEIJN, D. P. & PASTERKAMP, G. 2011. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*, 8, 292-300.
- ARYAL, B., DENISON, T. A., GONZALEZ, Y. & RAO, V. A. 2014. Chapter 19 - Autophagy-Based Protein Biomarkers for In Vivo Detection of Cardiotoxicity in the Context of Cancer Therapy. In: HAYAT, M. A. (ed.) *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Amsterdam: Academic Press.
- ASTON, D., CAPEL, R. A., FORD, K. L., CHRISTIAN, H. C., MIRAMS, G. R., ROG-ZIELINSKA, E. A., KOHL, P., GALIONE, A., BURTON, R. A. B. & TERRAR, D. A. 2017. High resolution structural evidence suggests the Sarcoplasmic Reticulum forms microdomains with Acidic Stores (lysosomes) in the heart. *Scientific Reports*, 7, 40620.
- AUDESSE, A. J., DHAKAL, S., HASSELL, L.-A., GARDELL, Z., NEMTSOVA, Y. & WEBB, A. E. 2019. FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *PLoS genetics*, 15, e1008097-e1008097.
- BAAR, K., WENDE, A. R., JONES, T. E., MARISON, M., NOLTE, L. A., CHEN, M., KELLY, D. P. & HOLLOSZY, J. O. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb j*, 16, 1879-86.

- BARRÈS, R., OSLER, M. E., YAN, J., RUNE, A., FRITZ, T., CAIDAHL, K., KROOK, A. & ZIERATH, J. R. 2009. Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab*, 10, 189-98.
- BASKIN, K. K. & TAEGTMEYER, H. 2011. Taking pressure off the heart: the ins and outs of atrophic remodelling. *Cardiovascular research*, 90, 243-250.
- BEALS, C. R., SHERIDAN, C. M., TURCK, C. W., GARDNER, P. & CRABTREE, G. R. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 275, 1930-4.
- BELKE, D. D., BETUING, S., TUTTLE, M. J., GRAVELEAU, C., YOUNG, M. E., PHAM, M., ZHANG, D., COOKSEY, R. C., MCCLAIN, D. A., LITWIN, S. E., TAEGTMEYER, H., SEVERSON, D., KAHN, C. R. & ABEL, E. D. 2002. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *The Journal of Clinical Investigation*, 109, 629-639.
- BELLACOSA, A., TESTA, STAAL, S. P. & TSICHLIS, P. N. 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254, 274.
- BELLOT, G., GARCIA-MEDINA, R., GOUNON, P., CHICHE, J., ROUX, D., POUYSSÉGUR, J. & MAZURE, N. M. 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29, 2570-81.
- BIGGS, W. H., 3RD, MEISENHELDER, J., HUNTER, T., CAVENEE, W. K. & ARDEN, K. C. 1999. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7421-7426.
- BJØRKØY, G., LAMARK, T., BRECH, A., OUTZEN, H., PERANDER, M., OVERVATN, A., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- BLOM, I. E., GOLDSCHMEDING, R. & LEASK, A. 2002. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol*, 21, 473-82.
- BÖNNER, F., BORG, N., BURGHOFF, S. & SCHRADER, J. 2012. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PloS one*, 7, e34730-e34730.
- BORNIQUEL, S., GARCÍA-QUINTÁNS, N., VALLE, I., OLMOS, Y., WILD, B., MARTÍNEZ-GRANERO, F., SORIA, E., LAMAS, S. & MONSALVE, M. 2010. Inactivation of Foxo3a and Subsequent Downregulation of PGC-1 $\alpha$  Mediate Nitric Oxide-Induced Endothelial Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*, 30, 4035-4044.
- BOZULIC, L., SURUCU, B., HYNX, D. & HEMMINGS, B. A. 2008. PKB $\alpha$ /Akt1 Acts Downstream of DNA-PK in the DNA Double-Strand Break Response and Promotes Survival. *Molecular Cell*, 30, 203-213.
- BRAND, T., SHARMA, H. S., FLEISCHMANN, K. E., DUNCKER, D. J., MCFALLS, E. O., VERDOUW, P. D. & SCHAPER, W. 1992. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res*, 71, 1351-60.
- BRIGSTOCK, D. R. 2010. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. *Journal of cell communication and signaling*, 4, 1-4.



- BRINKS, H., GIRAUD, M.-N., SEGISER, A., FERRIÉ, C., LONGNUS, S., ULLRICH, N. D., KOCH, W. J., MOST, P., CARREL, T. P. & TEVAEARAI, H. T. 2014. Dynamic patterns of ventricular remodeling and apoptosis in hearts unloaded by heterotopic transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33, 203-210.
- BRINKS, H., TEVAEARAI, H., MÜHLFELD, C., BERTSCHI, D., GAHL, B., CARREL, T. & GIRAUD, M.-N. 2009. Contractile function is preserved in unloaded hearts despite atrophic remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 137, 742-746.
- BROWNAWELL, A. M., KOPS, G. J., MACARA, I. G. & BURGERING, B. M. 2001. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Molecular and cellular biology*, 21, 3534-3546.
- BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M. J., LIN, M. Z., JUO, P., HU, L. S., ANDERSON, M. J., ARDEN, K. C., BLENIS, J. & GREENBERG, M. E. 1999. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96, 857-868.
- BRUNET, A., KANAI, F., STEHN, J., XU, J., SARBASSOVA, D., FRANGIONI, J. V., DALAL, S. N., DECAPRIO, J. A., GREENBERG, M. E. & YAFFE, M. B. 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology*, 156, 817-828.
- BRUNET, A., SWEENEY, L. B., STURGILL, J. F., CHUA, K. F., GREER, P. L., LIN, Y., TRAN, H., ROSS, S. E., MOSTOSLAVSKY, R., COHEN, H. Y., HU, L. S., CHENG, H.-L., JEDRYCHOWSKI, M. P., GYGI, S. P., SINCLAIR, D. A., ALT, F. W. & GREENBERG, M. E. 2004. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*, 303, 2011-2015.
- BUGGER, H., LEIPPERT, S., BLUM, D., KAHLE, P., BARLEON, B., MARME, D. & DOENST, T. 2006. Subtractive hybridization for differential gene expression in mechanically unloaded rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H2714-22.
- BURCH, G. E., PHILLIPS, J. H. & ANSARI, A. 1968. The Cachectic Heart: A Clinico-pathologic, Electrocardiographic and Roentgenographic Entity\*. *Diseases of the Chest*, 54, 403-409.
- BURKHOFF, D., WEISS, R. G., SCHULMAN, S. P., KALIL-FILHO, R., WANNENBURG, T. & GERSTENBLITH, G. 1991. Influence of metabolic substrate on rat heart function and metabolism at different coronary flows. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 261, H741-H750.
- CALERA, M. R., MARTINEZ, C., LIU, H., JACK, A. K., BIRNBAUM, M. J. & PILCH, P. F. 1998. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem*, 273, 7201-4.
- CALLEJA, V., ALCOR, D., LAGUERRE, M., PARK, J., VOJNOVIC, B., HEMMINGS, B. A., DOWNWARD, J., PARKER, P. J. & LARIJANI, B. 2007. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS biology*, 5, e95-e95.
- CALNAN, D. R. & BRUNET, A. 2008. The FoxO code. *Oncogene*, 27, 2276-2288.
- CAO, D. J., JIANG, N., BLAGG, A., JOHNSTONE, J. L., GONDALIA, R., OH, M., LUO, X., YANG, K. C., SHELTON, J. M., ROTHERMEL, B. A., GILLETTE, T. G., DORN, G. W. & HILL, J. A. 2013. Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J Am Heart Assoc*, 2, e000016.

- CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S. & REED, J. C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-21.
- CARTER, M. E. & BRUNET, A. 2007. FOXO transcription factors. *Current Biology*, 17, R113-R114.
- CAZZOLLI, R., CARPENTER, L., BIDEN, T. J. & SCHMITZ-PEIFFER, C. 2001. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes*, 50, 2210-8.
- CHAN, X. A. C. Y., BLACK, C. M., LIN, A. J., PING, P. & LAU, E. 2015. Mitochondrial protein turnover: methods to measure turnover rates on a large scale. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 78, 54-61.
- CHEN, M. M., LAM, A., ABRAHAM, J. A., SCHREINER, G. F. & JOLY, A. H. 2000. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, 32, 1805-19.
- CHO, H., MU, J., KIM, J. K., THORVALDSEN, J. L., CHU, Q., CRENSHAW, E. B., KAESTNER, K. H., BARTOLOMEI, M. S., SHULMAN, G. I. & BIRNBAUM, M. J. 2001. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB $\beta$ ). *Science*, 292, 1728-1731.
- CLARK, K. L., HALAY, E. D., LAI, E. & BURLEY, S. K. 1993. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364, 412-420.
- COFFER, P. J. & WOODGETT, J. R. 1991. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *European Journal of Biochemistry*, 201, 475-481.
- CONDORELLI, G., DRUSCO, A., STASSI, G., BELLACOSA, A., RONCARATI, R., IACCARINO, G., RUSSO, M. A., GU, Y., DALTON, N., CHUNG, C., LATRONICO, M. V. G., NAPOLI, C., SADOSHIMA, J., CROCE, C. M. & ROSS, J., JR. 2002. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12333-12338.
- COSPER, P. F., HARVEY, P. A. & LEINWAND, L. A. 2012. Interferon- $\gamma$ ; Causes Cardiac Myocyte Atrophy via Selective Degradation of Myosin Heavy Chain in a Model of Chronic Myocarditis. *The American Journal of Pathology*, 181, 2038-2046.
- COSPER, P. F. & LEINWAND, L. A. 2011. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res*, 71, 1710-20.
- DAITOKU, H., HATTA, M., MATSUZAKI, H., ARATANI, S., OHSHIMA, T., MIYAGISHI, M., NAKAJIMA, T. & FUKAMIZU, A. 2004. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10042-10047.
- DAITOKU, H., SAKAMAKI, J.-I. & FUKAMIZU, A. 2011. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813, 1954-1960.
- DAITOKU, H., YAMAGATA, K., MATSUZAKI, H., HATTA, M. & FUKAMIZU, A. 2003. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes*, 52, 642-9.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.

- DEAN, R. G., BALDING, L. C., CANDIDO, R., BURNS, W. C., CAO, Z., TWIGG, S. M. & BURRELL, L. M. 2005. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*, 53, 1245-56.
- DELAUGHTER, M. C., TAFFET, G. E., FIOROTTO, M. L., ENTMAN, M. L. & SCHWARTZ, R. J. 1999. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Faseb j*, 13, 1923-9.
- DIJKERS, P. F., MEDEMA, R. H., LAMMERS, J. W., KOENDERMAN, L. & COFFER, P. J. 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, 10, 1201-4.
- DING, W.-X. & YIN, X.-M. 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological chemistry*, 393, 547-564.
- DIWAN, A., KRENZ, M., SYED, F. M., WANSAPURA, J., REN, X., KOESTERS, A. G., LI, H., KIRSHENBAUM, L. A., HAHN, H. S., ROBBINS, J., JONES, W. K. & DORN, G. W. 2007. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest*, 117, 2825-33.
- DOENST, T., GOODWIN, G. W., CEDARS, A. M., WANG, M., STEPKOWSKI, S. & TAEGTMEYER, H. 2001. Load-induced changes in vivo alter substrate fluxes and insulin responsiveness of rat heart in vitro. *Metabolism*, 50, 1083-90.
- DUFNER, A. & THOMAS, G. 1999. Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation. *Experimental Cell Research*, 253, 100-109.
- ERIKSSON, U., RICCI, R., HUNZIKER, L., KURRER, M. O., OUDIT, G. Y., WATTS, T. H., SONDEREGGER, I., BACHMAIER, K., KOPF, M. & PENNINGER, J. M. 2003. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med*, 9, 1484-90.
- ESKELINEN, E.-L., SCHMIDT, C. K., NEU, S., WILLENBORG, M., FUERTES, G., SALVADOR, N., TANAKA, Y., LÜLLMANN-RAUCH, R., HARTMANN, D., HEEREN, J., VON FIGURA, K., KNECHT, E. & SAFTIG, P. 2004. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 15, 3132-3145.
- ESSERS, M. A., WEIJZEN, S., DE VRIES-SMITS, A. M., SAARLOOS, I., DE RUITER, N. D., BOS, J. L. & BURGERING, B. M. 2004. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo j*, 23, 4802-12.
- ESTERBAUER, H., OBERKOFER, H., KREMPLER, F. & PATSCH, W. 1999. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 62, 98-102.
- EVANS-ANDERSON, H. J., ALFIERI, C. M. & YUTZEY, K. E. 2008. Regulation of Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Growth During Development by FOXO Transcription Factors. *Circulation Research*, 102, 686-694.
- EVANS, M. J. & SCARPULLA, R. C. 1990. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev*, 4, 1023-34.
- FAN, M., RHEE, J., ST-PIERRE, J., HANDSCHIN, C., PUIGSERVER, P., LIN, J., JÄEGER, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2004. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes & development*, 18, 278-289.
- FERNANDEZ-MARCOS, P. J. & AUWERX, J. 2011. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition*, 93, 884S-90.

- FINGAR, D. C., SALAMA, S., TSOU, C., HARLOW, E. & BLENIS, J. 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & Development*, 16, 1472-1487.
- FONTANI, F., MARCUCCI, T., PICARIELLO, L., TONELLI, F., VINCENZINI, M. T. & IANTOMASI, T. 2014. Redox regulation of MMP-3/TIMP-1 ratio in intestinal myofibroblasts: effect of N-acetylcysteine and curcumin. *Exp Cell Res*, 323, 77-86.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2015. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Current opinion in cardiology*, 30, 240-245.
- FURUYAMA, T., NAKAZAWA, T., NAKANO, I. & MORI, N. 2000. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*, 349, 629-34.
- GALVEZ, A. S., DIWAN, A., ODLEY, A. M., HAHN, H. S., OSINSKA, H., MELENDEZ, J. G., ROBBINS, J., LYNCH, R. A., MARREEZ, Y. & DORN, G. W., 2ND 2007. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res*, 100, 1071-8.
- GAO, T., FURNARI, F. & NEWTON, A. C. 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*, 18, 13-24.
- GAO, Y., DAI, X., LI, Y., LI, G., LIN, X., AI, C., CAO, Y., LI, T. & LIN, B. 2020. Role of Parkin-mediated mitophagy in the protective effect of polydatin in sepsis-induced acute kidney injury. *Journal of Translational Medicine*, 18, 114.
- GILLEY, J., COFFER, P. J. & HAM, J. 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of cell biology*, 162, 613-622.
- GOEDECKE, S., HEINEN, A., MOELLER, F., DEENEN, R., KOEHRER, K. & GOEDECKE, A. 2017. AKT signaling is essential for functional and structural integrity of the heart. *The FASEB Journal*, 31, 1b149-1b149.
- GOTO, M., TERADA, S., KATO, M., KATOH, M., YOKOZEKI, T., TABATA, I. & SHIMOKAWA, T. 2000. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 274, 350-4.
- GOTTDIENER, J. S., GROSS, H. A., HENRY, W. L., BORER, J. S. & EBERT, M. H. 1978. Effects of self-induced starvation on cardiac size and function in anorexia nervosa. *Circulation*, 58, 425-433.
- GREER, E. L., OSKOUI, P. R., BANKO, M. R., MANIAR, J. M., GYGI, M. P., GYGI, S. P. & BRUNET, A. 2007. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*, 282, 30107-19.
- GROTENDORST, G. R. 1997. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 171-9.
- GUDE, N., MURASKI, J., RUBIO, M., KAJSTURA, J., SCHAEFER, E., ANVERSA, P. & SUSSMAN MARK, A. 2006. Akt Promotes Increased Cardiomyocyte Cycling and Expansion of the Cardiac Progenitor Cell Population. *Circulation Research*, 99, 381-388.
- GUO, K., SEARFOSS, G., KROLIKOWSKI, D., PAGNONI, M., FRANKS, C., CLARK, K., YU, K. T., JAYE, M. & IVASHCHENKO, Y. 2001. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*, 8, 367-76.
- GUSTAFSSON, Å. B. 2011. Bnip3 as a Dual Regulator of Mitochondrial Turnover and Cell Death in the Myocardium. *Pediatric Cardiology*, 32, 267-274.

- HAMACHER-BRADY, A., BRADY, N. R., LOGUE, S. E., SAYEN, M. R., JINNO, M., KIRSHENBAUM, L. A., GOTTLIEB, R. A. & GUSTAFSSON, A. B. 2007. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*, 14, 146-57.
- HANNA, R. A., QUINSAY, M. N., OROGO, A. M., GIANG, K., RIKKA, S. & GUSTAFSSON Å, B. 2012. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem*, 287, 19094-104.
- HANNENHALLI, S., PUTT, M. E., GILMORE, J. M., WANG, J., PARMACEK, M. S., EPSTEIN, J. A., MORRISEY, E. E., MARGULIES, K. B. & CAPPOLA, T. P. 2006. Transcriptional genomics associates FOX transcription factors with human heart failure. *Circulation*, 114, 1269-76.
- HANSEN, M., RUBINSZTEIN, D. C. & WALKER, D. W. 2018. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19, 579-593.
- HAQ, S., CHOUKROUN, G., KANG, Z. B., RANU, H., MATSUI, T., ROSENZWEIG, A., MOLKENTIN, J. D., ALESSANDRINI, A., WOODGETT, J., HAJJAR, R., MICHAEL, A. & FORCE, T. 2000. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol*, 151, 117-30.
- HARDT, S. E., TOMITA, H., KATUS, H. A. & SADOSHIMA, J. 2004. Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2Bepsilon; by Glycogen Synthase Kinase-3beta Regulates beta-Adrenergic Cardiac Myocyte Hypertrophy. *Circulation Research*, 94, 926-935.
- HARVEY, P. A. & LEINWAND, L. A. 2014. Chapter 3 - Cardiac Atrophy and Remodeling. In: WILLIS, M. S., HOMEISTER, J. W. & STONE, J. R. (eds.) *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*. San Diego: Academic Press.
- HAWKINS, P. T., ANDERSON, K. E., DAVIDSON, K. & STEPHENS, L. R. 2006. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*, 34, 647-62.
- HAYATA, N., FUJIO, Y., YAMAMOTO, Y., IWAKURA, T., OBANA, M., TAKAI, M., MOHRI, T., NONEN, S., MAEDA, M. & AZUMA, J. 2008. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 274-278.
- HE, H., DANG, Y., DAI, F., GUO, Z., WU, J., SHE, X., PEI, Y., CHEN, Y., LING, W., WU, C., ZHAO, S., LIU, J. O. & YU, L. 2003. Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 29278-29287.
- HE, X., SUN, C., WANG, F., SHAN, A., GUO, T., GU, W., CUI, B. & NING, G. 2012. Peri-implantation lethality in mice lacking the PGC-1-related coactivator protein. *Dev Dyn*, 241, 975-83.
- HILGENDORF, I., GERHARDT, L. M., TAN, T. C., WINTER, C., HOLDERRIED, T. A., CHOUSTERMAN, B. G., IWAMOTO, Y., LIAO, R., ZIRLIK, A., SCHERER-CROSBIE, M., HEDRICK, C. C., LIBBY, P., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2014a. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*, 114, 1611-22.
- HILGENDORF, I., GERHARDT, L. M. S., TAN, T. C., WINTER, C., HOLDERRIED, T. A. W., CHOUSTERMAN, B. G., IWAMOTO, Y., LIAO, R., ZIRLIK, A., SCHERER-CROSBIE, M., HEDRICK, C. C., LIBBY, P., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K.

- 2014b. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circulation research*, 114, 1611-1622.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S.-I., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J.-L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20, 1981-1991.
- HSIEH, P. C. H., SEGERS, V. F. M., DAVIS, M. E., MACGILLIVRAY, C., GANNON, J., MOKENTIN, J. D., ROBBINS, J. & LEE, R. T. 2007. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature medicine*, 13, 970-974.
- HU, M. C. T., LEE, D.-F., XIA, W., GOLFMAN, L. S., OU-YANG, F., YANG, J.-Y., ZOU, Y., BAO, S., HANADA, N., SASO, H., KOBAYASHI, R. & HUNG, M.-C. 2004. I $\kappa$ B Kinase Promotes Tumorigenesis through Inhibition of Forkhead FOXO3a. *Cell*, 117, 225-237.
- HUSS, J. M., KOPP, R. P. & KELLY, D. P. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- $\alpha$  and - $\gamma$ . Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*, 277, 40265-74.
- HÜTTER, J. F., SCHWEICKHARDT, C., PIPER, H. M. & SPIECKERMANN, P. G. 1984. Inhibition of fatty acid oxidation and decrease of oxygen consumption of working rat heart by 4-bromocrotonic acid. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 105-8.
- ILATOVSKAYA, D. V., PITTS, C., CLAYTON, J., DOMONDON, M., TRONCOSO, M., PIPPIN, S. & DELEON-PENNELL, K. Y. 2019. CD8<sup>+</sup> T-cells negatively regulate inflammation post-myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 317, H581-H596.
- 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, 648-57.
- IZUMO, S., NADAL-GINARD, B. & MAHDAVI, V. 1988. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 339-43.
- JACOBS, F. M., VAN DER HEIDE, L. P., WIJCHERS, P. J., BURBACH, J. P., HOEKMAN, M. F. & SMIDT, M. P. 2003a. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem*, 278, 35959-67.
- JACOBS, F. M. J., VAN DER HEIDE, L. P., WIJCHERS, P. J. E. C., BURBACH, J. P. H., HOEKMAN, M. F. M. & SMIDT, M. P. 2003b. FoxO6, a Novel Member of the FoxO Class of Transcription Factors with Distinct Shuttling Dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 35959-35967.
- JÄGER, S., HANDSCHIN, C., ST-PIERRE, J. & SPIEGELMAN, B. M. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 12017-12022.
- JAIN, A., LAMARK, T., SJØTTEM, E., LARSEN, K. B., AWUH, J. A., ØVERVATN, A., MCMAHON, M., HAYES, J. D. & JOHANSEN, T. 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, 285, 22576-22591.



- JEAN, S. & KIGER, A. A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of cell science*, 127, 923-928.
- JONASSEN, A. K., SACK, M. N., MJOS, O. D. & YELLON, D. M. 2001. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res*, 89, 1191-8.
- JONES, P. F., JAKUBOWICZ, T., PITOSI, F. J., MAURER, F. & HEMMING, B. A. 1991. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 4171-4175.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., UENO, T., YAMAMOTO, A., KIRISAKO, T., NODA, T., KOMINAMI, E., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19, 5720-8.
- KAESTNER, K. H., KNOCHEL, W. & MARTINEZ, D. E. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 14, 142-6.
- KANE, S., SANO, H., LIU, S. C. H., ASARA, J. M., LANE, W. S., GARNER, C. C. & LIENHARD, G. E. 2002. A Method to Identify Serine Kinase Substrates: Akt PHOSPHORYLATES A NOVEL ADIPOCYTE PROTEIN WITH A Rab GTPASE-ACTIVATING PROTEIN (GAP) DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 22115-22118.
- KENT, R. L., UBOH, C. E., THOMPSON, E. W., GORDON, S. S., MARINO, T. A., HOOBER, J. K. & COOPER, G. T. 1985. Biochemical and structural correlates in unloaded and reloaded cat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 17, 153-65.
- KHALIL, H., PELTZER, N., WALICKI, J., YANG, J.-Y., DUBUIS, G., GARDIOL, N., HELD, W., BIGLIARDI, P., MARSLAND, B., LIAUDET, L. & WIDMANN, C. 2012. Caspase-3 protects stressed organs against cell death. *Molecular and Cellular Biology*, MCB.00774-12.
- KINOSHITA, M., TAKANO, H., TAENAKA, Y., MORI, H., TAKAICHI, S., NODA, H., TATSUMI, E., YACURA, A., SEKII, H. & AKUTSU, T. 1988. Cardiac Disuse Atrophy During LVAD Pumping. *ASAIO Journal*, 34.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2009. *Physiologie*, Georg Thieme Verlag.
- KLIONSKY, D. J., ABDELMOHSEN, et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12, 1-222.
- KLOTZ, L.-O., SÁNCHEZ-RAMOS, C., PRIETO-ARROYO, I., URBÁNEK, P., STEINBRENNER, H. & MONSALVE, M. 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox biology*, 6, 51-72.
- KNAAPEN, M. W. M., DAVIES, M. J., DE BIE, M., HAVEN, A. J., MARTINET, W. & KOCKX, M. M. 2001. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovascular Research*, 51, 304-312.
- KNUTTI, D., KAUL, A. & KRALLI, A. 2000. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Molecular and cellular biology*, 20, 2411-2422.
- KONHILAS, J. P., WIDEGREN, U., ALLEN, D. L., PAUL, A. C., CLEARY, A. & LEINWAND, L. A. 2005. Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H455-65.
- KOPS, G. J. & BURGERING, B. M. 1999. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med (Berl)*, 77, 656-65.



- KOPS, G. J. P. L., DANSEN, T. B., POLDERMAN, P. E., SAARLOOS, I., WIRTZ, K. W. A., COFFER, P. J., HUANG, T.-T., BOS, J. L., MEDEMA, R. H. & BURGERING, B. M. T. 2002a. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419, 316-321.
- KOPS, G. J. P. L., MEDEMA, R. H., GLASSFORD, J., ESSERS, M. A. G., DIJKERS, P. F., COFFER, P. J., LAM, E. W. F. & BURGERING, B. M. T. 2002b. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Molecular and cellular biology*, 22, 2025-2036.
- KROEMER, G., MARIÑO, G. & LEVINE, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40, 280-293.
- KUBLI, D. A., YCAZA, J. E. & GUSTAFSSON, A. B. 2007. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J*, 405, 407-15.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- LAI, L., LEONE, T. C., ZECHNER, C., SCHAEFFER, P. J., KELLY, S. M., FLANAGAN, D. P., MEDEIROS, D. M., KOVACS, A. & KELLY, D. P. 2008. Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev*, 22, 1948-61.
- LAROUMANIE, F., DOUIN-ECHINARD, V., POZZO, J., LAIREZ, O., TORTOSA, F., VINEL, C., DELAGE, C., CALISE, D., DUTAUR, M., PARINI, A. & PIZZINAT, N. 2014. CD4+ T Cells Promote the Transition From Hypertrophy to Heart Failure During Chronic Pressure Overload. *Circulation*, 129, 2111-2124.
- LARSSON, N. G., WANG, J., WILHELMSSON, H., OLDFORS, A., RUSTIN, P., LEWANDOSKI, M., BARSH, G. S. & CLAYTON, D. A. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18, 231-6.
- LEASK, A. 2010. Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis. *Circulation Research*, 106, 1675-1680.
- LECO, K. J., MARTIN, E. L., BARCROFT, L. C. & GILL, S. E. 2006. MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS. In: LAURENT, G. J. & SHAPIRO, S. D. (eds.) *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Oxford: Academic Press.
- LEE, D. E., BROWN, J. L., ROSA-CALDWELL, M. E., PERRY, R. A., BROWN, L. A., HAYNIE, W. S., WASHINGTON, T. A., WIGGS, M. P., RAJARAM, N. & GREENE, N. P. 2020. Cancer-induced cardiac atrophy adversely affects myocardial redox state and mitochondrial oxidative characteristics. *JCSM Rapid Communications*, n/a.
- LEE, H. G., CHEN, Q., WOLFRAM, J. A., RICHARDSON, S. L., LINER, A., SIEDLAK, S. L., ZHU, X., ZIATS, N. P., FUJIOKA, H., FELSHER, D. W., CASTELLANI, R. J., VALENCIK, M. L., MCDONALD, J. A., HOIT, B. D., LESNEFSKY, E. J. & SMITH, M. A. 2009. Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS One*, 4, e7172.
- LEHMAN, J. J., BARGER, P. M., KOVACS, A., SAFFITZ, J. E., MEDEIROS, D. M. & KELLY, D. P. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, 106, 847-56.
- LEHTINEN, M. K., YUAN, Z., BOAG, P. R., YANG, Y., VILLEN, J., BECKER, E. B., DIBACCO, S., DE LA IGLESIA, N., GYGI, S., BLACKWELL, T. K. & BONNI, A. 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*, 125, 987-1001.

- LELLIOTT, C. J., MEDINA-GOMEZ, G., et al. 2006. Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol*, 4, e369.
- LEONE, T. C., LEHMAN, J. J., FINCK, B. N., SCHAEFFER, P. J., WENDE, A. R., BOUDINA, S., COURTOIS, M., WOZNIAK, D. F., SAMBANDAM, N., BERNAL-MIZRACHI, C., CHEN, Z., HOLLOSZY, J. O., MEDEIROS, D. M., SCHMIDT, R. E., SAFFITZ, J. E., ABEL, E. D., SEMENKOVICH, C. F. & KELLY, D. P. 2005. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology*, 3, e101-e101.
- LERIN, C., RODGERS, J. T., KALUME, D. E., KIM, S. H., PANDEY, A. & PUIGSERVER, P. 2006. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab*, 3, 429-38.
- LETRA, A., SILVA, R. M., RYLANDS, R. J., SILVEIRA, E. M., DE SOUZA, A. P., WENDELL, S. K., GARLET, G. P. & VIEIRA, A. R. 2012. MMP3 and TIMP1 variants contribute to chronic periodontitis and may be implicated in disease progression. *Journal of clinical periodontology*, 39, 707-716.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- LI, J., LI, Y., CHEN, L., YU, B., XUE, Y., GUO, R., SU, J., LIU, Y. & SUN, L. 2020. p53/PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial dysfunction promotes PC3 prostate cancer cell apoptosis. *Mol Med Rep*, 22, 155-164.
- LI, X., FANG, P., MAI, J., CHOI, E. T., WANG, H. & YANG, X. F. 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*, 6, 19.
- LI, X., MONKS, B., GE, Q. & BIRNBAUM, M. J. 2007. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature*, 447, 1012-6.
- LI, Y. Y., FENG, Y., MCTIERNAN, C. F., PEI, W., MORAVEC, C. S., WANG, P., ROSENBLUM, W., KORMOS, R. L. & FELDMAN, A. M. 2001. Downregulation of Matrix Metalloproteinases and Reduction in Collagen Damage in the Failing Human Heart After Support With Left Ventricular Assist Devices. *Circulation*, 104, 1147-1152.
- LIM, C. C., ZUPPINGER, C., GUO, X., KUSTER, G. M., HELMES, M., EPPENBERGER, H. M., SUTER, T. M., LIAO, R. & SAWYER, D. B. 2004. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279, 8290-9.
- LIN, J., PUIGSERVER, P., DONOVAN, J., TARR, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*, 277, 1645-8.
- LIPSON, K. E., WONG, C., TENG, Y. & SPONG, S. 2012. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5, S24.
- LITTLEWOOD, T. D., HANCOCK, D. C., DANIELIAN, P. S., PARKER, M. G. & EVAN, G. I. 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*, 23, 1686-90.
- 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. *Antioxidants & redox signaling*, 13, 1011-1022.
- LUSTIG, Y., RUAS, J. L., ESTALL, J. L., LO, J. C., DEVARAKONDA, S., LAZNIK, D., CHOI, J. H., ONO, H., OLSEN, J. V. & SPIEGELMAN, B. M. 2011. Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase. *Genes Dev*, 25, 1232-44.
- MA, X., GODAR, R. J., LIU, H. & DIWAN, A. 2012. Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death. *Autophagy*, 8, 297-309.
- MAEHAMA, T. & DIXON, J. E. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 273, 13375-8.
- MAILLET, M., VAN BERLO, J. H. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 38-48.
- MAMMUCARI, C., MILAN, G., ROMANELLO, V., MASIERO, E., RUDOLF, R., DEL PICCOLO, P., BURDEN, S. J., DI LISI, R., SANDRI, C., ZHAO, J., GOLDBERG, A. L., SCHIAFFINO, S. & SANDRI, M. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6, 458-71.
- MARTIN, O. J., LAI, L., SOUNDARAPANDIAN, M. M., LEONE, T. C., ZORZANO, A., KELLER, M. P., ATTIE, A. D., MUOIO, D. M. & KELLY, D. P. 2014. A role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circ Res*, 114, 626-36.
- MARTINS, R., LITHGOW, G. J. & LINK, W. 2016. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 15, 196-207.
- MATSUI, T., LI, L., DEL MONTE, F., FUKUI, Y., FRANKE, T. F., HAJJAR, R. J. & ROSENZWEIG, A. 1999. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*, 100, 2373-9.
- MATSUI, T., LI, L., WU, J. C., COOK, S. A., NAGOSHI, T., PICARD, M. H., LIAO, R. & ROSENZWEIG, A. 2002. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem*, 277, 22896-901.
- MATSUI, Y. & SADOSHIMA, J. 2004. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 37, 477-81.
- MATSUZAKI, H., DAITOKU, H., HATTA, M., TANAKA, K. & FUKAMIZU, A. 2003. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11285-11290.
- MAYO, L. D. & DONNER, D. B. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 11598-11603.
- MCMULLEN, J. R., SHIOI, T., HUANG, W. Y., ZHANG, L., TARNAVSKI, O., BISPING, E., SCHINKE, M., KONG, S., SHERWOOD, M. C., BROWN, J., RIGGI, L., KANG, P. M. & IZUMO, S. 2004. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem*, 279, 4782-93.

- MEDEMA, R. H., KOPS, G. J. P. L., BOS, J. L. & BURGERING, B. M. T. 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404, 782-787.
- MEIRHAEGHE, A., CROWLEY, V., LENAGHAN, C., LELLIOTT, C., GREEN, K., STEWART, A., HART, K., SCHINNER, S., SETHI, J. K., YEO, G., BRAND, M. D., CORTRIGHT, R. N., O'RAHILLY, S., MONTAGUE, C. & VIDAL-PUIG, A. J. 2003. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J*, 373, 155-65.
- MINSKY, M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10, 128-138.
- MIZUSHIMA, N. & YOSHIMORI, T. 2007. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-545.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140, 313-326.
- MODUR, V., NAGARAJAN, R., EVERS, B. M. & MILBRANDT, J. 2002. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem*, 277, 47928-37.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J.-R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. 1998. A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*, 93, 215-228.
- MONSALVE, M., WU, Z., ADELMANT, G., PUIGSERVER, P., FAN, M. & SPIEGELMAN, B. M. 2000. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*, 6, 307-16.
- MORI, T., KAWARA, S., SHINOZAKI, M., HAYASHI, N., KAKINUMA, T., IGARASHI, A., TAKIGAWA, M., NAKANISHI, T. & TAKEHARA, K. 1999. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor- $\beta$  in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *Journal of Cellular Physiology*, 181, 153-159.
- MORISCO, C., SETA, K., HARDT, S. E., LEE, Y., VATNER, S. F. & SADOSHIMA, J. 2001. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 276, 28586-97.
- MORRIS, J. B., KENNEY, B., HUYNH, H. & WOODCOCK, E. A. 2005. Regulation of the proapoptotic factor FOXO1 (FKHR) in cardiomyocytes by growth factors and alpha1-adrenergic agonists. *Endocrinology*, 146, 4370-6.
- MOTTA, M. C., DIVECHA, N., LEMIEUX, M., KAMEL, C., CHEN, D., GU, W., BULTSMA, Y., MCBURNEY, M. & GUARENTE, L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 116, 551-63.
- NAG, A. C. 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 28, 41-61.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J.-L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine*, 204, 3037-3047.
- NEMOTO, S. & FINKEL, T. 2002. Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a p66shc-Dependent Signaling Pathway. *Science*, 295, 2450-2452.
- NEVERS, T., SALVADOR, A. M., GRODECKI-PENA, A., KNAPP, A., VELÁZQUEZ, F., ARONOVITZ, M., KAPUR, N. K., KARAS, R. H., BLANTON, R. M. & ALCAIDE, P. 2015. Left

- Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure. *Circulation. Heart failure*, 8, 776-787.
- NI, Y. G., BERENJI, K., WANG, N., OH, M., SACHAN, N., DEY, A., CHENG, J., LU, G., MORRIS, D. J., CASTRILLON, D. H., GERARD, R. D., ROTHERMEL, B. A. & HILL, J. A. 2006. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation*, 114, 1159-68.
- O'CONNELL, T. D., NI, Y. G., LIN, K.-M., HAN, H. & YAN, Z. 2003. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes for signaling studies. *AfCS research reports*, 1, 1-9.
- OHNISHI, H., OKA, T., KUSACHI, S., NAKANISHI, T., TAKEDA, K., NAKAHAMA, M., DOI, M., MURAKAMI, T., NINOMIYA, Y., TAKIGAWA, M. & TSUJI, T. 1998. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 30, 2411-22.
- OLMOS, Y., VALLE, I., BORNIQUEL, S., TIERREZ, A., SORIA, E., LAMAS, S. & MONSALVE, M. 2009. Mutual Dependence of Foxo3a and PGC-1 $\alpha$  in the Induction of Oxidative Stress Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 14476-14484.
- OLSON, B. L., HOCK, M. B., EKHOLM-REED, S., WOHLSCHLEGEL, J. A., DEV, K. K., KRALLI, A. & REED, S. I. 2008. SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1 $\alpha$  transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes & development*, 22, 252-264.
- OLSON, E. N. & SCHNEIDER, M. D. 2003. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes & Development*, 17, 1937-1956.
- PANEK, A. N., POSCH, M. G., ALENINA, N., GHADGE, S. K., ERDMANN, B., POPOVA, E., PERROT, A., GEIER, C., DIETZ, R., MORANO, I., BADER, M. & OZCELIK, C. 2009. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS one*, 4, e6743-e6743.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20, 460-473.
- PASUMARTHI, K. B. S. & FIELD, L. J. 2002. Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation. *Circulation Research*, 90, 1044-1054.
- PENG, X.-D., XU, P.-Z., CHEN, M.-L., HAHN-WINDGASSEN, A., SKEEN, J., JACOBS, J., SUNDARARAJAN, D., CHEN, W. S., CRAWFORD, S. E., COLEMAN, K. G. & HAY, N. 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development*, 17, 1352-1365.
- PERHONEN, M. A., FRANCO, F., LANE, L. D., BUCKEY, J. C., BLOMQVIST, C. G., ZERWEKH, J. E., PESHOCK, R. M., WEATHERALL, P. T. & LEVINE, B. D. 2001. Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *Journal of Applied Physiology*, 91, 645-653.
- PLAS, D. R. & THOMPSON, C. B. 2003. Akt Activation Promotes Degradation of Tuberin and FOXO3a via the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12361-12366.
- POWELL, S. R. 2006. The Cardiac 26S Proteasome. *Circulation Research*, 99, 342-345.
- PUIGSERVER, P., ADELMANT, G., WU, Z., FAN, M., XU, J., O'MALLEY, B. & SPIEGELMAN, B. M. 1999. Activation of PPAR $\gamma$  coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286, 1368-71.
- PUIGSERVER, P., RHEE, J., DONOVAN, J., WALKEY, C. J., YOON, J. C., ORIENTE, F., KITAMURA, Y., ALTOMONTE, J., DONG, H., ACCILI, D. & SPIEGELMAN, B. M. 2003.

- Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, 423, 550-5.
- PUIGSERVER, P., RHEE, J., LIN, J., WU, Z., YOON, J. C., ZHANG, C. Y., KRAUSS, S., MOOTHA, V. K., LOWELL, B. B. & SPIEGELMAN, B. M. 2001. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*, 8, 971-82.
- PUIGSERVER, P., WU, Z., PARK, C. W., GRAVES, R., WRIGHT, M. & SPIEGELMAN, B. M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-39.
- QUINSAY, M. N., THOMAS, R. L., LEE, Y. & GUSTAFSSON, A. B. 2010. Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy*, 6, 855-62.
- RAMASWAMY, S., NAKAMURA, N., SANSAL, I., BERGERON, L. & SELLERS, W. R. 2002. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*, 2, 81-91.
- RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N. & NEWSHOLME, E. A. 1963. THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS. *The Lancet*, 281, 785-789.
- RAZEGHI, P., BASKIN, K. K., SHARMA, S., YOUNG, M. E., STEPKOWSKI, S., ESSOP, M. F. & TAEGTMEYER, H. 2006a. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 361-4.
- RAZEGHI, P., BUKSINSKA-LISIK, M., PALANICHAMY, N., STEPKOWSKI, S., FRAZIER, O. H. & TAEGTMEYER, H. 2006b. Transcriptional regulators of ribosomal biogenesis are increased in the unloaded heart. *The FASEB Journal*, 20, 1090-1096.
- RAZEGHI, P., SHARMA, S., YING, J., LI, Y. P., STEPKOWSKI, S., REID, M. B. & TAEGTMEYER, H. 2003. Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation*, 108, 2536-41.
- RAZEGHI, P., VOLPINI, K. C., WANG, M.-E., YOUKER, K. A., STEPKOWSKI, S. & TAEGTMEYER, H. 2007. Mechanical unloading of the heart activates the calpain system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42, 449-452.
- REINARTZ, M., RAUPACH, A., KAISERS, W. & GÖDECKE, A. 2014. AKT1 and AKT2 Induce Distinct Phosphorylation Patterns in HL-1 Cardiac Myocytes. *Journal of Proteome Research*, 13, 4232-4245.
- RENA, G., PRESCOTT, A. R., GUO, S., COHEN, P. & UNTERMAN, T. G. 2001. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *The Biochemical journal*, 354, 605-612.
- RODGERS, J. T., LERIN, C., HAAS, W., GYGI, S. P., SPIEGELMAN, B. M. & PUIGSERVER, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434, 113-8.
- RUDD, M. D., JOHNSTON, D. A., KAZIANIS, S. & BUTLER, A. P. 2003. Cloning and analysis of a FoxO transcription factor from *Xiphophorus*. *Gene*, 302, 31-41.
- RUSSELL, L. K., MANSFIELD, C. M., LEHMAN, J. J., KOVACS, A., COURTOIS, M., SAFFITZ, J. E., MEDEIROS, D. M., VALENCIK, M. L., MCDONALD, J. A. & KELLY, D. P. 2004. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis



- and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res*, 94, 525-33.
- SAFTIG, P. & KLUMPERMAN, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 623-635.
- SAMAREL, A. M., PARMACEK, M. S., MAGID, N. M., DECKER, R. S. & LESCH, M. 1987. Protein synthesis and degradation during starvation-induced cardiac atrophy in rabbits. *Circulation Research*, 60, 933-941.
- SANCHEZ, A. M., CSIBI, A., RAIBON, A., CORNILLE, K., GAY, S., BERNARDI, H. & CANDAU, R. 2012. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 695-710.
- SANDRI, M., SANDRI, C., GILBERT, A., SKURK, C., CALABRIA, E., PICARD, A., WALSH, K., SCHIAFFINO, S., LECKER, S. H. & GOLDBERG, A. L. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117, 399-412.
- SANO, H., KANE, S., SANO, E., MÎNEA, C. P., ASARA, J. M., LANE, W. S., GARNER, C. W. & LIENHARD, G. E. 2003. Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 14599-14602.
- 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.
- SCHENA, S., KURIMOTO, Y., FUKADA, J., TACK, I., RUIZ, P., PANG, M., STRIKER, L. J., AITOUCHE, A. & PHAM, S. M. 2004. Effects of ventricular unloading on apoptosis and atrophy of cardiac myocytes. *J Surg Res*, 120, 119-26.
- SCHIPS, T. G., WIETELMANN, A., HÖHN, K., SCHIMANSKI, S., WALTHER, P., BRAUN, T., WIRTH, T. & MAIER, H. J. 2011. FoxO3 induces reversible cardiac atrophy and autophagy in a transgenic mouse model. *Cardiovascular Research*, 91, 587-597.
- SENGUPTA, A., MOLKENTIN, J. D., PAIK, J.-H., DEPINHO, R. A. & YUTZEY, K. E. 2011. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 286, 7468-7478.
- SENGUPTA, A., MOLKENTIN, J. D. & YUTZEY, K. E. 2009. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*, 284, 28319-28331.
- SEOANE, J., LE, H. V., SHEN, L., ANDERSON, S. A. & MASSAGUE, J. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, 117, 211-23.
- SEVRIOUKOVA, I. F. 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 14, 2545-2579.
- SHARMA, S., YING, J., RAZEGHI, P., STEPKOWSKI, S. & TAEGTMEYER, H. 2006. Atrophic Remodeling of the Transplanted Rat Heart. *Cardiology*, 105, 128-136.
- SHI, J., ZHANG, L., ZHANG, Y.-W., SURMA, M., MARK PAYNE, R. & WEI, L. 2012. Downregulation of doxorubicin-induced myocardial apoptosis accompanies postnatal heart maturation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302, H1603-H1613.
- SHI, M., ZHU, J., WANG, R., CHEN, X., MI, L., WALZ, T. & SPRINGER, T. A. 2011. Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature*, 474, 343-349.



- SHIOI, T., MCMULLEN, J. R., KANG, P. M., DOUGLAS, P. S., OBATA, T., FRANKE, T. F., CANTLEY, L. C. & IZUMO, S. 2002. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 22, 2799-809.
- SHIOJIMA, I., SATO, K., IZUMIYA, Y., SCHIEKOFER, S., ITO, M., LIAO, R., COLUCCI, W. S. & WALSH, K. 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 2108-2118.
- SHIOJIMA, I., YEFREMASHVILI, M., LUO, Z., KUREISHI, Y., TAKAHASHI, A., TAO, J., ROSENZWEIG, A., KAHN, C. R., ABEL, E. D. & WALSH, K. 2002. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem*, 277, 37670-7.
- SHPIILKA, T., WEIDBERG, H., PIETROKOVSKI, S. & ELAZAR, Z. 2011. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome biology*, 12, 226-226.
- SHVETS, E., FASS, E., SCHERZ-SHOVAL, R. & ELAZAR, Z. 2008. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *J Cell Sci*, 121, 2685-95.
- SIME, P. J., XING, Z., GRAHAM, F. L., CSAKY, K. G. & GAULDIE, J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of clinical investigation*, 100, 768-776.
- SINGH, A., YE, M., BUCUR, O., ZHU, S., SANTOS, M. T., RABINOVITZ, I., WEI, W., GAO, D., HAHN, W. C. & KHOSRAVI-FAR, R. 2010. Protein Phosphatase 2A Reactivates FOXO3a through a Dynamic Interplay with 14-3-3 and AKT. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 1140-1152.
- SINN, H.-P., SCHNEEWEISS, A., KELLER, M., SCHLOMBS, K., LAIBLE, M., SEITZ, J., LAKIS, S., VELTRUP, E., ALTEVOGT, P., EIDT, S., WIRTZ, R. M. & MARMÉ, F. 2017. Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer*, 17, 124.
- SKURK, C., IZUMIYA, Y., MAATZ, H., RAZEGHI, P., SHIOJIMA, I., SANDRI, M., SATO, K., ZENG, L., SCHIEKOFER, S., PIMENTEL, D., LECKER, S., TAEGTMEYER, H., GOLDBERG, A. L. & WALSH, K. 2005. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280, 20814-20823.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SMITH, S. C. & ALLEN, P. M. 1991. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol*, 147, 2141-7.
- SOHAL, D. S., NGHIEM, M., CRACKOWER, M. A., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., TYMITZ, K. M., PENNINGER, J. M. & MOLKENTIN, J. D. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res*, 89, 20-5.
- SONODA, J., MEHL, I. R., CHONG, L.-W., NOFSINGER, R. R. & EVANS, R. M. 2007. PGC-1 $\beta$  controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 5223-5228.

- SPORN, M. B. & ROBERTS, A. B. 1992. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *The Journal of cell biology*, 119, 1017-1021.
- SPRINGER, J., TSCHIRNER, A., HAGHIKIA, A., VON HAEHLING, S., LAL, H., GRZESIAK, A., KASCHINA, E., PALUS, S., PÖTSCH, M., VON WEBSKY, K., HOCHER, B., LATOUCHE, C., JAISSE, F., MORAWIETZ, L., COATS, A. J. S., BEADLE, J., ARGILES, J. M., THUM, T., FÖLDES, G., DOEHNER, W., HILFIKER-KLEINER, D., FORCE, T. & ANKER, S. D. 2014. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *European heart journal*, 35, 932-941.
- STAAL, S. P. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 5034-5037.
- STAMBOLIC, V., SUZUKI, A., DE LA POMPA, J. L., BROTHERS, G. M., MIRTOSOS, C., SASAKI, T., RULAND, J., PENNINGER, J. M., SIDEROVSKI, D. P. & MAK, T. W. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29-39.
- STARKSEN, N. F., SIMPSON, P. C., BISHOPRIC, N., COUGHLIN, S. R., LEE, W. M., ESCOBEDO, J. A. & WILLIAMS, L. T. 1986. Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 8348-8350.
- STERNBERG, N. & HAMILTON, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- STITT, T. N., DRUJAN, D., CLARKE, B. A., PANARO, F., TIMOFEYVA, Y., KLINE, W. O., GONZALEZ, M., YANCOPOULOS, G. D. & GLASS, D. J. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Molecular Cell*, 14, 395-403.
- SUN, L., ZANG, W. J., WANG, H., ZHAO, M., YU, X. J., HE, X., MIAO, Y. & ZHOU, J. 2014. Acetylcholine Promotes ROS Detoxification Against Hypoxia/reoxygenation-Induced Oxidative Stress Through FoxO3a/PGC-1 $\alpha$  Dependent Superoxide Dismutase. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34, 1614-1625.
- SUNDERKÖTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M. J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D. A. & LEENEN, P. J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 172, 4410-7.
- TAEGTMEYER, H., RAZEGHI, P. & YOUNG, M. E. 2002. Mitochondrial Proteins In Hypertrophy And Atrophy: A Transcript Analysis In Rat Heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, 346-350.
- TAIPALE, J., SAHARINEN, J. & KESKI-OJA, J. 1998. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res*, 75, 87-134.
- TANG, T.-T., YUAN, J., ZHU, Z.-F., ZHANG, W.-C., XIAO, H., XIA, N., YAN, X.-X., NIE, S.-F., LIU, J., ZHOU, S.-F., LI, J.-J., YAO, R., LIAO, M.-Y., TU, X., LIAO, Y.-H. & CHENG, X. 2011. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*, 107, 232.
- TANIDA, I., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1, 84-91.

- TATEISHI, K., ASHIHARA, E., HONSHO, S., TAKEHARA, N., NOMURA, T., TAKAHASHI, T., UHEYAMA, T., YAMAGISHI, M., YAKU, H., MATSUBARA, H. & OH, H. 2007. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3 $\beta$  signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 352, 635-41.
- TEYSSIER, C., MA, H., EMTER, R., KRALLI, A. & STALLCUP, M. R. 2005. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 $\alpha$  by arginine methylation. *Genes & development*, 19, 1466-1473.
- THANNICKAL, V. J., LEE, D. Y., WHITE, E. S., CUI, Z., LARIOS, J. M., CHACON, R., HOROWITZ, J. C., DAY, R. M. & THOMAS, P. E. 2003. Myofibroblast Differentiation by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Is Dependent on Cell Adhesion and Integrin Signaling via Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12384-12389.
- THOMSEN, R., SOLVSTEN, C. A., LINNET, T. E., BLECHINGBERG, J. & NIELSEN, A. L. 2010. Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related XO values. *J Bioinform Comput Biol*, 8, 885-900.
- TIAN, M., ASP, M. L., NISHIJIMA, Y. & BELURY, M. A. 2011. Evidence for cardiac atrophic remodeling in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol*, 39, 1321-1326.
- TUNG O. CHAN, SUSAN E. RITTENHOUSE, A. & TSICHLIS, P. N. 1999. AKT/PKB and Other D3 Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 965-1014.
- TURRENS, J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*, 17, 3-8.
- TYAGI, S. C., LEWIS, K., PIKES, D., MARCELLO, A., MUJUMDAR, V. S., SMILEY, L. M. & MOORE, C. K. 1998. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. *J Cell Physiol*, 176, 374-82.
- VAINSHTEIN, A., DESJARDINS, E. M., ARMANI, A., SANDRI, M. & HOOD, D. A. 2015. PGC-1 $\alpha$  modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 5, 9-9.
- VAN DER HEIDE, L. P., HOEKMAN, M. F. M. & SMIDT, M. P. 2004. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochemical Journal*, 380, 297-309.
- VAN DER HORST, A. & BURGERING, B. M. 2007. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 440-50.
- VAN DER VOS, K. E. & COFFER, P. J. 2008. FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*, 27, 2289-2299.
- VANDE VELDE, C., CIZEAU, J., DUBIK, D., ALIMONTI, J., BROWN, T., ISRAELS, S., HAKEM, R. & GREENBERG, A. H. 2000. BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 5454-5468.
- VANHAESEBROECK, B. & ALESSI, D. R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal*, 346 Pt 3, 561-576.
- VARDA-BLOOM, N., LEOR, J., OHAD, D. G., HASIN, Y., AMAR, M., FIXLER, R., BATTLE, A., ELDAR, M. & HASIN, D. 2000. Cytotoxic T Lymphocytes Are Activated Following Myocardial Infarction and Can Recognize and Kill Healthy Myocytes In Vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32, 2141-2149.
- VEGA, R. B., HUSS, J. M. & KELLY, D. P. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of

- nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*, 20, 1868-76.
- VERNIER-MAGNIN, S., NEMOS, C., MANSUY, V., TOLLE, F., GUICHARD, L., DELAGE-MOURROUX, R., JOUVENOT, M. & FRAICHARD, A. 2005. Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1/GABARAPL1* gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1731, 23-31.
- VIANNA, C. R., HUNTGEBURTH, M., COPPARI, R., CHOI, C. S., LIN, J., KRAUSS, S., BARBATELLI, G., TZAMELI, I., KIM, Y.-B., CINTI, S., SHULMAN, G. I., SPIEGELMAN, BRUCE M. & LOWELL, B. B. 2006. Hypomorphic mutation of PGC-1 $\beta$  causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metabolism*, 4, 453-464.
- VILCHEZ, D., BOYER, L., MORANTTE, I., LUTZ, M., MERKWIRTH, C., JOYCE, D., SPENCER, B., PAGE, L., MASLIAH, E., BERGGREN, W. T., GAGE, F. H. & DILLIN, A. 2012. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature*, 489, 304-308.
- VILLENA, J. A. 2015. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *The FEBS Journal*, 282, 647-672.
- VINTEN-JOHANSEN, J. 2004. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 61, 481-497.
- VIRBASIOUS, J. V. & SCARPULLA, R. C. 1991. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Molecular and cellular biology*, 11, 5631-5638.
- VIRBASIOUS, J. V. & SCARPULLA, R. C. 1994. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 1309-1313.
- VLIEGEN, H. W., VAN DER LAARSE, A., CORNELISSE, C. J. & EULDERINK, F. 1991. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy: A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *European Heart Journal*, 12, 488-494.
- VYAS, J. M., VAN DER VEEN, A. G. & PLOEGH, H. L. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 8, 607-18.
- WALLBERG, A. E., YAMAMURA, S., MALIK, S., SPIEGELMAN, B. M. & ROEDER, R. G. 2003. Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 $\alpha$ . *Mol Cell*, 12, 1137-49.
- WAN, E., YEAP, X. Y., DEHN, S., TERRY, R., NOVAK, M., ZHANG, S., IWATA, S., HAN, X., HOMMA, S., DROSATOS, K., LOMASNEY, J., ENGMAN, D. M., MILLER, S. D., VAUGHAN, D. E., MORROW, J. P., KISHORE, R. & THORP, E. B. 2013. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circulation research*, 113, 1004-1012.
- WANG, L., HU, L., ZHOU, X., XIONG, Z., ZHANG, C., SHEHADA, H. M. A., HU, B., SONG, J. & CHEN, L. 2017. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Scientific reports*, 7, 13321-13321.

- WANG, W. J., MENG, Z. L., MO, Y. C., LIU, J. W., SUN, C. C., HU, S. S. & ZHANG, H. 2012. Unloading the infarcted heart affect MMPs-TIMPs axis in a rat cardiac heterotopic transplantation model. *Mol Biol Rep*, 39, 277-83.
- WANG, Z., ZHAO, C., MOYA, R. & DAVIES, J. D. 2008. A novel role for CD4+ T cells in the control of cachexia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181, 4676-4684.
- WATSON, P. A., REUSCH, J. E. B., MCCUNE, S. A., LEINWAND, L. A., LUCKEY, S. W., KONHILAS, J. P., BROWN, D. A., CHICCO, A. J., SPARAGNA, G. C., LONG, C. S. & MOORE, R. L. 2007. Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293, H246-H259.
- WEBB, A. E. & BRUNET, A. 2014. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends in biochemical sciences*, 39, 159-169.
- WEIGEL, D., JURGENS, G., KUTTNER, F., SEIFERT, E. & JACKLE, H. 1989. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell*, 57, 645-58.
- WELSH, D. C., DIPLA, K., MCNULTY, P. H., MU, A., OJAMAA, K. M., KLEIN, I., HOUSER, S. R. & MARGULIES, K. B. 2001. Preserved contractile function despite atrophic remodeling in unloaded rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1131-6.
- WOODLEY, S. L., MCMILLAN, M., SHELBY, J., LYNCH, D. H., ROBERTS, L. K., ENSLEY, R. D. & BARRY, W. H. 1991. Myocyte injury and contraction abnormalities produced by cytotoxic T lymphocytes. *Circulation*, 83, 1410-1418.
- WU, Z., PUIGSERVER, P., ANDERSSON, U., ZHANG, C., ADELMANT, G., MOOTHA, V., TROY, A., CINTI, S., LOWELL, B., SCARPULLA, R. C. & SPIEGELMAN, B. M. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98, 115-24.
- XIAO, G., MAO, S., BAUMGARTEN, G., SERRANO, J., JORDAN, M. C., ROOS, K. P., FISHBEIN, M. C. & MACLELLAN, W. R. 2001. Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ Res*, 89, 1122-9.
- YAN, X., ANZAI, A., KATSUMATA, Y., MATSUHASHI, T., ITO, K., ENDO, J., YAMAMOTO, T., TAKESHIMA, A., SHINMURA, K., SHEN, W., FUKUDA, K. & SANO, M. 2013. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 24-35.
- YANG, H., HUANG, Y., CHEN, X., LIU, J., LU, Y., BU, L., XIA, L., XIAO, W., CHEN, M., NIE, Q. & LIU, Z. 2010. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF- $\beta$ (2) , elucidated by treatment with CTGFsiRNA. *Acta Ophthalmol*, 88, 652-9.
- YANG, J. Y., ZONG, C. S., XIA, W., YAMAGUCHI, H., DING, Q., XIE, X., LANG, J. Y., LAI, C. C., CHANG, C. J., HUANG, W. C., HUANG, H., KUO, H. P., LEE, D. F., LI, L. Y., LIEN, H. C., CHENG, X., CHANG, K. J., HSIAO, C. D., TSAI, F. J., TSAI, C. H., SAHIN, A. A., MULLER, W. J., MILLS, G. B., YU, D., HORTOBAGYI, G. N. & HUNG, M. C. 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol*, 10, 138-48.
- YIN, J., GUO, J., ZHANG, Q., CUI, L., ZHANG, L., ZHANG, T., ZHAO, J., LI, J., MIDDLETON, A., CARMICHAEL, P. L. & PENG, S. 2018. Doxorubicin-induced mitophagy and

- mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicol In Vitro*, 51, 1-10.
- YOON, J. C., PUIGSERVER, P., CHEN, G., DONOVAN, J., WU, Z., RHEE, J., ADELMANT, G., STAFFORD, J., KAHN, C. R., GRANNER, D. K., NEWGARD, C. B. & SPIEGELMAN, B. M. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413, 131-8.
- YOSHII, S. R., KISHI, C., ISHIHARA, N. & MIZUSHIMA, N. 2011. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry*, 286, 19630-19640.
- YOU, H., PELLEGRINI, M., TSUCHIHARA, K., YAMAMOTO, K., HACKER, G., ERLACHER, M., VILLUNGER, A. & MAK, T. W. 2006. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*, 203, 1657-63.
- YOULE, R. J. & NARENDRA, D. P. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 9-14.
- YURKOVA, N., SHAW, J., BLACKIE, K., WEIDMAN, D., JAYAS, R., FLYNN, B. & KIRSHENBAUM, L. A. 2008. The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ Res*, 102, 472-9.
- ZELARAYÁN, L. C., NOACK, C., SEKKALI, B., KMECOVA, J., GEHRKE, C., RENGER, A., ZAFIRIOU, M.-P., VAN DER NAGEL, R., DIETZ, R., DE WINDT, L. J., BALLIGAND, J.-L. & BERGMANN, M. W. 2008.  $\beta$ -Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 19762-19767.
- ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J. & KORSMEYER, S. J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87, 619-28.
- ZHAO, J., BRAULT, J. J., SCHILD, A., CAO, P., SANDRI, M., SCHIAFFINO, S., LECKER, S. H. & GOLDBERG, A. L. 2007. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, 6, 472-83.
- ZHAO, X., GAN, L., PAN, H., KAN, D., MAJESKI, M., ADAM, S. A. & UNTERMAN, T. G. 2004. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochemical Journal*, 378, 839-849.
- ZHENG, Q., SU, H., RANEK MARK, J. & WANG, X. 2011. Autophagy and p62 in Cardiac Proteinopathy. *Circulation Research*, 109, 296-308.
- ZONG, H., REN, J. M., YOUNG, L. H., PYPAERT, M., MU, J., BIRNBAUM, M. J. & SHULMAN, G. I. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15983-15987.



## **DANKSAGUNG**

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Stefanie Gödecke und meinem Doktorvater Professor Axel Gödecke für die gute Begleitung während meiner Doktorarbeit bedanken. Durch den engen Austausch, fachlich wie persönlich, wird die Zeit an dieser Arbeit in sehr guter Erinnerung bleiben.

Den Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie Rianne Nederlof, André Heinen, Daniela Müller, Susanne Küsters und Julia Albrecht möchte ich ganz herzlich danken für Ihre Geduld bei der Einarbeitung und stetige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Schwierigkeiten.

Weiterhin bedanke ich mich beim Team des IRTG 1902, insbesondere bei Sandra Berger, Susanne Schindler und Axel Gödecke, die die Teilnahme an diesem Projekt ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihren ständigen Zuspruch und ihre bedingungslose Unterstützung.