

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

In vivo-Modulation von Signalwegen in
kardiomyozytenspezifischen
AKT-1/2-Doppel-Knockout-Mäusen

Dissertation

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

vorgelegt von

Lukas Breuling

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. med. Johannes Stegbauer

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die Proteinkinase AKT fördert als wichtiger Vermittler anaboler Prozesse Wachstum über mTORC1-Aktivierung sowie Überleben und Proliferation über inhibitorische Phosphorylierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren. Ein kardialer AKT-1/2-Doppel-Knockout führt in Mäusen zu letalem Herzversagen. Bisher ist unbekannt, welche AKT-Substrate dabei beteiligt sind. Daher sollte in dieser Arbeit durch Wiederherstellung AKT-vermittelter Teilfunktionen deren Bedeutung für den beobachteten Phänotyp untersucht werden: zum einen über Expression einer konstitutiv aktiven Rheb Q64L-Mutante zur mTORC1-Aktivierung, zum anderen über Expression einer panFOXO shRNA zur Reduktion der FOXO-Proteinmenge. Die Katabolismus-fördernde Proteinkinase AMPK ist bedeutend für die Homöostase des zellulären Energiestatus. Dennoch wurde in kardialen AKT-1/2-Doppel-Knockout-Mäusen trotz progredienter energetischer Verarmung eine vermehrte inhibitorische AMPK-Serin-485/491-Phosphorylierung beobachtet. Ein zweites Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch Wiederherstellung der AMPK-Aktivität mittels Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-S491A-Mutante deren Bedeutung für die beobachteten phänotypischen Veränderungen zu ermitteln.

Zunächst wurde die Expression von Plasmidsequenzen zur Wiederherstellung der Teilfunktionen mittels transienter Zelltransfektion und folgender Western Blot-Analyse überprüft. Die Rheb Q64L-vermittelte mTORC1-Aktivierung konnte gezeigt werden. Ein weiteres Plasmid enthielt eine loxP-flankierte GFP-Expressions-kassette zur Cre-abhängigen, induzierbaren Rheb Q64L-Expression. Nach transienter Zelltransfektion und Koexpression einer Cre-Rekombinase wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch auf Western Blot-Ebene eine reduzierte GFP-Expression nachgewiesen. Eine vermehrte Rheb Q64L-Expression blieb jedoch aus, sodass dieses Plasmidkonstrukt nicht weiterverwendet wurde. Da die Expression einer panFOXO shRNA trotz vorheriger FACS-basierter Zellsortierung nur zu einer moderaten Reduktion der FOXO3A-Menge führte, wurde auf die weiterführende Untersuchung verzichtet. Für die AMPK- α 2-S491A-Variante konnte eine fehlende inhibitorische Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Daraufhin wurden Tamoxifen-induzierbare, kardiale AKT-1/2-Doppel-Knockout-Mäuse mit Adeno-assoziierten Viruspartikeln vom Serotyp 9 zur Rheb Q64L- bzw. AMPK- α 2-S491A-Expression infiziert. Echokardiographisch im Zeitverlauf ermittelte kardiale Funktionsparameter sowie das Überleben wurden mit nicht-infizierten Knockout-Tieren verglichen. Post mortem wurde die Transgenexpression mittels qPCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft. Rheb Q64L-infizierte Tiere zeigten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da das Rheb Q64L-Transgen kardial nur gering exprimiert wurde, blieb unklar, ob die induzierte Aktivierung des mTORC1-Signalweges den kardialen Phänotyp nicht beeinflusst oder ob die Expression nicht ausreichend war, um einen Effekt zu erzielen. AMPK- α 2-S491A-infizierte Tiere zeigten eine verlangsamte Verschlechterung einiger kardialer Funktionsparameter und ein tendenziell verlängertes Überleben. Eine kardiale Infektion mit jedoch unklarer Effizienz wurde nachgewiesen. Es konnte von einer kardioprotektiven AMPK-Wirkung ausgegangen werden, die die Progredienz der Knockout-induzierten Herzinsuffizienz zumindest partiell abschwächt. Daher scheint die inhibitorische AMPK-Serin-485/491-Phosphorylierung im AKT-1/2-Doppel-Knockout-Modell zur kardialen Funktionseinschränkung beizutragen.

Summary

As an important mediator of anabolic processes, protein kinase AKT promotes growth via mTORC1 activation as well as survival and proliferation via inhibitory phosphorylation of FOXO transcription factors. Cardiac AKT-1/2 double knockout mice develop lethal heart failure. So far it is unknown which AKT substrates mediate the observed restriction. Therefore, by restoring AKT mediated subfunctions, their importance for the observed phenotype was examined in this work: on the one hand by expressing a constitutively active Rheb Q64L mutant to activate mTORC1 signaling, on the other hand by expressing a panFOXO shRNA to reduce the amount of FOXO protein. Catabolism-promoting protein kinase AMPK is of central importance for homeostasis of the cellular energy status. Surprisingly, an increased inhibitory AMPK serine 485/491 phosphorylation was detected in cardiac AKT-1/2 double knockout mice despite progressive energetic depletion. A second aim of this work was to determine the importance of AMPK for the observed cardiac changes by restoring the AMPK activity through expression of a non-inactivatable AMPK- α 2-S491A mutant.

First, the expression of plasmid sequences to restore the partial functions was investigated by transient cell transfection and subsequent Western Blot analysis. Rheb Q64L mediated activation of mTORC1 signaling was shown. Another plasmid contained a loxP flanked GFP expression cassette for Cre dependent, inducible Rheb Q64L expression. After transient cell transfection and co-expression of a Cre recombinase, reduced GFP expression was detected both by flow cytometry and Western Blot. However, an increased Rheb Q64L expression did not occur. Therefore, this plasmid construct was no longer used. Since the expression of panFOXO shRNA led only to a moderate reduction of FOXO3A amount despite prior FACS-based cell sorting, no further investigation was carried out. For the AMPK- α 2-S491A variant a lack of inhibitory phosphorylation was demonstrated.

Tamoxifen-inducible, cardiac AKT-1/2 double knockout mice were then infected with adeno-associated virus particles of serotype 9 for Rheb Q64L or AMPK- α 2-S491A expression. Cardiac function parameters determined over time by echocardiography as well as survival were compared with non-infected knockout mice. After the animals' death, transgene expression was investigated by qPCR or Western Blot analysis. In Rheb Q64L infected mice, no difference was detected in comparison to the control group. Since the Rheb Q64L transgene was only slightly expressed in hearts, it remained unclear whether the induced activation of mTORC1 signaling did not influence the cardiac phenotype or whether the expression was insufficient for achieving an effect. AMPK- α 2-S491A infected mice showed a slowed deterioration of some cardiac function parameters and a tendency towards prolonged survival. Cardiac infection was demonstrated. However, infection effectiveness remained unclear. An AMPK-mediated, cardioprotective effect can be assumed, which at least partially blunts the progression of knockout-induced heart failure. Therefore, the inhibitory phosphorylation of AMPK serine 485/491 in the AKT-1/2 double knockout model seems to contribute to the cardiac function restriction.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	micro-
3T3	<i>3-day transfer, inoculum 3*10⁵ cells</i>
4EBP1	<i>4E-binding protein 1</i>
A	Alanin; Ampere
(p)AAV (2/9)	<i>(plasmid) Adeno-assoziiertes Virus (Serotyp 2/9)</i>
AAV2 ITR	<i>AAV2 inverted terminal repeat</i>
Abb.	Abbildung
AGC	Proteinkinasen A, G und C
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase</i>
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
B-Mode	<i>brightness modulation</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, ungefähr
CaMK(Kβ)	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (kinase-β)</i>
CMGC	<i>cyclin-dependent kinases, mitogen-activated protein kinases, glycogen synthase kinases, CDK-like kinases</i>
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	<i>avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
Cre	<i>causes recombination</i>
C_T	<i>threshold cycle</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cTNT	<i>chicken cardiac troponin T</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
(c/g)DNA	<i>(complementary/genomic) Desoxyribonukleinsäure</i>
d	Diastole
DS	<i>discosoma species</i>

dT	<i>deoxy-thymine</i>
DTT	Dithiothreitol
(S-)EDTA	(Saline-)Ethyldiamintetraacetat
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESV	endsystolisches Volumen
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FAC	<i>fractional area change</i> , Flächenänderung
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FCS	<i>Forward Scatter</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
fl	<i>floxed</i> , flankiert
FOXO	<i>forkhead box O</i>
FS	<i>fractional shortening</i> , Verkürzungsfraction
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GLUT	<i>glucose transporter</i> , Glukosetransporter
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H₂O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hU6	<i>human U6</i>
HW/BW	<i>Heart weight/Body weight</i>
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
iCM	induzierbar, kardiomyozytenspezifisch
IGF(-1)	<i>Insulin-like growth factor (1)</i>
IKKβ	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β</i>
k	kilo-
KDEL_{R1}	<i>KDEL endoplasmatic reticulum protein retention receptor 1</i>

KO	Knockout
l	Liter
L	Leucin
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
LVAW	<i>left ventricular anterior wall</i> ; anteriore Wanddicke des linken Ventrikels
LVID	<i>left ventricular internal diameter</i> , linksventrikulärer Innendurchmesser/ innerventrikulärer Durchmesser des linken Ventrikels
LVPW	<i>left ventricular posterior wall</i> , posteriore Wanddicke des linken Ventrikels
M	Mega-; molar
m	milli-; Meter
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mer	<i>mutated estrogen receptor</i> , mutagenisierter Östrogenrezeptor
min	Minute
M-Mode	<i>motion modulation</i>
mTOR(C)	<i>mammalian target of rapamycin (complex)</i>
mU6	<i>mouse U6</i>
n	nano-; Anzahl
N-Terminus	Amino-Terminus
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
p	<i>probabilitas</i> , Wahrscheinlichkeit
pA	Polyadenylierungssignal
p70S6K	<i>p70 S6 kinase</i>
pan	gesamt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
(q)PCR	<i>(real-time quantitative) polymerase chain reaction</i> , (quantitative Echtzeit-)Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PKD1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PGC-1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α</i>
PGK	<i>phosphoglycerate kinase</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PKD-1	<i>protein kinase D1</i>

PI(3K)	Phosphoinositid(-3-Kinase)
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PP2A	Proteinphosphatase 2
PRAS40	<i>proline-rich AKT substrate of 40 kDA</i>
pSico(R)	<i>plasmid for stable RNA interference, conditional (Reverse)</i>
PSLA	<i>parasternal long-axis, parasternale lange Achse</i>
Q	Glutamin
Red	<i>red fluorescent protein</i>
rel.	relativ
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonukleinsäure</i>
s	Systole
S	Serin
SAX	<i>short axis, parasternale kurze Achse</i>
SDS	<i>sodium dodecyle sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SV	Schlagvolumen
SV 40	Simian-Virus 40
T	Threonin
TBS(-T)	<i>tris-buffered saline (with Tween 20)</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amniomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
V	Volt
vs.	<i>versus, gegen</i>
WRPE	<i>woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element</i>
WT	Wildtyp
α-MHC	<i>myosin heavy chain α isoform, schwere Kette des Myosins</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	AKT	1
1.1.1	AKT-Strukturaufbau	2
1.1.2	AKT-Funktionen	3
1.1.3	AKT-Signaltransduktion	3
1.1.4	AKT-Substrate	6
1.2	AMPK	8
1.2.1	AMPK-Strukturaufbau und -Signaltransduktion	8
1.2.2	AMPK-Funktionen und -Substrate	10
1.3	Kardiale Wirkung von AKT und AMPK	11
1.4	AKT-Knockout-Modelle mit Fokus auf die kardiale Funktion	13
1.5	Signalwegmodulation mithilfe eines AAV-Systems	14
1.6	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Laborgeräte und Zubehör	16
2.2	Softwareprogramme	17
2.3	Chemikalien und weitere Substanzen	17
2.4	Puffersysteme und weitere Lösungen	18
2.5	Primer	18
2.6	Kits	19
2.7	Zellkultur	19
2.8	Antikörper	19
2.9	Verwendung von Plasmiden	20
2.9.1	Grundvektoren	20
2.9.2	Rheb-basierte Plasmide	23
2.9.3	PanFOXO shRNA-basierte Plasmide	24
2.9.4	AMPK- α 2-basierte Plasmide	26
2.9.5	Weitere Plasmide	27
2.10	Transgenes Mausmodell	27
2.10.1	AAV9-Infektion	27
2.10.2	Cre-loxP-System	28
2.10.3	Induktion des iCMAKT1/2-KOs	28
2.10.4	Echokardiographie	29
2.10.5	Beurteilung der Belastungszeichen	32
2.10.6	Organentnahme	32

2.10.7	Primärprobenaufbereitung	32
2.11	Zellkultur	33
2.11.1	Verwendete Zelllinien	33
2.11.2	Kultivierung von HEK293- und NIH3T3-Zellen	33
2.11.3	Transiente Transfektion in HEK293- und NIH3T3-Zellen	33
2.11.4	Zellernte für Proteinanalyse	34
2.12	Untersuchung von Proteinen	34
2.12.1	Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test)	34
2.12.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.12.3	Western Blot-Analyse	35
2.13	Untersuchung von RNA	36
2.13.1	RNA-Isolation	36
2.13.2	Reverse Transkription in cDNA	36
2.13.3	Quantitative PCR	37
2.13.4	Auswertung	38
2.14	Untersuchung von Zellfluoreszenz	38
2.14.1	Vorbereitung der Proben	38
2.14.2	Durchflusszytometrie	39
2.14.3	Zellsortierung anhand eines Zellfluoreszenzsignals	40
2.15	Statistik	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Untersuchung des Effektes der transienten Rheb-Expression auf die mTORC1-Aktivität	41
3.2	Untersuchung eines Plasmids mit AAV9-Hintergrund zur induzierbaren Rheb Q64L-Expression	43
3.2.1	Charakterisierung des erzeugten Plasmids	43
3.2.2	In vitro Cre-Exzision einer GFP-Expressionskassette	47
3.2.3	Untersuchung einer Rheb Q64L-Mutante zur AAV9-Erzeugung	48
3.3	Bestimmung der Effizienz einer panFOXO shRNA	50
3.4	Charakterisierung einer AMPK- α 2-S491A-Mutante	51
3.5	In vivo-Expression von Rheb im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell	54
3.5.1	Untersuchung des Einflusses der Rheb-Expression auf die Herzfunktion	54
3.5.2	Überlebensvergleich nach Knockout-Induktion	58
3.5.3	Expressionsnachweis transgenen Rhebs nach AAV9-Infektion	58
3.6	In vivo-Expression von AMPK im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell	59
3.6.1	Inhibitorische AMPK- α -Phosphorylierung nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs	60

3.6.2	Untersuchung des Einflusses der AMPK- α 2-S491A-Expression auf die Herzfunktion.....	61
3.6.3	Überlebensvergleich nach Knockout-Induktion	69
3.6.4	Expressionsnachweis transgener AMPK nach AAV9-Infektion.....	70
4	Diskussion.....	72
4.1	Bedeutung von Rheb im iCMAKT1/2-KO-Modell.....	73
4.1.1	Wirkung der Rheb-Expression auf die mTORC1-Aktivität.....	73
4.1.2	Untersuchung der induzierbaren Rheb-Expression	74
4.1.3	Untersuchung einer Rheb Q64L-Mutante zur AAV9-Erzeugung	77
4.1.4	Wiederherstellung der Rheb-Funktion in iCMAKT1/2-KO-Mäusen ..	77
4.2	Untersuchung der Wirksamkeit einer panFOXO shRNA	79
4.3	Bedeutung von AMPK im iCMAKT1/2-KO-Modell	80
4.3.1	Charakterisierung einer AMPK- α 2-S491A-Mutante zur AAV9-Erzeugung	81
4.3.2	Untersuchung der Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell	82
4.3.3	Wiederherstellung der AMPK-Aktivität in iCMAKT1/2-KO-Mäusen ..	83
4.4	Limitationen des AAV9-vermittelten Gentransfers in vivo	86
4.5	Schlussfolgerungen.....	88
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	89
6	Anhang.....	102
7	Danksagung.....	106

1 Einleitung

1.1 AKT

Die Kommunikation über die Zellgrenze hinaus ist in vielzelligen Organismen unabdingbar, um komplexe Stoffwechselforgänge abzustimmen und schnell auf sich ändernde Umwelteinflüsse oder Bedürfnisse bestimmter Organe reagieren zu können. Die Signalübertragung durch membranständige Rezeptoren stellt einen von mehreren unterschiedlichen Mechanismen zur Umsetzung dieses Kommunikationsbedarfs dar. Diese Rezeptoren dienen als Transferstelle für die Übersetzung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere. Im Rahmen dieses auch als Signaltransduktion bezeichneten Vorganges setzt das Binden von extrazellulären Kommunikationsmolekülen wie Hormonen oder Zytokinen an den membranständigen Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade in Bewegung. Innerhalb dieser Kaskade modifizieren sekundäre Botenstoffe das Signal. Es kommt schließlich zur Aktivierung spezifischer Signalwege, die zu Veränderungen der intrazellulären Stoffwechselaktivität führen.

Die Beeinflussung der Aktivität bestimmter Zielproteine kann zum Beispiel über posttranslationale Modifikation erreicht werden. Die Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen stellt eine wichtige Möglichkeit dar, intrazelluläre Proteine nach Ablauf der Translation in ihrer Aktivität zu modifizieren. Proteinkinasen vermitteln die Übertragung des γ -Phosphatrestes eines ATP-/GTP-Moleküls auf spezifische Substrate (Hanks and Hunter, 1995). Nach Hanks und Hunter werden die Proteinkinasen, ausgehend von der phylogenetischen Untersuchung der Sequenzen ihrer katalytischen Domäne, in vier Subgruppen unterteilt. Die Gruppe der AGC-Kinasen zeichnet sich dabei durch die bevorzugte Phosphorylierung von Serin-/Threoninresten aus, die in der Nähe der basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin liegen. Auch die Gruppe der CaMK-Kinasen phosphoryliert bevorzugt in der Nähe basischer Aminosäuren, wohingegen die Proteinkinasen aus der Familie der CMGC-Kinasen meist die Phosphorylierung von Substraten favorisiert, in deren Umgebung die Aminosäure Prolin zahlreich vertreten ist. Die Gruppe der konventionellen Protein-Tyrosinkinasen enthält Kinasen, die spezifisch an der Aminosäure Tyrosin phosphorylieren. Weitere Proteinkinasen werden in einer zusätzlichen Gruppe der „anderen Proteinkinasen“ zusammengefasst (Hanks and Hunter, 1995).

Die Proteinkinase AKT ist eine Serin-/Threoninkinase und gehört zur Gruppe der AGC-Kinasen (Hanks and Hunter, 1995). Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass das AKT-Protein bedeutende Strukturähnlichkeiten mit den Proteinkinasen A und C besitzt, woraufhin dieses durch Coffe und Woodgett auch als Proteinkinase B titulierte wurde (Coffe and Woodgett, 1991, Jones et al., 1991b, Bellacosa et al., 1991). Durch Identifizierung zweier weiterer Mitglieder der Proteinkinase B-Familie (Jones et al., 1991a, Cheng et al., 1992, Konishi et al., 1995) sind nun insgesamt die drei Isoformen AKT-1, AKT-2 und AKT-3 bzw. Proteinkinase B- α , - β und - γ bekannt.

1.1.1 AKT-Strukturaufbau

Alle drei AKT-Isoformen zeigen einen gleichen strukturellen Aufbau, bestehend aus einer am N-Terminus gelegenen PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne, einer Kinase-Domäne sowie einer am C-Terminus gelegenen regulatorischen Domäne (Hanada et al., 2004) (Abb. 1). Bei der PH-Domäne handelt es sich um eine in zahlreichen Enzymen vorkommende Struktur mit einer Größe von annähernd 100 Aminosäuren (Shaw, 1996). Eine wichtige funktionelle Bedeutung kommt der PH-Domäne im Rahmen der Membranrekrutierung von Proteinen zu (Shaw, 1996). Die Aminosäuren Threonin 308 in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne sowie Serin 473 im hydrophoben Motif der regulatorischen Domäne stellen wichtige Phosphorylierungsstellen innerhalb des AKT-Moleküls zur Aktivierung der Proteinkinase dar (Alessi et al., 1996a). Die Phosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne zur Steigerung der Kinaseaktivität ist eine Gemeinsamkeit aller AGC-Kinasen, welche weiterhin über eine hohe Sequenzhomologie innerhalb der katalytischen Domäne verfügen (Peterson and Schreiber, 1999). Die Gene zur Expression der einzelnen AKT-Isoformen sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert (Murthy et al., 2000). Dennoch zeigen diese eine große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen (Konishi et al., 1995). Auch auf Ebene der Substratspezifität liegt zwischen den einzelnen AKT-Isoformen eine hohe Übereinstimmung vor, wobei die Substrate aller AKT-Isoformen über die spezifische Erkennungssequenz RXRXXS/T-F/L (R = Arginin; S = Serin; T = Threonin; F = Phenylalalin; L = Leucin; X = beliebige Aminosäure) verfügen (Alessi et al., 1996b, Meier et al., 1997, Walker et al., 1998).

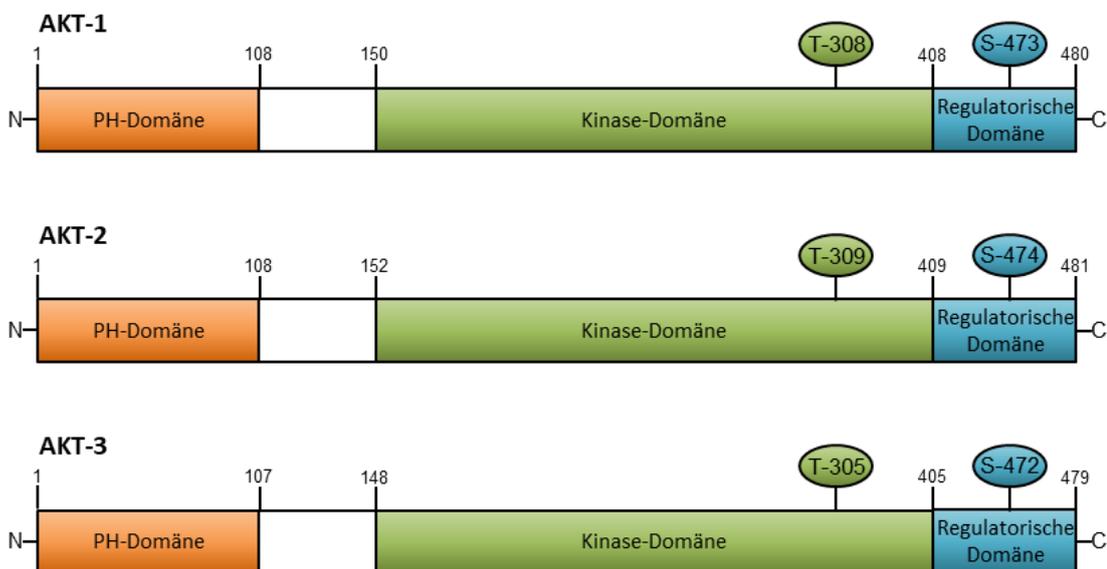


Abb. 1: Strukturaufbau der drei AKT-Isoformen. Dargestellt ist der strukturelle Aufbau der drei AKT-Isoformen bestehend aus N-terminaler PH-Domäne, Kinase-Domäne sowie C-terminaler regulatorischer Domäne inklusive der jeweiligen Aminosäure-Positionen. Die AKT-Isoformen besitzen je eine Phosphorylierungsstelle an den Aminosäuren Threonin (Threonin 308 für AKT-1; Threonin 309 für AKT-2; Threonin 305 für AKT-3) innerhalb der Kinase-Domäne sowie Serin (Serin 473 für AKT-1; Serin 474 für AKT-2; Serin 472 für AKT-3) innerhalb der regulatorischen Domäne (Hanada et al., 2004).

1.1.2 AKT-Funktionen

Die einzelnen AKT-Isoformen unterscheiden sich bezüglich der Expression in den verschiedenen Organsystemen. Dabei weist AKT-1 eine Expression in den meisten Organen auf (Chen et al., 2001). AKT-2 hingegen kommt vor allem in Insulin-sensitiven Geweben wie Leber, Fettgewebe oder Skelettmuskulatur vor (Cho et al., 2001a). AKT-3 wird hauptsächlich in Gehirn und Hoden exprimiert (Yang et al., 2003).

Allgemein ist AKT unter anderem beteiligt an der Hemmung der Apoptose, der zellulären Differenzierung sowie dem Glykogen-Stoffwechsel (Kennedy et al., 1997, Cross et al., 1995, Magun et al., 1996). Weiterhin werden auch den einzelnen AKT-Isoformen spezifische Aufgaben zugeschrieben, sodass sich diese hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung unterscheiden. AKT-1 nimmt eine wichtige Funktion im Rahmen des prä- und postnatalen Wachstums ein (Cho et al., 2001b). Dabei zeigte sich im murinen AKT-1-Knockout-Modell trotz des weit verbreiteten Vorkommens von AKT-1 kein relevanter Einfluss auf die Glukose-Homöostase und den Insulinspiegel, jedoch wiesen die AKT-1-Knockout-Mäuse ein vermindertes Körpergewicht auf (Chen et al., 2001, Cho et al., 2001b). AKT-2 spielt vor allem eine wichtige Rolle in der Glukose-Homöostase, wobei AKT-2-Knockout-Mäuse eine globale Hyperglykämie sowie eine Insulinresistenz entwickelten (Cho et al., 2001a, Garofalo et al., 2003). AKT-1-2-Doppel-Knockout-Mäuse wiesen unter anderem eine gestörte Hautentwicklung, eine verminderte Adipozytendifferenzierung sowie eine Skelettmuskelatrophie auf, wodurch insgesamt erneut die bedeutenden Funktionen von AKT im Rahmen der Proliferation und der zellulären Differenzierung herausgestellt wurden (Peng et al., 2003). Neugeborene AKT-1-2-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu wildtypischen Mäusen und waren nur für einige Stunden nach der Geburt lebensfähig (Peng et al., 2003). AKT-3 ist bedeutend für die postnatale Hirnentwicklung. Ein AKT-3-Knockout führte in Mäusen zu einer reduzierten Gehirngröße, beeinflusste jedoch nicht den Kohlenhydrat-Stoffwechsel und das allgemeine Wachstum des Organismus (Easton et al., 2005, Tschopp et al., 2005).

1.1.3 AKT-Signaltransduktion

Verschiedene extrazelluläre Substanzen können den Aktivitätszustand von AKT beeinflussen. Es wurden unter anderem Insulin, Proteinphosphatase-Inhibitoren sowie die Wachstumsfaktoren PDGF, IGF, EGF und FGF als AKT-Aktivatoren identifiziert; eine Inhibition der AKT-Aktivierung konnte über die PP2A (Proteinphosphatase 2) sowie den PI3K-Inhibitor Wortmannin gezeigt werden (Burgering and Coffey, 1995, Franke et al., 1995, Kohn et al., 1995, Andjelkovic et al., 1996, Arcaro and Wymann, 1993). Auch die Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie Adenosin, Bradykinin oder Angiotensin II können AKT aktivieren (New et al., 2007). Die Beeinflussung des Aktivitätszustandes von AKT, die der Proteinkinase die Vermittlung ihrer zellulären Funktionen ermöglicht, unterliegt einem komplexen Signalweg (Abb. 2). Verschiedene Liganden binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen und aktivieren dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade (Ullrich and Schlessinger, 1990). Über die aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen werden

intrazelluläre Signalmoleküle rekrutiert, die über *Second Messenger*-Systeme zu einer Signalverbreitung beitragen (Kapeller and Cantley, 1994). Als ein wichtiger Bestandteil dieser Signaltransduktion gilt der Phosphatidylinositol-Metabolismus über den PI3K-Signalweg (Kapeller and Cantley, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase AKT stromabwärts im PI3K-Signalweg liegt (Burgering and Coffey, 1995, Franke et al., 1995, Kohn et al., 1995, Andjelkovic et al., 1996).

Allgemein unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen von PI-Kinasen, von denen die im AKT-Signalweg relevanten PI3-Kinasen als Typ 1 klassifiziert werden (Whitman et al., 1987, Whitman et al., 1988). Eine weitere Unterteilung der PI3-Kinasen erfolgt in die Klassen 1A und 1B, wobei PI3-Kinasen der Klasse 1A in Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen treten (Hanada et al., 2004). Über SH2 (*src-homology 2*)-Domänen wird eine Bindung an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den EGF-, PDGF- oder IGF-1-Rezeptor vermittelt (Anderson et al., 1990, Hakuno and Takahashi, 2018). Über diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität führt (Panayotou et al., 1992, Shoelson et al., 1993). Andererseits ist auch eine Aktivierung der PI3-Kinasen über G-Proteingekoppelte Rezeptoren möglich (New et al., 2007). PI3-Kinasen, die über diese Rezeptoren aktiviert werden, werden als Klasse 1B klassifiziert (Hanada et al., 2004). Dabei können sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins zur Aktivierung der PI3-Kinase beitragen. Über die $\beta\gamma$ -Untereinheit erfolgt eine direkte Bindung sowie eine anschließende Aktivierung der PI3-Kinase; die α -Untereinheit kann über die Aktivierung weiterer Signalmoleküle Einfluss auf die PI3-Kinase-Aktivität nehmen (Schwindinger and Robishaw, 2001, New et al., 2007).

Die Funktion der aktivierten PI3-Kinasen vom Typ 1 besteht schlussendlich in der spezifischen Phosphorylierung der Hydroxylgruppe an Position D3 des Inositolrings des PI (Phosphatidylinositol) beziehungsweise der bereits phosphorylierten Derivate PI(4)P (Phosphatidylinositol-4-Phosphat) und PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, PIP₂), sodass unter anderem das Produkt PI(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat, PIP₃) generiert wird (Whitman et al., 1988, Panayotou and Waterfield, 1992). PIP₃ dient als *Second Messenger* zur intrazellulären Signalvermittlung (Cantley et al., 1991, Stephens et al., 1993). Durch die Bindung von AKT über die PH-Domäne an das Plasmamembran-gebundene PIP₃ wird eine Membranrekrutierung erreicht (James et al., 1996, Frech et al., 1997). Die Aktivierung von AKT erfolgt dann schließlich über die Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 308 sowie Serin 473. Beide Phosphorylierungsschritte sind unabhängig voneinander und wirken synergistisch auf die Aktivierung von AKT (Alessi et al., 1996a) (Abb. 2). Die Threonin-308-Phosphorylierung wird durch die Kinase PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) vermittelt (Alessi et al., 1997b). Auch PDK1 besitzt eine PH-Domäne zur Interaktion mit PIP₃, wobei durch die Bindung von PIP₃ die Aktivität der Kinase gesteigert wird (Alessi et al., 1997a, Stokoe et al., 1997). Weitere Studien konnten zeigen, dass unter Basalbedingungen AKT-1 und PDK1 bereits in einem Komplex im

Zytoplasma der Zelle vorliegen, eine Interaktion zwischen PH-Domäne und katalytischer Domäne von AKT-1 jedoch eine Threonin-308-Phosphorylierung verhindert und den Komplex in einem nicht-aktivierten Zustand verharren lässt (Calleja et al., 2007). Erst die Bindung der PH-Domäne an das Plasmamembran-gebundene PIP3 führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des AKT-1-Moleküls, wodurch die PDK1-bedingte Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin 308 ermöglicht wird (Calleja et al., 2007). Als potenzielle Kinasen für die Serin-473-Phosphorylierung wurden mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) und DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) beschrieben (Sarbasov et al., 2005, Bozucic et al., 2008). Durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin 473 wird zusätzlich innerhalb des AKT-Moleküls die Bereitschaft zum Übergang in die aktivierte Konformation verstärkt (Yang et al., 2002). Es erfolgt schließlich eine Dissoziation aktivierter AKT-Moleküle von der Plasmamembran und eine Verteilung innerhalb des Zytoplasmas und des Zellkerns, wo die Phosphorylierung AKT-spezifischer Substrate stattfindet (Andjelkovic et al., 1997, Calleja et al., 2007).

Die Aktivität von AKT kann sowohl indirekt als auch direkt beeinflusst werden. Einerseits bewirkt die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homology*) eine Dephosphorylierung des *Second Messengers* PIP3 spezifisch an der Position D3 des Inositolrings, wodurch die weitere AKT-Aktivierung über den PI3K-Signalweg vermindert

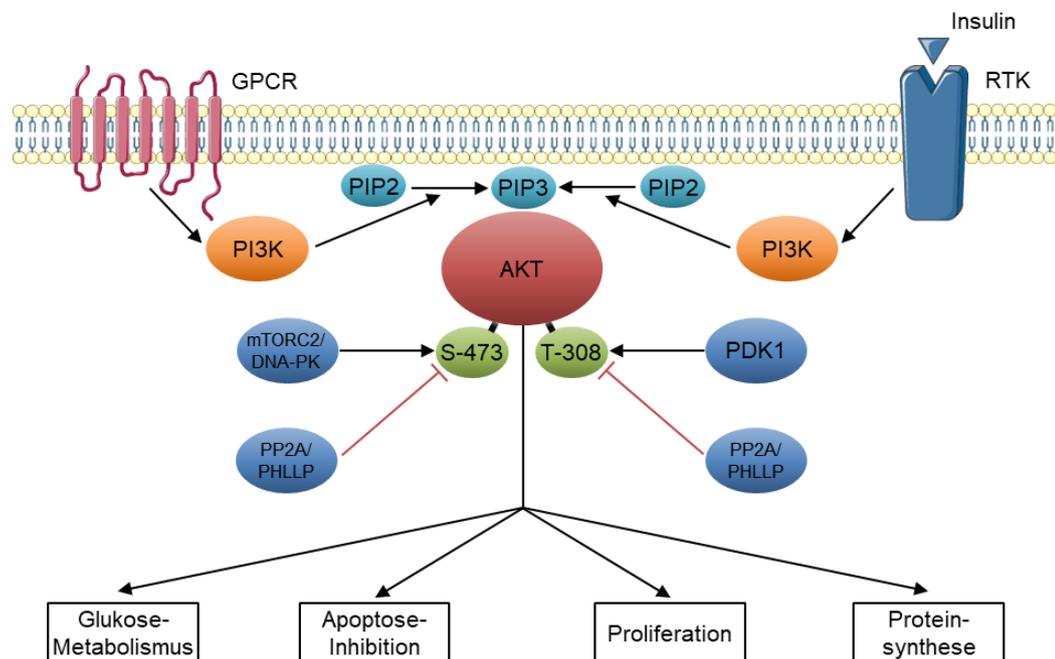


Abb. 2: AKT-Signaltransduktion über den PI3K-Signalweg und ausgewählte AKT-Funktionen. Dargestellt ist die Aktivierung von AKT nach Stimulation der PI3-Kinase (PI3K) über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder über beispielsweise durch Insulin aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Die weitere Signaltransduktion sowie alle weiteren aufgeführten Abkürzungen sind in Kapitel 1.1.3 detailliert beschrieben. Zudem sind ausgewählte, vom aktivierten AKT-Molekül vermittelte Funktionen im Rahmen des zellulären Stoffwechsels dargestellt. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von Servier Medical Art (smart.servier.com, bereitgestellt von Servier) erstellt, welche unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* lizenziert sind (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

wird (Maehama and Dixon, 1998). Andererseits führt eine direkte Dephosphorylierung der phosphorylierten Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 am bereits aktivierten AKT-Molekül durch die Phosphatasen PP2A oder PHLIP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) zur Beendigung der AKT-Aktivierung (Andjelkovic et al., 1996, Gao et al., 2005, Brognard et al., 2007) (Abb. 2).

1.1.4 AKT-Substrate

Es sind zahlreiche AKT-Substrate identifiziert worden, über die AKT Einfluss auf zelluläre Stoffwechselforgänge nehmen und so seine spezifischen Funktionen vermitteln kann. Dabei beeinflusst AKT über eine Serin- und/oder Threonin-Phosphorylierung seiner Substrate unter anderem Metabolismus, Proliferation, Wachstum und Überleben (Hers et al., 2011). Im Folgenden werden einige wichtige AKT-Substrate beschrieben und deren Wirkung im zellulären Stoffwechsel aufgezeigt.

Als erstes identifiziertes AKT-Substrat gilt GSK3 (*glykogen synthase kinase 3*), wobei aktiviertes AKT eine Inhibierung der GSK3 vermittelt (Cross et al., 1995). GSK3 spielt eine bedeutende Rolle im Glykogen-Stoffwechsel und hemmt durch Phosphorylierung die Glykogen-Synthase und somit die Synthese von Glykogen (Embi et al., 1980). Daher fördert das anabole Hormon Insulin die Glykogensynthese, indem AKT die GSK3 hemmt, was zur Aktivierung der Glykogen-Synthase führt (Parker et al., 1983). Weiterhin reguliert AKT innerhalb des Insulin-Signalweges die Glukoseaufnahme sowohl über die Plasmamembran-Rekrutierung des Insulin-abhängigen GLUT (*glucose transporter*)4-Transporters als auch über eine vermehrte Expression des GLUT1-Transporters (Kohn et al., 1996, Cong et al., 1997).

AKT fördert über die Phosphorylierung des Substrates Bad (*Bcl-2 associated agonist of cell death*) an der Aminosäure Serin 136 die Apoptose-Inhibition und begünstigt so das zelluläre Überleben (Datta et al., 1997). Auch über die Phosphorylierung von FOXO (*forkhead box O*)-Transkriptionsfaktoren begünstigt AKT das zelluläre Überleben und wirkt zudem positiv auf die Proliferation (Burgering and Medema, 2003). Die zellulären Funktionen von FOXO-Transkriptionsfaktoren sind vielfältig und werden vermutlich abhängig vom Gewebetyp unterschiedlich reguliert (Calnan and Brunet, 2008). Neben der proapoptotischen Funktion vermitteln die FOXO-Transkriptionsfaktoren eine antiproliferative Wirkung unter anderem über Aktivierung des Proteins p27^{kip1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), wodurch der Zellzyklus in Phase G1 (*gap 1*) arretiert (Medema et al., 2000, Nakamura et al., 2000). Andererseits wird den FOXO-Transkriptionsfaktoren auch eine protektive, antiapoptotische Wirkung bei oxidativem Stress in ruhenden Zellen zugeschrieben, die durch die Aktivierung des Proteins MnSOD (*manganese superoxide dismutase*) vermittelt wird (Kops et al., 2002). Auch sind die FOXO-Transkriptionsfaktoren an der Regulierung der zellulären Autophagie beteiligt (Mammucari et al., 2007, Sengupta et al., 2009).

Die FOXO1-Phosphorylierung durch AKT erfolgt an den Aminosäuren Threonin 24, Serin 256 und Serin 319; FOXO3A und FOXO4 werden an entsprechend gleichwertigen

Stellen phosphoryliert (Biggs et al., 1999, Rena et al., 1999, Brunet et al., 1999, Kops et al., 1999). Die FOXO-Transkriptionsfaktoren bilden eine Untergruppe der Fox (*forkhead box*)-Transkriptionsfaktoren, die durch das Vorhandensein einer konservierten DNA-Bindungsdomäne definiert werden (Kaestner et al., 2000). Zudem stellen die FOXO-Transkriptionsfaktoren die einzige durch AKT regulierte Untergruppe der Fox-Transkriptionsfaktoren dar (Burgering and Medema, 2003). Im nicht-phosphorylierten Zustand sind die FOXO-Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert und fördern die Transkription ihrer Zielgene. Die AKT-vermittelte Phosphorylierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren führt hingegen zu einer Assoziation mit 14-3-3-Proteinen und dadurch zu einem Verbleib im Zytoplasma (Brunet et al., 1999).

Eine weitere wichtige Funktion von AKT besteht in der Förderung zellulären Wachstums, wobei diese vor allem über die Aktivierung des mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*)-Signalweges vermittelt wird. Dieser nimmt eine wichtige Funktion in der Regulierung der Initiation der Translation und der ribosomalen Biogenese ein und ist bedeutend für die Kontrolle des zellulären Wachstums (Manning and Cantley, 2007). Seinen Einfluss auf mTORC1 erreicht AKT über die Phosphorylierung von TSC2 (*tuberous sclerosis 2*), was eine Inaktivierung von TSC2 durch Destabilisierung innerhalb des TSC2-Moleküls mit anschließender Auflösung des Komplexes aus TSC1 und TSC2 zur Folge hat (Inoki et al., 2002). Der Komplex aus TSC1 und TSC2 hemmt das stromabwärts liegende Protein Rheb. Diese Wirkung wird durch eine inhibitorische GAP (*GTPase-activating protein*)-Funktion von TSC2 gegenüber dem Protein Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) vermittelt (Inoki et al., 2003a). Rheb gehört zur Ras (*rat sarcoma*)-Familie der kleinen, GTP-bindenden Proteine und besitzt eine GTPase-Aktivität (Yamagata et al., 1994). In diesem Signalweg wirkt Rheb stimulierend auf die mTORC1-Aktivierung (Inoki et al., 2003a). Der Mechanismus der Aktivierung von mTORC1 durch Rheb ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass Rheb für eine direkte mTORC1-Aktivierung in seiner GTP-gebundenen Form vorliegen muss (Sato et al., 2009). Eine Bindung von Rheb an mTORC1 führt dabei über eine Konformationsänderung zu einer allosterischen Aktivierung von mTORC1 (Yang et al., 2017).

AKT führt somit insgesamt indirekt über die Phosphorylierung von TSC2 und der daraus resultierenden verminderten Rheb-Inhibition zu einer vermehrten, Rheb-vermittelten mTORC1-Aktivierung (Abb. 3).

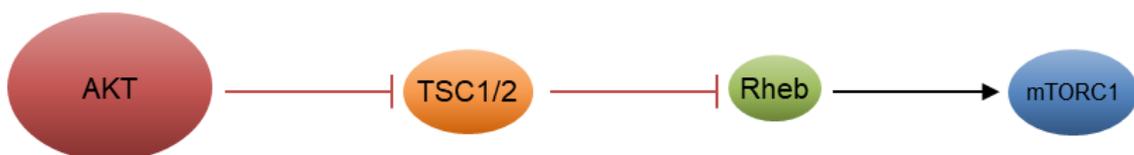


Abb. 3: AKT-vermittelte Stimulation des mTORC1-Signalweges. Dargestellt ist die Aktivierung von mTORC1 über AKT. Die detaillierte Signaltransduktion sowie alle aufgeführten Abkürzungen sind in Kapitel 1.1.4 beschrieben.

Ein weiterer Weg, über den AKT Einfluss auf den Aktivitätszustand von mTORC1 nehmen kann, besteht in der Phosphorylierung des Proteins PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40 kDA*) an der Aminosäure Threonin 246, wodurch dieses mit 14-3-3-Proteinen bindet und die PRAS40-abhängige, inhibierende Wirkung auf mTORC1 vermindert wird (Kovacina et al., 2003, Vander Haar et al., 2007).

Der aktivierte mTORC1 phosphoryliert das Protein 4EBP1 (*4E-binding protein 1*) an den Aminosäuren Threonin 36 und Threonin 45, wodurch die Bindung von 4EBP1 und eIF-4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) verhindert wird (Brunn et al., 1997, Burnett et al., 1998). Der freie eIF-4E nimmt über die Erkennung der mRNA-5'-cap-Struktur eine wichtige Rolle in der Initiation der Translation ein und fördert so die Proteinbiosynthese (Lawrence and Abraham, 1997). Weiterhin aktiviert mTORC1 durch Threonin-389-Phosphorylierung die p70S6K (*p70 S6 kinase*), die schließlich das ribosomale Protein S6 phosphoryliert (Burnett et al., 1998, Proud, 1996). Das Protein S6 reguliert unter anderem die Zellgröße bestimmter Gewebe (Ruvinsky et al., 2005, Ruvinsky and Meyuhas, 2006).

1.2 AMPK

Wie bereits erwähnt, ist die Abstimmung komplexer zellulärer Prozesse wie des anabolen und katabolen Stoffwechsels durch interzelluläre Kommunikation essenziell, um im vielzelligen Organismus schnell auf sich ändernde Umwelteinflüsse oder Bedürfnisse bestimmter Organe reagieren zu können. Über die Aktivierung des AKT-Signalweges werden vor allem anabole Stoffwechselwege gesteigert, insofern ein ausreichendes Nährstoffangebot vorhanden ist und der zelluläre Energiestatus dies zulässt. Im Gegensatz dazu sind bei Nährstoffmangel Stoffwechselvorgänge im Rahmen des AMPK-Signalweges von großer Bedeutung (Towler and Hardie, 2007). AMPK (*AMP-activated protein kinase*) spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des zellulären Energiestatus und kontrolliert diesen über die Detektion des AMP:ATP-Verhältnisses. Im Falle eines verminderten zellulären ATP-Spiegels bewirkt die aktivierte AMPK über die Stimulation kataboler Signalwege und die gleichzeitige Inhibition anaboler, ATP-verbrauchender Signalwege einen Angleich an das ursprüngliche AMP:ATP-Verhältnis (Hardie, 2007) (Abb. 4).

1.2.1 AMPK-Strukturaufbau und -Signaltransduktion

AMPK besteht aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen β - und γ -Untereinheiten, die zusammen einen heterotrimeren Komplex bilden. Es sind verschiedene Isoformen der einzelnen Untereinheiten bekannt: zwei Isoformen der α -Untereinheit ($\alpha 1$, $\alpha 2$), zwei Isoformen der β -Untereinheit ($\beta 1$, $\beta 2$) und drei Isoformen der γ -Untereinheit ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) (Davies et al., 1994, Hardie, 2007). Die verschiedenen Isoformen ermöglichen die Bildung von insgesamt 12 verschiedenen AMPK-Heterotrimeren, die vermutlich gewebespezifisch exprimiert werden (Kjosted et al., 2018).

Über die AMPK-Untereinheiten werden spezifische Funktionen innerhalb des Gesamtproteins vermittelt. So wird AMPK an der Aminosäure Threonin 172 innerhalb der α -Untereinheit durch eine stromaufwärts liegende Kinase phosphoryliert, was zu einer entscheidenden AMPK-Aktivierung führt (Hawley et al., 1996, Mitchelhill et al., 1997). Zu den stromaufwärts liegenden AMPK-Kinasen gehören LKB1 (*liver kinase B1*) und CaMKK β (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β*). Vermutlich können auch weitere Kinasen wie die TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase*) zu einer AMPK-Phosphorylierung führen (Carling et al., 2008, Momcilovic et al., 2006). Die C-terminale Sequenz der β -Untereinheit dient der Verbindung der α - und der γ -Untereinheit (Iseli et al., 2005). Weiterhin verfügt die β -Untereinheit über eine Glykogen-Bindungsdomäne, über die AMPK zusätzlich Funktionen im Glykogen-Metabolismus vermitteln kann (Hudson et al., 2003, Polekhina et al., 2003). Tandempare der CBS (*cystathionine β -synthase*)-Domänen der γ -Untereinheit können Adenosin-Nukleotide wie AMP und ATP binden und detektieren so den zellulären Energiestatus (Scott et al., 2004). Eine erhöhte intrazelluläre AMP-Konzentration fördert die AMPK-Aktivierung zum einen über eine direkte allosterische Aktivierung und zum anderen über die Beeinflussung des Phosphorylierungsgrades der Aminosäure Threonin 172 (Sanders et al., 2007). Dabei scheint AMP nicht direkt die Phosphorylierung von AMPK durch die stromaufwärts liegenden Kinasen zu beeinflussen, sondern vielmehr die Deaktivierung

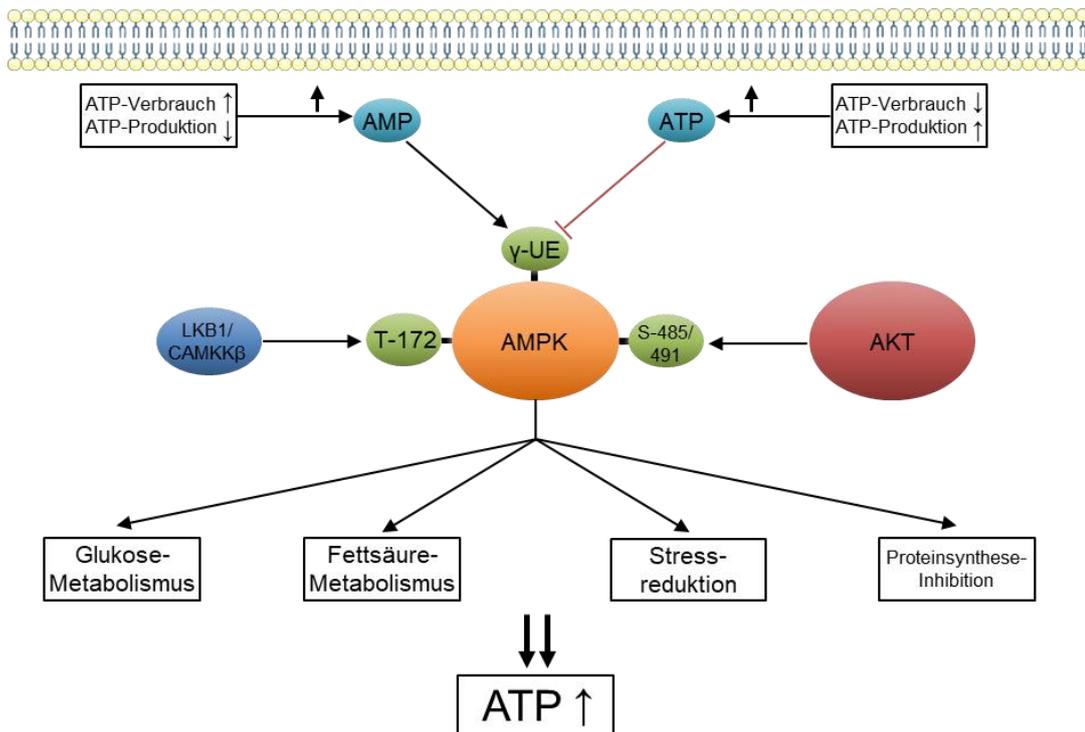


Abb. 4: AMPK-Signaltransduktion und ausgewählte AMPK-Funktionen. Abgebildet ist die Signaltransduktion, in deren Rahmen AMPK seine Funktion in der Homöostase des zellulären Energiestatus vermittelt. Außerdem sind ausgewählte funktionelle Teilbereiche aufgelistet, über die AMPK bei Energiemangel eine Erhöhung des zellulären ATP-Spiegels generiert. Die detaillierte AMPK-Signalkaskade sowie alle aufgeführten Abkürzungen sind in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von Servier Medical Art (smart.servier.com, bereitgestellt von Servier) erstellt, welche unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* lizenziert sind (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

von AMPK über Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 2C α zu vermindern (Suter et al., 2006, Sanders et al., 2007). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch auch eine direkte, AMP-vermittelte Förderung der Threonin-172-Phosphorylierung unter der Voraussetzung einer Myristoylierung der AMPK- β -Untereinheit (Oakhill et al., 2010).

Durch die Kombination der Effekte von AMP und der stromaufwärts liegenden Kinasen kann insgesamt eine Aktivitätssteigerung von AMPK um den Faktor 1000 erreicht werden (Suter et al., 2006). Hohe ATP-Konzentrationen bewirken hingegen einen gegenteiligen Effekt und wirken antagonistisch gegenüber der AMP-vermittelten allosterischen Aktivierung von AMPK (Corton et al., 1995). Die Aktivierung von AMPK wird zudem im PI3K-Signalweg durch AKT inhibiert, wobei eine AMPK-Phosphorylierung innerhalb der α -Untereinheit an der Aminosäure Serin an Position 485 (α 1-Untereinheit) bzw. an Position 491 (α 2-Untereinheit) durch AKT zu einer verminderten Threonin-172-Phosphorylierung durch die AMPK-Kinase LKB1 führt (Kovacic et al., 2003, Horman et al., 2006, Woods et al., 2003).

1.2.2 AMPK-Funktionen und -Substrate

Das übergeordnete Ziel der aktivierten AMPK besteht zum einen in der vermehrten Gewinnung von ATP über katabole Prozesse wie der Verstoffwechslung von Glukose und Fettsäuren und zum anderen in der Verminderung des ATP-Verbrauchs innerhalb anaboler Stoffwechselwege wie der Proteinbiosynthese (Hardie, 2007). Im Glukosestoffwechsel fördert AMPK die zelluläre Glukoseaufnahme über die GLUT4-Rekrutierung an die Zelloberfläche (Russell et al., 1999). Diese Funktion wird wie im AKT-Signalweg über die Phosphorylierung des Substrates AS160 (*AKT substrate of 160 kDa*) erreicht (Treebak et al., 2006, Kramer et al., 2006). Über eine inhibitorische Serin-212-Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase ist AMPK zudem in der Regulation der Fettsäure-Oxidation des Skelettmuskels involviert (O'Neill et al., 2014).

Im Proteinstoffwechsel erreicht AMPK eine Inhibition der Proteinsynthese über die Aktivierung der eEF2K (*eukaryotic elongation factor 2 kinase*), was zu einer inaktivierenden Phosphorylierung des eEF2 (*eukaryotic elongation factor 2*) führt (Horman et al., 2002). Außerdem phosphoryliert AMPK TSC2 an den Aminosäuren Threonin 1227 und Serin 1345, wodurch es über eine Hemmung von mTORC1 zu einer verminderten Phosphorylierung der p70S6K und 4EBP1 kommt. AMPK bewirkt über die Phosphorylierung von TSC2 neben der Translationsinhibition auch einen Schutz vor durch Energiemangel ausgelöster Apoptose-Induktion (Inoki et al., 2003b). Zudem steigert AMPK die Transkriptionsaktivität von FOXO3A durch dessen Phosphorylierung und bewirkt so die vermehrte Expression von Genen des Energiemetabolismus und der Regulation von zellulärem Stress (Greer et al., 2007).

Über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und deren Co-Aktivatoren führt die Aktivierung von AMPK zu einer verminderten Expression von Genen, die mit anabolen Funktionen wie der Glukoneogenese oder der Lipogenese verbunden sind, sowie zur vermehrten Expression von Katabolismus-fördernden Genen wie den mitochondrialen

Genen (Hardie, 2007). So reguliert AMPK beispielsweise über die Phosphorylierung von PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) die Expression zahlreicher Gene (Jager et al., 2007). PGC-1 α ist ein transkriptioneller Co-Aktivatoren, der seine Funktionen wie die Promotion der mitochondrialen Biogenese im Rahmen der energetischen Homöostase über die Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren vermittelt (Puigserver and Spiegelman, 2003, Wu et al., 1999). PGC-1 α ist beispielsweise als Co-Aktivatoren von PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) in der Kontrolle der Transkription von Genen mit wichtiger Funktion in der mitochondrialen Fettsäure-Oxidation involviert (Vega et al., 2000).

1.3 Kardiale Wirkung von AKT und AMPK

Auch im kardialen Metabolismus nimmt AKT zahlreiche spezifische Aufgaben wahr. Im Herzen werden bevorzugt die Isoformen AKT-1 und AKT-2 exprimiert (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Einige Teilfunktionen, die zum AKT-vermittelten kardialen Phänotyp beitragen, wurden bereits identifiziert. So nimmt AKT kardial eine wichtige Rolle sowohl bei physiologischem als auch bei pathologischem Wachstums ein. Die Expression einer konstitutiv aktiven AKT-1-Variante führte bei kurzzeitiger Expression zu physiologischer Herzhypertrophie, bei langanhaltender Expression jedoch zu pathologischer Herzhypertrophie, die schließlich in einer Kardiomyopathie und einer Herzinsuffizienz mündete. Dabei schien besonders ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Hypertrophie und Angiogenese zum Übergang in einen pathologischen Prozess beizutragen (Shiojima et al., 2005). Allgemein ist die AKT-Aktivität vermutlich vor allem bei physiologischer kardialer Hypertrophie gesteigert; bei pathologischer kardialer Hypertrophie zeigt sich die Aktivität des AKT-mTORC1-Signalweges hingegen reduziert (Kemi et al., 2008). Eine weitere wichtige AKT-vermittelte Funktion besteht in der Apoptose-Inhibition in Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen (Matsui et al., 1999).

Auch einige im AKT-Signalweg stromabwärts liegende Substrate, über die die kardialen AKT-Funktionen vermittelt werden, konnten identifiziert werden. Die von AKT regulierten FOXO-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im kardialen Stoffwechsel, wobei FOXO1 und FOXO3A in Kardiomyozyten exprimiert werden (Sengupta et al., 2009). Den FOXO-Transkriptionsfaktoren werden abhängig vom Stresssignal unterschiedliche Funktionen innerhalb des kardiomyozytären Stoffwechsel zugeschrieben. So wirken diese bei kardiomyozytärem oxidativem Stress kardioprotektiv und fördern das zelluläre Überleben, was durch die vermehrte nukleäre Lokalisation von FOXO1 und FOXO3A und die verstärkte Expression kardioprotektiver FOXO-Zielgene vermittelt wird (Sengupta et al., 2011). Allgemein wird zudem die kardiomyozytäre Autophagie sowie die Zellgröße durch die Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXO3A reguliert (Sengupta et al., 2009). Andererseits sind FOXO-Transkriptionsfaktoren im Rahmen von Laminopathien vermehrt aktiv und somit an der kardialen Pathogenese beteiligt. Die Reduktion der Expression der FOXO-Transkriptionsfaktoren bei diesen Krankheitsbildern vermindert die FOXO-vermittelte Apoptose und fördert das Überleben

(Auguste et al., 2018). Weiterhin führt eine vermehrte kardiale FOXO3A-Expression zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion sowie zum Verlust der kardialen Masse und geht insgesamt mit einer frühzeitigen Mortalität einher (Cao et al., 2013).

Auch der mTORC1-Signalweg übernimmt essenzielle Aufgaben im Rahmen der kardialen Homöostase. In adulten Mäusen mit induzierbarem, kardialem mTOR-Knockout entwickelte sich schnell eine dilatative Kardiomyopathie. Diese wurde begleitet von vermehrter Apoptose und Autophagie sowie einer 4EBP1-Akkumulation. Zudem war die reaktive Hypertrophieantwort auf kardiale Druckbelastung deutlich vermindert, sodass eine Herzinsuffizienz schneller eintrat (Zhang et al., 2010). In Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass Rheb die über den mTORC1-Signalweg vermittelte Proteinsynthese und Hypertrophie stimulieren kann (Wang et al., 2008). Insgesamt wird AKT somit eine wichtige Aufgabe in der Förderung des kardiomyozytären Überlebens sowie der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion zuteil (Matsui and Rosenzweig, 2005).

AMPK nimmt im kardialen Stoffwechsel sowohl im physiologischen Zustand als auch unter pathologischen Bedingungen wichtige protektive Funktionen ein. So wiesen Mäuse mit skelettmuskel- und herzspezifischem AMPK- β 1/2-Doppel-Knockout eine eingeschränkte kardiale Funktion auf (Sung et al., 2015). Eine wichtige Funktion von AMPK besteht in der Verminderung der kardialen Hypertrophie sowie der Förderung der Autophagie, was durch Inhibition des mTORC1-Signalweges erreicht wird (Chan et al., 2004, Li et al., 2014).

Innerhalb des kardialen Stoffwechsels steigert AMPK zudem über die Beeinflussung stromabwärts liegender Signalmoleküle die energetische Versorgung der Kardiomyozyten (Kim and Dyck, 2015). Dabei ist in Mausherzen die α 2-Untereinheit der AMPK die dominante Isoform (Stapleton et al., 1996). Bei Entwicklung einer durch aortale Konstriktion induzierten Herzinsuffizienz konnte ebenfalls eine vermehrte Expression der α 2-Untereinheit nachgewiesen werden (Kim et al., 2012). Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz wird begleitet von metabolischen Veränderungen, die mit einer reduzierten ATP-Konzentration einhergehen (Ingwall, 2009). Bei Herzversagen wird AMPK eine kardioprotektive Rolle mit Verbesserung der kardialen Funktion und verminderter Progression zuteil, wobei AMPK die kardiale Autophagie anders als im physiologischen Zustand inhibiert (Li et al., 2018). Die AMPK-bedingte Verbesserung der linksventrikulären Funktion wird unter anderem begleitet von einer PGC-1 α -Aktivierung (Gundewar et al., 2009). Auch PGC-1 α spielt im Herzen eine wichtige Rolle im Rahmen der energetischen Versorgung. So zeigten die Herzen von PGC-1 α -Knockout-Mäusen eine energetische Verarmung mit Reduktion der ATP-Konzentration sowie Verminderung der mitochondrialen Aktivität, begleitet von einer eingeschränkten Herzfunktion (Arany et al., 2005).

1.4 AKT-Knockout-Modelle mit Fokus auf die kardiale Funktion

Eine bedeutende Möglichkeit, den kardialen AKT-Phänotyp und das Zusammenspiel von AKT und AMPK im kardialen Metabolismus genauer zu untersuchen, stellen AKT-Knockout-Modelle dar. Durch globalen Knockout der AKT-1-Isoform konnte deren Funktion innerhalb des physiologischen Wachstums des Herzens nachgewiesen werden (DeBosch et al., 2006b). Globale AKT-2-Knockout-Mäuse zeigten hingegen eine eingeschränkte kardiomyozytäre Glukoseaufnahme und -oxidation, wodurch die Bedeutung von AKT-2 im kardialen Metabolismus betont wurde (DeBosch et al., 2006a). Unter physiologischen Bedingungen wiesen weder AKT-1- noch AKT-2-Knockout-Mäuse echokardiographisch kardiale Funktionseinschränkungen auf (DeBosch et al., 2006b, DeBosch et al., 2006a). In Tieren mit generalisiertem AKT-1-Knockout sowie zusätzlichem, induzierbarem kardialem AKT-2-Knockout wurde 28 Tage nach Beginn der Knockout-Induktion hingegen eine kontraktile Dysfunktion deutlich. Diese ging einher mit metabolischen Veränderungen wie der verminderten Expression von Genen mit wichtiger Funktion in der mitochondrialen Biogenese, der Fettsäureoxidation sowie der oxidativen Phosphorylierung (Ock et al., 2018).

Noch deutlicher waren die kardialen Veränderungen bei Verwendung eines induzierbaren, kardiomyozytenspezifischen AKT-1/2-Doppel-Knockouts (iCMAKT1/2-KO) (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Dabei entwickelten iCMAKT1/2-KO-Mäuse nach Induktion des Knockouts eine progrediente kardiale Atrophie durch Abnahme der Zellgröße, verbunden mit einem Verlust der Herzfunktion. Die beobachtete Herzinsuffizienz mündete nach $24,5 \pm 2,1$ Tagen in einem letalen Herzversagen. Immunhistochemisch konnte zudem bereits 10 Tage nach Beginn der Knockout-Induktion eine zunehmende FOXO3A-Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern sowie eine transkriptionelle Aktivierung von FOXO3A-Zielgenen mit wichtiger Funktion in der Autophagie beobachtet werden. Weitere Untersuchungen zeigten eine fortschreitende energetische Depletion mit Abnahme des Phosphokreatin:ATP-Verhältnisses und Zunahme an freiem Kreatin. Darüber hinaus waren deutliche Veränderungen des Lipidmetabolismus zu erkennen wie die Zunahme der Konzentration von Acylcarnitinen als Hinweis auf einen gestörten mitochondrialen Fettsäureimport. Interessanterweise wurde gezeigt, dass es trotz der im Verlauf zunehmenden Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels nicht wie zu erwarten zu einer Steigerung der AMPK-Aktivität kam. Vielmehr schien AMPK ab Tag 14 nach Beginn der Induktion des Knockouts durch vermehrte Phosphorylierung der Aminosäure Serin 485/491 inhibiert zu werden. Es blieb allerdings unklar, welche Kinase diese inhibitorische Funktion vermittelt. Weitere Transkriptionsanalysen zeigten zudem eine verminderte Transkription von Genen mitochondrialer Proteine (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der iCMAKT1/2-KO mit zahlreichen Veränderungen kardialer Funktionen einhergeht (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Darüber, wie bedeutend die einzelnen beobachteten Veränderungen innerhalb des zellulären Stoffwechsels für diesen Phänotyp sind, ist jedoch noch wenig bekannt.

1.5 Signalwegmodulation mithilfe eines AAV-Systems

Die experimentelle Modulation eines Signalweges in einem lebenden Organismus kann über verschiedene Methoden erreicht werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die cDNA (*complementary DNA*) des Signalmoleküls spezifisch in Zielzellen einzuschleusen und so eine vermehrte Expression zu erreichen. Die Verwendung von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Vektoren stellt eine etablierte Methode für einen solchen Gentransfer dar. Diese unbehüllten, einzelsträngigen DNA-Viren bieten bei Einsatz als Vektorsystem den Vorteil einer langfristigen Transgenexpression bei gleichzeitig fehlender Pathogenität (Daya and Berns, 2008). AAV werden unter anderem durch Clathrin-abhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Zelle erfolgt eine Freisetzung aus den Endosomen und eine nukleäre Aufnahme, bevor es schließlich innerhalb des Zellkerns zur Freisetzung des viralen Genoms aus dem Viruskapsid kommt (Bartlett et al., 2000, Nonnenmacher and Weber, 2012). Im Zellkern erfolgt die Synthese eines komplementären DNA-Stranges, sodass das AAV-Genom doppelsträngig vorliegt (Zhou et al., 2008, Zhong et al., 2008). Anschließende Rekombinationsereignisse führen besonders zu intramolekularer Zirkularisierung der AAV-Genome, jedoch ist auch die Bildung intermolekularer Konkatemere möglich (Choi et al., 2005). Selten kommt es auch zu einer chromosomalen Integration des Vektorgenoms (McCarty et al., 2004).

Im Vergleich der AAV-Serotypen 1-9 in männlichen Mäusen zeigten die mit Serotyp AAV9 infizierten Tiere die stärkste Expression des eingebrachten Zielproteins, wobei dieses eine weite Virusverbreitung im Körper aufwies (Zincarelli et al., 2008). Auch die murinen Herzen wurden erfolgreich durch verschiedene AAV-Serotypen infiziert. Dabei wurde sowohl die höchste Anzahl an viralen Genomkopien als auch die stärkste Expression des Zielproteins in den Herzen der mit Serotyp AAV9 infizierten Tieren nachgewiesen (Zincarelli et al., 2008). Trotz der erfolgreichen kardialen Infektion wiesen die AAV9-infizierten Tiere 100 Tage nach der Infektion keine Änderungen bezüglich der kardialen Funktion oder der Wanddicke auf. Es ist somit davon auszugehen, dass die Herzen nicht durch die eingebrachten AAV beeinflusst werden (Zincarelli et al., 2008).

1.6 Ziele der Arbeit

Wie zuvor ausgeführt, wurden bei der Analyse des iCMAKT1/2-KO-Modells zahlreiche Veränderungen des kardialen Metabolismus und der kardialen Funktion identifiziert (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Jedoch ist bisher ungeklärt, über welche stromabwärts von AKT liegenden Signalwege dieser veränderte kardiale Phänotyp vermittelt wird. Ziel dieser Arbeit war es, durch AAV9-vermittelte Infektion Teilfunktionen des gestörten AKT-Signalweges im Sinne einer „Reparatur“ in vivo zu modulieren. Durch diesen Ansatz sollte Aufschluss darüber erlangt werden, ob einer der beobachteten Störungen eine dominante Rolle bei der Entwicklung der kardialen Atrophie zukommt. Im Einzelnen sollten folgende Signalwege durch AAV-Infektion beeinflusst werden:

Da AKT zelluläres Wachstum über mTORC1-Aktivierung fördert, könnte die progrediente kardiale Atrophie mit reduzierter Zellgröße im iCMAKT1/2-KO-Modell durch verminderte mTORC1-Aktivität bedingt sein (Manning and Cantley, 2007, Gödecke et al., 2017). Daher sollte die Aktivität von mTORC1 durch kardiale Rheb-Expression gesteigert werden. Weiterhin wurde im iCMAKT1/2-KO-Modell eine zunehmende nukleäre FOXO3A-Translokation, verbunden mit einer transkriptionellen Aktivierung von FOXO3A-Zielgenen mit wichtiger Funktion in der zellulären Autophagie, beobachtet (Gödecke et al., 2017). Eine Steigerung der Autophagie über vermehrte Aktivität von FOXO3A könnte somit eine wichtige Rolle für die Entstehung der zellulären Atrophie spielen. Deshalb sollte eine Verminderung der FOXO-Transkriptionsfaktoren über die Expression einer die FOXO-Menge reduzierenden panFOXO shRNA (panFOXO *short hairpin RNA*) erzielt werden.

Zudem sollte der Einfluss der inhibitorischen Serin-485/491-Phosphorylierung von AMPK im iCMAKT1/2-KO auf den kardialen Phänotyp untersucht werden (Gödecke et al., 2019). Auch hierfür wurde ein AAV-Vektor konstruiert, der über die Expression einer nicht-inaktivierbaren, phosphodefekten AMPK- α 2-Variante die Wiederherstellung der AMPK-Funktion vermitteln sollte. Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die reduzierte AMPK-Aktivität zum Phänotyp des iCMAKT1/2-KOs beiträgt.

Zur Untersuchung der genannten Ziele wurden iCMAKT1/2-KO-Mäuse ca. 4 Wochen vor Knockout-Induktion mit zuvor konstruierten AAV9-Partikeln auf Grundlage der Rheb- und AMPK-codierenden Plasmide infiziert. Nach Induktion des AKT-1/2-Doppel-Knockouts in Kardiomyozyten erfolgte die Untersuchung der Herzfunktion mittels Echokardiographie im zeitlichen Verlauf sowie die Untersuchung des Überlebens der Mäuse, um eine mögliche Verbesserung der Herzfunktion zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Zubehör

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und Zubehör mit entsprechenden Herstellerangaben

Laborgerät	Hersteller: Produktbezeichnung
Bildgebungssystem	LI-COR Bioscience: Odyssey
Dewargefäß	KGW-Isotherm: Dewar Transportgefäße Typ B
Eismaschine	Ziegra: ZBE 70-35
FACS-Gerät	BD Bioscience: BD FACSCanto II
FACS-Röhrchen	Falcon: Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml (12 mm x 75 mm)
Filterpapier	GE Healthcare Life Science: Whatman GB003
Gelkamm	Bio-Rad: Mini-PROTEAN Comb, 1mm, 10-well/15-well
Gewebehomogenisator	IKA: T18 basic Ultra Turrax Qiagen: Tissue Ruptor II
Heiz-Misch-Platte	Eppendorf: Thermomixer comfort
Injektionsspritze	Becton Dickinson: Micro-Fine U100-Insulinspritze
Inkubationsbox	LI-COR Bioscience: Black Western Blot Incubation Boxes Small/Medium/Large
Inkubator	Thermo Fisher Scientific: Heracell VIOS 250i CO ₂ Incubator
Kühl- bzw. Gefrierschrank	Liebherr: ProfiLine GKv 4310 (4 °C) Liebherr: GNP 3056 Premium NoFrost (-20 °C) Thermo Scientific: Revco UxF 40086V (-80 °C)
Kühlbrutschrank	Heraeus: Brutschrank B 6120
Magnetrührer	IKA: RH basic 2
Mikroplatte	Greiner Bio-One: Microplate 96 Well
Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt: Reagiergefäß 1,5ml Eppendorf: Safe-Lock Tubes 2,0 ml
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Science: Amersham Protran 0,45µm NC
Pipetten	Gilson: PIPETMAN Classic P10-P5000 (1µl-5000µl) Star Lab: ErgoOne E Mehrkanal-Pipette (10-200µl)
Pipettierhilfe	Hirschmann: pipetus
Präzisionswaage	Kern: PCB1000-2
Reagenzröhrchen	Greiner Bio-One: Cellstar Tubes 15ml bzw. 50ml
Real-Time PCR Instrument	Applied Biosystems™: StepOnePlus™ Real-Time PCR System
Schüttler	neoLab: ST5 cat Biometra: Mini Rocking Platform WT16
SDS-Page Kammer	Bio-Rad: Mini PROTEAN 3 Cell
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific: Safe 2020 1.8
Skalpell	Feather: Feather Disposable Scalpel #23
Spektrophotometer	Bio-Rad: iMark Microplate Reader Peqlab: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Stickstofftank	Air Liquide: GT80
Stromquelle	Fisher Scientific: Fisherbrand Power Supply 608 Biometra: Standard Power Pack P25
Transfergerät Western Blot	Thermo Fisher Scientific: Invitrogen Power Blotter Thermo Fisher Scientific: Pierce G2 Fast Blotter
Vortexer	Heidolph: Reax top
Waage	Kern: Präzisionswaage PCB

Wasserbad	GFL: Schüttelwasserbad 1083
Zellkulturschale	TPP: Zellkulturschale 100 TPP: Zellkulturschale 150
Zellkulturtestplatte	TPP: Zellkulturtestplatte (12 Kalotten) Greiner Bio-One: Cellstar 6 Well Cell Culture Plate (6 Kolotten)
Zellschaber	Sarstedt: Cell Scraper 83.1832
Zentrifuge	Eppendorf: Centrifuge 5415 R Eppendorf: Centrifuge 5402 Hettich: Rotofix 32 Roth: Rotilabo-Mini-Zentrifuge VWR: Mega Star 1.6R

2.2 Softwareprogramme

Tabelle 2: Verwendete Softwareprogramme und entsprechende Hersteller

Softwareprogramm	Hersteller
BD FACSDiva Software	BD Bioscience
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc.
Image Studio Lite Ver 5.2	LI-COR Bioscience
Microplate Manager 6	Bio-Rad
Microsoft Excel	Microsoft
NanoDrop 1000 Operating Software	Thermo Fisher Scientific
StepOne™ Software v2.1	Applied Biosystems™
Vevo LAB 1.7.1	FUJIFILM VisualSonics

2.3 Chemikalien und weitere Substanzen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und weitere Substanzen mit entsprechendem Hersteller

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (40%)	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth
APS	Roth
Bromphenolblau	Roth
n-Butanol	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Dihydrat)	Merck
DTT	Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol 99,5 %	VWR International
Flüssigstickstoff	Linde
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	VWR Chemicals

Proteinase K	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl) 25%	Roth
SDS	Sigma-Aldrich
TEMED	Roth
Tricin	Roth
Tris	Roth
Tween 20	Merck

2.4 Puffersysteme und weitere Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffersysteme und weitere Lösungen mit entsprechender Zusammensetzung

Puffersystem/Lösung	Zusammensetzung
10x Laufpuffer	2 M Glycin 250 mM Tris 1% SDS
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris 100 mM Tricin
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris
Laemmli-Puffer (4x)	15 ml 20% SDS 12,5 ml Tris-HCl (pH 6,8; 250 mM) 10 ml Glycerol 5mg 0,005% Bromphenolblau
Lysispuffer	100 mM Natriumchlorid 10 mM Tris (pH 7,4) 1% Igepal
PBS (pH 7,5)	140 mM Natriumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
S-EDTA	140 mM Natriumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 0,7 mM EDTA
TBS	140 mM Natriumchlorid 20 mM Tris
TBS-T (pH 7,5)	140 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 0,1% Tween 20

2.5 Primer

Tabelle 5: In der qPCR-Analyse verwendete Primerpaare (fwd = forward primer; rev = reverse primer); Herstellung erfolgte durch Firma Sigma-Aldrich

Primer		Sequenz (5'-3')
Kdelr1	fwd	CATTTTCAGGGAAGAGCCAAGT
Kdelr1	rev	CTTCATGCAGGTGTTGTAGAGT
Rheb FM1	fwd	CATTTTTCTCAGACATACTCC
Rheb RM1	rev	TCATAGCTGATCACCCCTTTC
RhebTagfw	fwd	ACCGGTCATCATCACCATCAC

RhebTagrev	rev	GCGGTGTCTACAAGCTGAAGAT
------------	-----	------------------------

2.6 Kits

Tabelle 6: Verwendete kommerziell erhältliche Kits und entsprechende Hersteller

Kit	Hersteller
Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo Fisher Scientific
Odyssey Blocking Buffer in TBS	LI-COR Bioscience
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific
Pierce BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
REVERT 700 Total Protein Stain	LI-COR Bioscience
REVERT Wash Solution	LI-COR Bioscience
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific

2.7 Zellkultur

Tabelle 7: In der Zellkultur verwendete spezifische Substanzen und entsprechende Herstellerangaben sowie Produktbezeichnung

Verwendete Substanz	Hersteller: Produktbezeichnung
<i>Fetales</i> Kälberserum	Gibco (Thermo Fisher Scientific): FBS, Qualified
Grundsubstanz für Kulturmedium	Capricorn-Scientific: DMEM High Glucose (4,5g/l)
L-Glutamin-Zellkulturersatz	Gibco (Thermo Fisher Scientific): GlutaMAX-I (100x)
Lipofectamine (1mg/ml)	Thermo Fisher Scientific: Lipofectamine 2000 Reagent
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco (Thermo Fisher Scientific): MEM Non-Essential Amino Acids
Optimem	Opti-MEM
Penicillin Streptomycin	Gibco (Thermo Fisher Scientific): Pen Strep
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich: Trypsin-EDTA Solution

2.8 Antikörper

Tabelle 8: Für Western Blot-Analysen verwendete Primärantikörper

Antikörper	Referenznummer	Verdünnung in 5% BSA in TBS-T	Hersteller
AMPK α (F6) Mouse mAb	#2793	1:1000	Cell Signaling Technology
Myc-Tag (9B11) Mouse mAb	#2276	1:1000	Cell Signaling Technology
FoxO3a (D19A7) Rabbit mAb	#12829	1:1000	Cell Signaling Technology

GFP (D5.1) XP Rabbit mAb	#2956	1:1000	Cell Signaling Technology
Phospho-AMPK α 1 (Ser485)/AMPK α 2 (Ser491) Antibody	#4185	1:1000	Cell Signaling Technology
Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAB	#2535	1:1000	Cell Signaling Technology
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb	#2855	1:1000	Cell Signaling Technology
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb	#9234	1:1000	Cell Signaling Technology
Rheb (E1G1R) Rabbit mAB	#13879	1:1000	Cell Signaling Technology

Tabelle 9: Für Western Blot-Analysen verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Referenznummer	Verdünnung	Hersteller
IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG	926-68070	1:15000	LI-COR Bioscience
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG	926-32211	1:15000	LI-COR Bioscience

2.9 Verwendung von Plasmiden

2.9.1 Grundvektoren

Tabelle 10: Verwendung von Plasmiden zur AAV-Erzeugung

Name des Plasmids	Nummer intern	Referenznummer, Hersteller	Zusatzinformationen
pAAV:cTNT::Luciferase (Lin et al., 2014)	#615	69915, addgene	Grundvektor mit AAV-Elementen zur potenziellen AAV-Erzeugung

Tabelle 11: Verwendung von loxP-codierenden Plasmiden

Name des Plasmids	Nummer intern	Referenznummer, Hersteller	Zusatzinformationen
pSico (Ventura et al., 2004)	#432	11578, addgene	Lentiviraler Grundvektor mit loxP-flankierter GFP-Expressions-kassette zur induzierbaren Aktivierung der Expression einer shRNA
pSicoR (Ventura et al., 2004)	#633	11579, addgene	Lentiviraler Grundvektor mit loxP-flankierter GFP-Expressions-kassette zur induzierbaren Inaktivierung der Expression einer shRNA

Für die Untersuchung der in Kapitel 1.6 genannten Teilfunktionen (Rheb, panFOXO shRNA, nicht-inaktivierbare AMPK- α 2-Variante) wurden Plasmide zur potenziellen Erzeugung von AAV-Partikeln konstruiert. Dazu wurde das Plasmid „pAAV:cTNT::Luciferase“ (Tabelle 10 bzw. Abb. 5), das von Lin et al. entwickelt wurde (Lin et al., 2014), bei der Firma addgene (Watertown, Massachusetts, USA) käuflich erworben. Dieses diente als Grundvektor für die Konstruktion weiterer Plasmide, die zur Erzeugung viraler AAV9-Partikel verwendet werden konnten. Die in diesem Plasmid enthaltenen AAV2 ITR (AAV2 *inverted terminal repeat*)-Sequenzen dienen der Eingrenzung des Plasmidabschnittes, der bei der Erzeugung von AAV-Partikeln verpackt werden soll. Weiterhin sind ein Luciferase-Gen unter Kontrolle eines cTNT-Promotors, ein *Chimeric intron* sowie ein SV 40 pA (Simian-Virus 40 Polyadenylierungssignal) und ein Kaninchen- β -g pA (β -Globulin Polyadenylierungssignal) vorhanden. Der Replikationsursprung ori (*origin of replication*) dient der Vervielfältigung des Plasmids im Bakterium *Escherichia coli*. Das Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) unter Kontrolle des AmpR-Promotors erlaubt die Selektion transformierter Bakterien mit Ampicillin. Die Herstellung der weiteren Plasmide auf Grundlage des Plasmids „pAAV:cTNT::Luciferase“ erfolgte durch Susanne Küster aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie über verschiedene Klonierungsschritte. Dabei wurden die Plasmidstrukturen innerhalb der AAV2 ITR-Sequenzen ausgetauscht, die übrige Plasmidsequenz blieb unverändert. Zur Überprüfung der korrekten Durchführung erfolgte im Anschluss an die Klonierung eine Sequenzanalyse der Expressionskassetten. Die finale Erzeugung von AAV9-Partikeln als virale Vektoren für das Tiermodell auf Grundlage der erstellten Plasmide erfolgte extern durch die Firma Vector Biolabs (Malvern, Pennsylvania, USA).

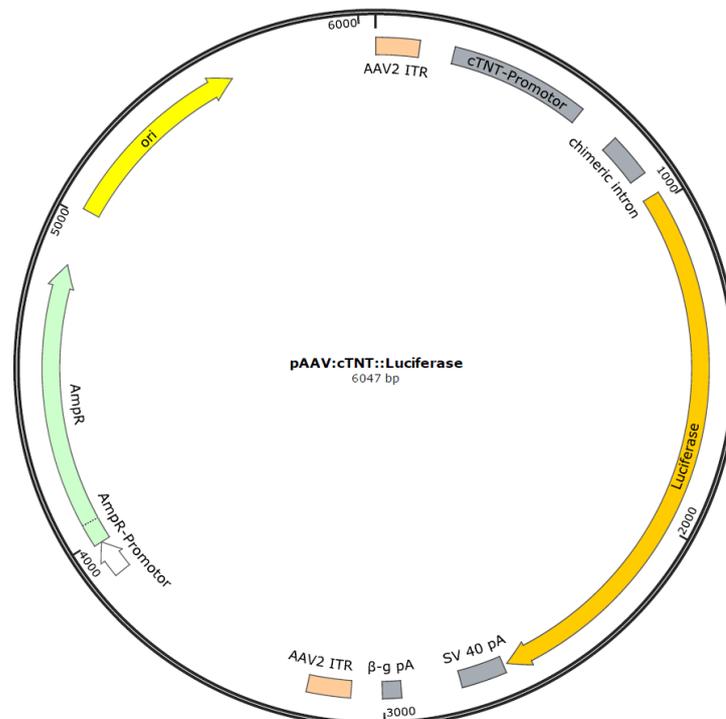


Abb. 5: Grundvektor zur Erzeugung von AAV-Partikeln. Dargestellt ist das von Lin et al. entwickelte Plasmid „pAAV:cTNT::Luciferase“ (Lin et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden unter anderem auch Plasmide konstruiert, die die induzierbare Aktivierung bzw. Inaktivierung der Expression eines Gens erlauben sollten. Dazu wurden die lentiviralen Plasmide „pSico“ und „pSicoR“ der Firma addgene (Watertown,

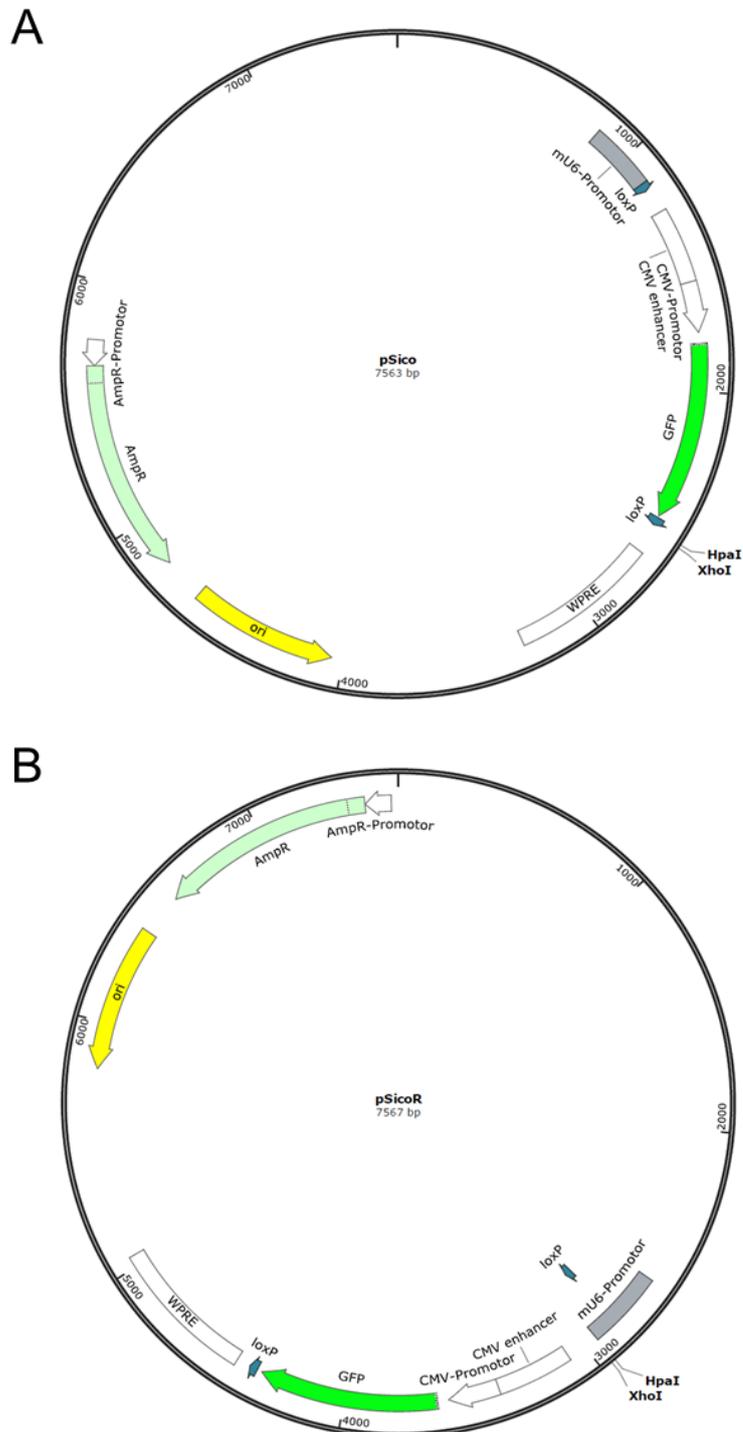


Abb. 6: Plasmide zur induzierbaren Aktivierung bzw. Inaktivierung der Expression einer shRNA. Die Plasmide „pSico“ und „pSicoR“ beinhalten wie das Plasmid „pAAV:cTNT::Luciferase“ jeweils ein Ampicillinresistenz-Gen (AmpR) unter Kontrolle eines AmpR-Promotors sowie den Replikationsursprung ori (*origin of replication*). Neben den im Text beschriebenen Plasmidelementen verfügen beide Plasmide zusätzlich über eine WRPE (*woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element*)-Sequenz. In beiden Plasmiden sind außerdem die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme HpaI und XhoI dargestellt, an denen die shRNA integriert wird.

Massachusetts, USA) verwendet (Tabelle 11 bzw. Abb. 6). Über Klonierungsschritte erfolgte der Einbau des zu exprimierenden Gens in das Grundkonstrukt dieser Plasmide. Das Plasmid „pSico“ ermöglicht nach Cre-Rekombinase-abhängiger Exzision einer mit loxP-Sequenzen flankierten GFP (*green fluorescent protein*)-Expressionskassette die induzierbare Aktivierung der Expression einer shRNA (Ventura et al., 2004). Dazu enthält dieses Plasmid einen murinen U6-Promotor (mU6-Promotor) sowie ein stromabwärts liegendes und von loxP-Sequenzen umgebendes GFP-Gen unter Kontrolle eines CMV (Cytomegalievirus)-Promotors inklusive eines verstärkenden CMV *enhancers*. Das GFP-Gen erlaubt die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins. Das lentivirale Plasmid „pSicoR“ ermöglicht hingegen die induzierbare Inaktivierung der Expression einer shRNA (Ventura et al., 2004). Das Plasmid beinhaltet dazu einen murinen U6-Promotor (mU6-Promotor) und ein stromabwärts liegendes GFP-Gen mit vorgeschaltetem CMV-Promotor sowie einem verstärkenden CMV *enhancer*. Hinter dem GFP-Gen sowie im Bereich des mU6-Promotors sind zudem loxP-Sequenzen lokalisiert, sodass über die Cre-Rekombinase-abhängige Exzision dieser Kassette die Expression einer shRNA induzierbar inaktiviert werden kann.

2.9.2 Rheb-basierte Plasmide

Tabelle 12: Verwendung von Rheb-basierten Plasmiden

Name des Plasmids	Nummer intern	Zusatzinformationen
Rheb Wildtyp	#605	Plasmid mit Wildtyp-Rheb-Expressionskassette
Rheb Q64L	#606	Plasmid mit konstitutiv aktiver Rheb-Expressionskassette
pAAV-flGFP-Rheb Q64L	#627	Plasmid auf Basis von #615 mit loxP-flankierter GFP-Expressionskassette aus „pSico“ zur induzierbaren Aktivierung einer Rheb Q64L-Expressionskassette
pAAV-loxP-Rheb Q64L	#628	#627 nach in vitro-Behandlung mit Cre-Rekombinase (M0298, New England Biolabs) mit einer verbliebenen loxP-Sequenz
pAAV-Rheb Q64L	#632	Plasmid auf Basis von #615 mit Rheb Q64L-Expressionskassette, auf dessen Grundlage virale AAV9-Partikel für das Mausmodell erzeugt wurden

Als Vektor zur Expression eines Rheb-Gens wurde zum einen das Plasmid „Rheb Wildtyp“ verwendet, welches ein wildtypisches Rheb-Allel enthält. Zum anderen wurde das Plasmid „Rheb Q64L“ mit einem mutierten Rheb-Allel benutzt. Dieses codiert für ein Rheb-Protein, das durch den Austausch der Aminosäure Glutamin an Position 64 durch Leucin konstitutiv aktiv ist, was im Vergleich zum Rheb-Wildtypgen zu einer 2-3-fachen Aktivitätssteigerung führt (Inoki et al., 2003a). Die detaillierten Strukturen der Plasmide „Rheb Wildtyp“ und „Rheb Q64L“ sind dem Anhang zu entnehmen. Über verschiedene Klonierungsschritte erfolgte die Erzeugung von Rheb-basierten Plasmiden im AAV-

Kontext auf Grundlage des Plasmids „pAAV:cTNT::Luciferase“. Die funktionell wichtigen Strukturen innerhalb der AA2 ITR-Sequenzen dieser Plasmide sind in Abbildung 7 dargestellt. Allen Plasmiden gemeinsam ist ein aus dem „Rheb Q64L“-Plasmid entstammendes Rheb Q64L-Gen, welches mit einem N-terminalen c-Myc Tag versehen ist, wodurch die Expression des Rheb Q64L-c-Myc Tag-Transgens in der Western Blot-Analyse mittels Anti-c-Myc Tag-Antikörper detektiert werden kann (Terpe, 2003). Alle in dieser Arbeit verwendeten, Rheb-basierten Plasmide sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Struktur des Plasmids „pAAV-Rheb Q64L“ diente der Erzeugung viraler AAV9-Partikel für die Expression von Rheb in adulten Mäusen.

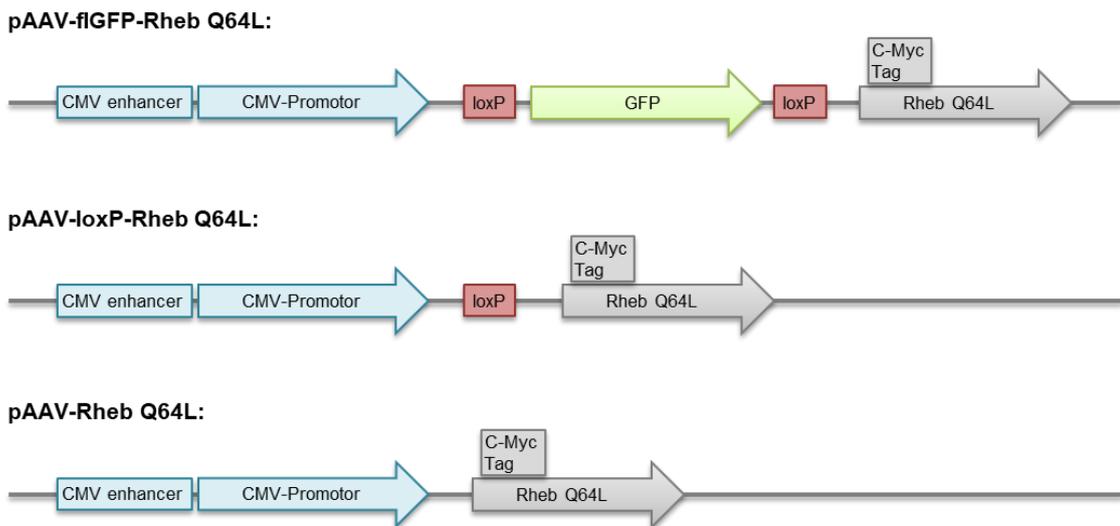


Abb. 7: Strukturen zwischen den AAV2 ITR-Sequenzen in Rheb-basierten Plasmiden. Die unterschiedlichen Rheb-basierten Plasmide, die auf Grundlage des Plasmids „pAAV:cTNT::Luciferase“ über verschiedene Klonierungsschritte erzeugt wurden, beinhalten alle ein Rheb Q64L-Gen mit einem N-terminalen c-Myc Tag. Alle weiteren dargestellten Strukturen und Abkürzungen sind in Kapitel 2.9.1 erläutert.

2.9.3 PanFOXO shRNA-basierte Plasmide

Tabelle 13: Verwendung von FOXO shRNA-basierten Plasmiden

Name des Plasmids	Nummer intern	Zusatzinformationen
pSico-flGFP-panFOXO shRNA	#622	Plasmid auf Basis von „pSico“ mit loxP-flankierter GFP-Expressionskassette zur induzierbaren Aktivierung einer panFOXO shRNA-Expressionskassette
pAAV-flGFP-panFOXO shRNA	#623	Plasmid auf Basis von #615 und #622 mit loxP-flankierter GFP-Expressionskassette zur induzierbaren Aktivierung einer panFOXO shRNA-Expressionskassette
pSicoR-hU6	#650	Plasmid auf Basis von „pSicoR“, in dem der murine U6-Promotor inklusive einer loxP-Sequenz gegen einen humanen U6-Promotor ausgetauscht wurde

pSicoR-hU6-panFOXO shRNA	#651	Plasmid auf Basis von #650 mit zusätzlich integrierter panFOXO shRNA-Expressionskassette
pSicoR-mU6-panFOXO shRNA	#653	Plasmid auf Basis von „pSicoR“ mit zusätzlich integrierter panFOXO shRNA-Expressionskassette

Das Plasmid „pSico-flGFP-panFOXO shRNA“ enthält eine panFOXO shRNA-Expressionskassette, die Cre-induzierbar aktiviert werden kann. Diese codiert für eine panFOXO shRNA, die gegen die FOXO1- und FOXO3A-mRNA gerichtet ist (Hribal et al., 2003, Renault et al., 2011). Die detaillierte Struktur dieses Plasmids wird im Anhang dargestellt. Über verschiedene Klonierungsschritte wurde das AAV-basierte Plasmid „pAAV-flGFP-panFOXO shRNA“ konstruiert, das die gleichen funktionell bedeutenden Elemente wie das Plasmid „pSico-flGFP-panFOXO shRNA“ trägt (Abb. 8).

pAAV-flGFP-panFOXO shRNA:



Abb. 8: Strukturen zwischen den AAV2 ITR-Sequenzen in panFOXO shRNA-basiertem Plasmid. Das Plasmid „pAAV-flGFP-panFOXO shRNA“ wurde über verschiedene Klonierungsschritte auf Grundlage des Plasmids „pAAV:cTNT::Luciferase“ erzeugt. Es beinhaltet ein Gen zur Expression einer panFOXO shRNA (shpanFOXO) unter Kontrolle eines murinen U6-Promotors (mU6-Promotor), wobei diese durch einen von loxP-Sequenzen umgebenen Bereich aus einem GFP-Gen und einem CMV-Promotor inklusive CMV *enhancer* voneinander getrennt werden. Dadurch wird die induzierbare Aktivierung der Expression des panFOXO shRNA-Gens nach Cre-Rekombination erlaubt. Alle weiteren Abkürzungen und Strukturen sind in Kapitel 2.9.1 erklärt. Das shpanFOXO-Element ist aus Übersichtsgründen überproportional groß dargestellt.

Weiterhin wurden panFOXO shRNA-basierte Plasmide auf Grundlage des Plasmids „pSicoR“ erzeugt (Abb. 9). Dabei ist die Grundstruktur der Plasmide identisch, lediglich

pSicoR-hU6:



pSicoR-hU6-panFOXO shRNA:



pSicoR-mU6-panFOXO shRNA:



Abb. 9: Funktionelle Strukturen von panFOXO shRNA-basierten Plasmiden, die auf Grundlage des Plasmids „pSicoR“ kloniert wurden. Die Grundstruktur der Plasmide beruht auf dem Plasmid „pSicoR“. Im Plasmid „pSicoR-hU6“ wurde in Klonierungsschritten der murine U6-Promotor inklusive der loxP-Sequenz entfernt und ein humaner U6-Promotor (hU6-Promotor) integriert. Das Plasmid „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“ unterscheidet sich vom Plasmid „pSicoR-hU6“ lediglich in dem stromabwärts des hU6-Promotors eingefügten shpanFOXO-Gen zur Expression einer panFOXO shRNA. Im Plasmid „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ wurde zusätzlich zu den Strukturen des Plasmids „pSicoR“ ein shpanFOXO-Gen integriert. Die weiteren Abkürzungen und funktionellen Strukturen sind in Kapitel 2.9.1 beschrieben. Das shpanFOXO-Element ist aus Übersichtsgründen überproportional groß dargestellt.

die für diese Arbeit relevanten Plasmidstrukturen wurden modifiziert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide auf panFOXO shRNA-Grundlage sind in Tabelle 13 abgebildet.

2.9.4 AMPK- α 2-basierte Plasmide

Tabelle 14: Verwendung von AMPK-basierten Plasmiden

Name des Plasmids	Nummer intern	Zusatzinformationen
pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp	#644	Plasmid auf Basis von #615 mit wildtypischer AMPK-Expressionskassette
pAAV-AMPK- α 2 S491A	#645	Plasmid auf Basis von #615 mit AMPK- α 2 S491A-Expressionskassette zur Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante, auf dessen Grundlage virale AAV9-Partikel für das Mausmodell erzeugt wurden

Das Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ (Tabelle 14 bzw. Abb. 10), dessen Struktur auf dem „pAAV:cTNT::Luciferase“-Grundvektor beruht, beinhaltet ein AMPK- α 2 S491A-Gen. Durch dieses Gen wird ein AMPK- α 2-Protein exprimiert, in dem an Position 491 die Aminosäure Serin durch die Aminosäure Alanin ersetzt wird. Dadurch wird eine Variante dieses Proteins erzeugt, welche nicht durch inhibitorische Phosphorylierung inaktiviert werden kann (Coughlan et al., 2016). Weiterhin enthält das AMPK- α 2 S491A-Gen ein N-terminales c-Myc Tag. Ein dadurch exprimiertes Transgen kann mit einem Anti-c-Myc Tag-Antikörper in einer Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Terpe, 2003). Auf Grundlage dieses Plasmids wurden virale AAV9-Partikel zur AMPK-Expression in adulten Mäusen erzeugt. Das ebenfalls dargestellte „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“-Plasmid unterscheidet sich vom Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ lediglich in der Expression eines wildtypischen AMPK- α 2-Gens.

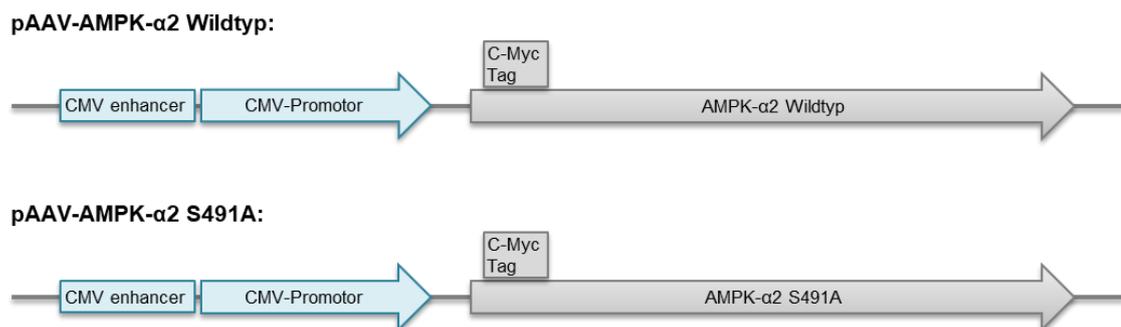


Abb. 10: Strukturen zwischen den AAV2 ITR-Sequenzen in AMPK-basierten Plasmiden. Der Bereich zwischen den AA2 ITR-Sequenzen der Plasmide „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“ und „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ umfasst für das „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“-Plasmid ein wildtypisches AMPK- α 2-Gen und für das „pAAV-AMPK- α 2 S491A“-Plasmid das AMPK- α 2-Gen mit Austausch der Aminosäure Serin durch Alanin an Position 491 (AMPK- α 2-S491A), das zur Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante führt (Coughlan et al., 2016). Alle weiteren Abkürzungen und abgebildeten Strukturen sind in Kapitel 2.9.1 erläutert.

2.9.5 Weitere Plasmide

Tabelle 15: Verwendung von weiteren Plasmiden

Name des Plasmids	Nummer intern	Zusatzinformationen
DS-Red	#220	Plasmid zur Expression eines rot fluoreszierenden Proteins
PGK-Cre	#267	Plasmid zur Expression einer Cre-Rekombinase

Die in Tabelle 15 dargestellten Plasmide wurden ausschließlich auf Zellkulturebene verwendet. Die Darstellung der Plasmidstrukturen erfolgt im Anhang.

2.10 Transgenes Mausmodell

Für die in vivo-Experimente in adulten Mäusen wurden männliche, gleichaltrige Tiere des Stammes „ α -MHC-mer-Cre-mer-AKT-1/2-flox“ (iCMAKT1/2-KO) verwendet, die zuvor in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität gezüchtet wurden. Das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz hat die Tierversuche inklusive der Organentnahmen unter den Aktenzeichen A308/15 und A244/19 genehmigt. Allen Tieren wurde freier Zugang zu Nahrung und Wasser ermöglicht. Ein Übungsschein zum Töten von Wirbeltieren der Spezies Maus wurde an der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben absolviert und lag vor Beginn der Experimente vor. Die Untersuchung der Herzfunktion erfolgte an iCMAKT1/2-KO-Mäusen mit bzw. ohne vorherige AAV9-Infektion. In Teiluntersuchungen wurden zudem wildtypische Tiere mit normaler AKT-1/2-Expression verwendet.

2.10.1 AAV9-Infektion

Das gezielte Einbringen von Gensequenzen in 7-8 Wochen alte, männliche Mäuse erfolgte mithilfe von AAV9-Partikeln. Infektiöse AAV9-Partikel wurden durch die Firma Vector Biolabs (Malvern, Pennsylvania, USA) mittels Transfektion der konstruierten Plasmide mit AAV9-Hintergrund zusammen mit zwei weiteren für die AAV-Produktion benötigten Plasmiden in HEK293-Zellen erzeugt. Der Titer der erworbenen AAV9-Partikel betrug abhängig von dem dafür verwendeten Plasmid zwischen $2,0-5,0 \cdot 10^{13}$ Virusgenomkopien/ml. Daraus wurden Aliquots erstellt, in denen mit PBS auf eine Virusanzahl $1,0 \cdot 10^{12}$ Virusgenomkopien/100 μ l verdünnt wurde. Die Mäuse wurden über einen Isofluran-Verdampfer (Isofluran Vaporizer, VetEquip) zunächst zur Einleitung mit 3,5 % Isofluran (Isofluran Piramal, Piramal Critical Care) in einer speziellen Kammer narkotisiert; im Anschluss erfolgte die Narkose mit 2 % Isofluran. Daraufhin wurden die viralen AAV9-Partikel mittels Schwanzveneninjektion in die Mäuse eingebracht, wobei das Injektionsvolumen 100 μ l und somit $1,0 \cdot 10^{12}$ Virusgenomkopien pro Maus betrug. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde den Kontrolltieren ohne AAV9-Infektion 100 μ l PBS über die Schwanzvene gespritzt. Die Durchführung der Schwanzveneninjektionen erfolgte durch Daniela Müller aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie.

Ca. 4 Wochen nach Virusinjektion wurde der AKT-1/2-Doppel-Knockout durch Tamoxifeninjektion induziert.

2.10.2 Cre-loxP-System

Die selektive AKT-1/2-Ausschaltung aus dem Mausgenom erfolgte mithilfe des Cre-loxP-Systems. Dieses System wurde in der Bakteriophage P1 identifiziert und dient der Exzision definierter genomischer DNA-Abschnitte. Die Exzision erfolgt zwischen zwei den DNA-Abschnitt in gleicher Richtung flankierenden, palindromischen loxP-Sequenzen, wobei die Cre-Rekombinase diese Reaktion katalysiert (Sternberg and Hamilton, 1981). Im Anschluss an die Exzision verbleibt eine hybride loxP-Sequenz im Genom. Um einen AKT-1/2-Doppel-Knockout der mit loxP-Sequenz flankierten AKT-1- und -2-Sequenzen ausschließlich in murinen Kardiomyozyten zu erreichen, wurde die Expression des Cre-Rekombinase-Gens unter die Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen α -MHC-Promotor gestellt (Sohal et al., 2001). Die kardiomyozytenspezifische Expression der Cre-Rekombinase dient der Vermeidung einer AKT-1/2-Deletion in anderen Zelltypen. Weiterhin wird die Cre-Rekombinase zusammen mit zwei veränderten Östrogenrezeptor-Bindungsdomänen (*mutated estrogen receptor, mer*) als mer-Cre-mer-Fusionsprotein exprimiert. Die Modifikation der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors führt dazu, dass murines Östrogen nicht mehr als Substrat an den Rezeptor binden kann. Per Injektion in die Mäuse eingebrachtes Tamoxifen hingegen kann an den mutierten Rezeptor binden, wodurch ein Transfer des Fusionsproteins aus modifiziertem Östrogenrezeptor und Cre-Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Zellkern erreicht wird (Littlewood et al., 1995). Schließlich kann die Cre-Rekombinase dort die Exzision der mit loxP-Sequenzen flankierten AKT-1- und AKT-2-Sequenzen katalysieren. Diese Sequenzen kodieren für die ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domänen von AKT-1 und AKT-2 (Stefanie Gödecke, persönliche Mitteilung, 2019). Insgesamt kann somit gewährleistet werden, dass es nur in Kardiomyozyten und erst nach Tamoxifeninjektion zur Gendeletion kommt. Zur Erzeugung der benötigten Mäuse war zuvor die Kreuzung von Mäusen, die mit loxP-Sequenzen flankierte AKT-1/2-Sequenzen exprimieren, mit Mäusen, die die Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase unter Kontrolle des α -MHC-Promotors exprimieren, notwendig.

2.10.3 Induktion des iCMAKT1/2-KOs

Die gezielte Induktion des iCMAKT1/2-KOs erfolgte in ca. 12 Wochen alten, männlichen Tieren mittels Tamoxifeninjektion. Dazu wurde zunächst Tamoxifen (Sigma-Aldrich) in Erdnussöl (Sigma-Aldrich) auf eine Konzentration von 0,5 mg/100 μ l gelöst. Sowohl iCMAKT1/2-KO-Mäuse als auch AKT-1/2-wildtypische Tiere erhielten *intraperitoneale* Injektionen von je 100 μ l des Tamoxifen-Erdnussöl-Gemisches an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Die Durchführung der Tamoxifeninjektionen erfolgte durch Daniela Müller aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie.

2.10.4 Echokardiographie

Die Untersuchung der murinen Herzfunktion im Zeitverlauf erfolgte mithilfe repetitiver Echokardiographie-Analysen. Dazu wurden ab der ersten Tamoxifengabe (Tag 0) wöchentlich Herzaufnahmen angefertigt. Die Durchführung der Echokardiographie-Untersuchung erfolgte verblindet durch Dr. André Heinen aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie. Vor Untersuchungsbeginn wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Zur Narkoseeinleitung wurden die Mäuse mit 3,5 % Isofluran (Isofluran Piramal, Piramal Critical Care) in einer Narkosebox (Induction Chamber, VetEquip) begast; zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde 2 % Isofluran über eine Narkosemaske verabreicht. Dazu wurde ein Isofluran-Verdampfer (Isofluran Vaporizer, VetEquip) verwendet. Zur Echokardiographie-Aufnahme wurden die Tiere in Rückenlage auf einem entsprechenden Tiermultifunktionsstisch (Vevo Imaging Station, FUJIFILM VisualSonics) mit integrierter Wärmefunktion fixiert, sodass die Körpertemperatur konstant auf 37 °C gehalten wurde. Zusätzlich wurden die Tiere bei Bedarf mit einer Infrarotlampe gewärmt. Gemessen wurde die Körpertemperatur anal. Während der Aufnahmen erfolgte die Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG) inklusive Herzfrequenzbestimmung sowie die Detektion der Atemfrequenz zur Kontrolle der optimalen Narkosetiefe. Somit wurden vergleichbare Aufnahmebedingungen garantiert. Ein auf 37 °C erwärmtes Ultraschallgel (Aquagel, PARKER) wurde auf den zuvor enthaarten Oberkörper der Mäuse aufgetragen. Die Aufnahmen erfolgten an einem Ultraschallgerät (Vevo 2100 Imaging System, FUJIFILM VisualSonics) über einen 30 MHz Schallkopf (Linear Array Transducer MS400, FUJIFILM VisualSonics). Für die spätere Analyse wurden dann folgende Echokardiographie-Aufnahmen des linken Ventrikels getätigt:

- B-Mode (*brightness modulation*) der parasternalen langen Achse (PSLA, *parasternal long-axis*) des linken Ventrikels in Systole und Diastole
- 3x (apikal, ventrikulär Mitte, basal) B-Mode der parasternalen kurzen Achse (SAX, *short-axis*) des linken Ventrikels in Systole und Diastole
- M-Mode (*motion modulation*) der parasternalen kurzen Achse (SAX, *short-axis*) des linken Ventrikels auf Höhe der Ventrikelmitte

Die B-Mode-Aufnahme dient einer zweidimensionalen Darstellung der kardialen Strukturen. Die M-Mode-Aufnahme ist eine eindimensionale Darstellung der Gewebestrukturen im Bezug zum Zeitverlauf. Mithilfe der M-Mode-Aufnahme der Ventrikelmitte können die kardialen Wandstrukturen der LVAW (*left ventricular anterior wall*) und LVPW (*left ventricular posterior wall*) sowie der linksventrikuläre Innendurchmesser (LVID, *left ventricular internal diameter*) über die Zeit verfolgt werden und Rückschlüsse auf die Myokardmasse gezogen werden (Abb. 12). Die Auswertung der Echokardiographie-Aufnahmen erfolgte verblindet mithilfe der Software Vevo LAB 1.7.1 (FUJIFILM VisualSonics). Alle im Folgenden beschriebenen Formeln entstammen der Formelsammlung dieses Softwareprogramms. Zunächst wurde das linksventrikuläre Volumen der Herzen am Ende der Systole (ESV, endsystolisches Volumen) und am Ende der Diastole (EDV, enddiastolisches Volumen) mit der modifizierten Simpson-

Methode errechnet. Die modifizierte Simpson-Methode stellt eine präzise Methode zur Bestimmung des linksventrikulären Volumens mithilfe zweidimensionaler Echokardiographieaufnahmen dar (Parisi et al., 1979). Dazu wurden die Ventrikellänge in der PSLA B-Mode-Aufnahme sowie der Flächeninhalt des linken Ventrikels in den drei SAX B-Mode-Aufnahmen jeweils in Systole und Diastole bestimmt (Abb. 11).

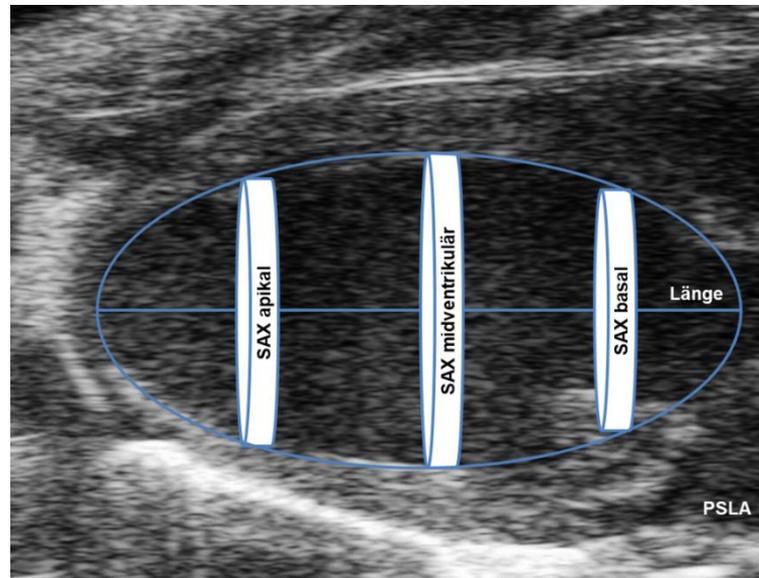


Abb. 11: Bestimmung des endsystolischen und enddiastolischen Volumens mithilfe der modifizierten Simpson-Methode. Exemplarisch abgebildet ist die B-Mode-Aufnahme einer parasternalen langen Achse (PSLA) des linken Ventrikels in Diastole. In diesem Aufnahmemodus wird die Länge des Ventrikels in Systole und Diastole bestimmt. Weiterhin wird für die Simpson-Methode der Flächeninhalt in den B-Mode-Aufnahmen der parasternalen kurzen Achse (SAX) des linken Ventrikels in basaler, midventrikulärer und apikaler Ebene jeweils in Systole und Diastole bestimmt. SAX-Aufnahme und PSLA-Aufnahme stehen senkrecht zueinander.

ESV bzw. EDV wurden mithilfe der folgenden Formel nach Simpson bestimmt:

- $ESV \text{ in } \mu\text{l} = (A \text{ Sys Apex} + A \text{ Sys Mitte} + A \text{ Sys Basis}) \cdot l \text{ Sys} / 3$
 - $EDV \text{ in } \mu\text{l} = (A \text{ Dia Apex} + A \text{ Dia Mitte} + A \text{ Dia Basis}) \cdot l \text{ Dia} / 3$
- A = Flächeninhalt
 - Sys = Systole
 - Dia = Diastole
 - l = Ventrikellänge

Über ESV und EDV konnten weitere Ventrikelfunktionen bestimmt werden:

- Schlagvolumen (SV) in $\mu\text{l} = EDV - ESV$
- Herzzeitvolumen (HZV) in $\text{ml}/\text{min} = SV \cdot \text{Herzfrequenz}$
- Ejektionsfraktion (EF) in % = $(EDV - ESV) / EDV \cdot 100$

Außerdem konnten die kardialen Funktionsparameter *fractional area change* (FAC, Flächenänderung) und *fractional shortening* (FS, Verkürzungsfraktion) des linken Ventrikels anhand folgender Formeln errechnet werden:

- $FAC \text{ in } \% = ((A \text{ Dia Mitte} - A \text{ Sys Mitte}) / (A \text{ Dia Mitte})) \cdot 100$

- A = Flächeninhalt
 - Sys = Systole
 - Dia = Diastole
- FS in % = $((I \text{ Dia} - I \text{ Sys}) / (I \text{ Dia})) * 100$
- I = Ventrikellänge
 - Sys = Systole
 - Dia = Diastole

In der M-Mode-Aufnahme der midventrikulären parasternalen kurzen Achse wurden der Durchmesser des Ventrikellumens (LVID) und die Durchmesser der Ventrikelwände (LVAW, LVPW) in Systole und Diastole über drei verschiedene Herzzyklen bestimmt. Zudem wurden die Wandbewegungen über drei Herzzyklen nachgezeichnet (Abb. 12) und dann die linksventrikuläre Masse über folgende Formel mithilfe des softwaregesteuerten Analysetools ermittelt:

- Linksventrikuläre Masse (LV Mass Corr (LV Trace)) in mg = $1,053 * 0,8 * (\text{durchschnittlicher Durchmesser der äußeren Wände in Diastole})^3 - (\text{durchschnittlicher Durchmesser der inneren Wände in Diastole})^3$

Aus Körpergewicht und linksventrikulärer Masse konnte die *Heart weight/Body weight ratio*, das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, ermittelt werden:

- HW/BW ratio = linksventrikuläre Masse / Körpergewicht

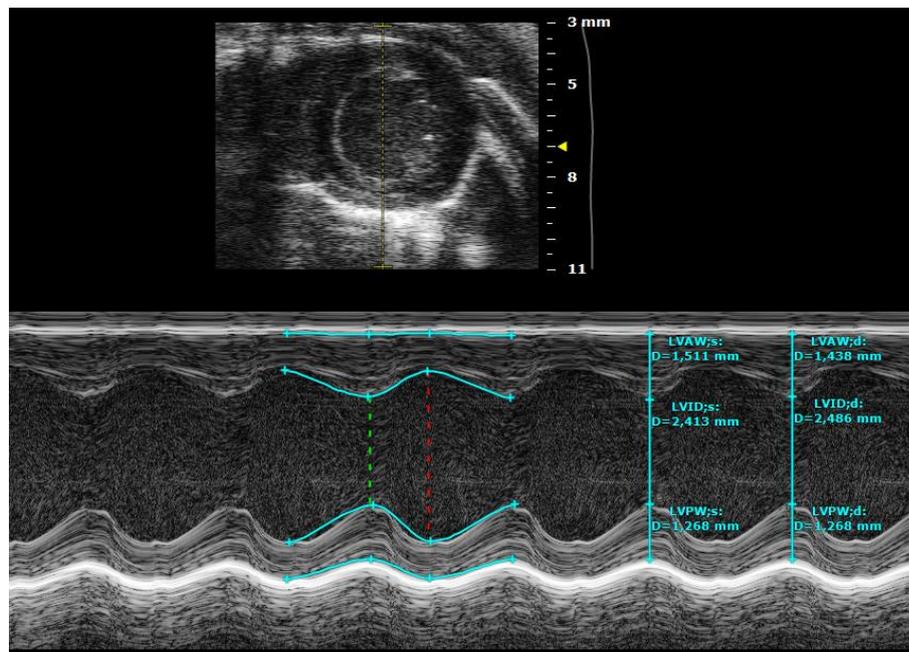


Abb. 12: M-Mode der midventrikulären parasternalen kurzen Achse (SAX). Exemplarisch dargestellt ist die Markierung der Wandbewegungen zur Berechnung der linksventrikulären Masse sowie die Bemessung der Durchmesser von Ventrikelwänden und -lumen (LVAW, LVPW, LVID) in Systole und Diastole.

2.10.5 Beurteilung der Belastungszeichen

Die im Rahmen des iCMAKT1/2-KO-Modells durchgeführte modifizierte Überlebensanalyse basierte auf der Beachtung von Belastungszeichen entsprechend der im Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen A244/19 aufgeführten Belastungstabelle. Die darin enthaltenen Parameter dienten zur Einschätzung des Belastungsgrades sowie zur Ermittlung von Abbruchkriterien. Dazu wurden die Tiere mindestens einmal täglich observiert. Bis einschließlich Tag 21 konnten keine Anzeichen von Belastung bei Betrachtung der Parameter Körpergewicht, Allgemeinzustand und Spontanverhalten festgestellt werden. Ab Tag 21 und später kam es innerhalb kurzer Zeit zur rasch progredienten Zunahme der Belastungszeichen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten täglich zwei Kontrollen der Tiere. Bei Erreichen der Abbruchkriterien anhand einer Punktesumme aus den beobachteten Parametern zur Belastungseinschätzung erfolgte die Tötung der Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation. Die Überlebenszeit (Zeit bis zum Erreichen von Abbruchkriterien) der Tiere wurde mithilfe modifizierter Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt.

2.10.6 Organentnahme

Nach dem Tod der Tiere durch zervikale Dislokation wurde der Brustkorb mithilfe eines Skalpells eröffnet. Es erfolgte die Entnahme des Herzens aus dem Brustkorb sowie das Entfernen der Vorhöfe des Herzens inklusive der Ventilebene und der Austrittsbahnen. Der restliche Teil des Herzens wurde in kaltem PBS blutfrei gewaschen. Daraufhin wurde auch der rechte Ventrikel vom Rest des Herzens entfernt. Das verbliebene Herzgewebe wurde in einer weiteren Schale mit PBS entsprechend den benötigten Probenmengen für die weitere Untersuchung der Herzen halbiert. Dabei wurde ca. eine Hälfte der Herzprobe für Proteinuntersuchungen verwendet, die andere Hälfte diente als Reserve für gegebenenfalls erfolgende weiterführende Untersuchungen wie der RNA-Analyse. Auch aus den Lebern der Tiere wurden mithilfe eines Skalpells Proben entnommen, die ebenfalls in PBS von Blut befreit wurden. Sowohl Herz- als auch Leberproben wurden vor dem Überführen in Mikroreaktionsgefäße kurz abgetrocknet. Abschließend erfolgte ein Schockgefrieren der Proben in flüssigem Stickstoff und eine Aufbewahrung der Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.10.7 Primärprobenaufbereitung

Das Herz- und Lebergewebe wurde für die weitere Proteinuntersuchung aufgeschlossen. Dazu wurde in ein Mikroreaktionsgefäß mit der entsprechenden Probe ca. 500 µl Lysispuffer hinzugegeben. Dieser wurde zuvor mit 1:100 Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific) ergänzt. Es erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes für ca. 20 Sekunden mithilfe eines Gewebehomogenisators mit anschließender Lagerung der homogenisierten Proteinextrakte auf Eis. Der Lysispuffer bewirkte einen Aufschluss der Zellmembranen, sodass die inneren Bestandteile der Zellen inklusive der Proteine aus den Zellen austreten konnten. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C

zentrifugiert. Danach befanden sich die Proteine im Überstand, welcher zur Proteinkonzentrationsbestimmung in ein neues Mikroreaktionsgefäß übertragen wurde.

2.11 Zellkultur

2.11.1 Verwendete Zelllinien

Für die Zellkulturexperimente wurden die Zelllinien HEK293 und NIH3T3 verwendet. Bei den HEK293-Zellen handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzell-Zelllinie (Graham et al., 1977), bei den NIH3T3-Zellen um eine murine Fibroblasten-Zelllinie (Todaro and Green, 1963).

2.11.2 Kultivierung von HEK293- und NIH3T3-Zellen

Sowohl das zur Kultivierung auf Zellkulturschalen verwendete Medium der HEK293- als auch der NIH3T3-Zellen basierte auf DMEM-Medium (Capricorn-Scientific) und den in Tabelle 16 aufgeführten Zusätzen. Sobald eine Konfluenz von ca. 90% erreicht war, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für ungefähr eine Minute mit S-EDTA gewaschen, um Rückstände des Kulturmediums zu beseitigen. Es folgte die Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale mittels Inkubation in Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) für ca. 5 Minuten. Die Zellen wurden daraufhin mithilfe einer Pipette in ein Reagenzröhrchen überführt. Durch Zentrifugation wurde das Trypsin-EDTA im Überstand wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen auf mit frischem Kulturmedium versehenen Zellkulturschalen ausplattiert. Es erfolgte ein täglicher Wechsel des Kulturmediums.

Tabelle 16: Zusammensetzung des in der Zellkultur verwendeten Kulturmediums

DMEM High Glucose	500 ml
FBS	58 ml
PenStrep	5,8 ml
GlutaMAX-I	5,8 ml
MEM Non-Essential Amino Acids	5,8 ml

2.11.3 Transiente Transfektion in HEK293- und NIH3T3-Zellen

Die transiente Transfektion von Plasmiden in Zellen erfolgte mittels Lipofektion, wobei kationische Lipide in Form von Liposomen Komplexe mit der negativ geladenen DNA bilden und so eine Fusion mit der Plasmamembran und die Aufnahme in die Zelle begünstigen (Felgner et al., 1987). Zur Lipofektion wurde Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welches die kationischen Liposome beinhaltet (Dalby et al., 2004). Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen auf Zellkulturtestplatten übertragen, mit jeweils 2 ml Kulturmedium pro *Well* der Platte versehen und bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70 % wachsen gelassen. Zur Transfektion eines Plasmids wurden in einem Mikroreaktionsgefäß 250 µl Optimem (Opti-MEM) und 7 µl Lipofectamine 2000 gemischt. In einem weiteren Mikroreaktionsgefäß wurden 250 µl Optimem und 3 µg der entsprechenden Plasmid-DNA gemischt. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann zusammengegeben. Nach

einer Wartezeit von ungefähr 30-50 Minuten erfolgte das Auftropfen des jeweiligen Ansatzes auf die entsprechenden Zellen auf der Zellkulturtestplatte. Nach eintägiger Inkubation wurde das Kulturmedium mit dem zuvor aufgetragenen Transfektionsgemisch entfernt und frisches Kulturmedium hinzugegeben. Es erfolgte ein täglicher Wechsel des Kulturmediums sowie der Aufschluss der Zellen (je nach Experiment nach 2 bis 5 Tagen) durch Zellyse (Kapitel 2.11.4). Zum Teil wurden auch Doppeltransfektionen mit zwei Plasmiden durchgeführt. Dabei wurde die Gesamtmenge an Plasmid-DNA auf 6 µg und die Menge an Lipofectamine 2000 auf 14 µl erhöht, die Menge an OptiMem blieb identisch mit der aus den Angaben für die Einzeltransfektion. Eine andere Möglichkeit bestand darin, identische Mengenangaben wie für die Einzeltransfektionen und somit weniger DNA pro Plasmid zu verwenden. Für beide Möglichkeiten der Doppeltransfektion entsprach das weitere Vorgehen dem oben beschriebenen Vorgehen für die Einzeltransfektion.

2.11.4 Zellernte für Proteinanalyse

Zunächst wurden Lysispuffer und Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific) in einem Verhältnis von 1:100 zusammengegeben. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde das Gemisch für ca. 2 Minuten zu den Zellen hinzugefügt. Die durch den Lysispuffer aufgeschlossenen Proteinextrakte und Zellreste wurden mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturtestplatten entfernt und in Mikroreaktionsgefäße überführt, die dann auf Eis gelagert wurden. Die Lysate wurden für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und im Anschluss der die Proteine enthaltene Überstand zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in neue Mikroreaktionsgefäße übertragen.

2.12 Untersuchung von Proteinen

2.12.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test)

Eine Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mithilfe des BCA (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure)-Test durchgeführt (Smith et al., 1985). Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte sowohl für die in den Zellkulturexperimenten gewonnenen Proteinproben als auch für die Proteinproben aus Mausgewebe. Das Vorgehen für beide Probenarten war identisch und wie vom Hersteller des BCA-Testkits beschrieben (Thermo Fisher Scientific). Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA in bekannter Konzentration (25-1000 µg/µl) auf eine 96-Well-Mikroplatte pipettiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl der Proben zusammen mit 25 µl sterilem H₂O in Dreifachbestimmung auf die Mikroplatte pipettiert. Außerdem wurde eine Kontrollprobe bestehend aus 25 µl sterilem H₂O aufgetragen. Zu der BSA-Verdünnungsreihe sowie der Kontrollprobe wurden jeweils 5 µl des zuvor für den Zellaufschluss verwendeten, mit Phosphatase- und Protease-Inhibitor versetzten Lysispuffers hinzugefügt. Anschließend wurden jeweils 200 µl eines 50:1-Gemisches aus Pierce BCA Protein Assay Reagent A und B (Thermo Fisher Scientific) zu der Verdünnungsreihe, der Kontrollprobe und den pipettierten Proben hinzugegeben. Die 96-Well-Mikroplatte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsbestimmung der Proben erfolgte mithilfe eines

Spektrophotometers bei 570 nm (iMark Microplate Reader, Bio-Rad). Dazu wurde das Softwareprogramm Microplate Manager 6 (Bio-Rad) verwendet. Anhand einer errechneten Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli konnte eine Auftrennung der Proteine erreicht werden (Laemmli, 1970). Dafür wurde zu den Proteinproben abhängig von der im BCA-Test errechneten Proteinkonzentration 4x-Laemmli-Puffer und Lysispuffer hinzugefügt, um eine Proteinzielkonzentration von 1 µg/µl zu erreichen. Zum 4x-Laemmli-Puffer wurde zuvor noch DTT (100 mM; Roth) im Verhältnis von 10:1 hinzugegeben. Das im 4x-Laemmli-Puffer enthaltene anionische Detergenz SDS dient der Denaturierung der Proteine und der Überlagerung der Proteineigenladung. DTT dient der Reduktion von Disulfidbrücken. Die Proben wurden zum Aufbrechen der Sekundärstruktur bei 99 °C für 5 Minuten aufgekocht. Für die anschließende Gelelektrophorese wurden ein Sammel- und ein Trenngel nach der im Folgenden beschriebenen Zusammensetzung erstellt. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden dabei 10 %-Acrylamid-Trenngele für Proteine mit einer Größe von ca. über 30 kDa und 12,5 %-Acrylamid-Trenngele für Proteine kleiner als ca. 30 kDa erstellt. Dabei konnten aus den in Tabelle 17 angegebenen Mengen jeweils zwei Gele gegossen werden. Jeweils 20 µl (entspricht 20 µg) der zuvor erstellten Proteinproben wurden in Geltaschen pipettiert, die durch einen Kamm im Sammelgel erzeugt wurden. Außerdem wurde eine weitere Geltasche mit 3 µl eines Proteingrößenstandards befüllt (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Zum Start der Gelelektrophorese wurde das beladene Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte SDS-Page Kammer gestellt und eine Spannung von 200 V eingestellt. Es erfolgte zunächst eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel und anschließend eine Auftrennung der Proteine im Trenngel. Die Laufzeit betrug dabei 40-90 Minuten.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Mengen beziehen sich auf die Produktion von je zwei Gelen)

	2x Trenngel 10 %	2x Trenngel 12,5 %	2x Sammelgel
H ₂ O	5 ml	4,375 ml	3,7 ml
40% Acrylamid	2,5 ml	3,125 ml	625 µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	-	625 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl
10% APS	25 µl	25 µl	15 µl

2.12.3 Western Blot-Analyse

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Western Blot-Transfergerät (Invitrogen Power Blotter bzw. Pierce G2 Fast Blotter, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dazu wurden Gel und Nitrozellulosemembran zusammen zwischen jeweils zwei zuvor in Anoden- bzw. Kathodenpuffer eingelegte Filterpapiere

gelegt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1,3 A für 7-10 Minuten. Daraufhin wurde die Nitrozellulosemembran mit einer 1:1-Mischung aus TBS und Odyssey Blocking Buffer in TBS (LI-COR Bioscience) bei Raumtemperatur behandelt, um im späteren Verlauf Antikörper-Wechselwirkungen mit freien Bindungsstellen zu vermeiden. Dies erfolgte in einer Inkubationsbox, die für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler platziert wurde. Im Anschluss wurde der zuvor in einer Primärantikörperlösung (5% BSA in TBS-T) verdünnte primäre Antikörper hinzugegeben. Die Inkubation fand über Nacht auf einem Schüttler bei einer Temperatur von 4 °C statt. Am nächsten Morgen wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für je 10 Minuten in TBS-T inkubiert, um den überschüssigen primären Antikörper abzuwaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Sekundärantikörperlösung (1:1-Mischung aus TBS und Odyssey Blocking Buffer in TBS mit 1:1000 Tween) verdünnt und zur Nitrozellulosemembran hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurde erneut für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach einem abschließenden 10-minütigen Waschschrift in TBS erfolgte die Immundetektion der fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper mithilfe eines Bildgebungssystems (Odyssey, LI-COR Bioscience). Dieses System detektiert bei einer Wellenlänge von 700 nm (rot) bzw. 800 nm (grün). Nach abgeschlossener Immundetektion wurde die Nitrozellulosemembran zur Anfärbung der Gesamtproteinmenge bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit dem Kit REVERT 700 Total Protein Stain (LI-COR Bioscience) und anschließend zweimal für jeweils 30 Sekunden mit dem Kit REVERT Wash Solution (LI-COR Bioscience) behandelt. Erneut erfolgte eine Bildaufnahme. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den jeweiligen Proben ist notwendig zur Normierung der Antikörper-Immunfluoreszenzsignale. Die Quantifizierung der detektierten Signalbanden erfolgte mithilfe des Softwareprogramms Image Studio Lite Ver 5.2 (LI-COR Bioscience). Dabei wurde zur Bestimmung der relativen Signalintensität für jede Proteinprobe die Intensität der detektierten Signalbande in Relation zur bestimmten Gesamtproteinmenge gesetzt. Dadurch wurde eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proteinproben gewährleistet.

2.13 Untersuchung von RNA

2.13.1 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus den gewonnenen murinen Herzproben erfolgte mithilfe der Materialien sowie des Protokolls aus dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Nach Gewinnung der RNA aus dem Herzgewebe wurden die Proben spektralphotometrisch quantifiziert (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab). Es wurden ausschließlich Proben mit einem Absorptionsquotienten bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}:A_{280}$) von ~2,0 für die weiteren Schritte ausgewählt.

2.13.2 Reverse Transkription in cDNA

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde das Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) verwendet. Dabei wurde für eine cDNA-Transkription 1 µg der zuvor isolierten RNA verwendet. Die gDNA (*genomic DNA*) wurde mithilfe von gDNA

Wipeout Buffer aus der RNA-Probe entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der RNA-Probe mit zuvor hinzugegebenem *Mastermix* bestehend aus Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer und RT Primer Mix bei 42 °C für 15 Minuten. Die im RT Primer Mix enthaltenen Oligo-dt und Random Primer dienten der Synthese von cDNA aus unterschiedlichen RNA-Abschnitten. Eine im letzten Schritt durchgeführte Inkubation bei 95 °C für 3 Minuten führte zum Abbruch der reversen Transkription.

2.13.3 Quantitative PCR

Die Durchführung einer qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) erfolgte zur quantitativen Bestimmung der Expression von mRNA (*messenger RNA*) des zu analysierenden Gens. Der dafür verwendete und im Kit Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green lagert sich an die synthetisierten cDNA-Doppelstränge an, sodass mit der Zunahme der synthetisierten cDNA im Laufe der PCR-Zyklen auch das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität kann somit die DNA-Menge bestimmt werden. Weiterhin sind im verwendeten Kit bereits Maxima Hot Start Taq-DNA-Polymerase und dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) sowie ein Puffer enthalten, sodass lediglich die zuvor erzeugte cDNA und die entsprechenden Primer für das zu untersuchende Gen nach dem folgenden Schema hinzugefügt werden mussten (Tabelle 18). Im Rahmen des Expressionsnachweises transgenen Rhebs wurden Primer zur Amplifikation transgener Rheb-cDNA (*forward/reverse primer*: RhebTagfw/RhebTagrev) sowie zur Amplifikation der Gesamtmenge an Rheb-cDNA (*forward/reverse primer*: Rheb FM1/Rheb RM1) verwendet (Kapitel 2.5: Tabelle 5). Die Erkennungssequenz der Primer zur Amplifikation transgener Rheb-cDNA liegt dabei im 5'-c-Myc Tag-Bereich, welcher im endogenen Rheb nicht vorkommt. So wird eine spezifische Amplifikation transgenen Rhebs ermöglicht. Die Erkennungssequenz der Primer zur Amplifikation der Gesamtmenge an Rheb-cDNA liegt in einem Bereich, der sowohl im endogenen als auch im transgenen Rheb vorhanden ist.

Tabelle 18: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion

SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	10,0 µl
cDNA	1,0 µl
forward primer	0,45 µM
reverse primer	0,45 µM
H ₂ O (destilliert)	7,2 µl

Am StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) erfolgte die Vervielfältigung der cDNA anhand der in Tabelle 19 zusammengefassten Bedingungen. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen. Abschließend wurden die Schmelzkurven der amplifizierten cDNA-Produkte bestimmt, um die Spezifität dieser zu überprüfen. Dazu erfolgte nach Erhitzen bei 95 °C für 15 Sekunden und anschließender einminütiger Phase bei 60 °C eine kontinuierliche Temperatursteigerung um 0,3 °C alle 15 Sekunden bis zu einer Temperatur von 95 °C.

Tabelle 19: Zyklus-Parameter zur Vervielfältigung der cDNA

Denaturierung	Zyklus 1: 95 °C für 10 Minuten
	alle weiteren Zyklen: 95 °C für 15 Sekunden
Hybridisierung und Polymerisation	60 °C für 1 Minute

2.13.4 Auswertung

Die Auswertung der qPCR erfolgte mithilfe des Softwareprogramms StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems™). Dazu wurde die X_0 -Methode angewendet, bei der der Vergleich der für alle Proben errechneten X_0 -Werte anzeigt, in welcher Probe vor Beginn der qPCR-Analyse die größte Menge der zu untersuchenden mRNA vorhanden war (Sasse et al., 2003, Thomsen et al., 2010). Es erfolgte die Berechnung anhand folgender Gleichung:

- $X_0 = 1 / (2^{C_T^{(mean)}})$

Der für die Berechnung benötigte C_T -Wert (*threshold cycle*) beschreibt die Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen einer amplifizierten cDNA-Probe, die notwendig sind, um einen vorher definierten Fluoreszenz-Schwellenwert zu überschreiten. Der Schwellenwert muss dabei in der logarithmischen Amplifikationsphase der qPCR liegen. Da die einzelnen Proben jeweils zweimal zur PCR-Analyse aufgetragen wurden, erfolgte die Berechnung eines mittleren C_T -wertes ($C_T^{(mean)}$). Nach Berechnung der X_0 -Werte erfolgte die Normierung des X_0 -wertes des zu untersuchenden Gens in einer Probe in Relation zum X_0 -wert eines Referenzgens in der gleichen Probe. Als Referenzgen mit geringer Differenz bezüglich des C_T -wertes zum zu untersuchenden Gen wurde *Kdelr1* (*KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1*) verwendet. Dieses bietet den Vorteil, dass es im iCMAKT1/2-KO und im Wildtyp nicht verändert exprimiert wird (Stefanie Gödecke, persönliche Mitteilung, 2019). Der prozentuale Anteil der Transkriptmenge transgenen Rhebs an der Rheb-Gesamttranskriptmenge in einer Probe wurde durch Dividieren des normierten X_0 -wertes für transgenes Rheb durch den normierten X_0 -wert für die Rheb-Gesamttranskriptmenge bestimmt.

2.14 Untersuchung von Zellfluoreszenz

2.14.1 Vorbereitung der Proben

Zur Untersuchung der Zellfluoreszenz nach Transfektion eines GFP-codierenden Plasmids in HEK293-Zellen wurden diese für 5 Minuten zur Ablösung von der Zellkulturschale mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) behandelt. Anschließend wurde das Trypsin-EDTA über einen 5-minütigen Zentrifugationsschritt wieder entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde in 3,5 ml FACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 2 mmol EDTA) resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation erfolgte die vollständige Resuspension des dabei entstandenen

Zellpellets in 200 µl des FACS-Puffers. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert und konnten für die Zellfluoreszenzanalyse verwendet werden.

2.14.2 Durchflusszytometrie

Die Zellfluoreszenzanalyse erfolgte mittels FACS (*fluorescence-activated cell scanning*), einer speziellen Form der Durchflusszytometrie zur Detektion von Zellen mit Fluoreszenzsignal (Hulett et al., 1969). Dafür wurde ein FACS-Gerät (BD FACSCanto II, BD Bioscience) verwendet. Bei der Durchflusszytometrie passieren die zu untersuchenden Zellen einzeln einen Laserstrahl, wobei abhängig von den Zelleigenschaften unterschiedliche dimensionslose Lichtsignale detektiert werden können. Über das ermittelte Vorwärtstreulicht (FCS, *Forward Scatter*) lassen sich Rückschlüsse auf die Zellgröße ziehen. Das erfasste Seitwärtstreulicht (SSC, *Side Scatter*) dient der Bestimmung der Zellgranularität. Zusätzlich erfolgte eine Fluoreszenzdetektion der Zellen mit Fluoreszenzsignal. In dieser Arbeit wurde das ebenfalls dimensionslose GFP-Signal gemessen. Zur Auswertung wurde das

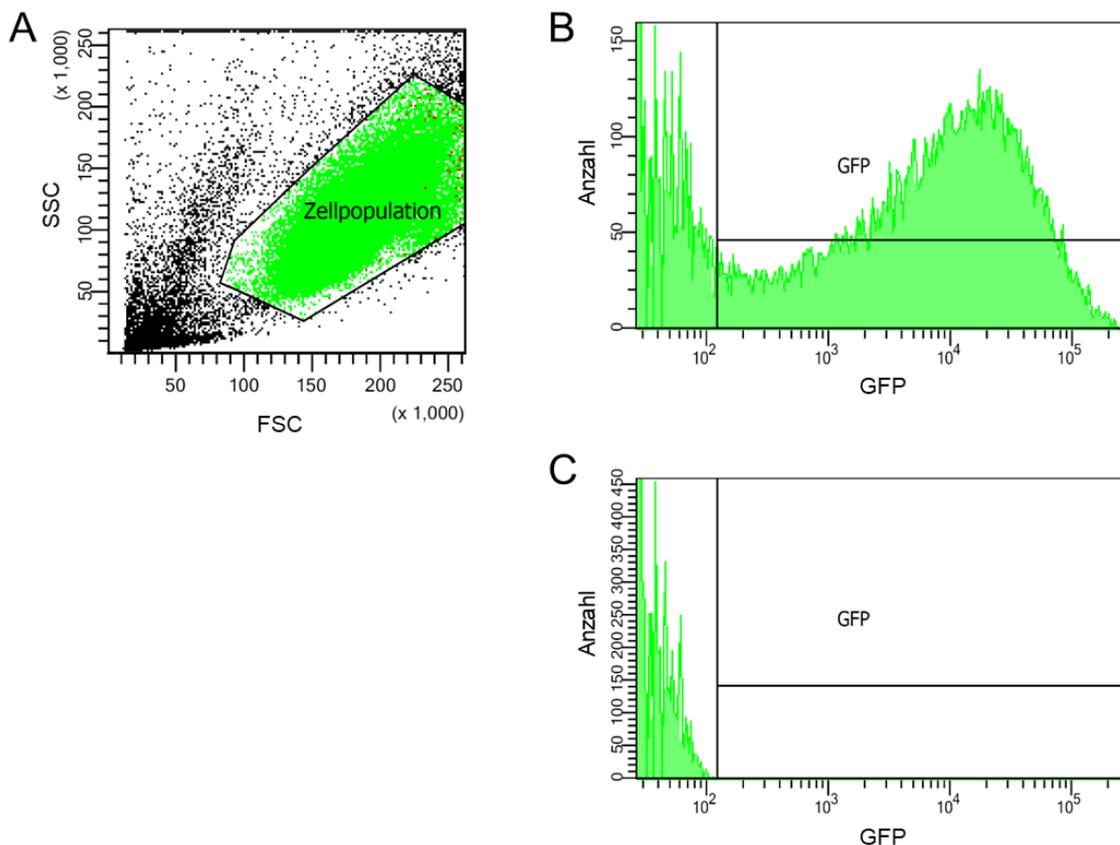


Abb. 13: Definition einer Zellpopulation und exemplarische Darstellung des GFP-Signals in der durchflusszytometrischen Untersuchung.

A: Bei Auswahl der zu untersuchenden Zellpopulation ist das gemessene Signal für das Vorwärtstreulicht (FCS) auf der x-Achse gegen das Signal für das Seitwärtstreulicht (SSC) auf der y-Achse graphisch aufgetragen.

B/C: Auftragung der GFP-Intensität (x-Achse) gegen die Anzahl an Zellen (y-Achse). Exemplarisch abgebildet ist die Messung des GFP-Signals in einer HEK293-Zellpopulation, die mit einem GFP-codierenden Plasmid transfiziert wurde (B). Als Kontrollprobe, in der der Trennwert für die Definition der fluoreszierenden, GFP-enthaltenen Population festgelegt wurde, dienen nicht-transfizierte HEK293-Zellen (C).

Softwareprogramm BD FACSDiva (BD Bioscience) verwendet. Die Festlegung der hinsichtlich des Fluoreszenzsignals zu untersuchenden Zellpopulation erfolgte über die Analyse von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der Zellen (Abb. 13 A). Dadurch konnten Ereignisse mit geringem FCS- und SSC-Signal wie Zelltrümmer, die über eine potenziell erhöhte Autofluoreszenz zu falschen Ergebnissen führen können, aus der Untersuchung ausgeschlossen werden. Ein Trennwert zwischen fluoreszierender und nicht-fluoreszierender Population wurde über die Analyse einer nicht-transfizierten Kontrollprobe bestimmt (Abb. 13 C). Dieser Trennwert dient der Bestimmung des prozentualen Anteils der fluoreszierenden Zellen (Abb. 13 B).

2.14.3 Zellsortierung anhand eines Zellfluoreszenzsignals

Zur Aufreinigung von Zellen, die mit GFP-codierenden Plasmiden transfiziert wurden, erfolgte eine FACS-basierte Zellsortierung entsprechend des zellulären Fluoreszenzsignals (Hulett et al., 1969). Dazu wurden die zu untersuchenden Zellproben wie in Kapitel 2.14.1 beschrieben vorbereitet. Die Durchführung der Zellsortierung erfolgte durch Dr. Priyadarshini Panjwani aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie an einem dafür im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (Core Flow Cytometry Facility, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellten FACS-Gerät mit Zellsortier-Funktion (MoFlo XDP Cell Sorter, Beckman Coulter). Anschließend wurden die selektierten, GFP-positiven Zellen für eine Proteinanalyse entsprechend den Angaben in Kapitel 2.11.4 aufgearbeitet.

2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Zur Untersuchung hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes zwischen zwei Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Bei der echokardiographischen Untersuchung des kardialen Phänotyps im Zeitverlauf in iCMAKT1/2-KO-Mäusen erfolgte für den Vergleich AAV9-infizierter Tiere und nicht-infizierter Kontrolltiere eine 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung (*Two Way Repeated Measures ANOVA*) und anschließendem Šidák Post-Hoc-Test. Es wurde zudem hinsichtlich einer Interaktion im Sinne eines zeitabhängigen Gruppeneffektes untersucht. Die Überlebenszeit (Zeit bis zum Erreichen von Abbruchkriterien, Kapitel 2.10.5) AAV9-infizierter und nicht-infizierter iCMAKT1/2-KO-Tiere wurde über die Bestimmung von modifizierten Kaplan-Meier-Überlebenskurven für beide Gruppen miteinander verglichen. Für die Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Überlebenszeit von AAV9-infizierten Tieren und nicht-infizierten Kontrolltieren wurde ein Logrank (Mantel-Cox)-Test angewandt. Ein Unterschied im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Verfahren wurde für einen Wert $p < 0,05$ als signifikant definiert ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Effektes der transienten Rheb-Expression auf die mTORC1-Aktivität

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, die Bedeutung des mTORC1-Signalweges im iCMAKT1/2-KO in adulten Mäusen zu untersuchen. Zur Stimulation des mTORC1-Signalweges sollten Rheb-codierende Plasmide dienen, die zunächst auf Zellkulturebene untersucht wurden. Um eine Überexpression transgenen Rhebs nachzuweisen und den Effekt einer transienten Rheb-Expression auf die stromabwärts liegenden Zielmoleküle des mTORC1-Signalweges zu untersuchen, wurden die Plasmide „Rheb Wildtyp“ und „Rheb Q64L“ mittels transienter Transfektion in NIH3T3-Zellen und HEK293-Zellen eingebracht. Das Plasmid „Rheb Q64L“ beinhaltet eine konstitutiv aktive Rheb-Expressionskassette. Die Struktur der genannten Plasmide ist in Kapitel 2.9.2 (Tabelle 12) beschrieben und dem Anhang zu entnehmen. Dabei zeigte sich in der Western Blot-Analyse der NIH3T3-Extrakte nach Transfektion mit den genannten Rheb-Plasmiden neben der endogenen Rheb-Bande bei ca. 16 kDa eine deutliche Überexpression von Rheb mit zwei zusätzlichen Rheb-Banden (20 kDa bzw. 23 kDa, Abb. 14 A). Auch in HEK293-Zellen konnte eine Rheb-Überexpression nach Transfektion des Plasmids „Rheb Q64L“ gezeigt werden (Abb. 14 B).

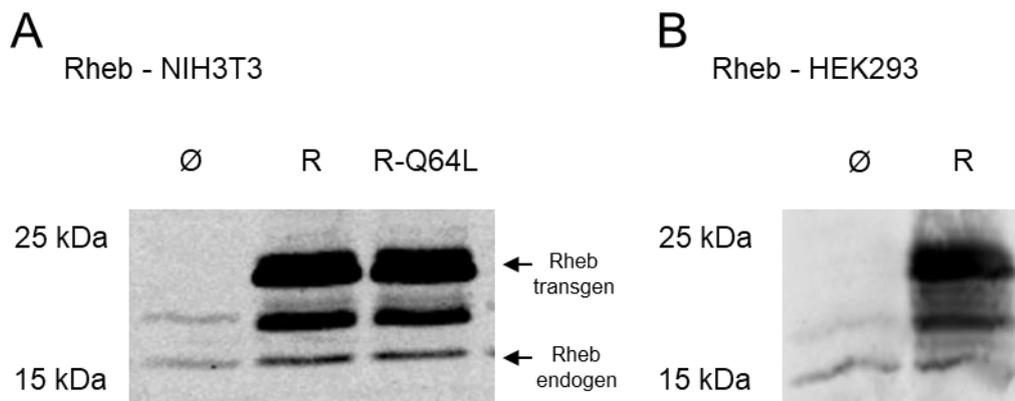


Abb. 14: Western Blot-Analyse der Rheb-Expression nach transienter Transfektion der Plasmide „Rheb Wildtyp“ und „Rheb Q64L“.

A: Rheb-Signal in NIH3T3-Zellen (ca. 16 kDa + 20 kDa + 23 kDa)

B: Rheb-Signal in HEK293-Zellen (ca. 16 kDa + 20 kDa + 23 kDa)

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte NIH3T3-/HEK293-Kontrollprobe; R: Plasmid „Rheb Wildtyp“; R-Q64L: Plasmid „Rheb Q64L“.

Anschließend erfolgte in den transfizierten NIH3T3-Zellen die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der Proteine p70S6K sowie 4EBP1. Dabei konnte in der Western Blot-Analyse eine gesteigerte Threonin-389-Phosphorylierung der p70S6K sowohl für die Transfektion des Plasmids „Rheb Wildtyp“ als auch für die des „Rheb Q64L“ nachgewiesen werden (Abb. 15 A/C). Nach Quantifizierung mittels Gesamtproteinfärbung ergab sich für das transfizierte „Rheb Wildtyp“-Plasmid eine Steigerung der Signalintensität um den Faktor 2,46 im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrollprobe. Für das aktivierte „Rheb Q64L“-Plasmid lag eine Steigerung der

Signalintensität um den Faktor 3,59 vor. Beide Signalunterschiede erwiesen sich in vier unabhängigen Transfektionen im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollproben im ungepaarten t-Test als statistisch signifikant. Auch die Western Blot-Analyse der Threonin-37/46-Phosphorylierung von 4EBP1 zeigte eine Zunahme dieses Signals in den beiden transfizierten Proben im Vergleich zu der nicht-transfizierten Kontrollprobe (Abb. 15 B/D). Wie in der Western Blot-Analyse für Phospho-p70S6K wurde auch hierbei nach Normierung mittels Gesamtproteinanfärbung eine signifikant höhere Signalintensität der Phospho-4EBP1-Bande in der Proteinprobe des transfizierten Plasmids „Rheb Q64L“ (Faktor 2,41) als in der des Plasmids „Rheb Wildtyp“ (Faktor 1,79) festgestellt. Erneut erwiesen sich beide Unterschiede als statistisch signifikant (n = 4). Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass es nach Transfektion der Rheb-codierenden Plasmide zu einer Überexpression transgenen Rhebs kommt und dass insbesondere das Einbringen der Rheb Q64L-Variante zu einer verstärkten Phosphorylierung von im mTORC1-Signalweg stromabwärts von Rheb liegenden Proteinen führt. Diese Befunde sprechen dafür, dass durch die Überexpression beider Rheb-Varianten eine mTORC1-Aktivierung erfolgte.

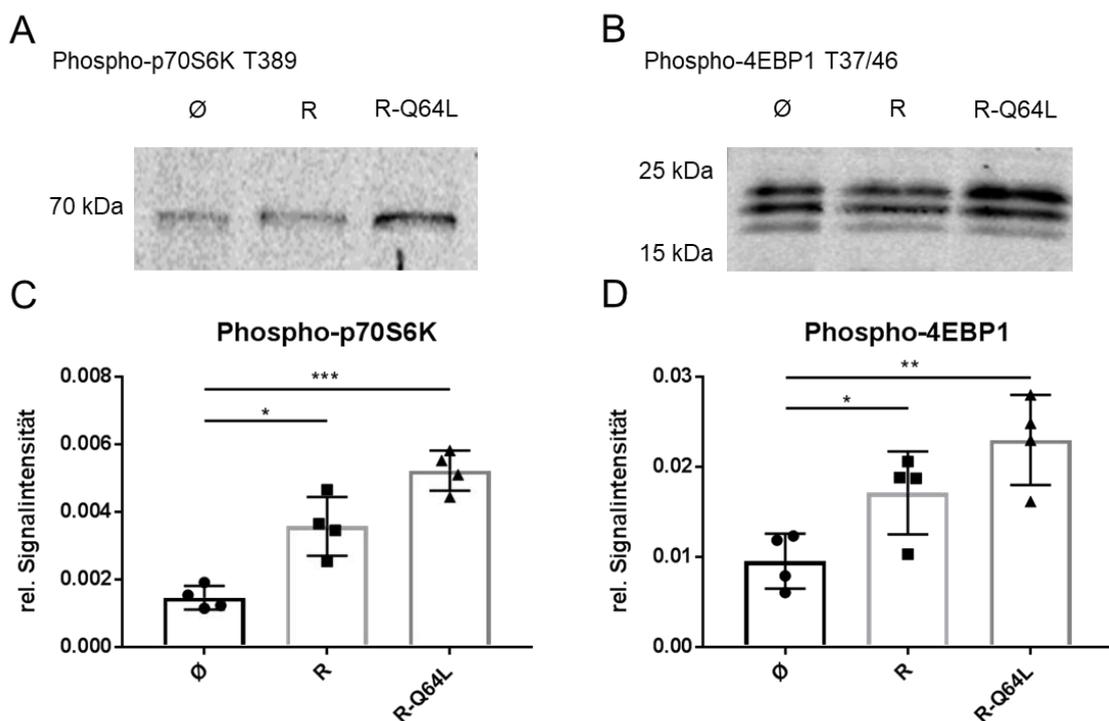


Abb. 15: Western Blot-Analyse des Phosphorylierungsstatus von p70S6K und 4EBP1 nach transienter Transfektion der Plasmide „Rheb Wildtyp“ und „Rheb Q64L“ in NIH3T3-Zellen (n = 4). Statistisch signifikante Unterschiede werden abgebildet für: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ungepaarter t-Test).

A: Phospho-T389-p70S6K-Signal (ca. 70 kDa)

B: Phospho-T37/46-4EBP1-Signal (ca. 16-23 kDa)

C/D: Quantifizierung der jeweiligen Signale nach Gesamtproteinanfärbung. Dazu wurden die Ergebnisse der Western Blot-Analysen von je vier identischen Plasmid-Transfektionen gemittelt.

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte NIH3T3-Kontrollprobe; R: Plasmid „Rheb Wildtyp“; R-Q64L: Plasmid „Rheb Q64L“

3.2 Untersuchung eines Plasmids mit AAV9-Hintergrund zur induzierbaren Rheb Q64L-Expression

Aufgrund der in Kapitel 3.1 nachgewiesenen Zunahme des Phosphorylierungsstatus von Zielmolekülen des mTORC1-Signalweges durch Rheb-Überexpression wurde im Anschluss ein geeignetes Plasmid zur Erzeugung viraler AAV9-Partikel für die Expression in adulten Mäusen erstellt. Das dafür hergestellte Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ (Kapitel 2.9.2: Tabelle 12, Abb. 7) enthält ein mit loxP-Sequenzen flankiertes GFP-Gen, das ein Rheb Q64L-Gen von dem dazugehörigen CMV-Promotor trennt und so eine induzierbare Rheb Q64L-Expression ermöglichen soll. In der Theorie kommt es nach Expression einer Cre-Rekombinase zur Exzision des GFP-Gens inklusive einer loxP-Sequenz. Der CMV-Promotor kommt so vor dem Rheb Q64L-Gen zu liegen und fördert dann die Expression des Rheb Q64L-Gens (Abb. 16). Der Vorteil einer induzierbaren Expression des Rheb-Gens besteht darin, dass bei Anwendung in adulten Mäusen der Zeitpunkt der Expression des Transgens gezielt gesteuert werden könnten. Außerdem könnte eine kardiomyozytenspezifische Transgenexpression erreicht werden.

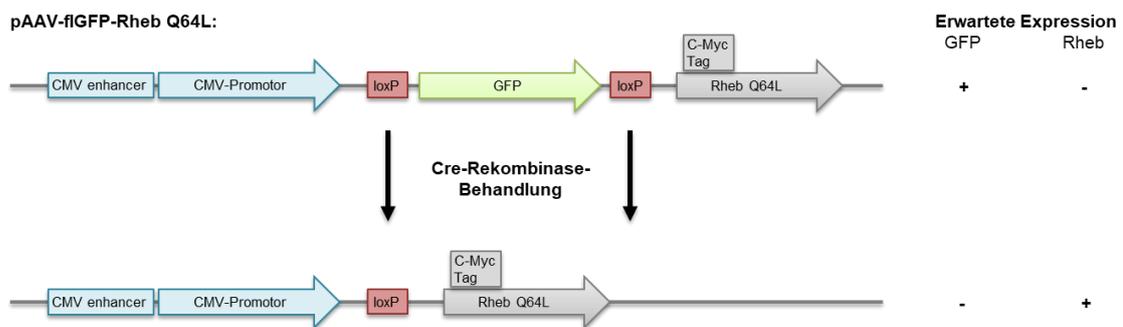


Abb. 16: Cre-vermittelte Exzision der GFP-Expressions-kassette und Aktivierung der Rheb-Expression. Zum besseren Verständnis des in diesem Telexperiment untersuchten Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ sind dessen Strukturen innerhalb der AAV2 ITR-Sequenzen noch einmal dargestellt. Zudem ist der Schritt der Behandlung des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ mit einer Cre-Rekombinase veranschaulicht. Eine ausführliche Beschreibung aller dargestellten Strukturen und Abkürzungen erfolgt in Kapitel 2.9.2.

3.2.1 Charakterisierung des erzeugten Plasmids

In einem ersten Schritt wurde die Funktionalität des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ im Sinne einer korrekten Exzision des GFP-Gens nach Expression einer Cre-Rekombinase sowie der daraufhin folgenden Expression des Rheb-Gens in der Zellkultur untersucht. Dazu wurde das Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ mittels transienter Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. Es erfolgte eine Doppeltransfektion entweder mit dem Plasmid „PKG-Cre“ zur Expression einer Cre-Rekombinase in den HEK293-Zellen oder mit dem Plasmid „DS-Red“ als Kontrolle zur Transfektion vergleichbarer Mengen an Plasmid-DNA (Kapitel 2.9.5: Tabelle 15). Zunächst wurde in einer durchflusszytometrischen Untersuchung das GFP-Signal beider Proben analysiert (Abb. 17).

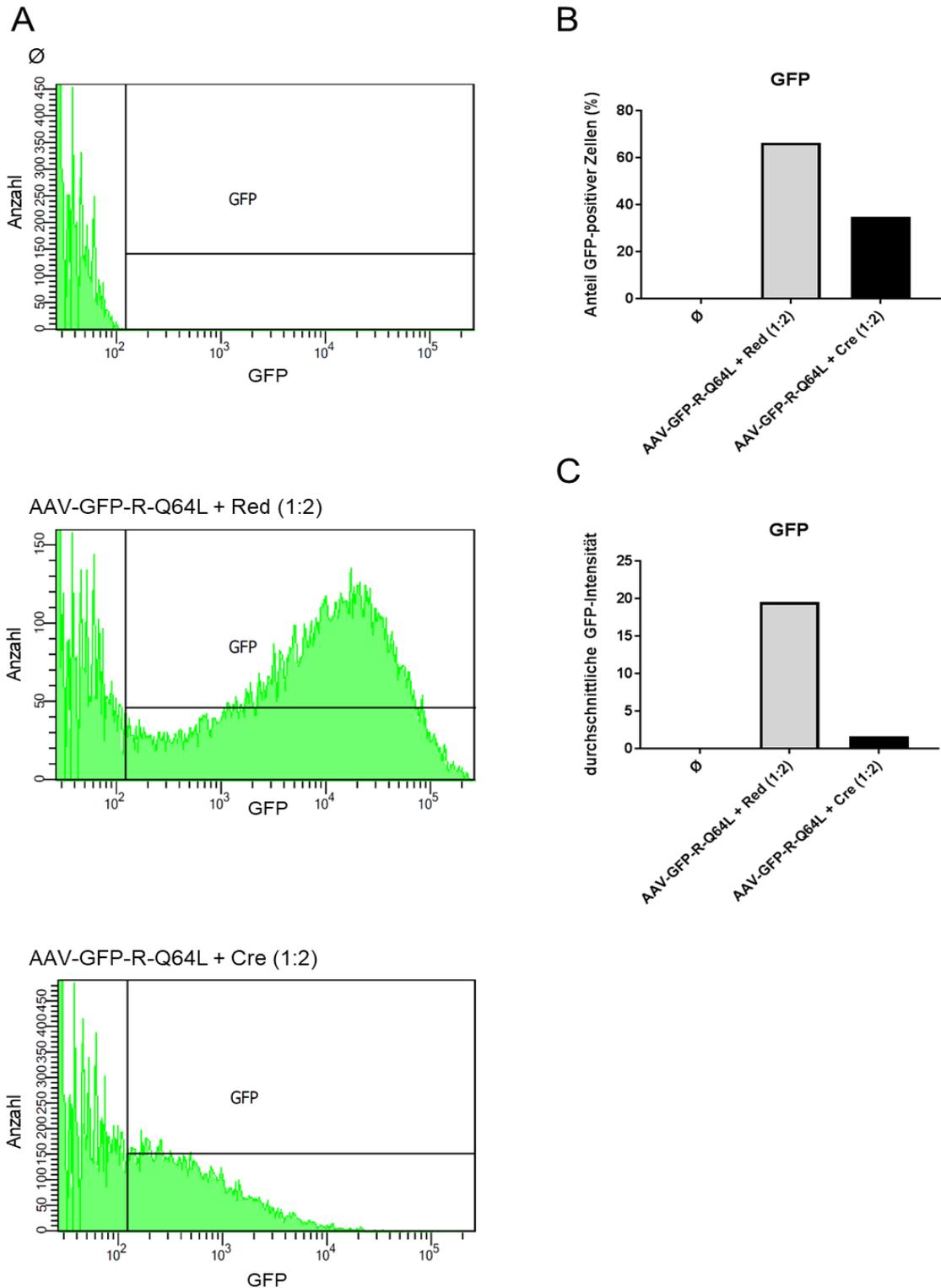


Abb. 17: Durchflusszytometrische Untersuchung des GFP-Signals nach Plasmid-Transfektion in HEK293-Zellen (n = 1).

A: Histogramme der FACS-Analysen der Zellpopulationen

B: prozentualer Anteil der detektierten GFP-positiven Zellen an der Gesamtanzahl aller Zellen

C: durchschnittlich pro Zelle gemessene, dimensionslose GFP-Intensität

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; AAV-GFP-R-Q64L + Red (1:2): Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“ im Verhältnis 1:2; AAV-GFP-R-Q64L + Cre (1:2): Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“ im Verhältnis 1:2.

Dabei zeigte sich ein deutlich verstärktes GFP-Signal in den mit dem Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und dem Kontrollvektor „DS-Red“ bzw. „PGK-Cre“ doppeltransfizierten Proben im Vergleich zur Kontrolle aus nicht-transfizierten HEK293-Zellen, die keine Plasmid-Transfektion erhielt (Abb. 17 A). Bei dem in der nicht-transfizierten Kontrollprobe detektierten Fluoreszenzsignal handelt es sich vermutlich um Autofluoreszenz. Im Vergleich der beiden doppeltransfizierten Proben untereinander wurde deutlich, dass in der Probe mit Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“ die GFP-Signalintensität geringer war als bei Doppeltransfektion mit dem Plasmid „DS-Red“. Im Vergleich zeigte die durchflusszytometrische Messung für die Probe mit zusätzlich transfiziertem „PGK-Cre“-Plasmid sowohl einen verminderten prozentualen Anteil an GFP-positiven Zellen (Abb. 17 B) an der Gesamtzahl aller untersuchten Zellen als auch eine geringere durchschnittliche GFP-Intensität pro Einzelzelle (Abb. 17 C) als die Probe mit Transfektion des Plasmids „DS-Red“.

In der anschließenden Western Blot-Analyse wurde die Expression in HEK293-Zellen nach erfolgter Transfektion untersucht (Abb. 18). Zunächst wurde dabei das GFP-Signal in den verschiedenen Proben analysiert (Abb. 18 A/B). Es zeigte sich wie bereits in der durchflusszytometrischen Untersuchung eine GFP-Expression in den doppeltransfizierten Proben, in der nicht-transfizierten Kontrollprobe konnte keine GFP-Expression nachgewiesen werden. Auch war ein stärkeres GFP-Signal in den Proben zu verzeichnen, die zusätzlich mit dem Plasmid „DS-Red“ transfiziert wurden, als in den Proben mit zusätzlicher Transfektion des Plasmids „PGK-Cre“. Die Ergebnisse dieser Western Blot-Analyse der GFP-Expression in den transfizierten HEK293-Zellen stimmte somit mit denen der durchflusszytometrischen Untersuchung überein.

Anschließend wurde die Rheb-Expression untersucht (Abb. 18 C). Eine endogene Rheb-Bande bei ca. 16 kDa konnte in allen Proben nachgewiesen werden. In der mit den Plasmiden „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“ doppeltransfizierten Probe wurde nur ein schwaches transgenes Rheb-Signal (ca. 23 kDa) exprimiert. Weiterhin wurde deutlich, dass auch in den Proben, die mit den Plasmiden „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“ doppeltransfiziert wurden, ein transgenes Rheb-Signal zu detektieren war. Für das Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ war dies so nicht zu erwarten, da bei der Doppeltransfektion mit „DS-Red“ keine Cre-Rekombinase vorhanden ist, die die Exzision des GFP-Gens und dadurch die Lokalisation des CMV-Promotors vor dem Rheb Q64L-Gen auslösen kann. Die nicht-transfizierte Kontrollprobe zeigte hingegen keine transgene Rheb-Bande. Bei der Untersuchung der Threonin-389-Phosphorylierung der stromabwärts von Rheb liegenden p70S6K wurde kein Unterschied zwischen den mit „DS-Red“ und „PGK-Cre“ doppeltransfizierten Proben nachgewiesen (Abb. 18 D/E). Außerdem zeigte die nicht-transfizierte Kontrollprobe eine höhere Signalintensität als die transfizierten Proben (Abb. 18 E).

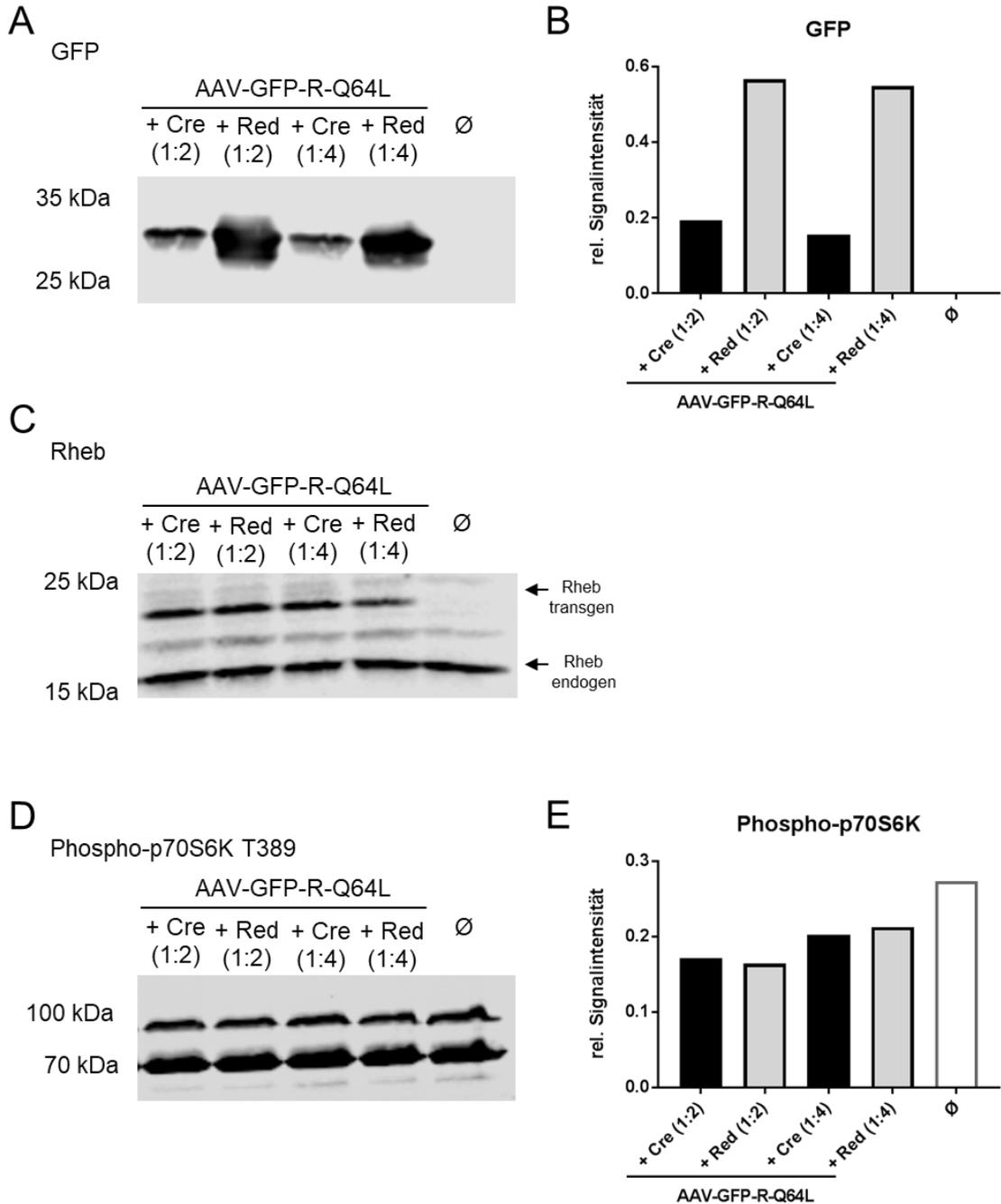


Abb. 18: Western Blot-Analyse der GFP- und Rheb-Expression sowie des Phospho-p70S6K-Signals nach Plasmid-Transfektion in HEK293-Zellen (n = 1). Die Doppeltransfektion der Plasmide erfolgte in einem Verhältnis von 1:2 bzw. 1:4.

A: GFP-Signal (ca. 27 kDa)

B: Quantifizierung des GFP-Signals nach Gesamtproteinanfärbung

C: Rheb-Signale (ca. 16 kDa bzw. ca. 23 kDa)

D: Phospho-T389-p70S6K-Signal (ca. 70 kDa)

E: Quantifizierung des Phospho-T389-p70S6K-Signals nach Gesamtproteinanfärbung

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; AAV-GFP-R-Q64L + Cre: Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“; AAV-GFP-R-Q64L + Red: Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“.

Insgesamt ließ sich somit festhalten, dass die Transfektion des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ zwar zur Expression eines GFP-Signals und zur Reduktion dieses GFP-Signals bei Koexpression einer Cre-Rekombinase führt. Jedoch kam es nicht zu der

erwarteten starken Zunahme der transgenen Rheb-Expression. Auch konnte ein transgenes Rheb-Signal ohne zusätzlich vorhandene Cre-Rekombinase detektiert werden.

3.2.2 In vitro Cre-Exzision einer GFP-Expressions-kassette

Aufgrund der in Kapitel 3.2.1 gewonnenen Erkenntnisse sollte untersucht werden, ob die Rekombination an sich der Grund für die ausbleibende Zunahme der Rheb-Expression nach Aktivierung der Cre-Rekombinase ist. Dazu sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass die loxP-Sequenz, die nach Exzision der GFP-Kassette durch die Cre-Rekombinase zwischen CMV-Promotor und Rheb Q64L-Gen verbleibt (Kapitel 3.2, Abb. 16), die Expression des Rheb Q64L-Gens behindert und somit die Ursache für die ausbleibende Zunahme der Expression transgenen Rhebs im vorherigen Experiment darstellt. Zur Überprüfung wurde das Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ in vitro mit einer Cre-Rekombinase behandelt, sodass bereits vor Transfektion des Plasmids in Zellen das mit loxP-Sequenzen flankierte GFP-Gen aus dem Plasmid ausgeschnitten wurde. Das so entstandene Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ (Abb. 19 A; Kapitel 2.9.2: Tabelle 12, Abb. 7) enthielt somit nur noch eine nach der GFP-Exzision übrigbleibende loxP-Sequenz zwischen dem CMV-Promotor und dem Rheb Q64L-Gen. Dieses Plasmid wurde mittels transienter Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht und die Zellen anschließend in einer Western Blot-Analyse auf Rheb- und Phospho-p70S6K-Signale hin untersucht (Abb. 19). Zusätzlich wurde in der Western Blot-Analyse die bereits in Kapitel 3.1 verwendete Probe einer transienten Transfektion des Plasmids „Rheb Q64L“ in HEK293-Zellen analysiert. Aus den Ergebnissen in Kapitel 3.1 war bereits bekannt, dass die Transfektion dieses Plasmids zu einer deutlichen Expression transgenen Rhebs führt. Auch die Proben der Doppeltransfektion des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ mit „PGK-Cre“ bzw. „DS-Red“ aus Kapitel 3.2.1 wurden zum Vergleich mit analysiert.

Dabei zeigte die mit dem Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ transfizierte Probe im Vergleich zur nicht-transfizierten Probe und zu den Proben der Doppeltransfektion aus Kapitel 3.2.1 ein deutlich stärkeres transgenes Rheb-Signal (ca. 23 kDa, Abb. 19 B/C). Dieses Signal war hinsichtlich der Intensität ungefähr mit der des transfizierten Plasmids „Rheb Q64L“ vergleichbar, weshalb nicht von einer Beeinflussung der Expression des Rheb Q64L-Gens durch die loxP-Sequenz auszugehen war. Auch bei der Analyse des Threonin-389-Phosphorylierungsstatus der p70S6K konnte eine im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrollprobe und den doppeltransfizierten Proben aus Kapitel 3.2.1 verstärkte Phosphorylierung in der Probe des transfizierten Plasmids „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ nachgewiesen werden (Abb. 19 D/E). Hierbei fiel diese ebenfalls ähnlich stark aus wie die Phospho-p70S6K-Phosphorylierung der Probe des transfizierten Plasmids „Rheb Q64L“. Zusammenfassend konnte nach Transfektion des in vitro mit einer Cre-Rekombinase behandelten Plasmids „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ sowohl eine Steigerung der Rheb-Aktivität als auch eine verstärkte Phosphorylierung des Proteins p70S6K festgestellt werden. Somit stellte die im Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ verbliebene

loxP-Sequenz vermutlich nicht die Ursache für fehlende vermehrte Rheb-Expression nach GFP-Exzision im Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ dar.

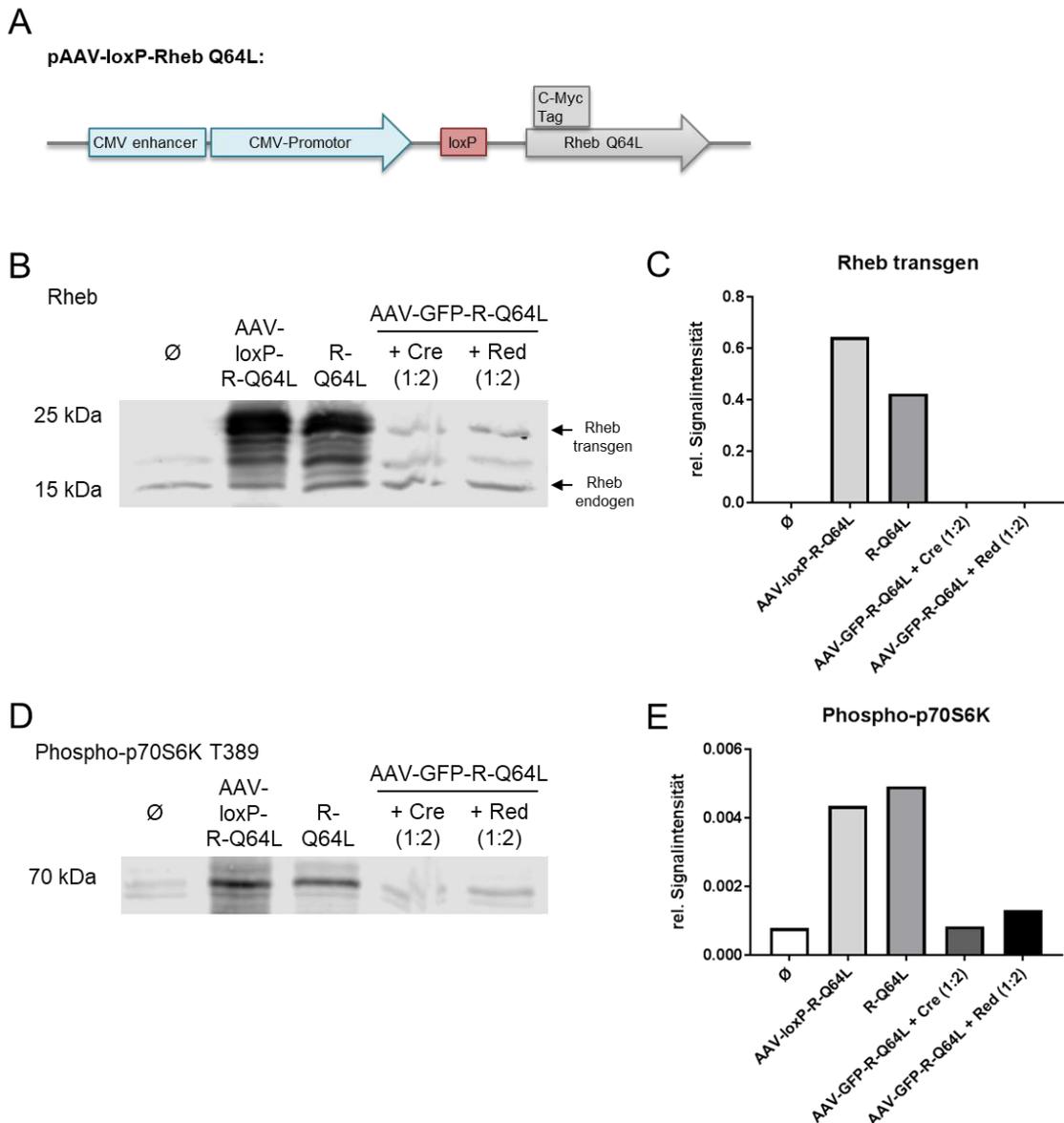


Abb. 19: Western Blot-Analyse der Rheb-Expression und des Phospho-p70S6K-Signals nach Plasmid-Transfektion in HEK293-Zellen (n = 1).

A: Strukturen des Plasmids „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ innerhalb der AAV2 ITR-Sequenzen. Eine ausführliche Beschreibung der dargestellten Strukturen und Abkürzungen erfolgt in Kapitel 2.9.2.

B: Rheb-Signale (ca. 16 kDa bzw. 23 kDa)

C: Quantifizierung des transgenen Rheb-Signals nach Gesamtproteinfärbung

D: Phospho-T389-p70S6K-Signal (ca. 70 kDa)

E: Quantifizierung des Threonin-389-Phosphorylierungsstatus nach Gesamtproteinfärbung

Abkürzungen: ∅: nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; AAV-loxP-R-Q64L: Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“; R-Q64L: Plasmid „Rheb Q64L“; AAV-GFP-R-Q64L + Cre (1:2): Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“ im Verhältnis 1:2; AAV-GFP-R-Q64L + Red (1:2): Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“ im Verhältnis 1:2.

3.2.3 Untersuchung einer Rheb Q64L-Mutante zur AAV9-Erzeugung

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2 zeigten zwar, dass die im Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ verbliebene loxP-Sequenz zwischen CMV-Promotor und Rheb Q64L-Gen die

Expression von transgenem Rheb vermutlich nicht beeinflusst. Jedoch blieb unklar, ob die im Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ zwischen CMV-Promotor und Rheb Q64L-Gen verbliebene loxP-Sequenz zu einer Rekombination zwischen mehreren Einzelmolekülen führt, wenn die Plasmide in Cre-Rekombinase-exprimierende Zellen eingeschleust werden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die im Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ nach Cre-Exzision des GFP-Gens verbliebene loxP-Sequenz entfernt, sodass nun das Rheb Q64L-Gen direkt hinter dem CMV-Promotor liegt. Das so entstandene Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ (Kapitel 2.9.2: Tabelle 12, Abb. 7) führt in der Theorie direkt nach Transfektion bzw. im Tiermodell nach Infektion durch virale AAV9-Partikel zu einer Expression von Rheb Q64L. In einem weiteren Zellkulturexperiment sollte untersucht werden, ob durch Transfektion des neu erstellten Plasmids „pAAV Rheb Q64L“ eine ähnlich starke Expression transgenen Rhebs erzielt werden kann wie durch Transfektion des Plasmids „pAAV-loxP-Rheb Q64L“. Dazu erfolgte eine transiente Transfektion der beiden Plasmide in HEK293-Zellen, um die Transgenexpression direkt vergleichen zu können. Zusätzlich sollte die Interaktion der im „pAAV-loxP-Rheb Q64L“-Plasmid enthaltenen loxP-Sequenz mit einer in vivo exprimierten Cre-Rekombinase näher untersucht werden. Daher erfolgte eine Doppeltransfektion des Plasmids „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ mit den Plasmiden „PGK-Cre“ oder „DS-Red“, wobei letzteres lediglich als Kontrolle transfiziert wurde, um bei den Doppeltransfektionen insgesamt eine vergleichbare Menge an Plasmid-DNA zu transfizieren. Zur Vergleichbarkeit wurde auch das Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ mit dem Plasmid „DS-Red“ doppeltransfiziert.

In der anschließenden Western Blot-Analyse der Rheb-Expression wurde eine zusätzliche transgene Rheb-Bande (ca. 23 kDa) sowohl nach Transfektion mit dem

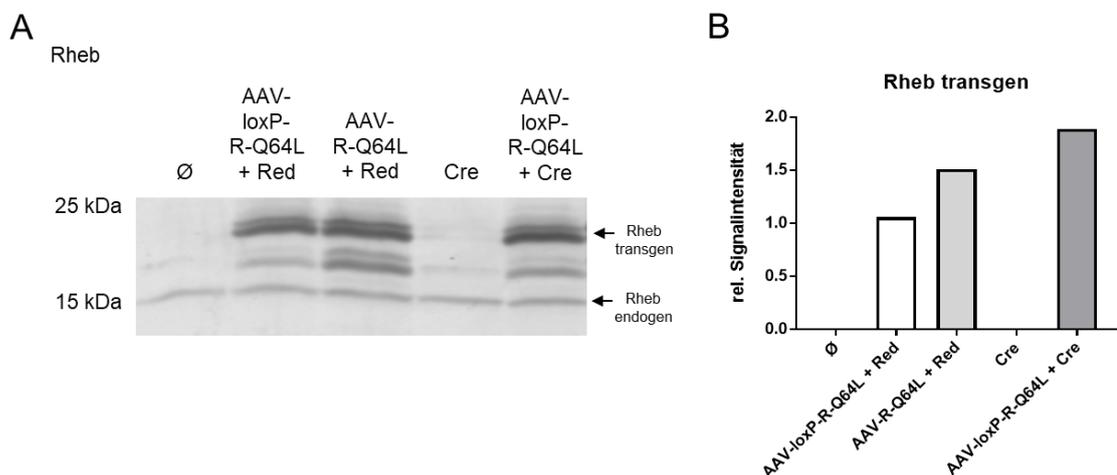


Abb. 20: Western Blot-Analyse der Rheb-Expression nach Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ bzw. „pAAV-Rheb Q64L“ zusammen mit den Plasmiden „PGK-Cre“ oder „DS-Red“ in HEK293-Zellen (n = 1).

A: Rheb-Signale (ca. 16 kDa bzw. 23 kDa)

B: Quantifizierung des transgenen Rheb-Signals nach Gesamtproteinanfärbung

Abkürzungen: ∅: nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; Cre: Plasmid „PGK-Cre“; AAV-loxP-R-Q64L + Red: Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“; AAV-loxP-R-Q64L + Cre: Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“; AAV-R-Q64L + Red: Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-Rheb Q64L“ und „DS-Red“

Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ als auch mit dem Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ nachgewiesen (Abb. 20 A/B). In einer nicht-transfizierten Kontrollprobe sowie der Probe, in der eine Einzeltransfektion des Plasmids „PGK-Cre“ erfolgte, war hingegen keine transgene Rheb-Bande zu detektieren. Zudem war die Expression transgenen Rhebs durch das Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ in der Doppeltransfektion mit dem „PGK-Cre“-Plasmid im Vergleich zur Doppeltransfektion mit dem „DS-Red“-Plasmid nicht vermindert. Somit war nicht von einer Interaktion zwischen loxP-Sequenz und Cre-Rekombinase auszugehen, die zu einer verminderten Rheb-Expression führt. Insgesamt zeigte sich eine mindestens ähnlich starke Expression transgenen Rhebs durch das neu konstruierte Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ wie durch das Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“, sodass auf Grundlage des Plasmids „pAAV-Rheb Q64L“ virale AAV9-Partikel für die anschließende in vivo-Untersuchung produziert werden konnten.

3.3 Bestimmung der Effizienz einer panFOXO shRNA

Um die Bedeutung der FOXO-Transkriptionsfaktoren im Rahmen des iCMAKT1/2-KOs zu untersuchen, sollte die FOXO-Proteinmenge durch Expression einer panFOXO shRNA reduziert werden. Zunächst war es notwendig, die Wirksamkeit der panFOXO shRNA bezüglich der Reduktion der FOXO-Menge auf Zellkulturebene zu prüfen. Dazu erfolgte eine transiente Transfektion verschiedener Plasmide in HEK293-Zellen. Die von der panFOXO shRNA „erkannte“ FOXO3A-Sequenz ist in humanen HEK293-Zellen identisch mit der murinen FOXO3A-Sequenz. Die Strukturen der folgend genannten Plasmide sind in Kapitel 2.9.3 (Tabelle 13, Abb. 9) dargestellt. Zum einen erfolgte die Transfektion des Plasmids „pSicoR-hU6“ als Kontrolle, da dieses keine shRNA exprimiert. Weiterhin wurden die Plasmide „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“ sowie „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ transfiziert. Beide Plasmide unterscheiden sich bezüglich des U6-Promotors, wobei das Plasmid „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“ einen humanen U6-Promotor enthält, das Plasmid „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ hingegen einen murinen U6-Promotor. Außerdem beinhalten alle Plasmide ein GFP-Gen unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Drei Tage nach der Transfektion erfolgte eine Selektion transfizierter Zellen mittels FACS-basierter Zellsortierung. Dabei wiesen die erfolgreich transfizierten Zellen durch Expression des GFP-Gens ein Fluoreszenzsignal auf und konnten dadurch isoliert werden. Diese Zellpopulation wurde anschließend in einer Western Blot-Analyse der Expression von GFP und FOXO3A untersucht (Abb. 21). Dabei erfolgte der Vergleich zu nicht-transfizierten HEK293-Zellen. Es zeigte sich ein GFP-Signal in den Plasmid-transfizierten Proben, nicht jedoch in der Probe mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Abb. 21 A/B). In der „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“-transfizierten Probe konnte eine Reduktion der FOXO3A-Expression um 47,0 % nachgewiesen werden. (Abb. 21 C/D) In der „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“-transfizierten Probe wurde die FOXO3A-Expression um 65,8 % reduziert. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die Expression eines panFOXO shRNA-codierenden Plasmids in transfizierten Zellen zu einer Reduktion der FOXO3A-Expression von 47,0-65,8 % führt. Da bei der Expression einer panFOXO shRNA mittels AAV9-Infektion in adulten Mäusen jedoch nicht von einer hundertprozentigen Infektionseffizienz der

Kardiomyozyten auszugehen ist, schien die hier beobachtete FOXO3A-Reduktion nicht ausreichend effizient zu sein, um einen Effekt im murinen Modell zu erzielen. Daher wurde anschließend auf die Erzeugung viraler AAV9-Partikel auf Grundlage des Plasmids „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ verzichtet.

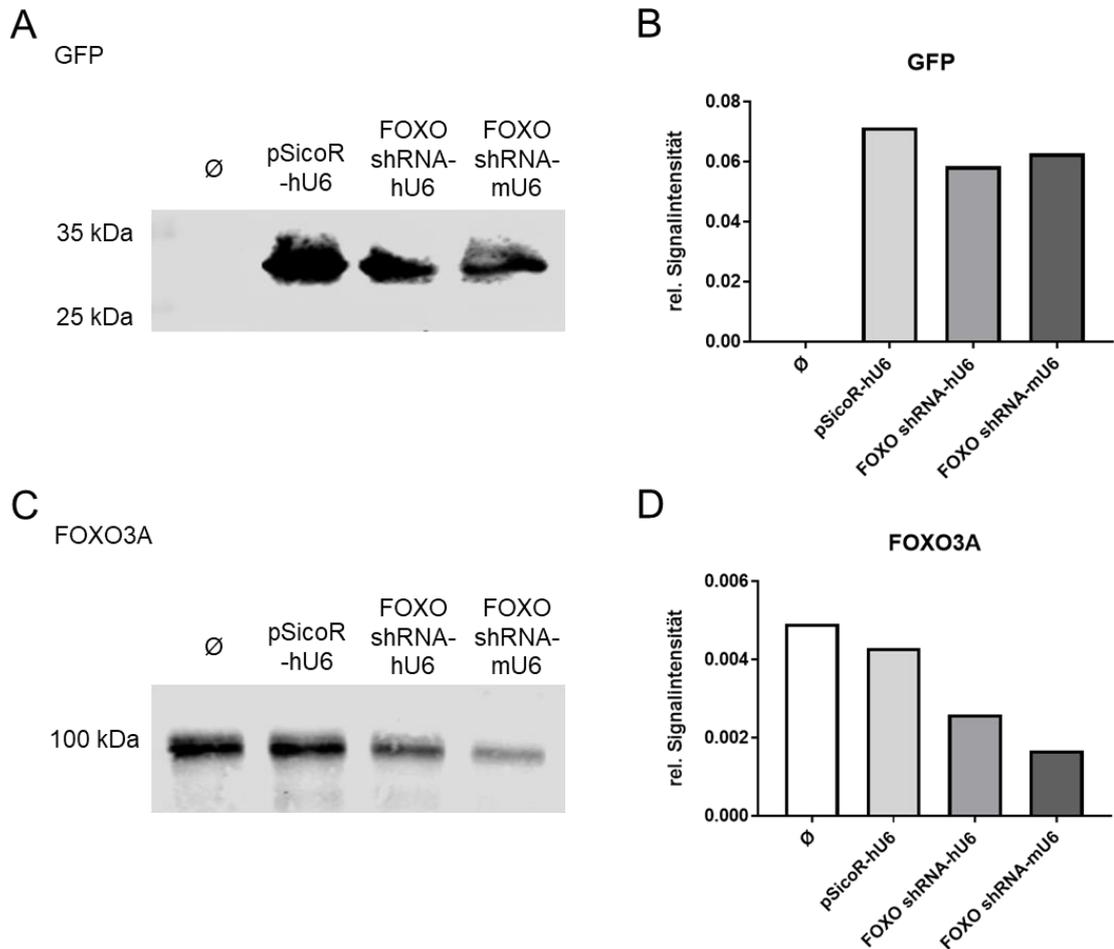


Abb. 21: Western Blot-Analyse der GFP-Expression sowie des FOXO3A-Signals nach Plasmid-Transfektion in HEK293-Zellen mit anschließender FACS-basierter Zellsortierung (n = 1).

A: GFP-Signal (ca. 27 kDa)

B: Quantifizierung des GFP-Signals nach Gesamtproteinfärbung

C: FOXO3A-Signal (ca. 97 kDa)

D: Quantifizierung des FOXO3A-Signals nach Gesamtproteinfärbung

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; pSicoR-hU6: Plasmid „pSicoR-hU6“; FOXO shRNA-hU6: Plasmid „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“; FOXO shRNA-mU6: Plasmid „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“

3.4 Charakterisierung einer AMPK- α 2-S491A-Mutante

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle der AMPK nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs in adulten Mäusen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst AMPK- α 2-codierende Plasmide auf Zellkulturebene getestet. Das Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ sollte die Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante ermöglichen, da eine Phosphorylierung an der Aminosäure Serin an Stelle 491 nicht mehr erfolgen kann. Zum Vergleich diente das Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“, das

zur Expression einer wildtypischen AMPK- α 2-Variante führt. Die Struktur beider Plasmide ist in Kapitel 2.9.4 (Tabelle 14, Abb. 10) dargestellt. Es war von Interesse, ob die Plasmide tatsächlich zu einer Überexpression transgener AMPK- α 2 führen und ob die AMPK- α 2-S491A-Variante tatsächlich nicht-inaktivierbar ist. Dies wurde über die Expression der AMPK- α -Gesamtmenge sowie den Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Serin 485/491 analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob die transgene AMPK- α 2 aktiv ist. Der Aktivierungsstatus der transgenen AMPK- α 2 wurde über die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 172 untersucht. Es erfolgte die transiente Transfektion der Plasmide in HEK293-Zellen. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte HEK293-Zellen. In der anschließenden Western Blot-Analyse war eine deutliche Überexpression beider AMPK- α 2-Varianten zu verzeichnen (Abb. 22 A/B). Weiterhin wurde sowohl in der mit dem „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“-Plasmid transfizierten als auch in der mit dem „pAAV-AMPK- α 2 S491A“-Plasmid transfizierten Probe eine ähnlich stark vermehrte Threonin-172-Phosphorylierung der AMPK- α nachgewiesen (Abb. 22 A/23 A). Das Phospho-Serin-485/491-Signal der AMPK- α war in der mit dem Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“ transfizierten Probe am stärksten (Abb. 22 B/23 B). Das Phospho-AMPK- α -Serin-485/491-Signal der „pAAV-AMPK- α 2 S491A“-transfizierten Probe war hingegen mit der der nicht-transfizierten HEK293-Kontrollprobe vergleichbar. Insgesamt ließ sich somit festhalten, dass über die Transfektion AMPK- α 2-codierender Plasmide eine Überexpression von aktiver, Threonin-172-phosphorylierbarer AMPK- α in HEK293-Zellen erreicht werden konnte. Weiterhin konnte anhand der unveränderten inhibitorischen Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α gezeigt werden, dass bei Transfektion des Plasmids „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ eine nicht-inaktivierbare AMPK- α 2-Variante exprimiert wird.

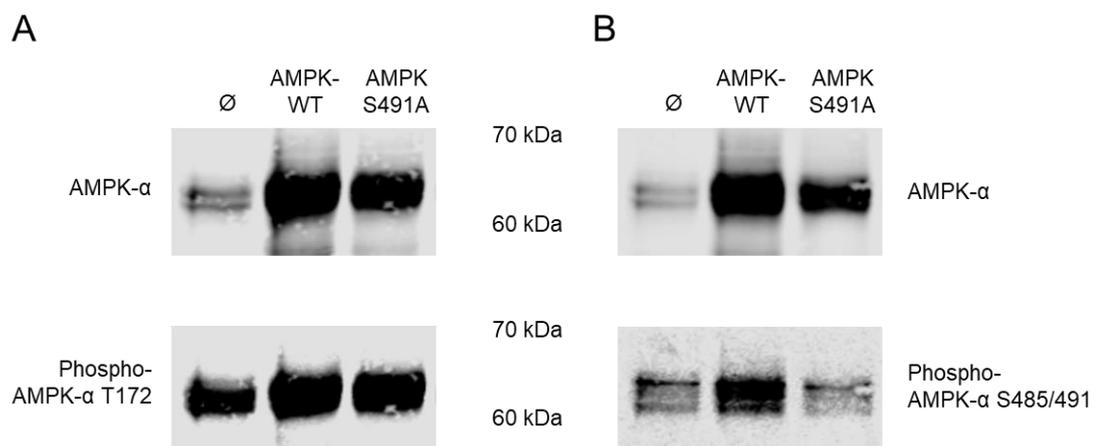


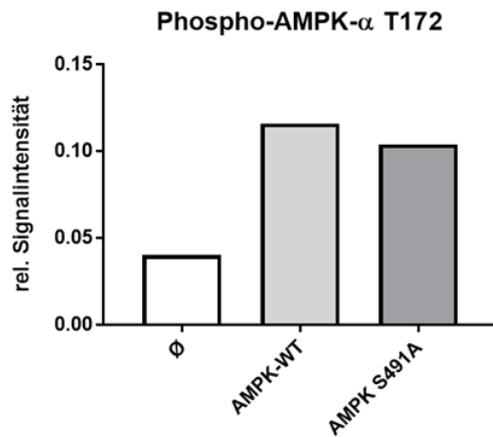
Abb. 22: Western Blot-Analyse der AMPK- α -, Phospho-AMPK- α T172- und Phospho-AMPK- α S485/491-Signale nach Transfektion der Plasmide „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“ und „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ in HEK293-Zellen. Alle verwendeten Antikörper stellen eine Signalbande bei ca. 62 kDa dar.

A: AMPK- α -Gesamt signal (AMPK- α) und Phosphorylierungsstatus der AMPK- α -Aminosäure Threonin 172 (Phospho-AMPK- α T172)

B: AMPK- α -Gesamt signal (AMPK- α) und Phosphorylierungsstatus der AMPK- α -Aminosäure Serin 485/491 (Phospho-AMPK- α S485/491)

Abkürzungen: \emptyset : nicht-transfizierte HEK293-Kontrollprobe; AMPK-WT: Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“; AMPK S491A: Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 S491A“

A



B

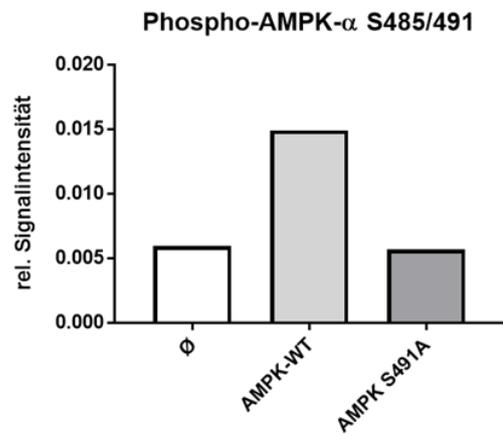


Abb. 23: Quantifizierung der Western Blot-Analyse der Expression von Threonin-172-phosphorylierter und Serin-491-phosphorylierter AMPK- α (n = 1).

A: Quantifizierung des Threonin-172-Phosphorylierungsstatus (Phospho-AMPK- α T172) der AMPK- α nach Gesamtproteinanfärbung

B: Quantifizierung des Serin-485/491-Phosphorylierungsstatus (Phospho-AMPK- α S485/491) der AMPK- α nach Gesamtproteinanfärbung

Abkürzungen: Ø: nicht-transfizierte HEK293-Wildtypprobe; AMPK-WT: Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 Wildtyp“; AMPK S491A: Plasmid „pAAV-AMPK- α 2 S491A“

3.5 In vivo-Expression von Rheb im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell

Wie in Kapitel 3.2.3 gezeigt wurde, führte die Transfektion des Plasmids „pAAV-Rheb Q64L“ zur Expression transgenen Rhebs, sodass auf Grundlage dieses Plasmids virale AAV9-Partikel durch die Firma Vector Biolabs (Malvern, Pennsylvania, USA) produziert wurden. Diese dienten zur Untersuchung des Einflusses einer Rheb-Expression zur mTORC1-Aktivierung auf den kardialen Phänotyp und das Überleben im iCMAKT1/2-KO-Modell. Dazu wurden 7-8 Wochen alte männliche iCMAKT1/2-KO-Mäuse verwendet, wobei $n = 10$ Tiere per Schwanzveneninjektion mit $1 \cdot 10^{12}$ Viruspartikeln der Rheb Q64L-AAV9 infiziert wurden. Als Kontrollgruppe dienten $n = 9$ nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere. Ca. 4 Wochen nach AAV9-Infektion erfolgte der Beginn der Tamoxifeninjektionen zur Induktion des iCMAKT1/2-KOs in den Rheb Q64L-infizierten Tieren und der Kontrollgruppe.

3.5.1 Untersuchung des Einflusses der Rheb-Expression auf die Herzfunktion

Die kardiale Funktion der Rheb Q64L-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäuse wurde im Zeitverlauf im Vergleich zur nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Kontrollgruppe mittels echokardiographischer Untersuchung bestimmt. Dazu erfolgte über drei Wochen, beginnend ab der ersten Tamoxifeninjektion (Tag 0) zur Induktion des iCMAKT1/2-KOs, wöchentlich eine echokardiographische Analyse in beiden Gruppen. Mithilfe dieser sollte untersucht werden, ob das Einbringen von Rheb Q64L-AAV9 einen Einfluss auf den kardialen Phänotyp im iCMAKT1/2-KO-Modell hat. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung (*Two Way Repeated Measures ANOVA*) mit anschließendem Šidák Post-Hoc-Test im Hinblick auf Gruppen- und Zeiteffekte. In Abbildung 24 sind die Veränderungen der kardialen Funktionsparameter im Zeitverlauf abgebildet. Sowohl für die Rheb Q64L-infizierten Tiere als auch die nicht-infizierten Kontrolltiere konnten im Zeitverlauf, verglichen mit den Basalwerten an Tag 0, für die untersuchten kardialen Funktionsparameter wie Herzzeitvolumen, Schlagvolumen und Ejektionsfraktion signifikante Verschlechterungen spätestens ab Tag 14 nach Knockout-Induktion nachgewiesen werden (Abb. 24 A/B/C). Daher war von einer funktionellen Beeinträchtigung der iCMAKT1/2-KO-Herzen auszugehen. Anhand der deutlichen Zunahme des endsystolischen Volumens in beiden Gruppen zeigte sich zudem eine progrediente Kontraktilitätseinschränkung des linken Ventrikels (Abb. 24 F). Zur Überprüfung auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erfolgte der Vergleich der Rheb Q64L-infizierten Mäuse sowie der nicht-infizierten Mäuse zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Ausgangswerte der kardialen Funktionsparameter an Tag 0 zeigten sich in beiden Gruppen ähnlich. Jedoch konnten auch zu den weiteren untersuchten Zeitpunkten für die kardialen Funktionsparameter keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Insgesamt war somit keine Veränderung der kardialen Funktionsparameter im Zeitverlauf nach

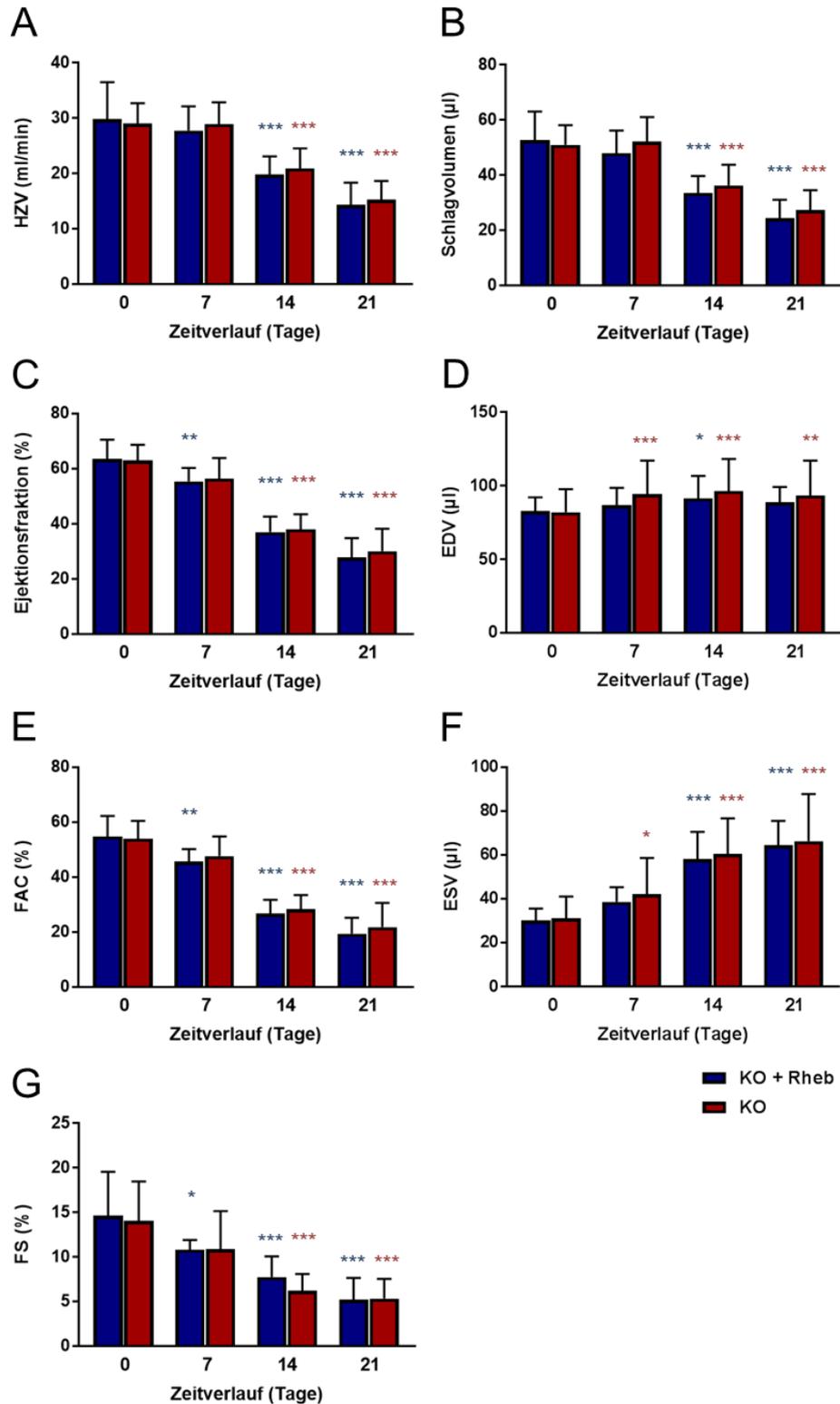


Abb. 24: Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion der Rheb Q64L-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/** p < 0,05/0,01/0,001 vs. Tag 0 (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + *Sidak Post-Hoc-Test*). A: Herzzeitvolumen (HZV); B: Schlagvolumen; C: Ejektionsfraktion; D: linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV); E: *fractional area change* (FAC); F: linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV); G: *fractional shortening* (FS)
Abkürzungen: KO + Rheb: Rheb Q64L-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 10); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

Induktion des iCMAKT1/2-KOs zwischen den beiden untersuchten Gruppen nachweisbar.

In Abbildung 25 sind die kardiale Wanddicke und der innerventrikuläre Durchmesser der Rheb Q64L-infizierten Tiere sowie der nicht-infizierten Kontrolltiere im Zeitverlauf abgebildet. Auch hierbei wurde im Vergleich zu Tag 0 in beiden Gruppen jeweils eine signifikante Verschlechterung der untersuchten Strukturparameter spätestens ab Tag 14

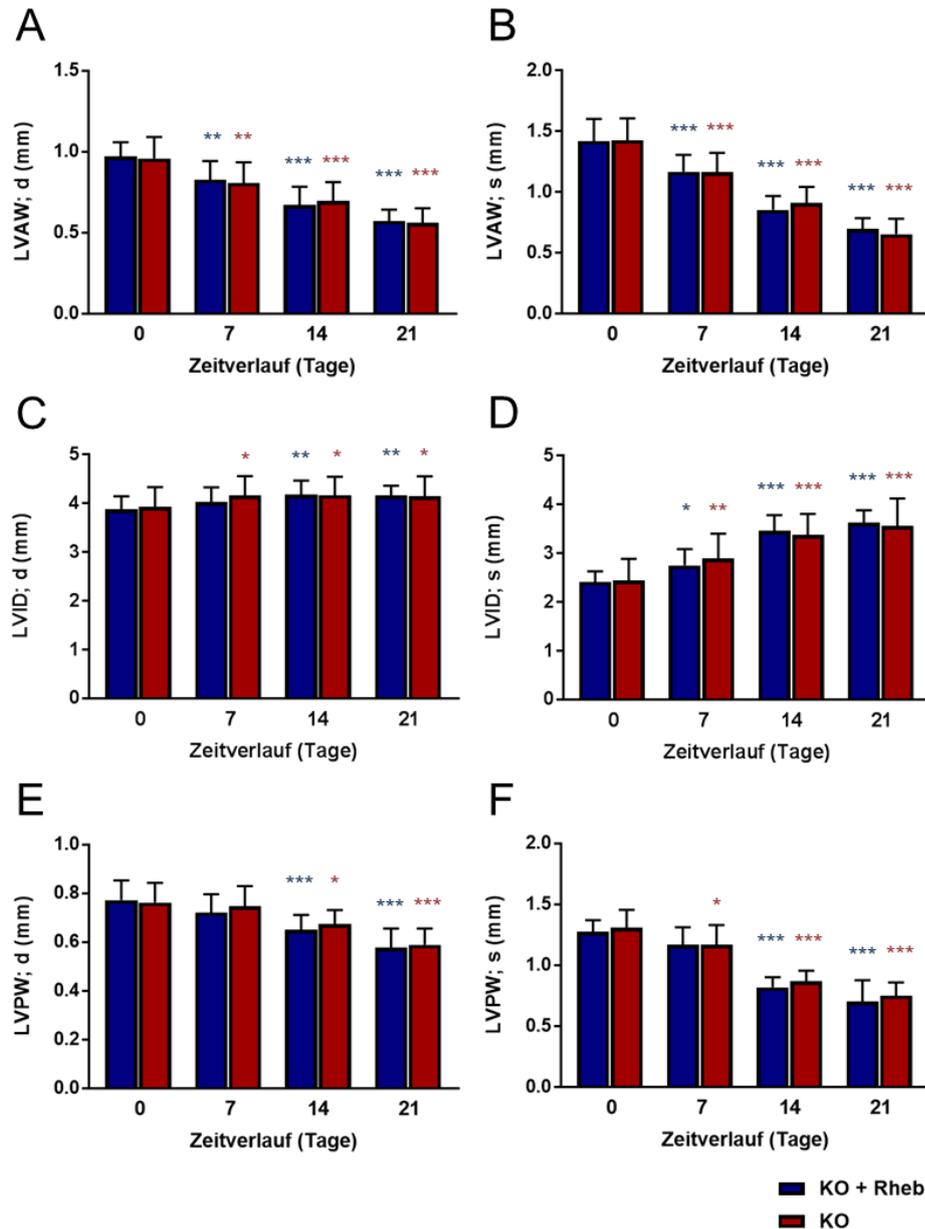


Abb. 25: Echokardiographische Untersuchung der kardialen Strukturparameter der Rheb Q64L-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/*** $p < 0,05/0,01/0,001$ vs. Tag 0 (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + Šidák Post-Hoc-Test).

Jeweils in Diastole (d) und Systole (s): A/B: *left ventricular anterior wall* (LVAW); C/D: *left ventricular internal diameter* (LVID); E/F: *left ventricular posterior wall* (LVPW)

Abkürzungen: KO + Rheb: Rheb Q64L-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 10); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

nach Knockout-Induktion festgestellt. Durch die kontinuierliche Abnahme der Wanddicken sowohl in Diastole als auch in Systole war von einer progredienten kardialen Atrophie auszugehen (Abb. 25 A/B/E/F). An Tag 0 zeigten beide Gruppen im Vergleich miteinander erneut ähnliche Ausgangswerte. Auch zu den weiteren Messzeitpunkten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede für die kardialen Wanddicken und den innerventrikulären Durchmesser zwischen Rheb Q64L-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tieren festgestellt. Somit schritt die kardiale Atrophie in beiden Gruppen im Zeitverlauf ähnlich stark fort.

Zudem wurden das Herzgewicht sowie das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW *ratio*) für die Rheb Q64L-infizierten Tiere und die nicht-infizierten Kontrolltiere im Zeitverlauf ermittelt (Abb. 26). Verglichen mit Tag 0 wurde in beiden Gruppen eine signifikante Abnahme beider Parameter im Zeitverlauf ab Tag 14 beobachtet. Auch die progrediente Abnahme des Herzgewichtes und der HW/BW *ratio* im Zeitverlauf waren Indikatoren für eine kardiale Atrophie. Im Vergleich der beiden Gruppen miteinander zeigten die untersuchten Parameter an Tag 0 ähnliche Werte. Bei Untersuchung der weiteren Zeitpunkte konnte an Tag 14 tendenziell ein geringeres Herzgewicht sowie eine geringere HW/BW *ratio* in den Rheb Q64L-infizierten Tieren beobachtet werden. An Tag 21 zeigten Rheb Q64L-infizierte und nicht-infizierte Tiere wieder ähnliche Werte bezüglich des Herzgewichtes und der HW/BW *ratios*. Für die beobachteten Unterschiede konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden.

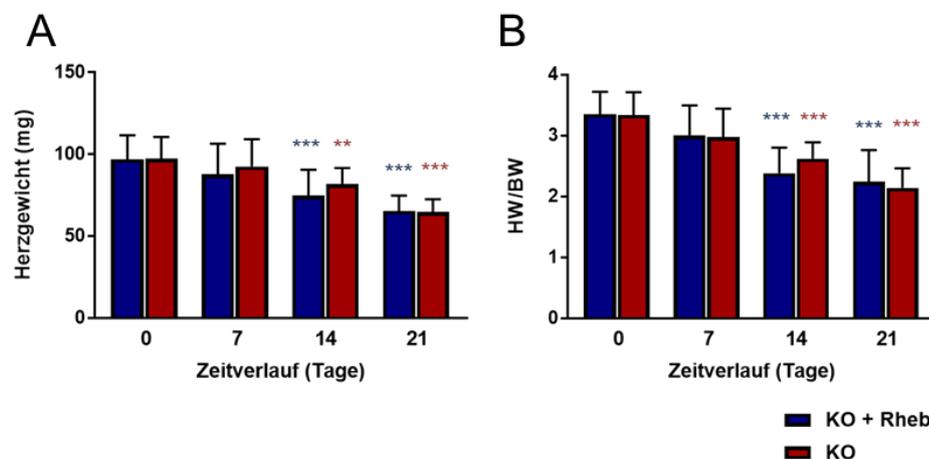


Abb. 26: Echokardiographische Untersuchung des Herzgewichtes sowie der HW/BW *ratio* der Rheb Q64L-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/** p < 0,05/0,01/0,001 vs. Tag 0 (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + Šidák Post-Hoc-Test).

A: Herzgewicht; B: HW/BW *ratio*

Abkürzungen: KO + Rheb: Rheb Q64L-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 10); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

Unter Betrachtung aller erhobenen kardialen Parameter konnte somit kein Einfluss der Rheb Q64L-AAV9-Infektion auf den kardialen Phänotyp nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs nachgewiesen werden. Die nach der iCMAKT1/2-KO-Induktion einsetzenden Veränderungen wie die Beeinträchtigung der kardialen Funktion und die kardiale

Atrophie waren sowohl in der Rheb Q64L-AAV9-infizierten als auch in der nicht-infizierten Gruppe zu den jeweiligen Messzeitpunkten ähnlich stark ausgeprägt.

3.5.2 Überlebensvergleich nach Knockout-Induktion

Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Überlebenszeit (Zeit bis zum Erreichen von Abbruchkriterien, Kapitel 2.10.5) der Rheb Q64L-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Kontrolltieren (Abb. 27). Dazu wurden modifizierte Kaplan-Meier-Überlebenskurven beider Gruppen bestimmt. Als Tag 0 der Untersuchung galt dabei die erste Tamoxifeninjektion zur Induktion des iCMAKT1/2-KOs in beiden Gruppen. Zur Untersuchung hinsichtlich eines Unterschiedes der Überlebensraten zwischen den beiden Gruppen wurde ein Logrank (Mantel-Cox)-Test angewandt. Dieser wies im Vergleich beider Gruppen miteinander keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,6316$). Die Rheb Q64L-infizierten Tiere überlebten nach Beginn der Induktion des iCMAKT1/2-KOs durchschnittlich 23,9 Tage, die nicht-infizierten Kontrolltiere 24,4 Tage. Neben den fehlenden signifikanten echokardiographischen Unterschieden bezüglich der Herzfunktion, der Wandstrukturen und des Herzgewichtes zwischen den Rheb Q64L-infizierten und den nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tieren wurde somit außerdem kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bei Analyse der modifizierten Überlebenszeitfunktionen im Zeitverlauf nachgewiesen.

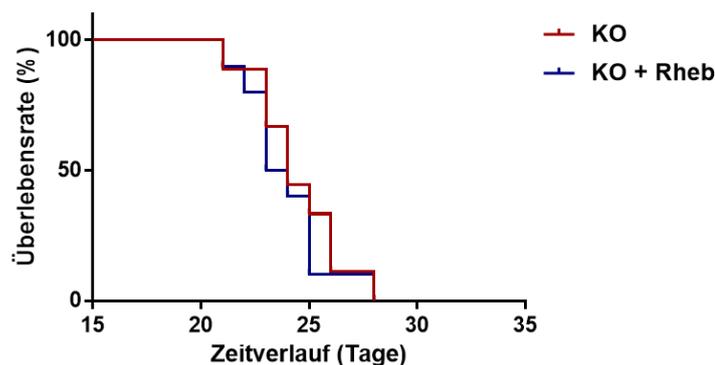


Abb. 27: Modifizierte Überlebenszeitfunktion für Rheb Q64L-infizierte Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen ab Beginn der iCMAKT1/2-KO-Induktion. Es erfolgte der Vergleich der Zeit von Beginn der Induktion des iCMAKT1/2-KOs bis zum Erreichen von Abbruchkriterien. Die prozentuale Überlebensrate im Zeitverlauf bezieht sich auf die Gesamtanzahl an Tieren der jeweiligen Bezugsgruppe.

Abkürzungen: KO + Rheb: Rheb Q64L-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere ($n = 10$); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere ($n = 9$)

3.5.3 Expressionsnachweis transgenen Rhebs nach AAV9-Infektion

Es konnten mit einem Rheb-Antikörper keine eindeutigen Signale in einer Western Blot-Analyse der kardialen Expression für endogenes und transgenes Rhebs detektiert werden. Auch in einer Untersuchung mit einem c-Myc Tag-Antikörper konnte die Transgenexpression nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transgenexpression in Herzen von Rheb Q64L-infizierten Tieren erfolgte daher eine mRNA-Expressionsanalyse von endogenem und transgenem Rheb mittels qPCR. Als Kontrolle wurden Herzextrakte zweier nicht-infizierter iCMAKT1/2-KO-Tiere mit untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Primerpaare zur Amplifikation

transgener Rheb-cDNA und der gesamten Menge an Rheb-cDNA in den Herzproben verwendet (Kapitel 2.5: Tabelle 5 + Kapitel 2.13.3). Zur Amplifikation des Referenzgens diente ein Kdelr1-Primerpaar. Die durchgeführten qPCR-Untersuchung zeigte, dass die Transkriptmenge transgenen Rhebs in den Herzextrakten der Rheb Q64L-infizierten Tiere nur einen geringen Anteil an der Gesamttranskriptmenge von Rheb ausmachte (Abb. 28). Dabei variierte der Anteil stark von 0,21 % bis 6,59 % und betrug durchschnittlich 3,05 %. In den Herzextrakten der beiden Kontrolltiere wurde wie zu erwarten keine transgene Rheb-Transkription nachgewiesen. Insgesamt war somit von einer sehr geringen Expression transgenen Rhebs in den Herzen Rheb Q64L-infizierter Tiere auszugehen.

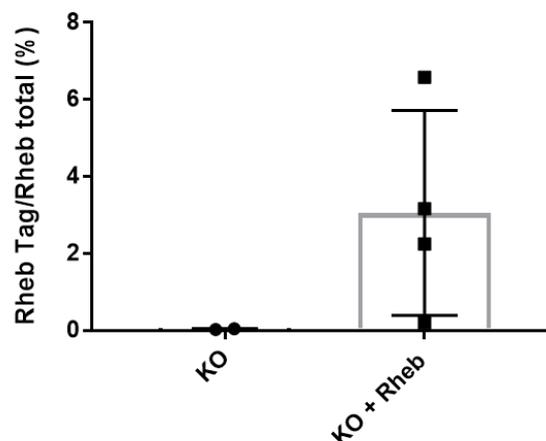


Abb. 28: Prozentualer Anteil der kardialen Transkriptmenge transgenen Rhebs an der Rheb-Gesamttranskriptmenge in einer qPCR-Analyse. Bei dem Vergleich der Rheb-Expressionsstärke in den verschiedenen Herzextrakten handelt es sich um eine ungefähre Abschätzung. **Abkürzungen:** Rheb Tag: transgenes Rheb; Rheb total: Rheb-Gesamttranskriptmenge; KO + Rheb: Herzextrakte Rheb Q64L-infizierter iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 4); KO: Herzextrakte nicht-infizierter iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 2)

3.6 In vivo-Expression von AMPK im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell

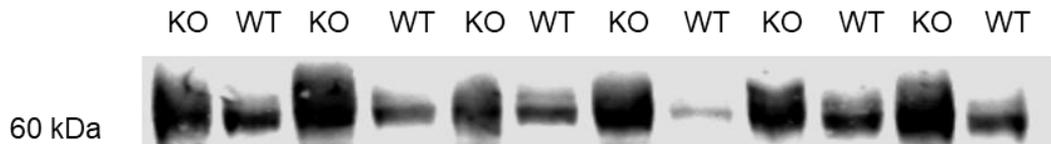
Aufgrund der in Kapitel 3.4 beschriebenen erfolgreichen Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante wurden im Anschluss virale AAV9-Partikel auf Grundlage des Plasmids „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ durch die Firma Vector Biolabs (Malvern, Pennsylvania, USA) erzeugt, die die genetischen Informationen zur Expression der AMPK- α 2-S491A-Variante tragen. Es wurden männliche iCMAKT1/2-KO-Mäuse im Alter von 7-8 Wochen per Schwanzveneninjektion mit $1 \cdot 10^{12}$ Viruspartikeln dieser AAV9 infiziert. Ca. 4 Wochen nach AAV9-Injektion erfolgte die Induktion der iCMAKT1/2-KOs. Insgesamt wurden n = 12 AMPK- α 2-S491A-infizierte Mäuse verwendet. Als Kontrollgruppe galten n = 9 nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Mäuse. Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, die funktionelle Bedeutung der Wiederherstellung der AMPK-Aktivität für den Phänotyp und das Überleben durch zusätzliche Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante im iCMAKT1/2-KO-Modell zu ermitteln.

3.6.1 Inhibitorische AMPK- α -Phosphorylierung nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs

In vorherigen Untersuchungen konnte, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, gezeigt werden, dass es an Tag 14 und zunehmend an Tag 21 nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs mittels Tamoxifeninjektion in Herzen zu einer vermehrten inhibitorischen Serin-485/491-

A

Phospho-AMPK- α S485/491



B

AMPK- α



C

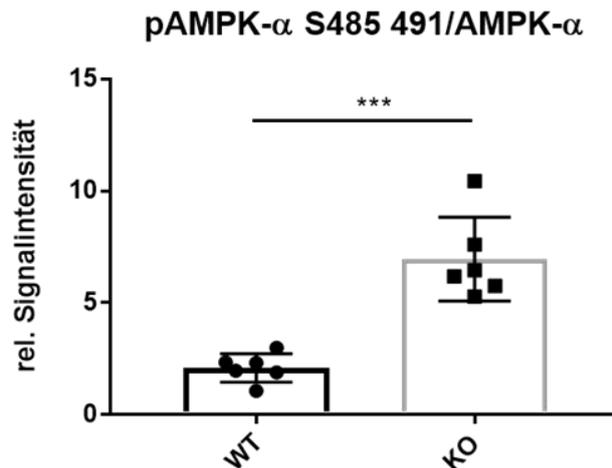


Abb. 29: Western Blot-Analyse der Herzextrakte von iCMAKT1/2-KO-Mäusen und wildtypischen Vergleichsmäusen bezüglich des AMPK- α -Signals und des Serin-485/491-Phosphorylierungsstatus der AMPK- α an Tag 21 nach Knockout-Induktion. Statistisch signifikante Unterschied werden angenommen für: *** $p < 0,001$ (ungepaarter t-Test). Alle verwendeten Antikörper stellen eine Signalbande bei ca. 62 kDa dar.

A: Serin-485/491-Phosphorylierungsstatus der AMPK- α (Phospho-AMPK- α S485/491)

B: AMPK- α -Gesamt signal (AMPK- α)

C: Quotient beider Signale für jedes einzelne Herzextrakt in der jeweiligen Gruppe

Abkürzungen: KO: iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 6); WT: wildtypische Kontrolltiere (n = 6)

Phosphorylierung der AMPK- α kommt (Gödecke et al., 2019). Um diese Ergebnisse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden zunächst vor Beginn der AAV9-Infektionsexperimente die Herzen von $n = 6$ Tieren mit iCMAKT1/2-KO und $n = 6$ wildtypischen Tieren an Tag 21 mittels Western Blot-Analyse hinsichtlich des Serin-485/491-Phosphorylierungsstatus untersucht (Abb. 29 A). Dabei wies das Signal der Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α in den Herzextrakten der iCMAKT1/2-KO-Tiere im Vergleich zu dem Signal der wildtypischen Tiere eine stärkere Intensität auf. Zudem wurde das AMPK- α -Gesamtsignal in den jeweiligen Herzextrakten ermittelt (Abb. 29 B), um anschließend zur besseren Vergleichbarkeit den Quotienten aus dem Signal für Serin-485/491-phosphorylierte AMPK- α und dem AMPK- α -Gesamtsignal zu bilden. Dabei war der durchschnittliche Quotient in den Herzextrakten der iCMAKT1/2-KO-Tiere signifikant um den Faktor 3,32 höher als in den wildtypischen Kontrolltieren (Abb. 29 C). Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse, die auf eine vermehrte inhibitorische Serin-485/491-Phosphorylierung in iCMAKT1/2-KO-Herzen 21 Tage nach Knockout-Induktion hindeuten, ließ sich somit die Verwendung einer nicht-inaktivierbaren AMPK-Variante begründen, die in den folgenden Versuchen zum Einsatz kam.

3.6.2 Untersuchung des Einflusses der AMPK- α 2-S491A-Expression auf die Herzfunktion

Zum Vergleich der kardialen Funktion wurden die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere sowie die Tiere der nicht-infizierten Kontrollgruppe im Zeitverlauf echokardiographisch untersucht. Der Beginn der Untersuchung erfolgte mit der ersten Tamoxifeninjektion (Tag 0) zur Induktion des iCMAKT1/2-KOs in beiden Gruppen. Anschließend wurden die Mäuserherzen wöchentlich über drei Wochen echokardiographisch analysiert. Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, einen möglichen Effekt der Inhibition der AMPK auf den kardialen Phänotyp im iCMAKT1/2-KO-Modell zu identifizieren. Zur statistischen Analyse erfolgte eine 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung (*Two Way Repeated Measures ANOVA*) mit anschließendem Šidák Post-Hoc-Test in Hinsicht auf Gruppen- und Zeiteffekte. Die in Abbildung 30 dargestellten Ergebnisse zeigen die Veränderungen der kardialen Funktionsparameter im Zeitverlauf. Sowohl in der AMPK- α 2-S491A-infizierten Gruppe als auch in der Gruppe der nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tiere konnte im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 0 für alle untersuchten kardialen Funktionsparameter eine signifikante Verschlechterung spätestens ab Tag 21 verzeichnet werden. Die Abnahme von Herzzeitvolumen, Schlagvolumen und Ejektionsfraktion deuteten auf eine funktionelle kardiale Beeinträchtigung hin (Abb. 30 A/B/C), die Zunahme des endsystolischen Volumens auf eine linksventrikuläre Kontraktilitätsstörung (Abb. 30 F).

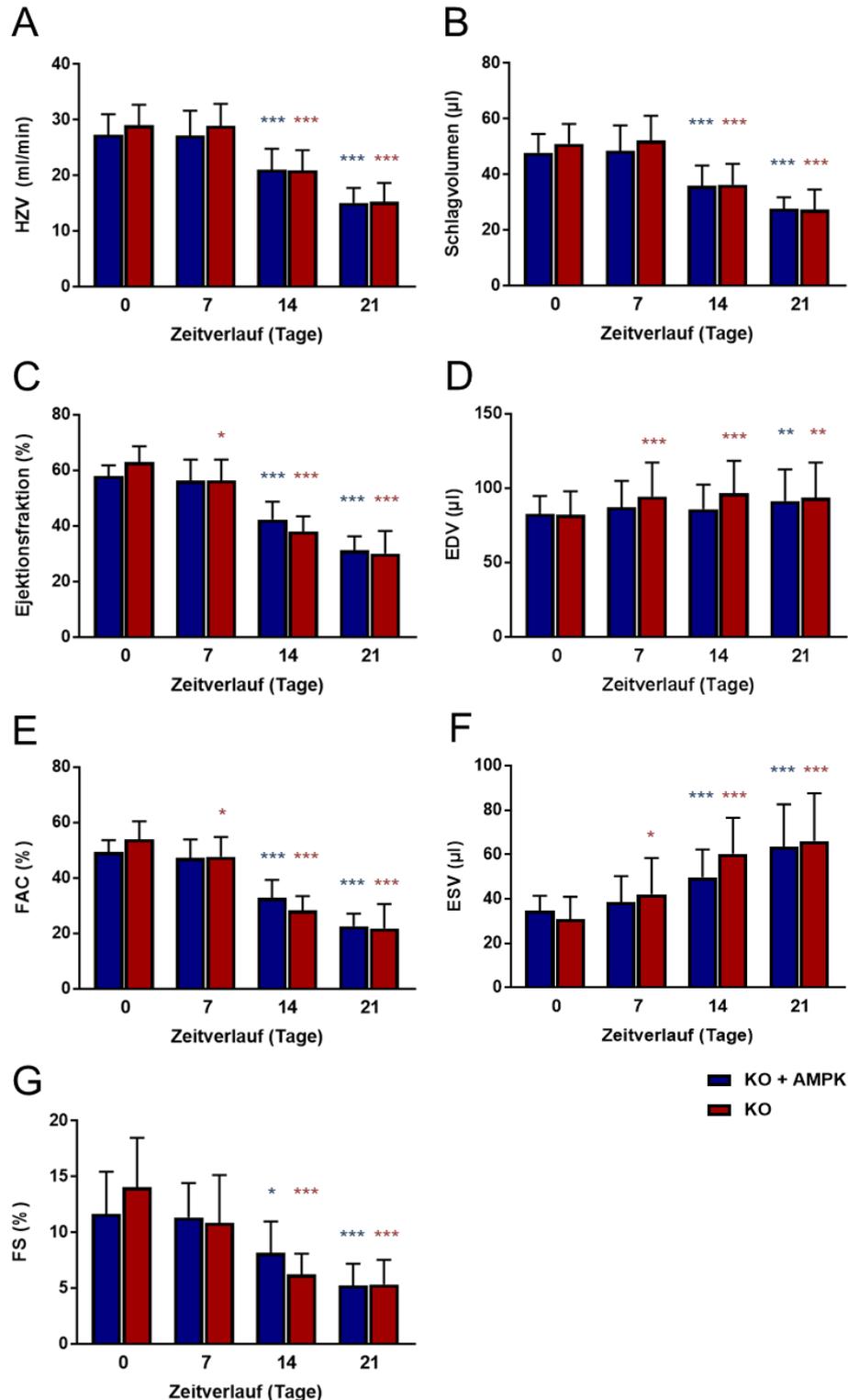


Abb. 30: Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/** p < 0,05/0,01/0,001 vs. Tag 0 (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + Šidák Post-Hoc-Test).

A: Herzzeitvolumen (HZV); B: Schlagvolumen; C: Ejektionsfraktion; D: linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV); E: *fractional area change* (FAC); F: linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV); G: *fractional shortening* (FS)

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 12); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

Im Vergleich beider Gruppen miteinander zu den jeweiligen Messzeitpunkten lag zu keinem der Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den Funktionsparametern der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere und der nicht-infizierten Tiere vor. Jedoch fiel im Vergleich der Werte von Tag 0 und Tag 14 beider Gruppen auf, dass in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren an Tag 0 einige Funktionsparameter tendenziell niedrigere Werte zeigten als in den nicht-infizierten Tieren, an Tag 14 einige Funktionsparameter in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren hingegen eine weniger starke Verschlechterung aufwiesen. Beispielsweise war die Ejektionsfraktion in der AMPK- α 2-S491A-infizierten Gruppe an Tag 0 im Durchschnitt ca. 4,9 % geringer als in der nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Gruppe; an Tag 14 wiesen die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere jedoch eine durchschnittlich ca. 4,3 % höhere Ejektionsfraktion auf (Abb. 30 C).

Daher stellte sich die Frage, ob es im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 nach iCMAKT1/2-KO-Induktion zu einer temporär verlangsamten Verschlechterung der kardialen Funktionsparameter in der AMPK- α 2-S491A-infizierten Gruppe kommt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde in einer weiteren Analyse die Interaktion im Sinne eines zeitabhängigen Gruppeneffektes mittels 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für den Vergleich der Messwerte von Tag 0 vs. Tag 14 bestimmt. Dabei wurde eine signifikante Interaktion zwischen den untersuchten Variablen „Gruppe“ und „Zeit“ für die kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion, *fractional shortening*, *fractional area change* sowie das linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Volumen nachgewiesen (Tabelle 20). Zur graphischen Darstellung dieses Effektes wurde im Anschluss die Änderung der Messwerte von Tag 0 und Tag 14 (Δ Tag 14 - Tag 0) der Einzeltiere beider Gruppen für die kardialen Funktionsparameter mit signifikanter Interaktion bestimmt (Abb. 31). Dabei zeigten die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren eine signifikant verminderte durchschnittliche Abnahme der Ejektionsfraktion, der *fractional area change*, des *fractional shortening* sowie eine signifikant verminderte durchschnittliche Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Volumens. Beispielsweise nahm im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 die Ejektionsfraktion der nicht-infizierten Kontrolltiere durchschnittlich um 24,88 % ab, die Ejektionsfraktion der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere hingegen nur um durchschnittlich 15,67 % (Abb. 31 A). Für das endsystolische Volumen konnte in den

Tabelle 20: Untersuchung der Interaktion kardialer Funktionsparameter und einer AMPK- α 2-S491A-Expression. Gezeigt sind die Ergebnisse einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für Tag 0 vs. Tag 14 zwischen AMPK- α 2-S491A-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen (Signifikanz für $p < 0,05$).

Funktionsparameter	p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 14
Herzzeitvolumen	0,243
Ejektionsfraktion	0,0036
<i>fractional area change</i>	0,0029
<i>fractional shortening</i>	0,0315
Schlagvolumen	0,2254
Enddiastolisches Volumen	0,0044
Endsystolisches Volumen	0,0024

nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen bei Betrachtung von Tag 0 und Tag 14 eine durchschnittliche Zunahme von 29,33 μl nachgewiesen werden, in AMPK- α 2-S491A-infizierten Mäusen betrug die durchschnittliche Zunahme hingegen nur 14,97 μl (Abb. 31 D). Insgesamt wurde somit im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 nach Knockout-Induktion eine signifikant verlangsamte Verschlechterung kardialer Funktionsparameter

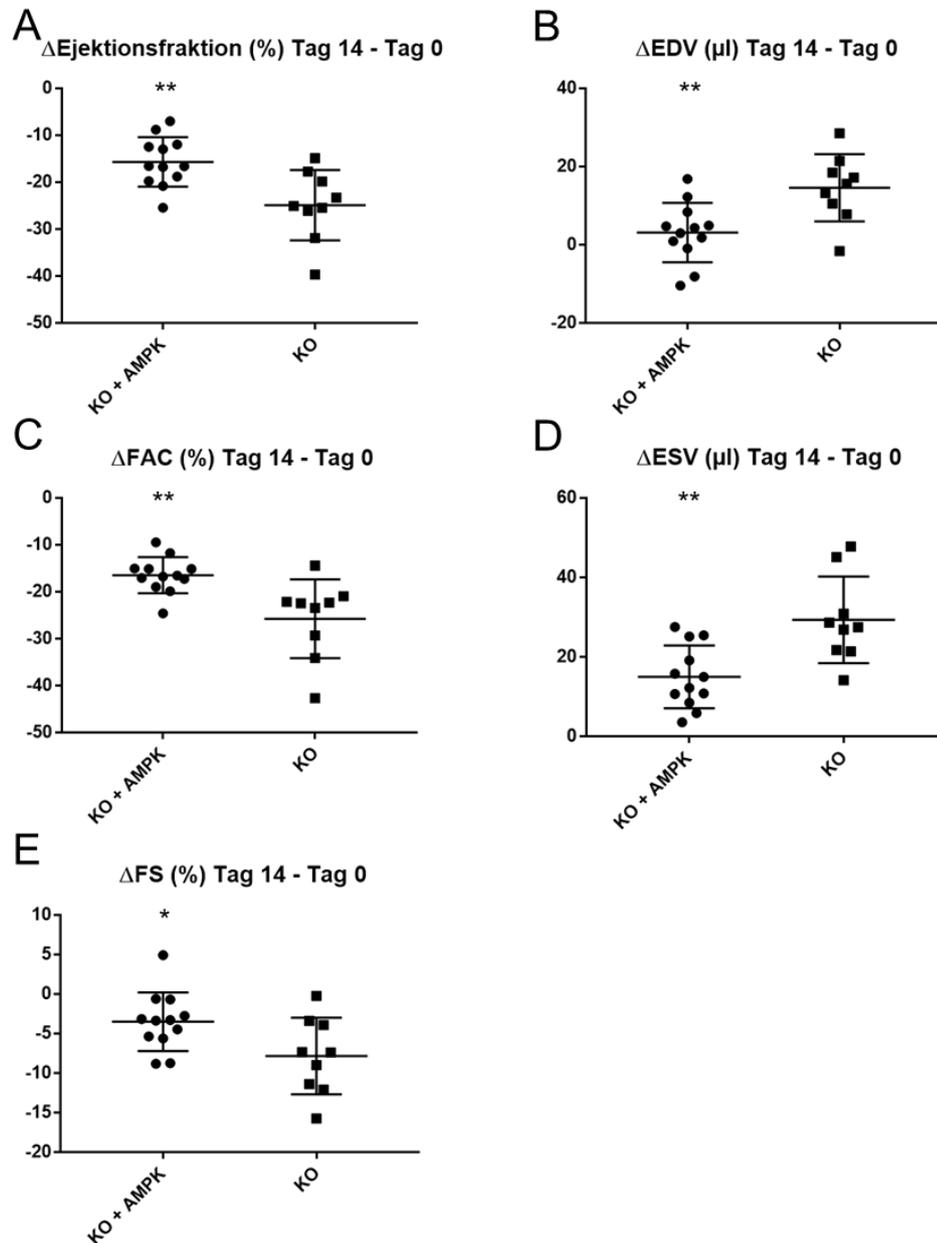


Abb. 31: Änderung der Herzfunktionsparameter der AMPK- α 2-S491A-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen von Tag 0 und Tag 14 nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt für: * $p < 0,05$ KO vs. KO + AMPK, ** $p < 0,01$ KO vs. KO + AMPK (ungepaarter t-Test).

A: Δ Ejektionsfraktion; B: Δ linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (Δ EDV); C: Δ fractional area change (Δ FAC); D: Δ linksventrikuläres endsystolisches Volumen (Δ ESV); E: Δ fractional shortening (Δ FS).

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 12); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren nachgewiesen. Es ist somit von einer temporären Verlangsamung der kardialen Funktionsverschlechterung und Kontraktilitätseinschränkung auszugehen.

Weiterhin erfolgte die Messung der kardialen Wanddicke sowie des innerventrikulären Durchmessers des linken Ventrikels beider Gruppen im Zeitverlauf (Abb. 32). Auch hierbei zeigten sowohl die AMPK- α 2-S491A-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tiere als auch

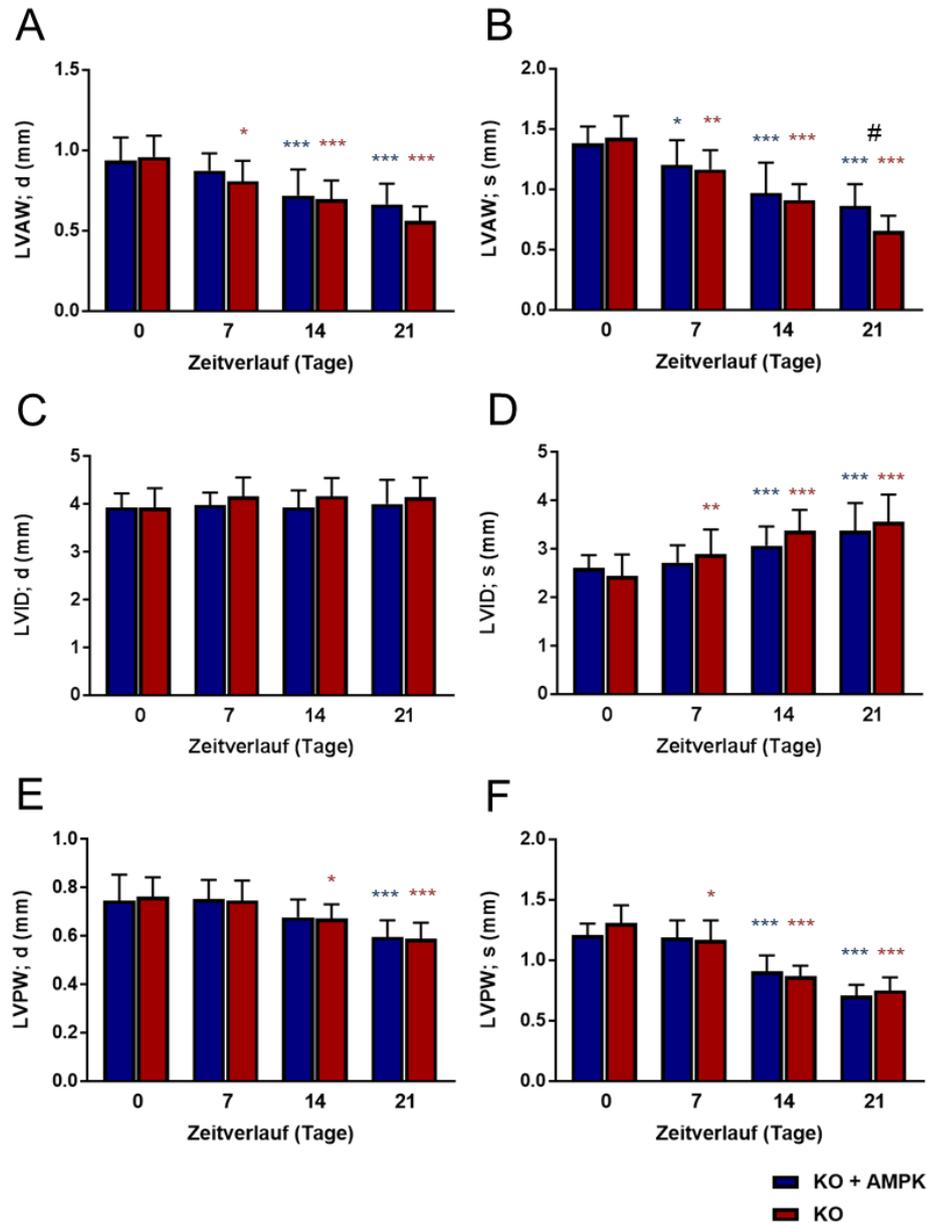


Abb. 32: Echokardiographische Untersuchung der kardialen Strukturparameter der AMPK- α 2-S491A-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/** p < 0,05/0,01/0,001 vs. Tag 0; # p < 0,05 KO + AMPK vs. KO (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + Šidák Post-Hoc-Test).

Jeweils in Diastole (d) und Systole (s): A/B: *left ventricular anterior wall* (LVAW); C/D: *left ventricular internal diameter* (LVID), E/F: *left ventricular posterior wall* (LVPW)

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 12); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

die nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 0 für alle Parameter, mit Ausnahme des linksventrikulären Innendurchmessers in Diastole (Abb. 32 C), eine signifikante Verschlechterung spätestens ab Tag 21 nach Knockout-Induktion. Anhand der progredienten Reduktion der Wanddicken im Zeitverlauf konnte von einer kardialen Atrophie ausgegangen werden (Abb. 32 A/B/E/F). Beim Vergleich der Messwerte beider Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden mit Ausnahme der anterioren Wanddicke des linken Ventrikels an Tag 21 (Abb. 32 B) keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren zu den jeweiligen Zeitpunkten festgestellt. Dennoch fiel auch für die Strukturparameter auf, dass die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere an Tag 0 besonders in Systole tendenziell niedrigere Messwerte aufwiesen als die nicht-infizierten Tiere, an Tag 14 und Tag 21 jedoch in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren für einige Strukturparameter tendenziell weniger starke Verschlechterungen als in den nicht-infizierten Tieren gezeigt werden konnten. Beispielsweise war die linksventrikuläre anteriore Wanddicke in Systole in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren an Tag 0 im Durchschnitt ca. 0,05 mm geringer als in den nicht-infizierten Tieren. An Tag 14 konnte in der AMPK- α 2-S491A-infizierten Gruppe hingegen in Systole eine im Durchschnitt 0,08 mm dickere anteriore Wand im Vergleich zur nicht-infizierten Gruppe festgestellt werden; an Tag 21 war diese in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren um durchschnittlich 0,21 mm signifikant dicker (Abb. 32 B).

Daher wurde weiterführend untersucht, ob im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 bzw. Tag 21 nach Knockout-Induktion die Werte der kardialen Wanddicke und des innerventrikulären Durchmessers in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren temporär verlangsamt verschlechtert waren. Dazu wurde die Interaktion der Messwerte beider Gruppen mittels 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung zum einen für Tag 0 vs. Tag 14 und zum anderen für Tag 0 vs. Tag 21 bestimmt (Tabelle 21). Eine signifikante Interaktion zwischen den Variablen „Gruppe“ und „Zeit“ wurde an Tag 14 für den innerventrikulären Durchmesser in Systole und Diastole sowie die posteriore Wanddicke des linken Ventrikels in Systole nachgewiesen. Für die linksventrikuläre anteriore Wanddicke an Tag 21 konnte ebenfalls eine signifikante Interaktion zwischen den Variablen „Gruppe“ und „Zeit“ nachgewiesen werden. Die graphische Darstellung der

Tabelle 21: Untersuchung der Interaktion kardialer Strukturparameter und einer AMPK- α 2-S491A-Expression. Gezeigt sind die Ergebnisse einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für Tag 0 vs. Tag 14 bzw. Tag 0 vs. Tag 21 zwischen AMPK- α 2-S491A-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen (Signifikanz für $p < 0,05$).

Strukturparameter		p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 14	p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 21
Systole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,3348	0,013
	<i>left ventricular internal diameter</i>	0,0017	0,1435
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,0403	0,3803
Diastole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,6271	0,1252
	<i>left ventricular internal diameter</i>	0,0174	0,3821
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,6577	0,6282

signifikanten Interaktionen erfolgte mithilfe der Bestimmung der Änderung der bestimmten Parameter für die Einzeltiere der jeweiligen Gruppe (Abb. 33). Für den innerventrikulären Durchmesser in Systole und Diastole sowie die posteriore Wanddicke des linken Ventrikels in Systole wurde die Änderung der Messwerte von Tag 0 und Tag 14 (Δ Tag 14 - Tag 0) ermittelt. Für die linksventrikuläre anteriore Wanddicke erfolgte die Bestimmung der Änderung der Messwerte von Tag 0 und Tag 21 (Δ Tag 21 - Tag 0). Dabei konnten für die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere eine signifikant geringere durchschnittliche Zunahme des innerventrikulären Durchmessers in Systole und Diastole sowie eine signifikant geringere durchschnittliche Abnahme der linksventrikulären posterioren Wanddicke in Systole im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 nachgewiesen werden (Abb. 33 A/B/C). Beispielsweise betrug die durchschnittliche Zunahme des innerventrikulären Volumens in Systole im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren 0,46 mm, in den nicht-infizierten Kontrolltieren hingegen 0,94 mm (Abb. 33 B). Im Vergleich von Tag 0 und Tag 21 war die durchschnittliche Abnahme der linksventrikulären anterioren Wanddicke in Systole in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren mit 0,52 mm signifikant geringer als in den nicht-

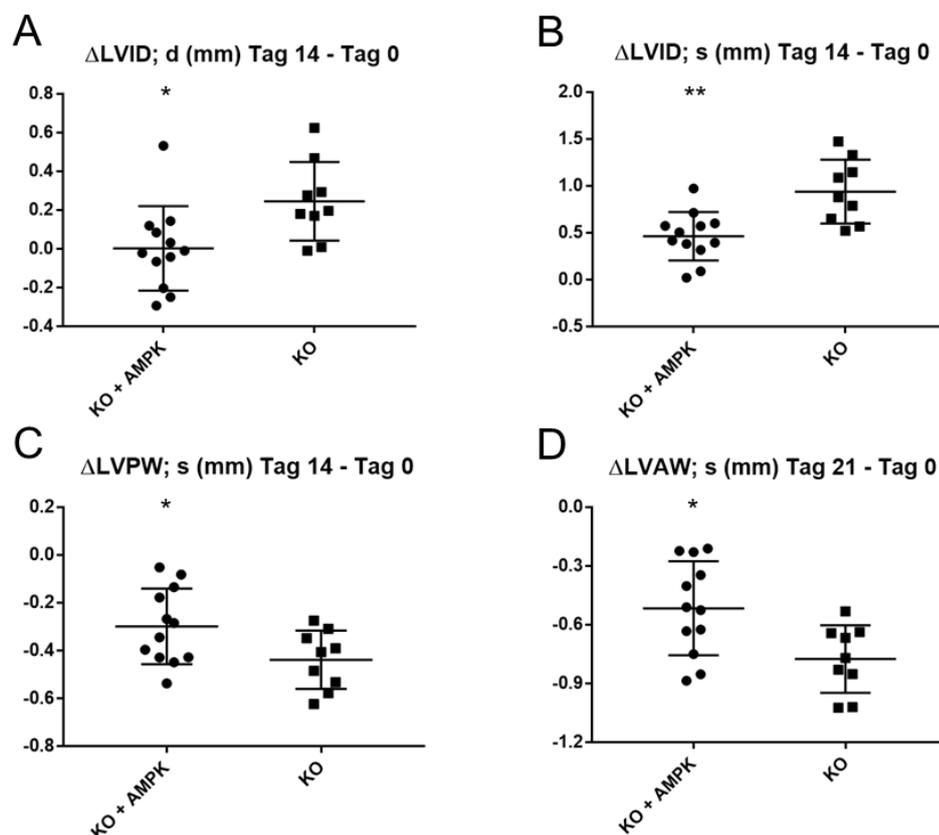


Abb. 33: Änderung der kardialen Strukturparameter der AMPK- α 2-S491A-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen von Tag 0 und Tag 14 bzw. Tag 21 nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede sind dargestellt für: * $p < 0,05$ KO vs. KO + AMPK, ** $p < 0,01$ KO vs. KO + AMPK (ungepaarter t-Test).

A: Δ left ventricular internal diameter Diastole (Δ LVID; d); B: Δ left ventricular posterior wall Systole (Δ LVPW; s); C: Δ left ventricular internal diameter Systole (Δ LVID; s); D: Δ left ventricular anterior wall Systole (Δ LVAW; s).

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere (n = 12); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere (n = 9)

infizierten Tieren mit 0,77 mm (Abb. 33 D). Für die AMPK- α 2-S491A-infizierte Tiere wurde somit im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 bzw. Tag 21 nach iCMAKT1/2-KO-Induktion eine signifikant verlangsamte Zunahme des innerventrikulären Durchmessers sowie eine signifikant verlangsamte Abnahme der kardialen Wanddicke festgestellt. Dies deutete auf eine temporär verlangsamte kardiale Atrophie nach AMPK- α 2-S491A-Infektion in den iCMAKT1/2-KO-Mäusen hin. Da die Veränderungen des innerventrikulären Durchmessers und der linksventrikulären posterioren Wanddicke in Systole auch durch eine unterschiedliche Kontraktionskraft des linken Ventrikels erklärt werden können, lassen die Daten auch die Interpretation zu, dass die Ergebnisse die Folge einer verlangsamten Kontraktionseinschränkung durch Expression der AMPK- α 2-S491A-Mutante sein könnten.

Zudem erfolgte die echokardiographische Ermittlung des Herzgewichtes sowie des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW *ratio*) für die AMPK- α 2-S491A-infizierte Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren (Abb. 34). In Bezug auf die Messwerte an Tag 0 zeigten beide Gruppen eine signifikante Abnahme des Herzgewichtes und der HW/BW *ratio* spätestens ab Tag 14 nach Knockout-Induktion, was ebenfalls für eine progrediente kardiale Atrophie sprach. Im Vergleich beider Gruppen miteinander konnte zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden. Für die HW/BW *ratio* fiel auf, dass es trotz tendenziell höherer Ausgangswerte an Tag 0 in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren an Tag 14 zu einer stärkeren Abnahme kam. Zur Untersuchung hinsichtlich einer beschleunigten Verschlechterung im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 erfolgte erneut die Untersuchung der Interaktion im Sinne eines zeitabhängigen Gruppeneffektes im Vergleich der Messzeitpunkte Tag 0 vs. Tag 14 mittels 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung. Es wurde jedoch sowohl für das Herzgewicht ($p = 0,2938$) als auch

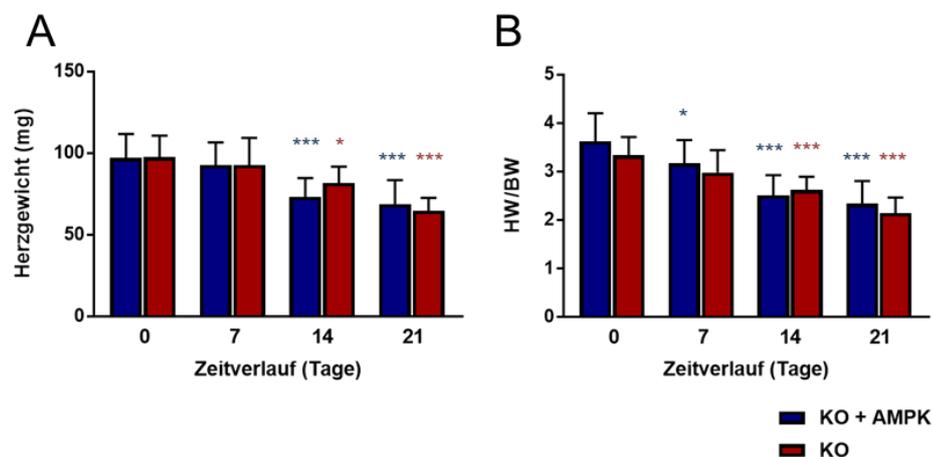


Abb. 34: Echokardiographische Untersuchung des Herzgewichtes sowie der HW/BW *ratio* der AMPK- α 2-S491A-infizierten Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs. Statistisch signifikante Unterschiede werden angenommen für: */**/** $p < 0,05/0,01/0,001$ vs. Tag 0 (*Two Way Repeated Measures ANOVA* + Sidák Post-Hoc-Test).

A: Herzgewicht (A); B: HW/BW *ratio*

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere ($n = 12$); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere ($n = 9$)

für die HW/BW *ratio* ($p = 0,149$) keine signifikante Interaktion zwischen den Variablen „Gruppe“ und „Zeit“ festgestellt. Somit war hierbei nicht von einer beschleunigten Verschlechterung in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren auszugehen.

Zusammenfassend konnte in der echokardiographischen Untersuchung im iCMAKT1/2-KO-Modell eine temporär verlangsamte Verschlechterung kardialer Parameter im Zeitverlauf in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren identifiziert werden. Die verminderte Abnahme kardialer Funktionsparameter wie der Ejektionsfraktion oder des endsystolischen Volumens sprach für eine temporär weniger deutliche Ausprägung der Funktions- und der Kontraktilitätseinschränkung in den AMPK- α 2-S491A-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen. Die geringere Reduktion der kardialen Wanddicke wies auf eine temporär verminderte kardiale Atrophie nach AMPK- α 2-S491A-Infektion in den iCMAKT1/2-KO-Mäusen hin.

3.6.3 Überlebensvergleich nach Knockout-Induktion

Weiterhin erfolgte eine Vergleichsanalyse hinsichtlich der Überlebenszeit (Zeit bis zum Erreichen von Abbruchkriterien, Kapitel 2.10.5) zwischen den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren und den nicht-infizierten Kontrolltieren. Abbildung 35 zeigt die modifizierten Kaplan-Meier-Überlebenskurven der beiden Gruppen ab Beginn der Tamoxifeninjektion zur iCMAKT1/2-KO-Induktion. Dabei wiesen die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren tendenziell ein verlängertes Überleben im Zeitverlauf auf. Die durchschnittliche Überlebensdauer nach iCMAKT1/2-KO-Induktion betrug für die AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere 26,4 Tage, für die nicht-infizierten Tieren 24,4 Tage. Im Logrank (Mantel-Cox)-Test zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Überlebensrate ($p = 0,0699$). Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass die AMPK- α 2-S491A-Infektion zu einer signifikant verlangsamten Verschlechterung der Herzfunktion und einer tendenziell verlängerten Überlebenszeit in iCMAKT1/2-KO-Mäusen führte.

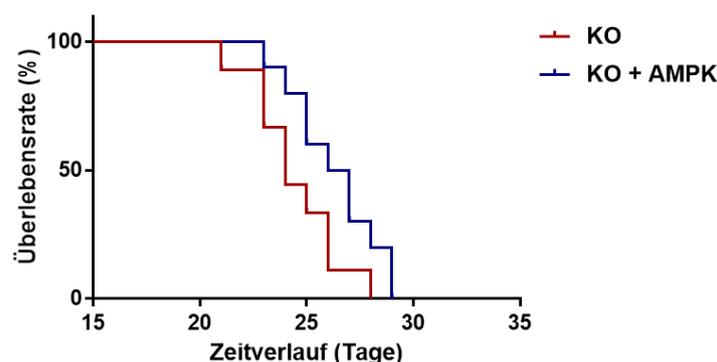


Abb. 35: Modifizierte Überlebenszeitfunktion für AMPK- α 2-S491A-infizierte Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen ab Beginn der iCMAKT1/2-KO-Induktion. Verglichen wurde die Zeit von Beginn der Induktion des iCMAKT1/2-KOs bis zum Erreichen von Abbruchkriterien. Dabei ist die prozentuale Überlebensrate bezogen auf die Gesamtanzahl der Tiere der jeweiligen Gruppe im Zeitverlauf dargestellt.

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere ($n = 10$); KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere ($n = 9$)

3.6.4 Expressionsnachweis transgener AMPK nach AAV9-Infektion

Um die Herzen der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere auf Transgenexpression hin zu untersuchen, erfolgte nach dem Tod der Tiere eine Proteinuntersuchung der Herzextrakte mittels Western Blot-Analyse. In der Untersuchung zum Nachweis transgener AMPK- α 2 über das c-Myc Tag zeigten die Herzextrakte der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere ein deutliches Signal bei ca. 62 kDa (Abb. 36). Dabei variierte die Intensität des detektierten Signals in den verschiedenen Herzextrakten. Die als Kontrollproben dienenden Herzextrakte eines wildtypischen, nicht-infizierten Tieres (Abb. 36 A) sowie nicht-infizierter Tiere mit iCMAKT1/2-KO (Abb. 36 B) exprimierten eines solchen Signals nicht. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Expression der transgenen AMPK- α 2 und seiner Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin 172 mit AMPK- α -spezifischen Antikörpern sowohl in Herzproben als auch in Leberproben (Abb. 37). Im Vergleich zu den Herzextrakten wildtypischer Tiere wurde in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Herzextrakten bei Untersuchung der Gesamtmenge an AMPK- α eine zusätzliche schwache Signalbande direkt oberhalb der Bande des endogenen AMPK- α -Signals festgestellt (Abb. 37 A). Auch bei Untersuchung der aktivierenden Phosphorylierung der AMPK- α -Aminosäure Threonin 172 ließ sich eine zusätzliche schwache Signalbande in den Herzextrakten der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere nachweisen (Abb. 37 D). Deutlicher waren die festgestellten Unterschiede bei Untersuchung der Leberproben der beiden Vergleichsgruppen. Hierbei wurden ebenfalls zusätzliche Signalbanden bezüglich der AMPK- α -Gesamtmenge und der Threonin-172-Phosphorylierung von AMPK- α oberhalb des endogenen Signals in den Leberproben der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere nachgewiesen (Abb. 37 B/E). Bei den dargestellten zusätzlichen Signalbanden handelt es sich vermutlich um die c-Myc Tag-markierte AMPK- α 2. Insgesamt war somit aufgrund der Expression der transgenen, c-Myc Tag-markierten AMPK- α 2 sowie dem Nachweis schwacher zusätzlicher Signalbanden bei Untersuchung der transgenen AMPK- α 2 und seiner Threonin-172-

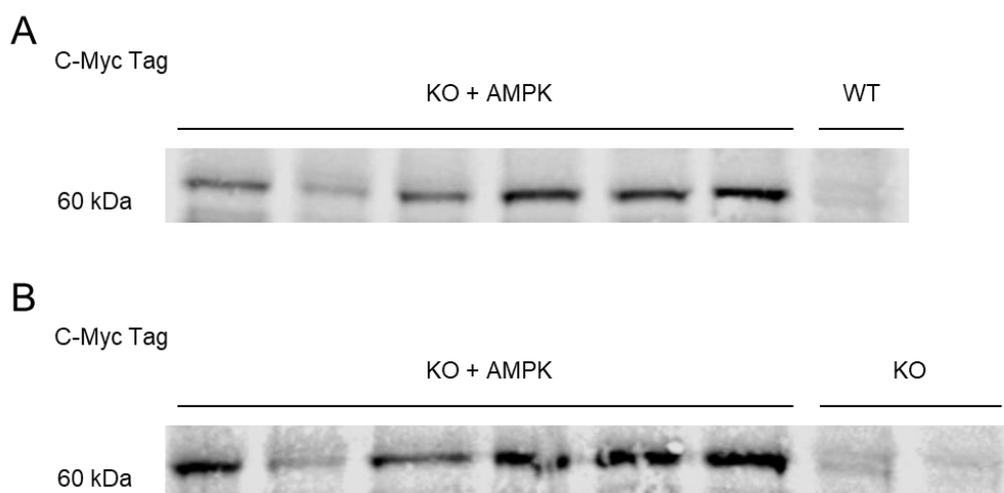


Abb. 36: Western Blot-Analyse der Herzextrakte AMPK- α 2-S491A-infizierter iCMAKT1/2-KO-Mäuse hinsichtlich des Signals der c-Myc Tag-markierten, transgenen AMPK- α 2.

A/B: Signale c-Myc Tag-markierter AMPK- α 2 (ca. 62 kDa)

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere; WT: wildtypisches, nicht-infiziertes Kontrolltier; KO: nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltiere

Phosphorylierung in den Herzextrakten AMPK- α 2-S491A-infizierter Tiere von einer erfolgreichen Infektion sowie einer Transgenexpression auszugehen. Aussagen über die Effizienz der Infektion waren jedoch nicht möglich; anhand des Vergleichs der Expression transgener und endogener AMPK- α kann sie jedoch als gering angesehen werden.

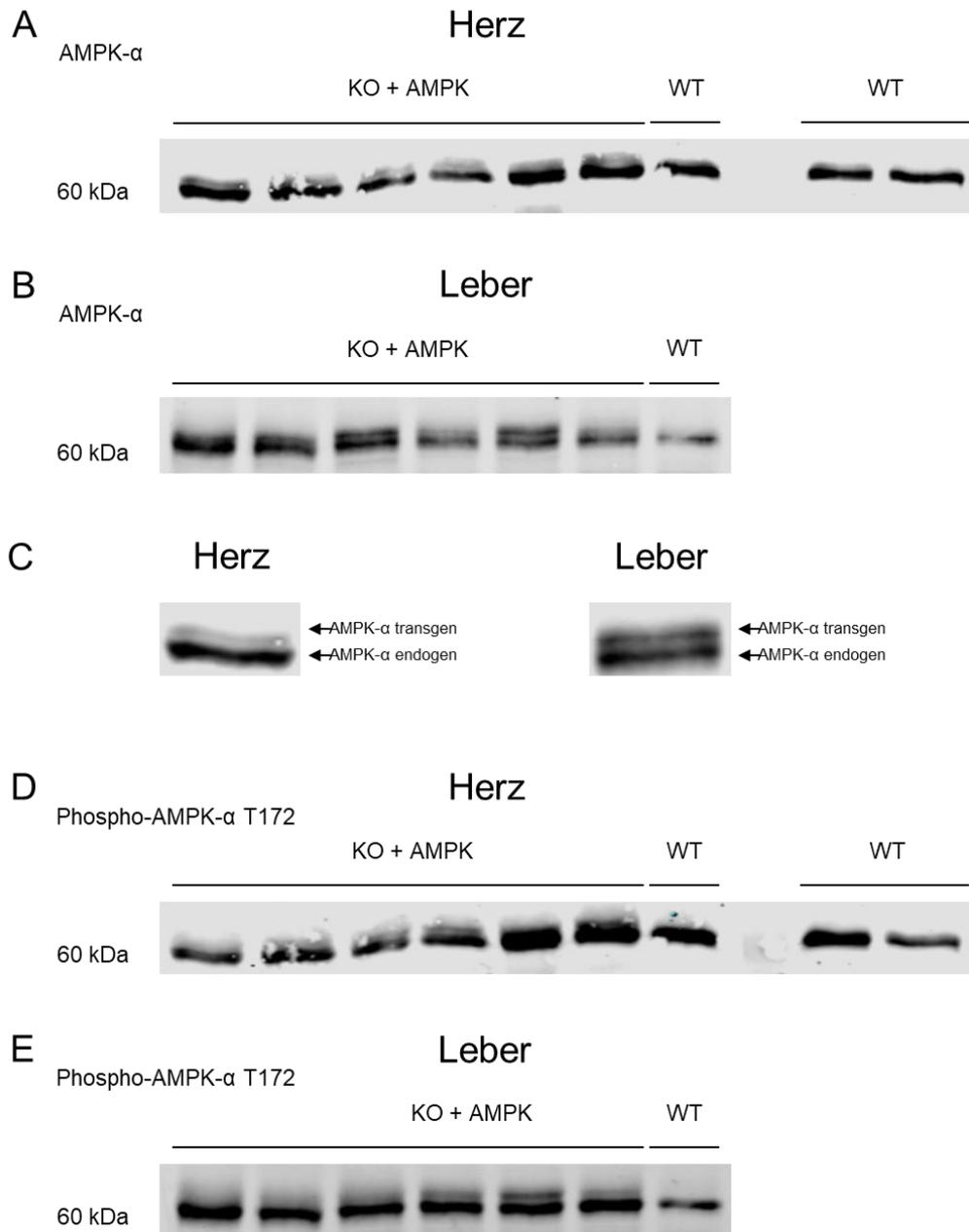


Abb. 37: Western Blot-Analyse der Herz- und Leberextrakte AMPK- α 2-S491A-infizierter iCMAKT1/2-KO-Mäuse hinsichtlich des AMPK- α -Gesamtsignals und des Threonin-172-Phosphorylierungsstatus von AMPK- α .

A/B: AMPK- α -Gesamtsignal (AMPK- α) in Herzproben/Leberproben (ca. 62 kDa + unmittelbar darüber transgene AMPK- α)

C: exemplarische Veranschaulichung der endogenen und transgenen AMPK- α -Signalbande an einer Herz- und einer Leberprobe eines AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieres

D/E: Threonin-172-Phosphorylierungsstatus der AMPK- α (Phospho-AMPK- α T172) in Herzproben/Leberproben (ca. 62 kDa + unmittelbar darüber transgene AMPK- α)

Abkürzungen: KO + AMPK: AMPK- α 2-S491A-infizierte iCMAKT1/2-KO-Tiere; WT: wildtypische, nicht-infizierte Kontrolltiere

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit gewonnenen wesentlichen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Expression einer konstitutiv aktiven Rheb-Variante sowie einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-Variante in einem AAV-Vektor konnte auf Zellkulturebene nachgewiesen werden
- Eine induzierbare Rheb-Expression konnte auf Zellkulturebene nicht erreicht werden
- Die Expression einer panFOXO shRNA in HEK293-Zellen führte zu einer moderaten Reduktion der FOXO3A-Expression
- Rheb Q64L-infizierte iCMAKT1/2-KO-Mäuse zeigten nur eine geringgradige Transgenexpression und keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kardialen Funktion und des Überlebens im Vergleich zur nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Kontrollgruppe
- Die kardiale AMPK- α 2-S491A-Expression führte in iCMAKT1/2-KO-Mäusen zu einer temporär verlangsamten Verschlechterung kardialer Funktionsparameter sowie zu einem moderaten Überlebensvorteil verglichen mit nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Kontrolltieren

Die Proteinkinase AKT übt über die Interaktion mit verschiedenen Signalmolekülen wichtige zelluläre Funktionen aus. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass AKT auch für den kardialen Metabolismus und die kardiale Funktion von entscheidender Bedeutung ist. So entwickeln Mäuse mit iCMAKT1/2-KO nach Induktion der Gendelektion eine kardiale Dysfunktion und weisen ein deutlich eingeschränktes Überleben auf (Gödecke et al., 2017). Es ist bisher jedoch unbekannt, welche stromabwärts im AKT-Signalweg liegenden Substrate wesentlich an den beobachteten Veränderungen des kardialen Phänotyps beteiligt sind. Die Verminderung der mTORC1-Aktivität könnte mit für die beobachtete kardiale Atrophie verantwortlich sein; auch die Zunahme der FOXO3A-Aktivität mit Stimulation der Autophagie könnte zum kardialen Phänotyp im iCMAKT1/2-KO-Modell beitragen. Weiterhin konnte in iCMAKT1/2-KO-Herzen gezeigt werden, dass der Energiesensor AMPK im Zeitverlauf trotz energetischer Verarmung zunehmend inhibitorisch phosphoryliert wurde (Gödecke et al., 2019). Es ist bisher jedoch unklar, inwiefern diese Beobachtung zum veränderten kardialen Phänotyp beiträgt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die mTORC1- bzw. AMPK-Aktivität in vivo wiederherzustellen, um so deren Bedeutung für den veränderten kardialen

Phänotyp im iCMAKT1/2-KO-Modell zu untersuchen. Dazu erfolgte zunächst die Charakterisierung geeigneter Plasmide zur mTORC1- bzw. AMPK-Aktivierung sowie zur Reduktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren in Zellkulturexperimenten. Daraufhin wurden iCMAKT1/2-KO-Mäuse ca. 4 Wochen vor Induktion des Knockouts mit viralen AAV9-Partikeln mit Expressionskassetten für konstitutiv aktives Rheb Q64L zur mTORC1-Aktivierung bzw. nicht-inaktivierbare AMPK- α 2-S491A infiziert. Im Zeitverlauf wurden die echokardiographisch ermittelte Herzfunktion sowie das Überleben mit nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen verglichen.

4.1 Bedeutung von Rheb im iCMAKT1/2-KO-Modell

Über den mTORC1-Signalweg vermittelt AKT die Förderung von zellulärem Wachstum (Manning and Cantley, 2007). Für iCMAKT1/2-KO-Mäuse wurde eine progrediente kardiale Atrophie mit Reduktion der Zellgröße nachgewiesen (Gödecke et al., 2017). Diese könnte durch Reduktion der mTORC1-Aktivität bedingt sein, da mTORC1 eine wichtige Funktion in der Kontrolle des zellulären Wachstums einnimmt (Manning and Cantley, 2007). Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch Wiederherstellung der mTORC1-Stimulation im iCMAKT1/2-KO-Modell dessen Beitrag zur Veränderung des kardialen Phänotyps zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Rheb mTORC1 über Bindung und Konformationsänderung allosterisch aktiviert (Yang et al., 2017). Daher wurde zur Untersuchung der Fragestellung eine Rheb Q64L-Mutante verwendet, die durch den Austausch der Aminosäure Glutamin an Position 64 durch Leucin zur Expression eines konstitutiv aktiven Rheb-Proteins führt (Inoki et al., 2003a). Der Vorteil bei Verwendung der Rheb Q64L-Mutante besteht in einer 2-3-fachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zur wildtypischen Rheb-Variante (Inoki et al., 2003a).

4.1.1 Wirkung der Rheb-Expression auf die mTORC1-Aktivität

Zunächst wurden Rheb-codierende Plasmide auf Zellkultureben charakterisiert. Mittels Western Blot-Analyse wurde eine deutliche Rheb-Überexpression in den transfizierten Zellen detektiert (Kapitel 3.1: Abb. 14). Es wurde eine Signalbande bei ca. 16 kDa detektiert, bei der es sich vermutlich um das endogene Rheb handelt. Die deutliche Bande bei 23 kDa entspricht dem transgenen Rheb und war vermutlich aufgrund der N-terminalen Fusion des c-Myc Tags an das Rheb-Protein größer als die des endogenen Rhebs. Auch zeigten die transfizierten Proben eine zusätzliche Bande bei ca. 20 kDa. Hierbei könnte es sich um eine verkürzte Variante des transgenen Rhebs handeln, die durch die Nutzung eines internen Methionins in der c-Myc Tag-Sequenz als Startcodon der Translation erklärbar ist.

Es ist bekannt, dass es über den mTORC1-Signalweg zur Aktivierung der stromabwärts liegenden Zielmoleküle p70S6K und 4EBP1 kommt (Burnett et al., 1998, Brunn et al., 1997). Die in der Western Blot-Analyse gezeigten Phospho-p70S6K- und Phospho-4EBP1-Signalverstärkungen deuteten darauf hin, dass die Expression einer transgenen Rheb-Variante zur vermehrten Phosphorylierung der Proteine p70S6K oder 4EBP1 führte (Kapitel 3.1: Abb. 15). Somit war davon auszugehen, dass die verwendeten

transgenen Rheb-Varianten funktionsfähig sind und dass es durch deren Expression zu einer effektiven Stimulation des mTORC1-Signalweges mit anschließender Phosphorylierung von stromabwärts liegenden Effektoren kommt. Zudem wurde sichtbar, dass die Rheb Q64L-Variante zu einer stärkeren Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K und 4EBP1 führte als die wildtypische Rheb-Variante.

4.1.2 Untersuchung der induzierbaren Rheb-Expression

Auf Grundlage der vorherigen Ergebnisse wurde das Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ mit AAV9-Hintergrund konstruiert, das der Erzeugung viraler AAV9-Partikel für das Tiermodell dienen sollte. Zudem sollte dadurch eine induzierbare Rheb Q64L-Expression ermöglicht werden. Dabei kommt in der Theorie der CMV-Promotor erst nach Expression einer kardiomyozytenspezifischen, Tamoxifen-abhängigen Cre-Rekombinase und der darauffolgenden Exzision des GFP-Gens vor dem Rheb Q64L-Gen zu liegen, was schließlich zur Expression des Rheb Q64L-Transgens führt (Abb. 38). Die induzierbare Expression eines Rheb-Gens bietet den Vorteil, dass bei Verwendung viraler AAV9-Partikel auf Grundlage dieses Plasmids im Tiermodell die Expression des Rheb Q64L-Gens in den infizierten Tieren aktiv durch die Injektion von Tamoxifen gesteuert werden kann. Die Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase soll somit neben der Induktion des iCMAKT1/2-KOs auch zur Expression des Rheb Q64L-Gens führen. Durch diese gezielte Steuerung sollen Effekte einer vorzeitigen Expression des Rheb Q64L-Gens vor dem Knockout der AKT-1/2-Sequenzen verhindert werden. Obwohl AAV des Serotyps 9 einen erhöhten kardialen Tropismus aufweisen, findet auch eine Infektion anderer Zelltypen, vor allem in der Leber, statt (Zincarelli et al., 2008). Die Expression des Rheb Q64L-Gens außerhalb des Herzens kann somit durch die Kardiomyozytenspezifität der Cre-Rekombinase, bedingt durch die Verwendung eines α -MHC-Promotors (Sohal et al., 2001), verhindert werden.

pAAV-flGFP-Rheb Q64L:



Abb. 38: Darstellung der Strukturen innerhalb der AAV2 ITR-Sequenzen des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“. Zur Veranschaulichung des diskutierten Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ sind dessen Strukturen innerhalb der AAV2 ITR-Sequenzen noch einmal abgebildet. Die ausführliche Darstellung der abgebildeten Strukturen und Abkürzungen erfolgt in Kapitel 2.9.2.

Zunächst wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch auf Western Blot-Ebene eine erfolgreiche GFP-Expression nach Transfektion des Plasmids in HEK293-Zellen nachgewiesen (Kapitel 3.2.1: Abb. 17 + Abb. 18). Das reduzierte GFP-Signal bei Koexpression einer Cre-Rekombinase zeigte zudem eine erfolgreiche Exzision der mit loxP-Sequenzen flankierten GFP-Expressionskassette. Anschließend konnte jedoch nicht wie erwartet eine Zunahme der Rheb-Expression nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.1: Abb. 18).

Folgend wurde die Rekombination näher untersucht, um eine Ursache für die ausbleibende Zunahme der Rheb-Expression innerhalb dieses Vorgangs zu finden. Eine Hypothese bestand darin, dass die verbleibende loxP-Sequenz zwischen CMV-Promotor und Rheb Q64L-Gen die transgene Rheb-Expression behindert. Daher erfolgte, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, eine Behandlung des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ in vitro mit einer Cre-Rekombinase, wodurch die Exzision der GFP-Expressions-kassette inklusive einer loxP-Sequenz bereits vor Transfektionsbeginn stattfand. Im Vergleich zum Plasmid „Rheb Q64L“, für das bereits zuvor eine erfolgreiche Expression transgenen Rhebs gezeigt werden konnte, vermittelte das so erzeugte Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ jedoch sowohl eine ähnliche Expressionsstärke für das transgene Rheb-Signal als auch einen ähnlichen Phosphorylierungsstatus für das Phospho-T389-p70S6K-Signal (Kapitel 3.2.2: Abb. 19). Es war somit davon auszugehen, dass die nach Exzision des GFP-Gens verbliebene loxP-Sequenz keinen Einfluss auf die Expression des Rheb Q64L-Gens hat.

Eine weitere mögliche Ursache für die beobachtete fehlende vermehrte Rheb-Expression nach Exzision der GFP-Expressions-kassette in vivo bestand darin, dass die Interaktion der verbliebenen loxP-Stelle mit einer Cre-Rekombinase im Sinne einer Rekombination zwischen Plasmid-Einzelmolekülen die Rheb-Expression beeinflusst. Jedoch wurde in der in Kapitel 3.2.3 (Abb. 20) beschriebenen Western Blot-Analyse nachgewiesen, dass das Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ in Doppeltransfektion mit dem „PGK-Cre“-Plasmid zu einer mindestens ähnlich starken transgenen Rheb-Expression führte wie mit dem Kontrollplasmid „DS-Red“. Die beobachtete vermehrte Expression transgenen Rhebs bei Doppeltransfektion der Plasmide „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ und „PGK-Cre“ im Vergleich zur Doppeltransfektion von „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ und „DS-Red“ beruhte am ehesten auf einer erhöhten Variabilität aufgrund der nur einmaligen Durchführung der Western Blot-Analyse. Eine Interaktion zwischen der verbleibenden loxP-Sequenz und einer in vivo exprimierten Cre-Rekombinase schien somit ebenfalls nicht als Ursache für die geringe Expression im „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“-Transfektionsversuch in Frage zu kommen.

Insgesamt wurde somit festgestellt, dass die verbleibende loxP-Sequenz nach erfolgreicher GFP-Exzision durch die Cre-Rekombinase nicht zu einer Behinderung der Expression des Rheb Q64L-Gens führte und diese zudem vermutlich nicht mit der in vivo exprimierten Cre-Rekombinase im Sinne einer Rekombination zwischen Plasmid-Einzelmolekülen interagiert.

Das Grundkonstrukt zur induzierbaren Expression eines Transgens basiert auf dem Plasmid „pSico“, welches die induzierbare Expression einer shRNA erlaubt. Dabei wird die shRNA-Expression durch die Cre-vermittelte Exzision einer GFP-Expressions-kassette ermöglicht (Ventura et al., 2004). Ventura et al. nutzten dieses Plasmid, um eine p53-shRNA zu exprimieren. Eine Woche nach zusätzlicher Expression einer Cre-Rekombinase konnten die Autoren eine deutliche Zunahme der Expression der induzierten p53-shRNA nachweisen. In Proben ohne zusätzliche Expression der

Cre-Rekombinase konnte hingegen keine p53-shRNA-Expression nachgewiesen werden. Eine Behinderung der Expression durch die verbleibende loxP-Stelle wurde nicht beschrieben, was sich mit den Erkenntnissen in dieser Arbeit deckt (Ventura et al., 2004). Da somit eine Ursache für die fehlende vermehrte Expression des Rheb Q64L-Gens innerhalb der Plasmidstruktur nicht in Frage kommt, scheint die Ursache vermutlich im Prozess der Aktivierung der Cre-Rekombinase und der Exzision des GFP-Gens innerhalb der Zellen zu liegen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Untersuchung des Plasmids „pSico“ und des Plasmids „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ in dieser Arbeit besteht im Einbringen des Plasmids in die Zelle. Während von Ventura et al. Lentiviren auf Grundlage des Plasmids „pSico“ generiert wurden (Ventura et al., 2004), wurde das Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ in dieser Arbeit mittels transienter Transfektion auf Zellkulturebene untersucht. Zudem erfolgte durch Ventura et al. die Überexpression einer Cre-Rekombinase mittels adenoviraler Superinfektion (Ventura et al., 2004); in dieser Arbeit wurde die Cre-Rekombinase mittels Co-Transfektion in die Zelle eingebracht. Eine mögliche Ursache für die fehlende vermehrte Rheb-Expression nach Cre-induzierter Exzision der GFP-Expressions-kassette in dieser Arbeit könnte somit darin bestehen, dass aufgrund einer sehr hohen Transfektionseffizienz viele Plasmidkopien pro Zelle aufgenommen wurden. Nach Exzision der GFP-Kassette durch die Cre-Rekombinase könnte es dabei zu intermolekularer Rekombination zwischen mehreren der zu diesem Zeitpunkt an den loxP-Sequenzen geöffneten Plasmiden gekommen sein, wodurch die Expression eines Rheb Q64L-Produktes durch Konkatemerbildung in einem Großteil der Zellen verhindert wurde.

Für den zellulären Aufnahmemechanismus von AAV ist beschrieben, dass es innerhalb des Zellkerns durch Rekombinationsereignisse neben einer intramolekularen Zirkularisierung der AAV-Genome auch zur Bildung intermolekularer Konkatemere kommen kann (Choi et al., 2005). Da somit auch im Rahmen der AAV-Infektion mehrere Genome in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind und teilweise sogar eine Verbindung miteinander eingehen, könnten auch in diesem Kontext Fehlverknüpfungen zwischen verschiedenen, an loxP-Sequenzen geöffneten Genomen möglich sein. Letztendlich blieb die genaue Ursache für die ausbleibende Zunahme der Rheb-Expression nach Cre-vermittelter Exzision der GFP-Expressions-kassette ungeklärt.

Eine weitere beobachtete Einschränkung bestand darin, dass bereits vor Exzision der GFP-Expressions-kassette durch eine Cre-Rekombinase transgenes Rheb in geringer Menge exprimiert wurde, auch wenn durch die Expression keine vermehrte Phosphorylierung der p70S6K nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2.1: Abb. 18). Eine Ursache hierfür könnte ein interner Neustart der Translation durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle sein.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse auf Zellkulturebene sowie der Hypothese einer möglichen Fehlverknüpfung von Plasmiden wurde abschließend auf die theoretischen Vorteile der induzierbaren Rheb Q64L-Expression durch AAV9-vermittelten Gentransfer verzichtet.

4.1.3 Untersuchung einer Rheb Q64L-Mutante zur AAV9-Erzeugung

Das anschließend konstruierte Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ enthielt ein Rheb Q64L-Gen direkt stromabwärts des CMV-Promotors und zeigte eine ähnlich starke Expression transgenen Rhebs wie das zuvor untersuchte Plasmid „pAAV-loxP-Rheb Q64L“ (Kapitel 3.2.3: Abb. 20). Das Plasmid „pAAV-Rheb Q64L“ führt in der Theorie direkt nach Transfektion bzw. im Tiermodell nach Infektion durch virale AAV9-Partikel zu einer Expression von Rheb Q64L. Der Nachteil dieser Variante besteht darin, dass der Zeitpunkt der Expression nicht kontrolliert werden kann. Auch kann die Expression nicht kardiomyozytenspezifisch erfolgen, da die Cre-Rekombinase, deren Kardiomyozytenspezifität durch die Verwendung eines α -MHC-Promotors bedingt ist (Sohal et al., 2001), nicht wie bei dem Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ für die Expression des Rheb Q64L-Gens notwendig ist. Nachteilige Effekte einer Expression in anderen Organsystemen wie der Leber mit Beeinflussung der untersuchten Parameter, beispielsweise dem Überlebensvergleich, können in adulten Mäusen somit nicht ausgeschlossen werden. Unter physiologischen Bedingungen ist Rheb über die Aktivierung des mTORC1-Signalweges an der Förderung von zellulärem Wachstum beteiligt (Inoki et al., 2003a). Jedoch verfügt die konstitutiv aktive Rheb Q64L-Variante auch über eine onkogene Wirkung (Jiang and Vogt, 2008). In verschiedenen Tumorgeweben war eine Überexpression von Rheb festzustellen (Lu et al., 2010, Kobayashi et al., 2010, Liu et al., 2018).

Durch die Verwendung von AAV des Serotyps 9 sowie eines CMV-Promotors in dieser Arbeit konnte jedoch eine gewisse Präferenz für eine bevorzugte Transgenexpression in Mausherzen erwartet werden. Die Infektion mit AAV des Serotyps 9 führt zu einer breiten Verteilung des Vektorgenoms mit Bevorzugung von Herz und Leber (Zincarelli et al., 2008). Dabei führen AAV9 in murinen Herzen im Vergleich zu anderen Serotypen zur effizientesten Transgenexpression (Pacak et al., 2006, Zincarelli et al., 2008, Prasad et al., 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich bei Verwendung von AAV9 zur Expression eines GFP-Gens unter Kontrolle eines CMV-Promotors die deutlichste GFP-Expression in Mausherzen identifizieren ließ, obwohl die höchste Kopienzahl an AAV-DNA in der Leber detektiert werden konnte (Chen et al., 2015). Zudem konnte beobachtet werden, dass in vielen Organen außer Herz, Leber, Pankreas und Skelettmuskel trotz erfolgreicher AAV9-Infektion keine ausreichende Menge des Transgens exprimiert wurde (Inagaki et al., 2006). Folglich wurden virale AAV9-Partikel auf Grundlage des Plasmids „pAAV-Rheb Q64L“ für die Untersuchungen in adulten Mäusen generiert.

4.1.4 Wiederherstellung der Rheb-Funktion in iCMAKT1/2-KO-Mäusen

Um einen Effekt der Rheb Q64L-Variante zu analysieren, erfolgte ca. 4 Wochen nach AAV9-Infektion die Induktion des iCMAKT1/2-KOs sowohl in den infizierten Tieren als auch in der Kontrollgruppe. Die Analyse des kardialen Phänotyps nach Infektion mit diesen AAV9-Partikeln zur Wiederherstellung der Rheb-Funktion erfolgte mithilfe einer echokardiographischen Untersuchung und einer modifizierten Überlebensanalyse im Vergleich zu nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tieren. Da bereits gezeigt wurde, dass

wildtypische Mäuse, die mit AAV der Serotypen 1-9 mit Fähigkeit zur Expression eines Luciferase-Transgens infiziert wurden, keine Veränderungen bezüglich kardialer Funktion und Wanddicke im Zeitverlauf über 100 Tage nach erfolgter AAV-Infektion aufwiesen (Zincarelli et al., 2008), wurden wildtypische Tiere nicht in die Analyse einbezogen.

In der echokardiographischen Funktionsanalyse wurden im Zeitverlauf sowohl in den Rheb Q64L-infizierten Tieren als auch in den nicht-infizierten Kontrolltieren signifikante Verschlechterungen beobachtet (Kapitel 3.5.1: Abb. 24-26). Dabei waren die kardialen Funktionsparameter wie Ejektionsfraktion, Schlagvolumen und Herzzeitvolumen im Zeitverlauf vermindert, was auf eine funktionelle Beeinträchtigung der iCMAKT1/2-KO-Herzen hindeutet. Die deutliche Zunahme des endsystolischen Volumens sprach für eine Kontraktilitätseinschränkung des linken Ventrikels. Die kontinuierliche Abnahme der Wanddicken, des Herzgewichtes und der HW/BW *ratio* im Zeitverlauf waren Hinweise auf eine kardiale Atrophie. Insgesamt wurde somit im Zeitverlauf das Bild einer zunehmenden Herzinsuffizienz beobachtet. Diese entsprach den zuvor beobachteten Veränderungen bei der durch kardiale AKT-1/2-Deletion induzierten Herzinsuffizienz (Gödecke et al., 2017).

Die ähnlichen Ausgangswerte der untersuchten kardialen Parameter von infizierten und nicht-infizierten Tieren an Tag 0 vor iCMAKT1/2-KO-Induktion wiesen darauf hin, dass allein das Einbringen der Rheb Q64L-Variante in die murinen Herzen zu keiner Beeinflussung des kardialen Phänotyps führte. Auch konnte im weiteren Zeitverlauf kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der untersuchten Parameter festgestellt werden. Zur Überprüfung der erhobenen Parameter auf eine Interaktion im Sinne eines zeitabhängigen Gruppeneffektes erfolgte eine Untersuchung von Tag 0 vs. Tag 14 für die kardialen Funktionsparameter, das Herzgewicht und die HW/BW *ratio* sowie von Tag 0 vs. Tag 14 bzw. Tag 0 vs. Tag 21 für die kardiale Wanddicke und den innerventrikulären Durchmesser. Unter Durchführung einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung konnten dabei keine signifikanten Interaktionen festgestellt werden (Anhang: Tabellen 22-24). Zudem zeigten die Rheb Q64L-infizierten Tiere keinen Überlebensvorteil verglichen mit den nicht-infizierten Kontrolltieren (Kapitel 3.5.2: Abb. 27).

In einer Untersuchung der kardialen Rheb-Expression auf Western Blot-Ebene mit einem Rheb-Antikörper konnten weder für endogenes Rheb noch für transgenes Rheb eindeutige Signale nachgewiesen werden. Auch mit einem Antikörper gegen das c-Myc Tag konnte in infizierten Herzen kein transgenes Rheb detektiert werden. In der in dieser Arbeit daher durchgeführten qPCR-Untersuchung zum Nachweis einer transgenen Rheb-Expression in Rheb Q64L-infizierten Herzen wies die Transkriptmenge transgenen Rhebs nur einen geringen Anteil von durchschnittlich 3,05 % an der Rheb-Gesamttranskriptmenge auf (Kapitel 3.5.3: Abb. 28). Die geringe Expression ließ darauf schließen, dass nur relativ wenige Kardiomyozyten infiziert wurden. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten blieb somit insgesamt unklar, ob die Expression transgenen

Rheb in iCMAKT1/2-KO-Mäusen für den kardialen Phänotyp unerheblich ist oder ob die Expression transgenen Rhebs nicht ausreichend hoch war, um den kardialen Phänotyp zu beeinflussen.

Es ist bereits Wissen über verschiedene mTORC1-vermittelte kardiale Funktionen vorhanden. So entwickelten Mäuse mit kardialem mTORC1-Defekt eine dilatative Kardiomyopathie und verstarben vorzeitig (Zhang et al., 2010). Auch konnte nachgewiesen werden, dass über den mTORC1-Signalweg, der zuvor über Rheb aktiviert wurde, das zelluläre Wachstum von Rattenkardiomyozyten gefördert wird (Wang et al., 2008). Zudem war die mTORC1-Aktivität bei physiologischer kardialer Hypertrophie gesteigert (Kemi et al., 2008). Anhand der vorhandenen Literatur, in der zahlreiche kardiale mTORC1-Wirkungen beschrieben wurden, ist eigentlich zu erwarten, dass eine ausreichende Stimulation des mTORC1-Signalweges in iCMAKT1/2-KO-Mäusen zur Beeinflussung des kardialen Phänotyps führen würde.

4.2 Untersuchung der Wirksamkeit einer panFOXO shRNA

Durch AKT phosphorylierte FOXO-Transkriptionsfaktoren assoziieren mit 14-3-3-Proteinen und sind im Zytoplasma lokalisiert. FOXO-Transkriptionsfaktoren im nicht-phosphorylierten Zustand können hingegen im Zellkern die Transkription ihrer Zielgene fördern (Brunet et al., 1999). Auch in iCMAKT1/2-KO-Mäusen wurden FOXO3A-Transkriptionsfaktoren vermehrt im Zellkern von Kardiomyozyten nachgewiesen. Zudem war die Transkription von FOXO3A-Zielgenen, die die zelluläre Autophagie fördern, gesteigert (Gödecke et al., 2017), was zur kardialen Atrophie der iCMAKT1/2-KO-Mäuse beitragen könnte. Um die Bedeutung dieser Beobachtungen für die progrediente Herzinsuffizienz im iCMAKT1/2-KO-Modell zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit die FOXO-Menge mithilfe einer panFOXO shRNA gegen FOXO1- und FOXO3A-mRNA wieder reduziert werden (Hribal et al., 2003, Renault et al., 2011). Zur Expression der panFOXO shRNA wurde zunächst ein Plasmid („pAAV-flGFP-panFOXO shRNA“) konstruiert, das eine Cre-abhängige Expression dieser shRNA erlauben sollte (Kapitel 2.9.3: Tabelle 13 bzw. Abb. 8). Die Grundkonstrukte zur induzierbaren Expression von Rheb im Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ und einer panFOXO shRNA im Plasmid „pAAV-flGFP-FOXO shRNA“ sind identisch. Da im Laufe der Untersuchung die Induktion der Rheb-Expression im Plasmid „pAAV-flGFP-Rheb Q64L“ (Kapitel 3.2) Probleme aufwarf, wurde auf die induzierbare Expression der panFOXO shRNA verzichtet. Daher wurde auch in diesem Fall die Konstruktion weiterer Plasmide ohne induzierbaren Aktivierungsmechanismus notwendig (Kapitel 2.9.3: Tabelle 13 bzw. Abb. 9).

Diese Plasmide wurden, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, auf ihre Effektivität bezüglich der Reduktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren hin untersucht. Da die Zielsequenz der panFOXO shRNA in Mäusen und Menschen identisch ist, erfolgte die Charakterisierung zunächst in den sehr gut transfizierbaren HEK293-Zellen. Aufgrund der durchgeführten FACS-basierten Zellsortierung waren in der anschließenden Western Blot-Analyse alle untersuchten HEK293-Zellen transfiziert. Unter diesen optimalen Bedingungen führte die Transfektion des Plasmids „pSicoR-hU6-panFOXO shRNA“ zu einer maximalen

Reduktion der FOXO3A-Expression von 47 %, bei Transfektion des Plasmids „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ wurde eine Maximalreduktion von 65,8 % erreicht (Kapitel 3.3: Abb. 21). Somit war insgesamt unter den Bedingungen einer erfolgreichen Plasmid-Transfektion aller Zellen von einer moderaten Reduktion der FOXO3A-Expression auszugehen.

Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund der hohen Transfektionseffizienz vermutlich jeweils mehrere Plasmid-Kopien in einer Zelle aufgenommen wurden. Bei Verwendung von AAV-Vektoren in vivo ist jedoch von einer deutlich geringeren Infektionseffizienz auszugehen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression einer panFOXO shRNA nach AAV9-Infektion in murinen Kardiomyozyten zu einer Reduktion der FOXO3A-Proteinmenge um ca. 61 % und der FOXO1-Proteinmenge um ca. 49,5 % führte (Auguste et al., 2018). Dabei erfolgte die AAV-Infektion in neugeborenen Tieren seriell am 2., 4. und 6. Tag postnatal (Auguste et al., 2018). In dieser Arbeit sollten hingegen 7-8 Wochen alte Tiere verwendet werden. Die AAV-vermittelte Transduktionseffizienz in Mausherzen scheint zwar altersunabhängig zu sein (Bostick et al., 2007). Allerdings kann nach Auguste et al. die Transduktionseffizienz durch serielle Injektion vor Erlangen einer vollständigen Immunkompetenz gesteigert werden (Auguste et al., 2018). Die serielle Injektion von AAV9 in neugeborenen Tieren könnte somit eine Ursache für die starke Reduktion der FOXO-Expression darstellen. Da in adulten Mäusen nicht von einer nahezu vollständigen Infektion aller Kardiomyozyten ausgegangen werden konnte und die Effizienz der panFOXO shRNA zur Reduktion von FOXO-Transkriptionsfaktoren unter diesen Bedingungen nicht vollständig klar war, wurde abschließend auf die Erzeugung viraler AAV9-Partikel auf Grundlage des Plasmids „pSicoR-mU6-panFOXO shRNA“ zur FOXO-Expressionsreduktion im iCMAKT1/2-KO-Modell verzichtet.

4.3 Bedeutung von AMPK im iCMAKT1/2-KO-Modell

Die Aktivierung der AMPK spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Energiemangel (Towler and Hardie, 2007). Ein erhöhter intrazellulärer AMP-Spiegel trägt zur Aktivierung der AMPK über direkte allosterische Aktivierung und Regulierung der Threonin-172-Phosphorylierung bei (Sanders et al., 2007). Die aktivierte AMPK stimuliert katabole Signalwege zur Bereitstellung von ATP und inhibiert anabole Signalwege mit ATP-Verbrauch (Hardie, 2007). Die progrediente Herzinsuffizienz in iCMAKT1/2-KO-Mäusen ging mit einer zunehmenden energetischen Depletion nach Knockout-Induktion einher. Erstaunlicherweise konnte eine vermehrte inhibitorische Serin-485-Phosphorylierung der α 1-Untereinheit bzw. Serin-491-Phosphorylierung der α 2-Untereinheit der AMPK nachgewiesen werden (Woods et al., 2003, Gödecke et al., 2019). Dies legte den Schluss nahe, dass die Inhibition der AMPK eine Aktivierung kataboler Stoffwechselwege verhindert und somit zur energetischen Depletion der AKT1/2-defizienten Herzen beitrug. Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand daher darin, die Bedeutung dieser Veränderung für den beobachteten kardialen Phänotyp zu untersuchen. Dies sollte durch Wiederherstellung der AMPK-Aktivität in iCMAKT1/2-KO-

Mäusen mithilfe der Expression einer nicht-inaktivierbaren, phosphodefekten AMPK- α 2-S491A-Variante erfolgen.

4.3.1 Charakterisierung einer AMPK- α 2-S491A-Mutante zur AAV9- Erzeugung

Zunächst wurde ein AAV-Expressionsvektor zur Expression einer nicht-inaktivierbaren AMPK- α 2-S491A-Variante konstruiert und auf Zellkulturebene untersucht. Durch den Austausch der Aminosäure Serin an Position 491 durch Alanin wird eine nicht durch inhibitorische Phosphorylierung inaktivierbare Proteinvariante erzeugt (Coughlan et al., 2016). Dazu wurde die AMPK- α 2-Isoform gewählt, da diese in Mausherzen die dominante Isoform gegenüber der α 1-Isoform darstellt (Stapleton et al., 1996). Nach Transfektion des Plasmids „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ in HEK293-Zellen wurde auf Western Blot-Ebene eine deutlich vermehrte AMPK- α -Expression nachgewiesen. Zudem wurde eine vermehrte Threonin-172-Phosphorylierung, jedoch keine gesteigerte Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α festgestellt (Kapitel 3.4: Abb. 22 + Abb. 23). Es ist bekannt, dass über die Phosphorylierung der AMPK-Aminosäure Threonin 172 eine AMPK-Aktivierung erreicht wird (Hawley et al., 1996, Mitchelhill et al., 1997). Eine Phosphorylierung der Aminosäure Serin 485/491 vermittelt hingegen eine Inhibition der AMPK-Aktivität (Kovacic et al., 2003, Horman et al., 2006). Somit zeigte sich, dass nach Transfektion des Plasmids „pAAV-AMPK- α 2 S491A“ trotz der Zunahme Threonin-172-phosphorylierter AMPK- α die Menge an Serin-491-phosphorylierter, inaktiver AMPK- α nicht erhöht war. Dies spricht dafür, dass die exprimierte AMPK- α 2-S491A-Variante tatsächlich nicht durch Phosphorylierung inaktivierbar ist.

Aktivierte AMPK stimuliert katabole Prozesse wie die Verstoffwechslung von Glukose und Fettsäuren zur Produktion von ATP und hemmt anabole Stoffwechselwege mit hohem ATP-Verbrauch wie die Neusynthese von Fettsäuren oder Glykogen (Hardie, 2007). So spielt die α 2-Isoform der AMPK beispielsweise eine wichtige Rolle in der Regulation der hepatischen Glukoseproduktion (Andreelli et al., 2006). Die kurzzeitige hepatische Expression einer konstitutiv aktiven AMPK- α 2-Variante führte zu einer Reduktion der Blutglukosekonzentration und der Glykogensynthese sowie der Akkumulation von Lipiden. Andererseits erfolgte eine vermehrte Fettsäureoxidation und die Synthese von Ketonkörpern in der Leber (Foretz et al., 2005). Prinzipiell könnten die hier genannten Veränderungen des Leberstoffwechsels auch bei der AAV9-Infektion zur Expression der AMPK- α 2-S491A-Variante in den iCMAKT1/2-KO-Mäusen eintreten, da eine virale Infektion und Transgenexpression anderer Zielorgane nicht ausgeschlossen werden konnte. Zu beachten ist jedoch, dass in dieser Arbeit eine nicht-inaktivierbare Variante der AMPK- α 2 verwendet wurde und nicht wie in der angegebenen Literatur eine konstitutiv aktive Variante (Foretz et al., 2005). Auch konnte über die Verwendung von AAV des Serotyps 9 sowie des CMV-Promotors eine gewisse Bevorzugung der kardialen Expression erreicht werden (Chen et al., 2015) (Kapitel 4.1.3).

4.3.2 Untersuchung der Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α im murinen iCMAKT1/2-KO-Modell

In vorherigen Untersuchungen kam es in den Herzen von Mäusen mit iCMAKT1/2-KO trotz zunehmender energetischer Verarmung an Tag 14 und Tag 21 nach Knockout-Induktion zu einer vermehrten inhibitorischen Serin-485/491-Phosphorylierung der AMPK- α (Gödecke et al., 2019). Im Gegensatz dazu konnte eine AMPK-Aktivierung in anderen kardialen Stresssituationen mit verändertem Metabolismus wie der Hypertrophie durch Drucküberlastung oder der kardialen Ischämie gezeigt werden (Tian et al., 2001, Kim et al., 2012, Kudo et al., 1995). Daher wurde auch in dieser Arbeit zunächst der Phosphorylierungsstatus der AMPK-Aminosäure Serin 485/491 in iCMAKT1/2-KO-Herzen 21 Tage nach Knockout-Induktion untersucht (Kapitel 3.6.1: Abb. 29). Der Befund einer vermehrten Serin-485/491-Phosphorylierung in den iCMAKT1/2-KO-Herzen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollherzen konnte dabei reproduziert werden.

Es ist bekannt, dass AKT über eine Phosphorylierung der Aminosäure Serin 485/491 zu einer reduzierten Threonin-172-Phosphorylierung durch die Kinase LKB1 und so zu einer Verminderung der AMPK-Aktivität führt (Kovacic et al., 2003, Horman et al., 2006). Jedoch liegt in dieser Arbeit die Situation eines Knockouts der Isoformen AKT-1 und AKT-2 vor, welche kardial bevorzugt exprimiert werden (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Da zudem gezeigt werden konnte, dass im iCMAKT1/2-KO-Modell auch AKT-3 nicht kompensatorisch vermehrt exprimiert wird (Gödecke et al., 2017), scheint AKT nicht für die beobachtete Serin-485/491-Phosphorylierung verantwortlich zu sein.

Es sind jedoch noch weitere Kinasen bekannt, die AMPK- α an der Aminosäure Serin 485/491 phosphorylieren können. So fördert PKD-1 (*protein kinase D1*) in Skelettmuskelzellen eine inhibitorische Phosphorylierung der AMPK- α 2 an der Aminosäure Serin 491 (Coughlan et al., 2016). Es wurde eine vermehrte Expression sowie eine Aktivitätssteigerung von PKD-1 im Rahmen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen (Bossuyt et al., 2008). Ob die in iCMAKT1/2-KO-Mäusen ausgelöste Herzinsuffizienz mit vermehrter PKD-1-Aktivität und folgender AMPK-Serin-485/491-Phosphorylierung einhergeht, ist derzeit nicht bekannt. Weiterhin wurde im Hypothalamus p70S6K als Signalmolekül identifiziert, das die inhibitorische Serin-491-Phosphorylierung der AMPK- α 2-Untereinheit vermittelt (Dagon et al., 2012). AMPK wird zudem an der Aminosäure Serin 485 in Makrophagen-ähnlichen Zellen durch IKK β und in reifen dendritischen Zellen MEK-1/2-ERK-1/2-abhängig phosphoryliert (Park et al., 2014, Lopez-Cotarelo et al., 2015). Eine Serin-485/491-Phosphorylierung über die Proteinkinase A konnte ebenfalls gezeigt werden (Hurley et al., 2006). Auch wenn unklar bleibt, über welche Kinase die vermehrte Phosphorylierung an Tag 21 nach Knockout-Induktion erfolgte, verdeutlichten diese Ergebnisse, dass die Expression einer nicht-inaktivierbaren, phosphodefekten AMPK- α 2-Variante zur Wiederherstellung der AMPK-Aktivität im iCMAKT1/2-KO-Modell führen könnte.

4.3.3 Wiederherstellung der AMPK-Aktivität in iCMAKT1/2-KO-Mäusen

Nach der Charakterisierung der AMPK- α 2-S491A-Mutante in Zellen erfolgte die Infektion von iCMAKT1/2-KO-Mäusen mit viralen AAV9-Partikeln. Eine echokardiographische Untersuchung des kardialen Phänotyps im Zeitverlauf sowie eine modifizierte Überlebensanalyse erfolgten im Vergleich zu nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Tieren.

Die echokardiographische Funktionsanalyse zeigte weder vier bzw. zwei Wochen vor Induktion des Knockouts (Stefanie Gödecke und André Heinen, persönliche Mitteilung, 2020) noch an Tag 0 unmittelbar vor Knockout-Induktion für einen der untersuchten Funktionsparameter einen signifikanten Unterschied zwischen AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren und nicht-infizierten Kontrolltieren. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass allein die AMPK- α 2-S491A-Infektion nicht zur Veränderung der kardialen Funktion vor Knockout-Induktion führte.

Nach Tamoxifen-Injektion zur Induktion des iCMAKT1/2-KOs konnte im Zeitverlauf eine signifikante Verschlechterung in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren und den nicht-infizierten Kontrolltieren nachgewiesen werden (Kapitel 3.6.2: Abb. 30 + Abb. 32 + Abb. 34). Aufgrund der progredienten Einschränkung der kardialen Funktion (Ejektionsfraktion, Schlagvolumen und Herzzeitvolumen) konnte von einer funktionellen Beeinträchtigung der Herzen ausgegangen werden. Die deutliche Zunahme des endsystolischen Volumens bei moderater Vergrößerung des enddiastolischen Volumens wies zudem auf eine zunehmende Einschränkung der Ventrikelkontraktilität hin. Zudem deutete die Reduktion der Wanddicken sowie des Herzgewichtes und der HW/BW *ratio* auf eine progressive Atrophie der kardialen Wand hin. Die beobachteten Veränderungen zeigten somit eine progrediente Herzinsuffizienz und stimmten mit dem von Gödecke et al. beschriebenen Phänotyp der iCMAKT1/2-KO-Hezen überein (Gödecke et al., 2017).

Bei der weiteren Untersuchung im Zeitverlauf nach Induktion des iCMAKT1/2-KOs wurden allerdings Unterschiede zwischen AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren und nicht-infizierten Kontrolltieren deutlich (Kapitel 3.6.2: Abb. 31 + Abb. 33). So konnte eine signifikant geringere Abnahme der kardialen Funktionsparameter Ejektionsfraktion, *fractional area change*, *fractional shortening* sowie eine signifikant geringere Zunahme des enddiastolischen und endsystolischen Volumens in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 nach Knockout-Induktion nachgewiesen werden. Auch für den innerventrikulären Durchmesser in Systole und Diastole zeigte sich im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 in den AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren eine signifikant geringere Zunahme. Dies spricht für eine weniger stark ausgeprägte Kontraktilitätseinschränkung des linken Ventrikels. Außerdem nahm die posteriore Wanddicke in Systole signifikant weniger ab, was als Hinweis auf eine verlangsamte Atrophie nach AMPK- α 2-S491A-Infektion zu werten ist. Es ist jedoch auch eine Interpretation als Folge einer verlangsamten Kontraktionseinschränkung möglich, da die Veränderung der posterioren Wanddicke in Systole auch durch eine unterschiedliche linksventrikuläre Kontraktionskraft erklärt werden kann.

Zusammenfassend wurde somit nachgewiesen, dass die Expression einer AMPK- α 2-S491A-Variante zur signifikant verlangsamten Verschlechterung kardialer Funktions- und Strukturparameter im iCMAKT1/2-KO-Modell besonders an Tag 14 nach Knockout-Induktion führt und somit vermutlich eine kardioprotektive Wirkung entfaltet.

Diese Beobachtung reiht sich in die Ergebnisse vorheriger Studien ein, die ebenfalls auf eine kardioprotektive AMPK-Wirkung hinwiesen. Im durch Drucküberlastung induzierten Herzversagen zeigte AMPK ähnlich wie in dieser Arbeit, in der durch den iCMAKT1/2-KO ein Herzversagen induziert wurde, eine Verbesserung der kardialen Funktion (Li et al., 2018). Eine AMPK-Stimulation führte in dieser Untersuchung zu einer verbesserten Ejektionsfraktion sowie zu einer verminderten Dilatation des linken Ventrikels. Dabei inhibierte AMPK, anders als unter physiologischen Bedingungen, die Autophagie, was zur Verbesserung der Herzfunktion beizutragen scheint (Li et al., 2018). Auch im Rahmen einer Ischämie-induzierten Herzinsuffizienz führte die Metformin-vermittelte AMPK-Aktivierung zu einer verbesserten Ejektionsfraktion sowie einer Reduktion des linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Durchmessers (Gundewar et al., 2009). Umgekehrt zeigten skelettmuskel- und herzspezifische AMPK- β 1/2-Doppel-Knockout-Mäuse eine Verminderung der systolischen und diastolischen Funktion (Sung et al., 2015). Auch der herzspezifische Knockout von LKB1, der wichtigsten stromaufwärts von AMPK liegenden Kinase (Carling et al., 2008), ging mit einer kardialen Dysfunktion einher (Ikeda et al., 2009). Im Adiponektin-Knockout-Modell konnte eine geringere AMPK- α -Expression sowie einer Regulationsstörung des Glukosemetabolismus beobachtet werden, wobei diese Veränderungen bei Druck-induzierter kardialer Hypertrophie zu deutlicheren Funktionseinschränkungen führten und zur rascheren Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitrugen (Liao et al., 2005).

Neben der kardialen Funktionsverbesserung zeigte die AMPK- α 2-S491A-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäuse weiterhin ein verlängertes Überleben (Kapitel 3.6.3: Abb. 35), wobei jedoch das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht wurde ($p = 0,0699$). Jedoch ist Literatur vorhanden, in der eine kardioprotektive AMPK-Aktivierung im Herzinsuffizienz-Modell einen Überlebensvorteil bietet. So konnte bei Ischämie-induzierter Herzinsuffizienz in Metformin-stimulierten Mäusen mit erhöhter AMPK-Aktivität ein signifikanter Überlebensvorteil verzeichnet werden (Gundewar et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den Mäusen mit AMPK- α 2-S491A-Expression im Rahmen des iCMAKT1/2-KOs eine kardioprotektive Wirkung besonders im Vergleich von Tag 0 und 14 Tage nach Induktion des Knockouts beobachtet werden konnte, die zudem von einem tendenziellen Überlebensvorteil begleitet wurde.

Post mortem erfolgte der Nachweis der transgenen AMPK- α 2-Expression in den Mausherzen mittels Western Blot-Analyse (Kapitel 3.6.4: Abb. 36 + Abb. 37). Dabei konnte in den Herzen der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe bei der Untersuchung zum Nachweis der Transgenexpression über das c-Myc Tag ein deutliches Signal in der Größe der transgenen AMPK- α

detektiert werden. In der Untersuchung der Transgenexpression über Bestimmung der AMPK- α -Gesamtmenge sowie seiner Threonin-172-Phosphorylierung zeigten sich schwache zusätzliche Banden. Transgene AMPK- α konnte zudem in den Leberproben der infizierten Tiere nachgewiesen werden. Ein quantitativer Mengenvergleich zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren zur Abschätzung der Infektionseffizienz anhand dieses Signals war jedoch nicht möglich, da die Signalbanden der endogenen und der c-Myc Tag-markierten, transgenen AMPK- α kaum voneinander zu trennen sind. Allerdings lag die transgene AMPK- α -Menge deutlich unter der der endogen exprimierten AMPK- α . Für eine funktionelle Wiederherstellung muss jedoch die transgene AMPK- α 2-S491A mit der endogenen AMPK- α um die Bildung aktiver trimerer Komplexe aus α -, β - und γ -Untereinheit kompetieren. So ist zu vermuten, dass man bei einem höheren Expressionsniveau der AMPK- α 2-S491A-Mutante einen noch stärkeren protektiven Effekt erwarten könnte.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in Herzgewebe der AMPK- α 2-S491A-infizierten Tiere eine Expression der AMPK- α 2-S491A-Variante gezeigt werden konnte. Insgesamt blieb allerdings unklar, wie viele Kardiomyozyten infiziert wurden und in welchem Maße die Expression der AMPK- α 2-S491A-Variante in den einzelnen Kardiomyozyten erfolgte. Anhand der beschriebenen Ergebnisse ist jedoch eher von einer moderaten Expression auszugehen.

Es kommen verschiedene Zielstrukturen in Frage, über die AMPK die beobachtete kardioprotektive Wirkung vermittelt. So wurde beschrieben, dass AMPK bei Herzversagen, anders als im physiologischen Zustand, zur Kardioprotektion die Verminderung der Autophagie fördert und dies vermutlich durch mTORC2-Aktivierung und anschließende AKT-Serin-473-Phosphorylierung erreicht wird (Li et al., 2018). Eine AKT-Aktivierung ist jedoch im iCMAKT1/2-KO nicht möglich, weshalb andere Mechanismen die Verbesserung der Herzfunktion ausüben müssen.

Zur Aufrechterhaltung der kontraktile Funktion verfügt das Herz über einen hohen Bedarf an ATP (Lopaschuk et al., 2010). Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz führt jedoch zu metabolischen Veränderungen, die mit einer Reduktion der ATP-Menge einhergehen (Ingwall, 2009). Auch im iCMAKT1/2-KO-Modell konnte eine mit der Zeit zunehmende energetische Depletion mit abnehmendem Phosphokreatin:ATP-Verhältnis und Zunahme an freiem Kreatin beobachtet werden (Gödecke et al., 2019). Wie zuvor beschrieben besteht die zentrale Rolle von AMPK im Energiemetabolismus darin, die intrazelluläre ATP-Konzentration zu erhöhen, wobei dies über die Aktivierung kataboler Prozesse wie beispielsweise der Aufnahme und Verstoffwechslung von Glukose sowie der Inhibition anaboler Stoffwechselwege erreicht wird (Hardie, 2007). So vermittelt AMPK unter ischämischen Bedingungen durch metabolische Anpassung mit Aktivierung der Glukoseaufnahme und der Glykolyse einen kardioprotektiven Effekt (Russell et al., 2004). Zudem resultiert die spezifische Hemmung der AMPK- α 2-Untereinheit bei kardialer Ischämie in einem beschleunigten ATP-Verbrauch sowie einer reduzierten Glukoseaufnahme, verbunden mit einer Funktionsbeeinträchtigung des

Herzens (Xing et al., 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Expression einer AMPK- α 2-491A-Variante in iCMAKT1/2-KO-Mäusen zur metabolischen Anpassung und veränderten Substratnutzung führt.

Weitere beschriebene kardioprotektive Wirkungen der AMPK bei Herzinsuffizienz bestehen in einer Verminderung der mitochondrialen Dysfunktion sowie einer erhöhten mitochondrialen ATP-Synthese. Gundewar et al. vermuten dabei, dass die mitochondriale Atmung bei Ischämie-induzierter Herzinsuffizienz eingeschränkt war und eine Metformin-vermittelte vermehrte AMPK-Aktivität zu einer verbesserten mitochondrialen Energiegewinnung beitrug (Gundewar et al., 2009). Dabei konnten sowohl eine vermehrte eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)-Phosphorylierung als auch eine gesteigerte PGC-1 α -Expression nachgewiesen werden, die an der beobachteten gesteigerten mitochondrialen ATP-Synthese beteiligt waren (Gundewar et al., 2009).

PGC-1 α ist ein wichtiger Stimulator der mitochondrialen Biogenese und Funktion im Herzen und wird AMPK-abhängig phosphoryliert (Lehman et al., 2000, Jager et al., 2007). In den Herzen von PGC-1 α -Knockout-Mäusen konnte eine verminderte mitochondriale Enzymaktivität sowie ein niedriger ATP-Spiegel festgestellt werden. Außerdem war eine kardiale Funktionseinschränkung festzustellen (Arany et al., 2005). Auch im iCMAKT1/2-KO-Modell konnte im Zeitverlauf begleitend zu der zunehmenden AMPK-Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 485/491 neben einer energetischen Verarmung auch eine mitochondriale Dysfunktion festgestellt werden. Diese zeigte sich in einer verminderten Transkription von Genen mitochondrialer Proteine sowie in der Zunahme der Konzentration von Acylcarnitinen als Hinweis auf einen gestörten Fettsäureimport in die Mitochondrien (Gödecke et al., 2017, Gödecke et al., 2019). Auch Ock et al. zeigten, dass in Mäusen mit generalisiertem AKT-1-Knockout und induziertem kardialen AKT-2-Knockout Gene mit wichtiger Bedeutung in der mitochondrialen Biogenese und der oxidativen Phosphorylierung vermindert exprimiert wurden (Ock et al., 2018). Somit könnte auch die in dieser Arbeit beobachtete temporär verlangsamte Verschlechterung der kardialen Funktion in AMPK- α 2-S491A-infizierten Tieren teilweise durch eine mit der Wiederherstellung der AMPK-Aktivität einhergehende Verbesserung der mitochondrialen Funktion und Energiegewinnung, möglicherweise über PGC-1 α -Aktivierung, erklärt werden. Abschließend bleibt unklar, über welche AMPK-Substrate die beobachtete Kardioprotektion vermittelt wird. Es sind somit weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese zu identifizieren.

4.4 Limitationen des AAV9-vermittelten Gentransfers in vivo

Für den echokardiographischen Vergleich kardialer Funktionsparameter zwischen AAV9-infizierten Tieren und nicht-infizierten Kontrolltieren ist eine ausreichende Infektionseffizienz der murinen Kardiomyozyten essenziell. AAV9 ermöglichen bei Verwendung eines CMV-Promotors einen effizienten Gentransfer sowie eine effiziente Expression des Transgens in Mausherzen (Chen et al., 2015). Daher wurde auch in dieser Arbeit ein CMV-Promotor zur Expression von Rheb Q64L bzw. AMPK- α 2 S491A

verwendet. Inagaki et al. benötigten bei der Verwendung von AAV9 mit einem CMV-Promotor zur Expression eines lacZ (β -Galactosidase)-Gens in 6-8 Wochen alten Mäusen $3,0 \cdot 10^{10}$ Virusgenome pro Maus, um ca. 32 % der murinen Kardiomyozyten zu transduzieren (Inagaki et al., 2006). Bei der Verwendung von $3,0 \cdot 10^{11}$ Virusgenomen pro Maus lag die kardiale Transduktionseffizienz bereits bei ca. 91 %; mit $1,0 \cdot 10^{12}$ Virusgenomen pro Maus wurde schließlich eine Effizienz von ca. 100 % erreicht (Inagaki et al., 2006). Auch in dieser Arbeit wurden $1,0 \cdot 10^{12}$ Virusgenomkopien pro Maus appliziert. Dennoch lag der geschätzte Anteil des Rheb Q64L-Transgens an der Rheb-Gesamttranskriptmenge wie zuvor beschrieben bei durchschnittlich nur 3,05 % (Kapitel 3.5.3: Abb. 28); ein Expressionsnachweis auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse war aufgrund uneindeutiger Signale nicht möglich. Die transgene AMPK-Expression konnte auf Western Blot-Ebene nachgewiesen werden, jedoch war auch dabei eher von einer geringen Transgenexpression auszugehen. Eine quantitative Aussage über die Infektionseffizienz und die prozentuale Anzahl an Kardiomyozyten, die das Transgen exprimieren, war anhand der durchgeführten Untersuchungen sowohl für die Rheb- als auch die AMPK-Untersuchung nicht möglich. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen jedoch eine geringere Infektionseffizienz als in der angegebenen Literatur vermuten. Letztendlich bleibt allerdings unklar, wie hoch die tatsächliche Infektionseffizienz der verwendeten Rheb Q64L- und AMPK- α 2-S491A-AAV9 war.

Ein im iCMAKT1/2-KO-Modell untersuchter Faktor stellte das Überleben AAV9-infizierter Mäuse im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren dar. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Faktoren als die progrediente Herzinsuffizienz aufgrund des iCMAKT1/2-KOs das Überleben der Tiere beeinflusst haben. Neben den Effekten der AMPK- α 2-S491A- bzw. Rheb Q64L-Expression in anderen Organsystemen stellt auch die Ernährungslage der Tiere einen solchen möglichen Faktor dar. So wies das nicht-infizierte iCMAKT1/2-KO-Kontrolltier mit dem höchsten Körpergewicht mit 28 Tagen nach Knockout-Induktion auch das längste Überleben aller Kontrolltiere auf, verglichen mit einem durchschnittlichen Überleben von 24,4 Tagen in der Gruppe der nicht-infizierten Kontrolltiere (Anhang: Tabelle 25). Die echokardiographisch detektierten Funktionsparameter des Herzens dieses Tieres 3 Wochen nach Knockout-Induktion lagen hingegen fast alle unterhalb der Durchschnittswerte der Kontrolltiere. Es ist somit davon auszugehen, dass die kardialen Einschränkungen aufgrund des iCMAKT1/2-KOs zwar zum Tode der Tiere führten, die exakte Anzahl an überlebten Tagen jedoch vermutlich durch mehrere Faktoren wie dem Körpergewicht beeinflusst wurden und somit der direkte Überlebensvergleich zwischen den untersuchten Gruppen bei ohnehin nur geringgradigen zu erwartenden Unterschieden erschwert wurde.

4.5 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, Teilfunktionen des AKT-Signalweges in iCMAKT1/2-KO-Mäusen wiederherzustellen, um so deren Bedeutung für den kardialen Phänotyp zu untersuchen. Dabei sollte durch kardiale Rheb Q64L-Expression die Aktivität von mTORC1 gesteigert sowie durch Expression einer panFOXO shRNA die Verminderung der FOXO-Transkriptionsfaktoren erreicht werden. Weiterhin sollte die kardiale AMPK-Funktion durch Expression einer nicht-inaktivierbaren, phosphodefekten AMPK- α 2-S491A-Mutante wiederhergestellt werden. Unter den gewählten gentherapeutischen Ansätzen erwies sich die kardiale AMPK- α 2-S491A-Expression am wirksamsten. Bei den beiden weiteren Ansätzen konnte aufgrund methodischer Schwierigkeiten keine abschließende Beurteilung der jeweiligen phänotypischen Bedeutung im iCMAKT1/2-KO-Modell vorgenommen werden.

Im iCMAKT1/2-KO-Modell zeigten AMPK- α 2-S491A-infizierte Mäuse nach Knockout-Induktion besonders im Vergleich von Tag 0 und Tag 14 eine temporär verlangsamte Verschlechterung einiger Funktions- und Strukturparameter im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen. Eine langfristige Verbesserung der kardialen Funktion konnte jedoch nicht erreicht werden. Somit ist davon auszugehen, dass die nicht-inaktivierbare AMPK- α 2-S491A-Variante einen kardioprotektiven Effekt bei Inaktivierung des AKT-1/2-Signalweges vermittelt und die Knockout-induzierte Herzinsuffizienz abschwächt. Umgekehrt lässt dies vermuten, dass die zuvor im iCMAKT1/2-KO-Modell beobachtete vermehrte AMPK-Serin-485/491-Phosphorylierung an Tag 14 und Tag 21 nach Knockout-Induktion zur Veränderung des kardialen Phänotyps mit Abnahme der kardialen Funktion beiträgt (Gödecke et al., 2019).

Die Infektionseffizienz der AAV9-vermittelten AMPK- α 2-S491A-Infektion blieb insgesamt unklar, wobei eher von einer geringen Transgenexpression auszugehen war. Es kann vermutet werden, dass bei Erreichen eines höheren kardialen AMPK- α 2-S491A-Expressionsniveaus der kardioprotektive Effekt noch deutlicher ausgefallen wäre. Folglich sollte das Ziel weiterführender Untersuchungen darin bestehen, die kardiale Infektionseffizienz zu steigern und zu quantifizieren, um so die Bedeutung von AMPK für den kardialen Phänotyp im iCMAKT1/2-KO-Modell noch deutlicher herauszustellen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMINGS, B. A. 1996a. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15, 6541-51.
- ALESSI, D. R., CAUDWELL, F. B., ANDJELKOVIC, M., HEMMINGS, B. A. & COHEN, P. 1996b. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 399, 333-8.
- ALESSI, D. R., DEAK, M., CASAMAYOR, A., CAUDWELL, F. B., MORRICE, N., NORMAN, D. G., GAFFNEY, P., REESE, C. B., MACDOUGALL, C. N., HARBISON, D., ASHWORTH, A. & BOWNES, M. 1997a. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol*, 7, 776-89.
- ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B. & COHEN, P. 1997b. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph α . *Curr Biol*, 7, 261-9.
- ANDERSON, D., KOCH, C. A., GREY, L., ELLIS, C., MORAN, M. F. & PAWSON, T. 1990. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science*, 250, 979-82.
- ANDJELKOVIC, M., ALESSI, D. R., MEIER, R., FERNANDEZ, A., LAMB, N. J., FRECH, M., CRON, P., COHEN, P., LUCOCQ, J. M. & HEMMINGS, B. A. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, 272, 31515-24.
- ANDJELKOVIC, M., JAKUBOWICZ, T., CRON, P., MING, X. F., HAN, J. W. & HEMMINGS, B. A. 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5699-704.
- ANDREELLI, F., FORETZ, M., KNAUF, C., CANI, P. D., PERRIN, C., IGLESIAS, M. A., PILLOT, B., BADO, A., TRONCHE, F., MITHIEUX, G., VAULONT, S., BURCELIN, R. & VIOLLET, B. 2006. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology*, 147, 2432-41.
- 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 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*, 1, 259-71.
- ARCARO, A. & WYMANN, M. P. 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 296 (Pt 2), 297-301.
- AUGUSTE, G., GURHA, P., LOMBARDI, R., COARFA, C., WILLERSON, J. T. & MARIAN, A. J. 2018. Suppression of Activated FOXO Transcription Factors in the Heart Prolongs Survival in a Mouse Model of Laminopathies. *Circ Res*, 122, 678-692.
- BARTLETT, J. S., WILCHER, R. & SAMULSKI, R. J. 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 74, 2777-85.
- BELLACOSA, A., TESTA, J. R., STAAL, S. P. & TSICHLIS, P. N. 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254, 274-7.

- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7421-6.
- BOSSUYT, J., HELMSTADTER, K., WU, X., CLEMENTS-JEWERY, H., HAWORTH, R. S., AVKIRAN, M., MARTIN, J. L., POGWIZD, S. M. & BERS, D. M. 2008. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circ Res*, 102, 695-702.
- BOSTICK, B., GHOSH, A., YUE, Y., LONG, C. & DUAN, D. 2007. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther*, 14, 1605-9.
- BOZULIC, L., SURUCU, B., HYNX, D. & HEMMINGS, B. A. 2008. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell*, 30, 203-13.
- BROGNARD, J., SIERECKI, E., GAO, T. & NEWTON, A. C. 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*, 25, 917-31.
- 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, 857-68.
- BRUNN, G. J., HUDSON, C. C., SEKULIC, A., WILLIAMS, J. M., HOSOI, H., HOUGHTON, P. J., LAWRENCE, J. C., JR. & ABRAHAM, R. T. 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 277, 99-101.
- BURGERING, B. M. & COFFER, P. J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376, 599-602.
- BURGERING, B. M. & MEDEMA, R. H. 2003. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol*, 73, 689-701.
- BURNETT, P. E., BARROW, R. K., COHEN, N. A., SNYDER, S. H. & SABATINI, D. M. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1432-7.
- 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 Biol*, 5, e95.
- CALNAN, D. R. & BRUNET, A. 2008. The FoxO code. *Oncogene*, 27, 2276-88.
- CANTLEY, L. C., AUGER, K. R., CARPENTER, C., DUCKWORTH, B., GRAZIANI, A., KAPPELLER, R. & SOLTOFF, S. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64, 281-302.
- 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.
- CARLING, D., SANDERS, M. J. & WOODS, A. 2008. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 4, S55-9.
- CHEN, B. D., HE, C. H., CHEN, X. C., PAN, S., LIU, F., MA, X., LI, X. M., GAI, M. T., TAO, J., MA, Y. T., YANG, Y. N. & GAO, X. M. 2015. Targeting transgene to the heart and liver with AAV9 by different promoters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 42, 1108-17.
- CHEN, W. S., XU, P. Z., GOTTLÖB, K., CHEN, M. L., SOKOL, K., SHIYANOVA, T., RONINSON, I., WENG, W., SUZUKI, R., TOBE, K., KADOWAKI, T. & HAY, N.

2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*, 15, 2203-8.
- CHENG, J. Q., GODWIN, A. K., BELLACOSA, A., TAGUCHI, T., FRANKE, T. F., HAMILTON, T. C., TSICHLIS, P. N. & TESTA, J. R. 1992. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9267-71.
- CHO, H., MU, J., KIM, J. K., THORVALDSEN, J. L., CHU, Q., CRENSHAW, E. B., 3RD, KAESTNER, K. H., BARTOLOMEI, M. S., SHULMAN, G. I. & BIRNBAUM, M. J. 2001a. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292, 1728-31.
- CHO, H., THORVALDSEN, J. L., CHU, Q., FENG, F. & BIRNBAUM, M. J. 2001b. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 276, 38349-52.
- CHOI, V. W., SAMULSKI, R. J. & MCCARTY, D. M. 2005. Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol*, 79, 6801-7.
- 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. *Eur J Biochem*, 201, 475-81.
- CONG, L. N., CHEN, H., LI, Y., ZHOU, L., MCGIBBON, M. A., TAYLOR, S. I. & QUON, M. J. 1997. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Endocrinol*, 11, 1881-90.
- CORTON, J. M., GILLESPIE, J. G., HAWLEY, S. A. & HARDIE, D. G. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 229, 558-65.
- COUGHLAN, K. A., VALENTINE, R. J., SUDIT, B. S., ALLEN, K., DAGON, Y., KAHN, B. B., RUDERMAN, N. B. & SAHA, A. K. 2016. PKD1 Inhibits AMPKalpha2 through Phosphorylation of Serine 491 and Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem*, 291, 5664-75.
- CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M. & HEMMINGS, B. A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 785-9.
- DAGON, Y., HUR, E., ZHENG, B., WELLENSTEIN, K., CANTLEY, L. C. & KAHN, B. B. 2012. p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab*, 16, 104-12.
- DALBY, B., CATES, S., HARRIS, A., OHKI, E. C., TILKINS, M. L., PRICE, P. J. & CICCARONE, V. C. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33, 95-103.
- 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.
- DAVIES, S. P., HAWLEY, S. A., WOODS, A., CARLING, D., HAYSTEAD, T. A. & HARDIE, D. G. 1994. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem*, 223, 351-7.
- DAYA, S. & BERNS, K. I. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*, 21, 583-93.
- DEBOSCH, B., SAMBANDAM, N., WEINHEIMER, C., COURTOIS, M. & MUSLIN, A. J. 2006a. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem*, 281, 32841-51.
- DEBOSCH, B., TRESKOV, I., LUPU, T. S., WEINHEIMER, C., KOVACS, A., COURTOIS, M. & MUSLIN, A. J. 2006b. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*, 113, 2097-104.

- EASTON, R. M., CHO, H., ROOVERS, K., SHINEMAN, D. W., MIZRAHI, M., FORMAN, M. S., LEE, V. M., SZABOLCS, M., DE JONG, R., OLTERS DORF, T., LUDWIG, T., EFSTRATIADIS, A. & BIRNBAUM, M. J. 2005. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol*, 25, 1869-78.
- EMBI, N., RYLATT, D. B. & COHEN, P. 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, 107, 519-27.
- FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M. & DANIELSEN, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7413-7.
- FORETZ, M., ANCELLIN, N., ANDREELLI, F., SAINTILLAN, Y., GRONDIN, P., KAHN, A., THORENS, B., VAULONT, S. & VIOLLET, B. 2005. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*, 54, 1331-9.
- FRANKE, T. F., YANG, S. I., CHAN, T. O., DATTA, K., KAZLAUSKAS, A., MORRISON, D. K., KAPLAN, D. R. & TSICHLIS, P. N. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81, 727-36.
- FRECH, M., ANDJELKOVIC, M., INGLEBY, E., REDDY, K. K., FALCK, J. R. & HEMMINGS, B. A. 1997. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem*, 272, 8474-81.
- 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.
- GAROFALO, R. S., ORENA, S. J., RAFIDI, K., TORCHIA, A. J., STOCK, J. L., HILDEBRANDT, A. L., COSKRAN, T., BLACK, S. C., BREES, D. J., WICKS, J. R., MCNEISH, J. D. & COLEMAN, K. G. 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest*, 112, 197-208.
- GÖDECKE, S., FLÖGEL, U., HEINEN, A. & GÖDECKE, A. 2019. AKT- and AMPK-signaling are important regulators of cardiac metabolism. *ACTA PHYSIOLOGICA*, 227, A 06-1.
- GÖDECKE, S., HEINEN, A., MÖLLER, F., DEENEN, R., KÖHRER, K. & GÖDECKE, A. 2017. AKT signaling is essential for functional and structural integrity of the heart. *FASEB J*, 31, LB149.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- 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.
- GUNDEWAR, S., CALVERT, J. W., JHA, S., TOEDT-PINGEL, I., JI, S. Y., NUNEZ, D., RAMACHANDRAN, A., ANAYA-CISNEROS, M., TIAN, R. & LEFER, D. J. 2009. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*, 104, 403-11.
- HAKUNO, F. & TAKAHASHI, S. I. 2018. IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, 61, T69-t86.
- HANADA, M., FENG, J. & HEMMINGS, B. A. 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 3-16.

- HANKS, S. K. & HUNTER, T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb j*, 9, 576-96.
- HARDIE, D. G. 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 774-85.
- HAWLEY, S. A., DAVISON, M., WOODS, A., DAVIES, S. P., BERI, R. K., CARLING, D. & HARDIE, D. G. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271, 27879-87.
- HERS, I., VINCENT, E. E. & TAVARE, J. M. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*, 23, 1515-27.
- HORMAN, S., BROWNE, G., KRAUSE, U., PATEL, J., VERTOMMEN, D., BERTRAND, L., LAVOINNE, A., HUE, L., PROUD, C. & RIDER, M. 2002. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol*, 12, 1419-23.
- HORMAN, S., VERTOMMEN, D., HEATH, R., NEUMANN, D., MOUTON, V., WOODS, A., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLING, D., HUE, L. & RIDER, M. H. 2006. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem*, 281, 5335-40.
- HRIBAL, M. L., NAKAE, J., KITAMURA, T., SHUTTER, J. R. & ACCILI, D. 2003. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol*, 162, 535-41.
- HUDSON, E. R., PAN, D. A., JAMES, J., LUCOCQ, J. M., HAWLEY, S. A., GREEN, K. A., BABA, O., TERASHIMA, T. & HARDIE, D. G. 2003. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, 13, 861-6.
- HULETT, H. R., BONNER, W. A., BARRETT, J. & HERZENBERG, L. A. 1969. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166, 747-9.
- HURLEY, R. L., BARRE, L. K., WOOD, S. D., ANDERSON, K. A., KEMP, B. E., MEANS, A. R. & WITTERS, L. A. 2006. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem*, 281, 36662-72.
- IKEDA, Y., SATO, K., PIMENTEL, D. R., SAM, F., SHAW, R. J., DYCK, J. R. & WALSH, K. 2009. Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. *J Biol Chem*, 284, 35839-49.
- INAGAKI, K., FUESS, S., STORM, T. A., GIBSON, G. A., MCTIERNAN, C. F., KAY, M. A. & NAKAI, H. 2006. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, 14, 45-53.
- INGWALL, J. S. 2009. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res*, 81, 412-9.
- INOKI, K., LI, Y., XU, T. & GUAN, K. L. 2003a. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- 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.
- INOKI, K., ZHU, T. & GUAN, K. L. 2003b. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577-90.
- ISELI, T. J., WALTER, M., VAN DENDEREN, B. J., KATSIS, F., WITTERS, L. A., KEMP, B. E., MICHELL, B. J. & STAPLETON, D. 2005. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J Biol Chem*, 280, 13395-400.

- JAGER, 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 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12017-22.
- JAMES, S. R., DOWNES, C. P., GIGG, R., GROVE, S. J., HOLMES, A. B. & ALESSI, D. R. 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 315 (Pt 3), 709-13.
- JIANG, H. & VOGT, P. K. 2008. Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene*, 27, 5729-40.
- JONES, P. F., JAKUBOWICZ, T. & HEMMING, B. A. 1991a. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul*, 2, 1001-9.
- JONES, P. F., JAKUBOWICZ, T., PITOSI, F. J., MAURER, F. & HEMMING, B. A. 1991b. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4171-5.
- KAESTNER, K. H., KNOCHEL, W. & MARTINEZ, D. E. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 14, 142-6.
- KAPELLER, R. & CANTLEY, L. C. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays*, 16, 565-76.
- KEMI, O. J., CECI, M., WISLOFF, U., GRIMALDI, S., GALLO, P., SMITH, G. L., CONDORELLI, G. & ELLINGSEN, O. 2008. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*, 214, 316-21.
- KENNEDY, S. G., WAGNER, A. J., CONZEN, S. D., JORDAN, J., BELLACOSA, A., TSICHLIS, P. N. & HAY, N. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev*, 11, 701-13.
- KIM, M., SHEN, M., NGOY, S., KARAMANLIDIS, G., LIAO, R. & TIAN, R. 2012. AMPK isoform expression in the normal and failing hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 1066-73.
- KIM, T. T. & DYCK, J. R. 2015. Is AMPK the savior of the failing heart? *Trends Endocrinol Metab*, 26, 40-8.
- KJOBSTED, R., HINGST, J. R., FENTZ, J., FORETZ, M., SANZ, M. N., PEHMOLLER, C., SHUM, M., MARETTE, A., MOUNIER, R., TREEBAK, J. T., WOJTASZEWSKI, J. F. P., VIOLLET, B. & LANTIER, L. 2018. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J*, 32, 1741-1777.
- KOBAYASHI, T., SHIMIZU, Y., TERADA, N., YAMASAKI, T., NAKAMURA, E., TODA, Y., NISHIYAMA, H., KAMOTO, T., OGAWA, O. & INOUE, T. 2010. Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. *Prostate*, 70, 866-74.
- KOHN, A. D., KOVACINA, K. S. & ROTH, R. A. 1995. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *Embo j*, 14, 4288-95.
- KOHN, A. D., SUMMERS, S. A., BIRNBAUM, M. J. & ROTH, R. A. 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, 271, 31372-8.
- KONISHI, H., KURODA, S., TANAKA, M., MATSUZAKI, H., ONO, Y., KAMEYAMA, K., HAGA, T. & KIKKAWA, U. 1995. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 216, 526-34.
- KOPS, G. J., DANSEN, T. B., POLDERMAN, P. E., SAARLOOS, I., WIRTZ, K. W., COFFER, P. J., HUANG, T. T., BOS, J. L., MEDEMA, R. H. & BURGERING, B. M. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419, 316-21.

- KOPS, G. J., DE RUITER, N. D., DE VRIES-SMITS, A. M., POWELL, D. R., BOS, J. L. & BURGERING, B. M. 1999. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398, 630-4.
- KOVACIC, S., SOLTYS, C. L., BARR, A. J., SHIOJIMA, I., WALSH, K. & DYCK, J. R. 2003. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem*, 278, 39422-7.
- KOVACINA, K. S., PARK, G. Y., BAE, S. S., GUZZETTA, A. W., SCHAEFER, E., BIRNBAUM, M. J. & ROTH, R. A. 2003. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem*, 278, 10189-94.
- KRAMER, H. F., WITCZAK, C. A., FUJII, N., JESSEN, N., TAYLOR, E. B., ARNOLDS, D. E., SAKAMOTO, K., HIRSHMAN, M. F. & GOODYEAR, L. J. 2006. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes*, 55, 2067-76.
- KUDO, N., BARR, A. J., BARR, R. L., DESAI, S. & LOPASCHUK, G. D. 1995. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 270, 17513-20.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAWRENCE, J. C., JR. & ABRAHAM, R. T. 1997. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci*, 22, 345-9.
- 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.
- LI, Y., WANG, Y., ZOU, M., CHEN, C., CHEN, Y., XUE, R., DONG, Y. & LIU, C. 2018. AMPK blunts chronic heart failure by inhibiting autophagy. *Biosci Rep*, 38.
- LIAO, Y., TAKASHIMA, S., MAEDA, N., OUCHI, N., KOMAMURA, K., SHIMOMURA, I., HORI, M., MATSUZAWA, Y., FUNAHASHI, T. & KITAKAZE, M. 2005. Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism. *Cardiovasc Res*, 67, 705-13.
- LIN, Z., VON GISE, A., ZHOU, P., GU, F., MA, Q., JIANG, J., YAU, A. L., BUCK, J. N., GOUIN, K. A., VAN GORP, P. R., ZHOU, B., CHEN, J., SEIDMAN, J. G., WANG, D. Z. & PU, W. T. 2014. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circ Res*, 115, 354-63.
- 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.
- LIU, F., PAN, Z., ZHANG, J., NI, J., WANG, C., WANG, Z., GU, F., DONG, W., ZHOU, W. & LIU, H. 2018. Overexpression of RHEB is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 15, 3838-3845.
- LOPASCHUK, G. D., USSHER, J. R., FOLMES, C. D., JASWAL, J. S. & STANLEY, W. C. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 207-58.
- LOPEZ-COTARELO, P., ESCRIBANO-DIAZ, C., GONZALEZ-BETHENCOURT, I. L., GOMEZ-MOREIRA, C., DEGUIZ, M. L., TORRES-BACETE, J., GOMEZ-CABANAS, L., FERNANDEZ-BARRERA, J., DELGADO-MARTIN, C., MELLADO, M., REGUEIRO, J. R., MIRANDA-CARUS, M. E. & RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L. 2015. A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells. *J Biol Chem*, 290, 827-40.

- LU, Z. H., SHVARTSMAN, M. B., LEE, A. Y., SHAO, J. M., MURRAY, M. M., KLADNEY, R. D., FAN, D., KRAJEWSKI, S., CHIANG, G. G., MILLS, G. B. & ARBEIT, J. M. 2010. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res*, 70, 3287-98.
- 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.
- MAGUN, R., BURGERING, B. M., COFFER, P. J., PARDASANI, D., LIN, Y., CHABOT, J. & SORISKY, A. 1996. Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology*, 137, 3590-3.
- 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.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-74.
- 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.
- MCCARTY, D. M., YOUNG, S. M., JR. & SAMULSKI, R. J. 2004. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet*, 38, 819-45.
- MEDEMA, R. H., KOPS, G. J., BOS, J. L. & BURGERING, B. M. 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404, 782-7.
- MEIER, R., ALESSI, D. R., CRON, P., ANDJELKOVIC, M. & HEMMINGS, B. A. 1997. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem*, 272, 30491-7.
- MITCHELHILL, K. I., MICHELL, B. J., HOUSE, C. M., STAPLETON, D., DYCK, J., GAMBLE, J., ULLRICH, C., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. 1997. Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem*, 272, 24475-9.
- MOMCILOVIC, M., HONG, S. P. & CARLSON, M. 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*, 281, 25336-43.
- MURTHY, S. S., TOSOLINI, A., TAGUCHI, T. & TESTA, J. R. 2000. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 88, 38-40.
- NAKAMURA, N., RAMASWAMY, S., VAZQUEZ, F., SIGNORETTI, S., LODA, M. & SELLERS, W. R. 2000. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol*, 20, 8969-82.
- NEW, D. C., WU, K., KWOK, A. W. & WONG, Y. H. 2007. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *Febs j*, 274, 6025-36.
- NONNENMACHER, M. & WEBER, T. 2012. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, 19, 649-58.
- O'NEILL, H. M., LALLY, J. S., GALIC, S., THOMAS, M., AZIZI, P. D., FULLERTON, M. D., SMITH, B. K., PULINILKUNNIL, T., CHEN, Z., SAMAN, M. C., JORGENSEN, S. B., DYCK, J. R., HOLLOWAY, G. P., HAWKE, T. J., VAN DENDEREN, B. J., KEMP, B. E. & STEINBERG, G. R. 2014. AMPK

- phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia*, 57, 1693-702.
- OAKHILL, J. S., CHEN, Z. P., SCOTT, J. W., STEEL, R., CASTELLI, L. A., LING, N., MACAULAY, S. L. & KEMP, B. E. 2010. beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 19237-41.
- OOCK, S., LEE, W. S., KIM, H. M., PARK, K. S., KIM, Y. K., KOOK, H., PARK, W. J., LEE, T. J., ABEL, E. D. & KIM, J. 2018. Connexin43 and zonula occludens-1 are targets of Akt in cardiomyocytes that correlate with cardiac contractile dysfunction in Akt deficient hearts. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864, 1183-1191.
- PACAK, C. A., MAH, C. S., THATTALIYATH, B. D., CONLON, T. J., LEWIS, M. A., CLOUTIER, D. E., ZOLOTUKHIN, I., TARANTAL, A. F. & BYRNE, B. J. 2006. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res*, 99, e3-9.
- PANAYOTOU, G., BAX, B., GOUT, I., FEDERWISCH, M., WROBLOWSKI, B., DHAND, R., FRY, M. J., BLUNDELL, T. L., WOLLMER, A. & WATERFIELD, M. D. 1992. Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes. *Embo j*, 11, 4261-72.
- PANAYOTOU, G. & WATERFIELD, M. D. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: a key enzyme in diverse signalling processes. *Trends Cell Biol*, 2, 358-60.
- PARISI, A. F., MOYNIHAN, P. F., FELDMAN, C. L. & FOLLAND, E. D. 1979. Approaches to determination of left ventricular volume and ejection fraction by real-time two-dimensional echocardiography. *Clin Cardiol*, 2, 257-63.
- PARK, D. W., JIANG, S., LIU, Y., SIEGAL, G. P., INOKI, K., ABRAHAM, E. & ZMIJEWSKI, J. W. 2014. GSK3beta-dependent inhibition of AMPK potentiates activation of neutrophils and macrophages and enhances severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L735-45.
- PARKER, P. J., CAUDWELL, F. B. & COHEN, P. 1983. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, 130, 227-34.
- 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 Dev*, 17, 1352-65.
- PETERSON, R. T. & SCHREIBER, S. L. 1999. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol*, 9, R521-4.
- POLEKHINA, G., GUPTA, A., MICHELL, B. J., VAN DENDEREN, B., MURTHY, S., FEIL, S. C., JENNINGS, I. G., CAMPBELL, D. J., WITTERS, L. A., PARKER, M. W., KEMP, B. E. & STAPLETON, D. 2003. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, 13, 867-71.
- PRASAD, K. M., XU, Y., YANG, Z., ACTON, S. T. & FRENCH, B. A. 2011. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Ther*, 18, 43-52.
- PROUD, C. G. 1996. p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends Biochem Sci*, 21, 181-5.
- PUIGSERVER, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, 24, 78-90.
- RENA, G., GUO, S., CICHY, S. C., UNTERMAN, T. G. & COHEN, P. 1999. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem*, 274, 17179-83.

- RENAULT, V. M., THEKKAT, P. U., HOANG, K. L., WHITE, J. L., BRADY, C. A., KENZELMANN BROZ, D., VENTURELLI, O. S., JOHNSON, T. M., OSKOUI, P. R., XUAN, Z., SANTO, E. E., ZHANG, M. Q., VOGEL, H., ATTARDI, L. D. & BRUNET, A. 2011. The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene*, 30, 3207-21.
- RUSSELL, R. R., 3RD, BERGERON, R., SHULMAN, G. I. & YOUNG, L. H. 1999. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol*, 277, H643-9.
- RUSSELL, R. R., 3RD, LI, J., COVEN, D. L., PYPAERT, M., ZECHNER, C., PALMERI, M., GIORDANO, F. J., MU, J., BIRNBAUM, M. J. & YOUNG, L. H. 2004. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*, 114, 495-503.
- RUVINSKY, I. & MEYUHAS, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 31, 342-8.
- RUVINSKY, I., SHARON, N., LERER, T., COHEN, H., STOLOVICH-RAIN, M., NIR, T., DOR, Y., ZISMAN, P. & MEYUHAS, O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 19, 2199-211.
- SANDERS, M. J., GRONDIN, P. O., HEGARTY, B. D., SNOWDEN, M. A. & CARLING, D. 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403, 139-48.
- 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, 1098-101.
- SASSE, A., WALLICH, M., DING, Z., GOEDECKE, A. & SCHRADER, J. 2003. Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure. *J Gene Med*, 5, 876-882.
- SATO, T., NAKASHIMA, A., GUO, L. & TAMANOI, F. 2009. Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *J Biol Chem*, 284, 12783-91.
- SCHWINDINGER, W. F. & ROBISHAW, J. D. 2001. Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, 20, 1653-60.
- SCOTT, J. W., HAWLEY, S. A., GREEN, K. A., ANIS, M., STEWART, G., SCULLION, G. A., NORMAN, D. G. & HARDIE, D. G. 2004. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*, 113, 274-84.
- 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. *J Biol Chem*, 286, 7468-78.
- SENGUPTA, A., MOLKENTIN, J. D. & YUTZEY, K. E. 2009. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 284, 28319-31.
- SHAW, G. 1996. The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays*, 18, 35-46.
- 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. *J Clin Invest*, 115, 2108-18.
- SHOELSON, S. E., SIVARAJA, M., WILLIAMS, K. P., HU, P., SCHLESSINGER, J. & WEISS, M. A. 1993. Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *Embo j*, 12, 795-802.
- 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.
- 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.
- STAPLETON, D., MITCHELHILL, K. I., GAO, G., WIDMER, J., MICHELL, B. J., TEH, T., HOUSE, C. M., FERNANDEZ, C. S., COX, T., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, 271, 611-4.
- STEPHENS, L. R., JACKSON, T. R. & HAWKINS, P. T. 1993. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*, 1179, 27-75.
- STERNBERG, N. & HAMILTON, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- STOKOE, D., STEPHENS, L. R., COPELAND, T., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B., PAINTER, G. F., HOLMES, A. B., MCCORMICK, F. & HAWKINS, P. T. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, 277, 567-70.
- SUNG, M. M., ZORDOKY, B. N., BUJAK, A. L., LALLY, J. S., FUNG, D., YOUNG, M. E., HORMAN, S., MILLER, E. J., LIGHT, P. E., KEMP, B. E., STEINBERG, G. R. & DYCK, J. R. 2015. AMPK deficiency in cardiac muscle results in dilated cardiomyopathy in the absence of changes in energy metabolism. *Cardiovasc Res*, 107, 235-45.
- SUTER, M., RIEK, U., TUERK, R., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T. & NEUMANN, D. 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 281, 32207-16.
- TERPE, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 523-33.
- 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 X0 values. *J Bioinform Comput Biol*, 8, 885-900.
- TIAN, R., MUSI, N., D'AGOSTINO, J., HIRSHMAN, M. F. & GOODYEAR, L. J. 2001. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 104, 1664-9.
- TODARO, G. J. & GREEN, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, 17, 299-313.
- TOWLER, M. C. & HARDIE, D. G. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, 100, 328-41.
- TREEBAK, J. T., GLUND, S., DESHMUKH, A., KLEIN, D. K., LONG, Y. C., JENSEN, T. E., JORGENSEN, S. B., VIOLLET, B., ANDERSSON, L., NEUMANN, D., WALLIMANN, T., RICHTER, E. A., CHIBALIN, A. V., ZIERATH, J. R. & WOJTASZEWSKI, J. F. 2006. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes*, 55, 2051-8.
- TSCHOPP, O., YANG, Z. Z., BRODBECK, D., DUMMLER, B. A., HEMMINGS-MIESZCZAK, M., WATANABE, T., MICHAELIS, T., FRAHM, J. & HEMMINGS, B. A. 2005. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132, 2943-54.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-12.

- VANDER HAAR, E., LEE, S. I., BANDHAKAVI, S., GRIFFIN, T. J. & KIM, D. H. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9, 316-23.
- 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.
- VENTURA, A., MEISSNER, A., DILLON, C. P., MCMANUS, M., SHARP, P. A., VAN PARIJS, L., JAENISCH, R. & JACKS, T. 2004. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10380-5.
- WALKER, K. S., DEAK, M., PATERSON, A., HUDSON, K., COHEN, P. & ALESSI, D. R. 1998. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J*, 331 (Pt 1), 299-308.
- WANG, Y., HUANG, B. P., LUCIANI, D. S., WANG, X., JOHNSON, J. D. & PROUD, C. G. 2008. Rheb activates protein synthesis and growth in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 812-20.
- WHITMAN, M., DOWNES, C. P., KEELER, M., KELLER, T. & CANTLEY, L. 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, 332, 644-6.
- WHITMAN, M., KAPLAN, D., ROBERTS, T. & CANTLEY, L. 1987. Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts. Implications for cellular regulation. *Biochem J*, 247, 165-74.
- WOODS, A., VERTOMMEN, D., NEUMANN, D., TURK, R., BAYLISS, J., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLING, D. & RIDER, M. H. 2003. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 278, 28434-42.
- 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.
- XING, Y., MUSI, N., FUJII, N., ZOU, L., LUPTAK, I., HIRSHMAN, M. F., GOODYEAR, L. J. & TIAN, R. 2003. Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 278, 28372-7.
- YAMAGATA, K., SANDERS, L. K., KAUFMANN, W. E., YEE, W., BARNES, C. A., NATHANS, D. & WORLEY, P. F. 1994. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem*, 269, 16333-9.
- YANG, H., JIANG, X., LI, B., YANG, H. J., MILLER, M., YANG, A., DHAR, A. & PAVLETICH, N. P. 2017. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552, 368-373.
- YANG, J., CRON, P., GOOD, V. M., THOMPSON, V., HEMMINGS, B. A. & BARFORD, D. 2002. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol*, 9, 940-4.
- YANG, Z. Z., TSCHOPP, O., HEMMINGS-MIESZCZAK, M., FENG, J., BRODBECK, D., PERENTES, E. & HEMMINGS, B. A. 2003. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem*, 278, 32124-31.
- ZHANG, D., CONTU, R., LATRONICO, M. V., ZHANG, J., RIZZI, R., CATALUCCI, D., MIYAMOTO, S., HUANG, K., CECI, M., GU, Y., DALTON, N. D., PETERSON, K. L., GUAN, K. L., BROWN, J. H., CHEN, J., SONENBERG, N. & CONDORELLI, G. 2010. mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*, 120, 2805-16.

- ZHONG, L., ZHOU, X., LI, Y., QING, K., XIAO, X., SAMULSKI, R. J. & SRIVASTAVA, A. 2008. Single-polarity recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transgene expression in vitro and in vivo: mechanism of transduction. *Mol Ther*, 16, 290-5.
- ZHOU, X., ZENG, X., FAN, Z., LI, C., MCCOWN, T., SAMULSKI, R. J. & XIAO, X. 2008. Adeno-associated virus of a single-polarity DNA genome is capable of transduction in vivo. *Mol Ther*, 16, 494-9.
- ZINCARELLI, C., SOLTYS, S., RENGO, G. & RABINOWITZ, J. E. 2008. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 16, 1073-80.

6 Anhang

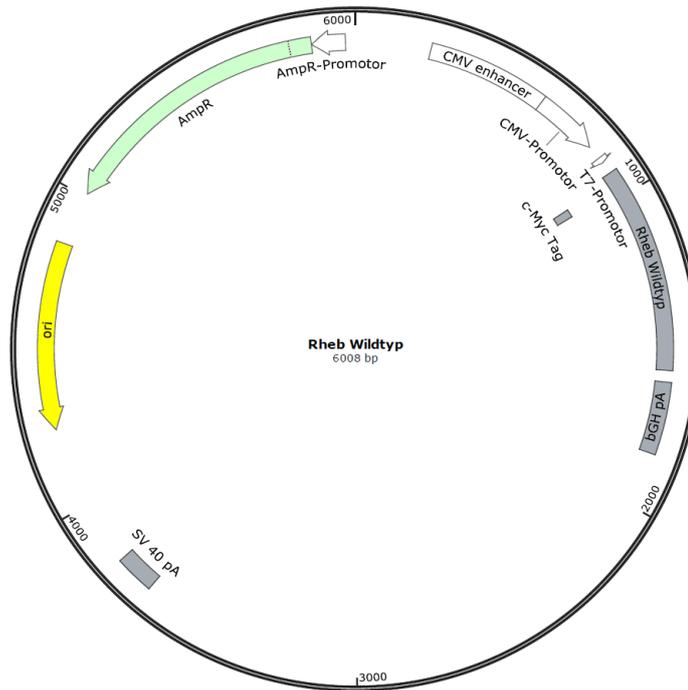


Abb. 39: Plasmid „Rheb Wildtyp“. Das Plasmid beinhaltet einen CMV-Promotor mit vorgeschaltetem CMV *enhancer*, einen T7-Promotor sowie ein mit c-Myc Tag versehenes, wildtypisches Rheb-Gen (Rheb Wildtyp). Weiterhin enthält das Plasmid ein bovines Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal (bGH pA). Alle weiteren Strukturen und Abkürzungen sind in Kapiteln 2.9.1 erklärt.

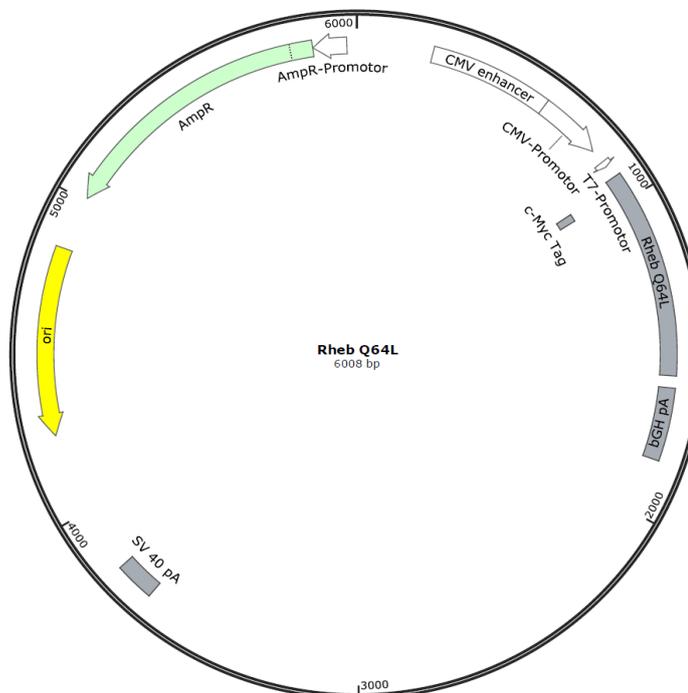


Abb. 40: Plasmid „Rheb Q64L“. Im Plasmid sind ein CMV-Promotor mit verstärkendem CMV *enhancer*, ein T7-Promotor sowie ein mit dem Fusions-Polypeptid c-Myc Tag versehenes Rheb Q64L-Gen enthalten. Zudem ist ein bovines Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal (bGH pA) vorhanden. Alle weiteren Strukturen und Abkürzungen sind in Kapiteln 2.9.1 beschrieben.

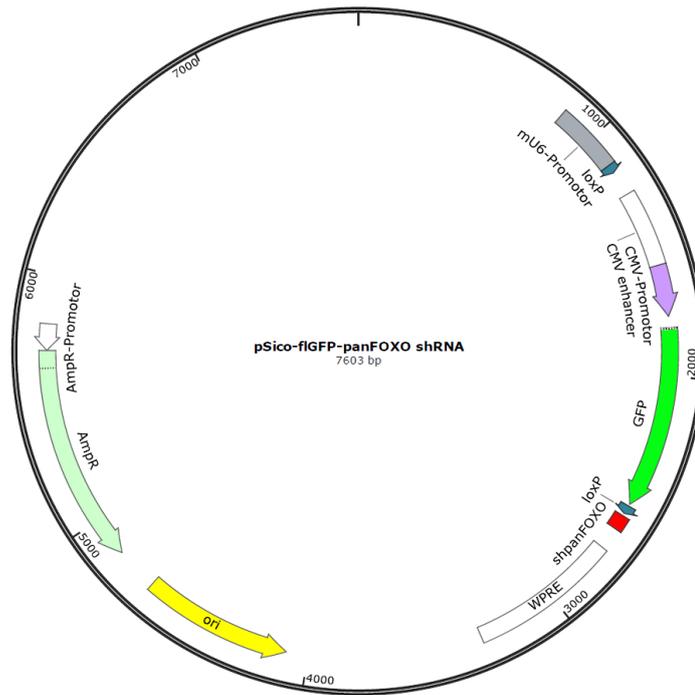


Abb. 41: Plasmid „pSico-flGFP-panFOXO shRNA“. Das Plasmid beruht auf dem Grundvektor „pSico“ und beinhaltet zusätzlich ein Gen zur Expression der panFOXO shRNA (shpanFOXO), welches stromabwärts der GFP-Kassette direkt hinter einer loxP-Sequenz lokalisiert ist. Alle weiteren dargestellten Strukturen und Abkürzungen sind in Kapitel 2.9.1 erläutert.

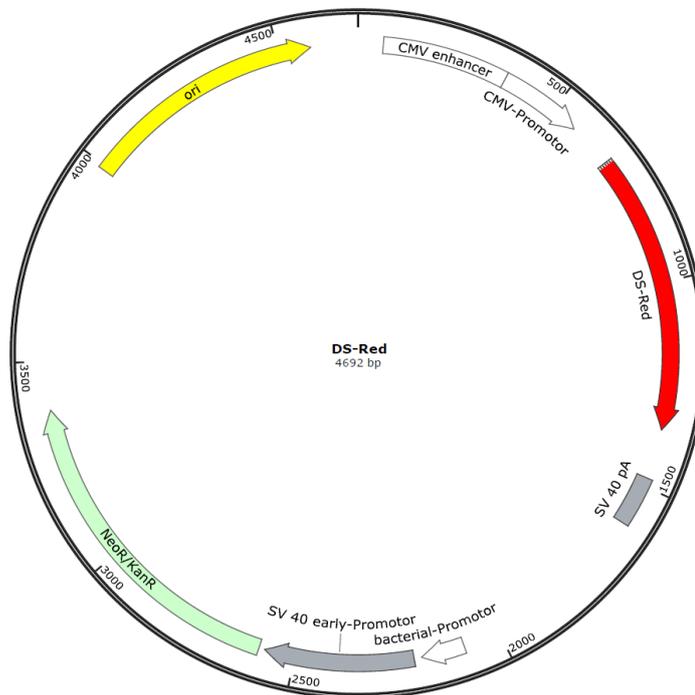


Abb. 42: Plasmid „DS-Red“. Im Plasmid ist ein Gen zur Expression eines rot fluoreszierenden Proteins (DS-Red) enthalten. Dieses steht unter Kontrolle des CMV-Promotors mit zusätzlichem CMV *enhancer*. Außerdem ist ein Neomycin-/Kanamycin-/G418-Resistenzgen (Neor/KanR) unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors (*bacterial*-Promotor) sowie SV 40 *early*-Promotors vorhanden. Alle weiteren Strukturen und Abkürzungen sind in Kapitel 2.9.1 beschrieben.

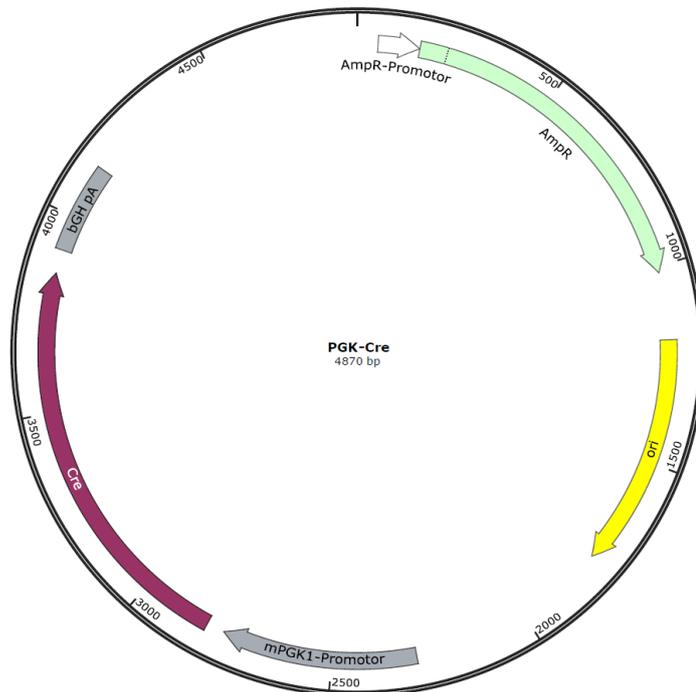


Abb. 43: Plasmid „PGK-Cre“. Das dargestellte Plasmid enthält ein Gen zur Expression einer Cre-Rekombinase (Cre) unter Kontrolle eines murinen PGK1-Promotors (mPGK1-Promotor). Zudem ist ein bovines Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal (bGH pA) enthalten. Alle weiteren Strukturen und Abkürzungen sind in Kapitel 2.9.1 erklärt.

Tabelle 22: Untersuchung der Interaktion kardialer Funktionsparameter und einer Rheb Q64L-Expression. Gezeigt sind die Ergebnisse einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für Tag 0 vs. Tag 14 zwischen Rheb Q64L-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen (Signifikanz für $p < 0,05$).

Funktionsparameter	p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 14
Herzzeitvolumen	0,3631
Ejektionsfraktion	0,7084
<i>fractional area change</i>	0,585
<i>fractional shortening</i>	0,6923
Schlagvolumen	0,24
Enddiastolisches Volumen	0,1354
Endsystolisches Volumen	0,8026

Tabelle 23: Untersuchung der Interaktion kardialer Strukturparameter und einer Rheb Q64L-Expression. Gezeigt sind die Ergebnisse einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für Tag 0 vs. Tag 14 bzw. Tag 0 vs. Tag 21 zwischen Rheb Q64L-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen (Signifikanz für $p < 0,05$).

Strukturparameter		p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 14	p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 21
Systole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,5941	0,5529
	<i>left ventricular internal diameter</i>	0,4286	0,6387
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,7579	0,7824
Diastole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,5931	0,9803
	<i>left ventricular internal diameter</i>	0,5266	0,6568
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,392	0,5764

Tabelle 24: Untersuchung der Interaktion des Herzgewichtes sowie des HW/BW *ratio* und einer Rheb Q64L-Expression. Gezeigt sind die Ergebnisse einer 2-Wege-Varianz-Analyse mit Messwiederholung für Tag 0 vs. Tag 14 zwischen Rheb Q64L-infizierten und nicht-infizierten iCMAKT1/2-KO-Mäusen (Signifikanz für $p < 0,05$).

Funktionsparameter	p-Wert Interaktion Tag 0 - Tag 14
Herzgewicht	0,2874
HW/BW <i>ratio</i>	0,2193

Tabelle 25: Vergleich der an Tag 21 echokardiographisch detektierten Messwerte für die kardialen Parameter des nicht-infizierten Kontrolltieres mit dem höchsten Körpergewicht im Vergleich zu den durchschnittlichen Messwerten aller nicht-infizierten Kontrolltiere

Parameter	Messwert ausgewähltes KO-Tier	Durchschnitts- messwert KO-Tiere \pm Standardabweichung (n = 10)
Herzeitvolumen (ml/min)	11,731179	15,2 \pm 3,2
Ejektionsfraktion (%)	21,739324	30,0 \pm 7,6
<i>fractional area change</i> (%)	15,674577	21,7 \pm 8,3
<i>fractional shortening</i> (%)	5,026516	5,3 \pm 2,1
Schlagvolumen (μ l)	19,747485	27,4 \pm 6,8
Enddiastolisches Volumen (μ l)	90,837622	93,6 \pm 22,3
Endsystolisches Volumen (μ l)	71,090137	66,2 \pm 20,2
Systole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,5525
	<i>left ventricular internal diameter</i>	3,85125
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,609375
Diastole	<i>left ventricular anterior wall</i>	0,511875
	<i>left ventricular internal diameter</i>	4,298125
	<i>left ventricular posterior wall</i>	0,463125
Herzgewicht (mg)	57,592382	64,7 \pm 7,4
HW/BW <i>ratio</i>	1,75	2,14 \pm 0,32
Körpergewicht (g)	33	30,29 \pm 1,61
Überleben (Tage)	28	24,4

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke für die Möglichkeit der Promotion und die ausgesprochen gute Betreuung meiner Arbeit. Durch die erhaltene Unterstützung habe ich immer ein klares Ziel vor Augen gehabt. Auch die Möglichkeit, jederzeit mit Fragen zu dir kommen zu können, habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Herrn Dr. Johannes Stegbauer möchte ich für die Co-Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Stefanie Gödecke für die tatkräftige Unterstützung bedanken. Du warst mir jederzeit bei der Umsetzung meiner Arbeit behilflich, hast alle meiner „kleinen Fragen“ beantwortet und es geschafft, mich trotz mancher Rückschläge stets zu motivieren.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. André Heinen für die Durchführung der echokardiographischen Aufnahmen sowie Frau Dr. Rianne Nederlof für die Unterstützung im Labor und bei der statistischen Auswertung.

Auch bei den weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes sowie des Graduiertenkollegs IRTG 1902 möchte ich besonders für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima sowie die Unterstützung bei meiner Arbeit danken. Ein besonderes Dankeschön gilt Susanne Küsters und Selina Dangeleit für das Anlernen und die Unterstützung im Zellkultur- und Western Blot-Labor sowie Daniela Müller und Julia Albrecht für die Hilfe bei den Mausmodellen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Verlobten Insa bedanken, die mich im Privaten immer unterstützt haben. Meinen Dank dafür kann ich nicht in Worte fassen.