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

Einfluss von p53 auf die Herzfunktion im Kardiomyozyten-spezifischen AKT-1/2-Doppel-Knockout-Modell

Dissertation

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

vorgelegt von
Lennart Friedrichs
2026

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

Zweitgutacherin: Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Für Lore und Günter

Zusammenfassung:

In einem Mausmodell mit einem induzierbaren, Kardiomyozyten-spezifischen Knockout (KO) der Proteinkinasen AKT1 und AKT2 (iCMAKT12KO) entwickelt sich nach Induktion des Knockouts eine progrediente Herzinsuffizienz mit kardialer Atrophie, gesteigerter Autophagie und metabolischen Veränderungen, die nach spätestens 28 Tagen letal ist. In einer Transkriptom-Analyse dieser KO-Herzen wurde mittels Ingenuity Pathway Analyse gefunden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert war. Interessanterweise entwickeln kardiomyozytenspezifische p53-KO-Mäuse sechs Monate nach Induktion des KO eine kardiale Hypertrophie. Dies führte zur Hypothese, dass eine in iCMAKT12KO-Mäusen erfolgte Aktivierung von p53 zur Entwicklung der Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte die Zucht und Analyse von Mäusen, die über einen induzierbaren dreifach–KO für AKT1, AKT2 und p53 verfügten. Diese Mäuse (iCMAKT12p53KO) wurden parallel zu iCMAKT12KO, iCM-p53KO und wildtypischen Mäusen (WT) nach KO-Induktion über drei Wochen sequentiell echokardiographisch untersucht. Die Funktionsanalyse ergab, dass sich Atrophie und Funktionseinschränkung der Herzen in den triple-KO Mäusen (iCMAKT12p53KO) vergleichbar zu der Entwicklung in den iCMAKT12KO-Mäusen entwickelten. PCR-Untersuchungen mit kardialer DNA ergaben, dass es nach KO-Induktion zur Rekombination im p53-Gen kommt. Da in Herzgewebe neben Kardiomyozyten auch andere Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten zu finden sind, in denen keine Rekombination am p53-Gen zu erwarten ist, wurde zur Quantifizierung der KO-Effizienz ein Protokoll zur Isolierung von Kardiomyozyten-Zellkernen über FACS-Sorting etabliert. PCR-Analysen an DNA aus angereicherten Kardiomoyzyten-Zellkernen zeigten, dass es nur zu einem partiellen p53-KO kam.

Um die Auswirkungen der partiellen p53-Deletion näher zu analysieren, wurden Transkriptomanalysen mit kardialer RNA aus WT, iCMp53KO-, iCMAKT12KO- und iCM-AKT12p53KO-Mäusen durchgeführt. Wie in früheren Untersuchungen führte die Inaktivierung von AKT 1 und AKT2 zu massiven Veränderungen im Transkriptom. Interessanterweise waren auch in iCMp53KO-Herzen 733 Transkripte im Vergleich zum WT differentiell reguliert. Eine IPA Analyse zeigte, dass unter den 10 am stärksten regulierten Signalwegen „Cardiac conduction“ (9.2 % des Gensets), „Tp53 regulates metabolic genes“ (9.4%) und „Transcriptional regulation by MecP2“ (11.1 %) herunter reguliert werden und auf einen kardialen Phänotyp hindeuten. Ein direkter Vergleich von iCMAKT12KO und iCMAKT12p53KO ergab lediglich einen signifikanten Unterschied für die MicroRNA Mir450b.

Dies zeigt, dass ein partieller kardiomyozytärer p53-Knockout innerhalb des Beobachtungszeitraums von 3 Wochen zu einem milden kardialen Phänotyp im p53-Einzel-KO führt. Die durch die kardiomyozytäre AKT-Deletion induzierte kardiale Atrophie kann nicht durch eine partielle Deletion von p53 kompensiert werden, und die Entwicklung der Herzinsuffizienz ist in iCMAKT12p53-Dreifach-Knockout Mäusen im Vergleich zu iCMAKT12KO nicht verlangsamt.

Des Weiteren beschäftigte sich die Arbeit mit der Aktivierung von p53 in iCMAKT12KO Herzen. p53 kann durch die Proteinkinasen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) phosphoryliert und so stabilisiert werden. Tatsächlich konnte im Western Blot mit phospho-ATM/ATR-Substrat-spezifischen Antikörpern eine erhöhte Kinaseaktivität in iCMAKT12KO-Herzen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Phosphorylierung des spezifischen ATM/ATR-Substrats Histon H2A.X konnte allerdings weder im Western Blot an angereicherten Kardiomyozytenkernen noch in der Immunhistochemie nachgewiesen werden. Es bleibt daher offen, ob die Proteinkinasen ATM/ATR an einer Aktivierung von p53 in iCMAKT12KO-Herzen beteiligt sind.

Summary:

In a mouse model with inducible, cardiomyocyte-specific knockout (KO) of the protein kinases AKT1 and AKT2 (iCMAKT12KO), progressive heart failure develops after induction of the knockout, with cardiac atrophy, increased autophagy, and metabolic changes, which is lethal after 28 or less days. In a transcriptome analysis of these KO hearts, Ingenuity Pathway Analysis revealed that the transcription factor p53 was highly likely to be activated. Interestingly, cardiomyocyte-specific p53 KO mice develop cardiac hypertrophy six months after induction of the KO. This led to the hypothesis that activation of p53 in iCMAKT12KO mice could contribute to the development of heart failure.

To test this hypothesis, mice with an iCMAKT12 knockout and an iCMp53 knockout were bred and analyzed. These mice (iCMAKT12p53KO) were examined sequentially by echocardiography over three weeks following KO-induction, in parallel with iCMAKT12KO, iCM-p53KO, and wild-type (WT) mice. Functional analysis revealed that atrophy and functional impairment of the hearts in the triple KO mice (iCMAKT12p53KO) developed similarly to that observed in the iCMAKT12KO mice. PCR analysis of cardiac DNA revealed that recombination occurs in the p53 gene after KO-induction. Since cardiac tissue contains not only cardiomyocytes but also other cell types such as endothelial cells and fibroblasts, in which no recombination at the p53 gene is to be expected, a protocol for isolating cardiomyocyte cell nuclei via FACS sorting was established to quantify KO efficiency. PCR analyses of DNA from enriched cardiomyocyte cell nuclei showed that only partial p53 KO occurred.

To analyze the effects of partial p53 deletion in more detail, transcriptome analyses were performed using cardiac RNA from WT, iCMp53KO, iCMAKT12KO, and iCM-AKT12p53KO mice. As in previous studies, the inactivation of AKT 1 and AKT2 led to massive changes in the transcriptome. Interestingly, 733 transcripts were also differentially regulated in iCMp53KO hearts compared to WT. An IPA analysis showed that among the 10 most strongly regulated signaling pathways, “Cardiac conduction” (9.2% of the gene set), “Tp53 regulates metabolic genes” (9.4%), and “Transcriptional regulation by MecP2” (11.1%) were downregulated, indicating a cardiac phenotype. A direct comparison of iCMAKT12KO and iCMAKT12p53KO revealed only one significant difference for the microRNA Mir450b.

This shows that partial cardiomyocyte p53 knockout leads to a mild cardiac phenotype in p53 single KO within the observation period of 3 weeks. The cardiac atrophy induced by cardiomyocyte AKT deletion cannot be compensated for by partial deletion of p53, and the development of heart failure is not slowed in iCMAKT12p53 triple knockout mice compared to iCMAKT12KO.

Furthermore, the study examined the activation of p53 in iCMAKT12KO hearts. p53 can be phosphorylated and thus stabilized by the protein kinases ATM (ataxia-telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3-related). Indeed, Western blot analysis with phospho-ATM/ATR substrate-specific antibodies revealed increased kinase activity in iCMAKT12KO hearts. However, increased phosphorylation of the specific ATM/ATR substrate histone H2A.X could not be detected in Western blot analysis of enriched cardiomyocyte nuclei or in immunohistochemistry. It therefore remains unclear whether the protein kinases ATM/ATR are involved in the activation of p53 in iCMAKT12KO hearts.

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celcius
αMHC	*myosin heavy chain α*
µ	mirco-
A	Ampere; Adenin
AGC	Proteinkinasen A, G und C
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
ARC	*apoptosis repressor with a reduction in caspase recruitment domain*
ATM	*ataxia telangiectasia mutated*
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5A1	*ATP synthase F1 subunit alpha*
ATR	*ataxia telangiectasia and Rad3-related*
B-Mode	*Brightness modulation*
BAX	*BCL2 associated X, apoptosis regulator*
BCA	*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure
BCL-2	*B-cell CLL/lymphoma 2*
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
BIM	*B-cell Lymphoma 2-like protein 11*
BMFZ	Biolgisch-Medizinisches Forschungszentrum
Bnip	*BCL2 Interacting Protein 3*
BSA	*bovine serum albumi,* Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff, Cytosin
c	centi**-**
C-terminal	Carboxy-terminal
CAI	Centre for advanced Imaging
Cdk2/Cdk4	*Cyclin Dependent Kinase 2/ Cyclin Dependent Kinase 4*
cDNA	*complementary DNA***,** komplementäre DNA
cMyc	*avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*
CO	*Cardiac output*, Herzzeitvolumen
Cre	*causes recombination*
CT	*cycle threshold*
CypD	Cyclophilin D

Da	Dalton
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	*epidermal growth factor*
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches Volumen
et al.	*et alii*, und andere
F	Phenylalanin
FAC	*fraction area change*
FACS	*Fluorescence-Activated Cell Sorting*
FasL	*Fas ligand*
FBS	*fetal bovine serum*, fetales Rinderserum
Floxed	*flanked by loxP*
FoxO	*forkhead box O*
FS	*fractional shortening*, fraktionelle Verkürzung
g	Gramm
G	Guanin
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3	Glycogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
HZV	Herzzeitvolumen
iCM	*Inducible cardiomyocyte-specific*; induzierbar, kardiomyozytenspezifisch
IGF	*Insulin-like growth factor*
IPA	Ingenuity Pathway Analysis

k	kilo-
KO	Knockout
l	Liter
loxP	*locus of X-over P1*
LVAW	*left ventricular anterior wall thickness*; anteriore Wanddicke des linken Ventrikels
LVID	*left ventricular internal diameter*, linksventrikulärer Innendurchmesser
LVPW	*left ventricular posterior wall thickness*, posteriore Wanddicke des linken Ventrikels
m	mili-, Meter
M	Mol
M-Mode	*motion modulation*
MCL1	*myeloid cell leukemia-1*
Mdm	*Mouse double minute*
Mer	*mutated estrogen receptor*, mutagenisierter Östrogenrezeptor
MgCl2	Magnesiumchlorid
MPT	*mitochondrial permeability transition*
mPTP	*mitochondrial permeability transition pore*
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
MTA	medizinisch technische/r Assistent/in
mTorc	*mammalian target of rapamycin*
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxyd, Natronlauge
NGS	*Normal Goat Serum*
NHEJ	*non-homologous DNA end joining*
Noxa/*PMAIP1*	*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
NRF2	*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
OHTX	Hydroxy-Tamoxifen
P	Phosphat
p	*probabilitas*, Wahrscheinlichkeit
PBS	*phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCM-1	*Pericentriolar Material 1*

PCR *polymerase chain reaction,* Polymerase Kettenreaktion
PDGF *platelet derived growth factor*
PDK1 *Phosphoinositide-dependent Kinase-1*
PenStrep Penicillin/Streptomycin
PFT-α Pifithrin-α
PGC-1 *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*
PH Pleckstrin-Homologie-Domäne
pH *potentia hydrogenii*
PI3,4P2 *Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat*
PI3K *Phosphoinositid(-3-Kinase)*
PI4,5P2 *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*
PI4P *Phosphatidylinositol-4-phosphat*
PIKK *phosphatidylinositol-3 -(PI-3)-kinase-like Kinase*
PIP3 *Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat*
Pparα *Peroxisome proliferator-activated receptor α*
PRAS40 *Proline-rich AKT substrate of 40 kDa*
PSLA *parasternal long-axis***,** parasternale lange Achse
PTEN *Phosphatase and Tensin homolog*
PUMA *p53 upregulated modulator of apoptosis*

qPCR real-time quantitative PCR, quantitative Echtzeit PCR

Rheb *Ras homolog enriched in brain*
RNase Ribonukleasen
rpm *revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute

S Serin
s Sekunde
SAX *short axis***,** parasternale kurze Axe
SDS *Sodium dodecyl sulfate***,**
Serca sarco/ER-Ca^{2+}-ATPase
SHIP 5`-Phosphatase SH2-domain-containing-inositol-5´-phosphatase
SV *Stroke Volume*, Schlagvolumen

T Thymin, Threonin
TAC *trans-aortic-constriction*
TAD *transactivation domain*
TBC1D7 *TBC1 Domain Family Member 7*

TBS	*tris-buffered saline,* Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	*tris-buffered saline with Tween*
TPS	*total protein Stain,* Gesamtproteinfärbung
Trail	*Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*
Tris	*Tris(hydroxymethyl)-amniomethan*
TSC	*tuberous sclerosis*
TUNEL	*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*
V	Volt
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
WGA	*Wheat Germ Agglutinin*
Y	Tyrosin

Inhalt

1 Einleitung 1
1.1 AKT 2
1.1.1. AKT Struktur 3
1.1.2 AKT Aktivierung 4
1.1.3 AKT Substrate, Signalwege und Wirkung 5
1.1.4 AKT im kardialen System 7
1.1.5 Das iCMAKT12-Knockoutmodell 8
1.2 p53 10
1.2.1 p53 Struktur 10
1.2.2 p53 Aktivierung 11
1.2.3 p53 Wirkung 12
1.2.4 p53 im kardiovaskulären System 14
1.3 Ziele der Arbeit 16
2. Material und Methoden 16
2.1. Material 16
2.1.1 Laborgeräte 16
2.1.2 Verwendete Softwareprogramme 18
2.1.3 Chemikalien 18
2.1.4 Puffersysteme 19
2.1.5 Für die Zellkultur verwendete Substanzen 21
2.1.5 Verwendete Kits 21
2.1.7 Antikörper 22
2.1.8 Primer 22
2.2. Methoden 23
2.2.1 Das transgene Mausmodell 23
2.2.2 Induktion des Knockouts durch das Cre-LoxP-System 23
2.2.3 Echokardiographie 24
2.2.4 Organentnahme 27
2.2.5 Zellkultur 27
2.2.6 Proteinfraktionierung aus Herzgewebe 28
2.2.7 Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch Dichtegradientenzentrifugation 29
2.2.8 Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch FACS-Sorting 30
2.2.9 Analyse von Proteinen 32
2.2.9.1 Western Blot 32
2.2.9.2 Immunhistochemie 34
2.2.10 PCR Analyse von RNA und DNA 36
2.2.11 RNA Sequenzierung 38

3. Ergebnisse 38
3.1 Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR in iCMAKT12KO-Herzen 38
3.1.1 Etablierung der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation Kardiomoytyzen-Zellkernen 40
3.1.2. Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR mittels Western Blot 43
3.1.3 Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR mittels Immunhistochemie 44
3.2 Untersuchung der DNA-PKcs Aktivität in iCMAKT12KO-Herzen 48
3.3 Charakterisierung des iCMp53KO 49
3.3.1 p53 Western-Blot 49
3.3.2 Untersuchung der p53-Deletion durch PCR an Herz-DNA 50
3.3.3 Quantifizierung der Deletion durch PCR auf Herz-DNA 52
3.3.4 Quantifizierung der Deletion durch DNA-PCR nach FACS-Sorting Anreicherung 54
3.4 Echokardiographische Untersuchung von iCMAKT12p53KO-, iCMAKT1/2KO- und WT-Mäusen 56
3.5 Kardiale Transkriptomanalyse von iCMp53KO-, iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO- und wildtypischen-Mäusen 58
4. Diskussion 62
4.1 Untersuchung der Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO Herzen 63
4.2 Untersuchung der DNA-PKcs Aktivität in iCMAKT12KO Herzen 67
4.3 Einfluss von p53 auf die myokardiale Funktion von iCMAKT12KO-Mäusen 68
4.4 Vergleich des kardialen Transkriptoms zwischen iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO, iCMp53KO und wildtypischen Mäusen 71
4.5 Schlussfolgerung 74
5. Literatur- und Quellenverzeichnis 75
6. Anhang 84
7. Danksagung 87

1 Einleitung

Den Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie sowohl in Deutschland als auch weltweit zu den häufigsten Ursachen von Krankheit und Todesfällen zählen und damit sowohl eine gesamtgesellschaftliche als auch eine gesundheitspolitische Bedeutung aufweisen. So zeigte sich für das Jahr 2022, dass 33,6 % aller Todesfälle in Deutschland durch Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems verursacht wurden. Innerhalb dieser Gruppe hat die Herzinsuffizienz mit einem Anteil von 10,5 % nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit mit 21,7 % und dem akuten Myokardinfarkt mit 13 % eine große Relevanz (Statistisches Bundesamt, 2023). Dementsprechend spielt die

Forschung an Erkrankungen im Bereich des Herz- und Kreislaufsystems eine entscheidende Rolle, um sowohl Todesfälle und Krankheit als auch hohe Kosten, die durch sie verursacht werden, zu verhindern. Zur Erforschung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz steht dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie durch das iCMAKT12-Knockout-Modell (iCMAKT12KO) ein Mausmodell zur Verfügung, in dem eine Herzinsuffizienz durch die Gendeletion der beiden Proteinkinasen AKT1 und AKT2 erzeugt werden kann. In diesem Mausmodell induziert die Deletion, dass es innerhalb von drei Wochen zu einer gesteigerten Autophagie und damit zu einer myokardialen Atrophie kommt. Dies führt schlussendlich zum Tod der Knockout-Tiere 21-28 Tage nach Induktion. Es konnten darüber hinaus starke Veränderungen des Transkriptoms beobachtet werden, wobei 21 Tage nach Knockoutinduktion mehr als 3000 Gene in ihrer Expression verändert waren [1]. Anhand dieses Modells kann der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz beobachtet und erforscht werden. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor ist dabei p53. Daher beschäftigte sich diese Arbeit mit dem Einfluss von p53 auf die Herzfunktion im kardiomyozytenspezifischen AKT-1/2-Doppel-Knockout-Modell.

1.1 AKT

Um auf sich ändernde Umwelteinflüsse schnell reagieren zu können, kommt in einem komplexen Organismus der Kommunikation zwischen den Zellen eine große Bedeutung zu. So müssen Zellen in unterschiedlichen Organen in der Lage sein, abgestimmt auf die wechselnden Bedingungen zu reagieren. Im Rahmen dessen spielen interzelluläre Signalmoleküle eine entscheidende Rolle. Ebenfalls entscheidend ist anschließend jedoch auch, die Signale von extrazellulär in intrazelluläre Signalwege zu konvertieren. Hier haben membranständige Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einen großen Einfluss. Sie empfangen durch Bindung ihrer Liganden extrazelluläre Signale und übertragen diese nach intrazellulär. In der darauffolgenden intrazellulären Signaltransduktion kommt Proteinkinasen, die in der Lage sind, Phosphatreste von ATP- und GTP-Molekülen auf ihre Substrate zu übertragen und diese so posttranslational zu verändern, eine große Bedeutung zu [2]. Die Proteinkinasen können phylogenetisch anhand der Struktur ihrer katalytischen Domäne in vier Gruppen eingeteilt werden. Eine der Gruppen ist die der AGC-Kinasen. Diese Gruppe besteht aus 63 evolutionär verwandten Kinasen. Der Name AGC leitet sich dabei von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) und der Proteinkinase C (PKC) ab [3]. Sie phosphorylieren bevorzugt die Aminosäuren Serin und Threonin, insbesondere, wenn diese in der Nähe der basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin liegen [2]. Bei AKT handelt es sich um eine Kinase der AGC-Familie [2], die aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu den

Proteinkinasen A und C auch unter dem Namen Proteinkinase B (PKB) bekannt ist [4] [5]. Sie spielt über verschiedene, von ihr angestoßene Signalwege eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Weiterleitung von Signalen und ist so in fast allen Zellen von Säugetieren vorzufinden. Dort nimmt sie eine zentrale Rolle in der Regulation von Wachstum, Überleben, Proliferation und Metabolismus ein [6]. Es sind drei verschiedene AKT Isoformen bekannt: AKT1, AKT2 und AKT3, beziehungsweise PKBalpha, PKBbeta und PKBgamma [7-9]. Von diesen drei Isoformen werden im Herzen vor allem AKT1 und AKT2 exprimiert [10].

1.1.1 AKT Struktur

Die Struktur der drei AKT-Isoformen ähnelt sich in ihrem Aufbau stark. Alle drei besitzen an ihrem Amino-Ende eine PH-Domäne (Pleckstrin-homology-Domäne), eine zentral gelegene Kinase-Domäne und eine am Carboxyl-Ende gelegene regulatorische Domäne [11] (siehe Abbildung 1). Bei der PH-Domäne handelt es sich um eine in vielen weiteren Proteinen zu findende Struktur, die initial nach Pleckstrin, dem größten Phosphorylierungsziel der Proteinkinase C in Thrombozyten, benannt wurde [12]. Ihre Funktion besteht darin, mit Membranlipiden wie Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat, die zuvor von Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) produziert worden sind, zu interagieren [13]. Zudem spielt sie eine signifikante Rolle in der Erkennung von Upstream-Kinasen und der Membrantranslokation [11]. Die Kinase-Domäne befindet sich in der Mitte des Moleküls und weist große Ähnlichkeiten mit denen weiterer AGC-Kinasen auf [14]. Ebenfalls befindet sich hier im Aktivierungssegment der Kinase-Domäne an Positionen 305 (AKT3), 308 (AKT1) oder 309 (AKT2) die Aminosäure Threonin, deren Phosphorylierung für die Aktivierung der Kinase essentiell ist [14]. In der etwa 40 Aminosäuren umfassenden, am Carboxyl-Ende des Proteins gelegenen regulatorischen Domäne befindet sich die hydrophobe Aminosäuresequenz F-X-X-F/Y-S/T-Y/F (F=Phenylalanin, X= eine beliebige Aminosäure, Y= Thyrosin, S= Serin T= Threonin). Auch diese Aminosäuresequenz findet sich in weiteren Vertretern der AGC-Kinase-Familie [14]. Eine Phosphorylierung der hier gelegenen Aminosäuren Serin (472, 473 oder 474) und Threonin ist entscheidend für die vollständige Aktivierung von AKT [15].

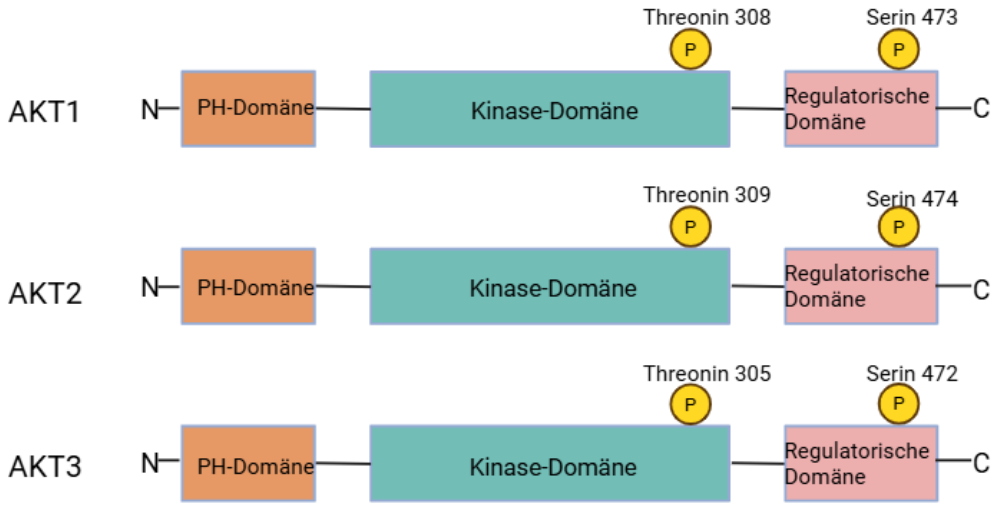


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der drei AKT-Isoformen. In der Abbildung dargestellt ist der sehr ähnliche Strukturelle Aufbau von AKT1, AKT2 und AKT3. Sie verfügen über ein N-terminale PH-Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne. Ebenfalls dargestellt sind die für die Aktivierung notwendigen Phosphorylierungen von Threonin und Serin, welche sich zwischen den drei Isoformen geringfügig unterscheiden (AKT1 Threonin 308 und Serin 473, AKT2 Threonin 309 und Serin 474, AKT3 Threonin 305 und Serin 472) [11]

1.1.2 AKT Aktivierung

Es wurden mehrere Rezeptoren extrazellulärer Signalmoleküle identifiziert, die zu einer Aktivierung von AKT führen können. So zeigte sich, dass Liganden von Rezeptortyrosinkinasen wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), Insulin, EGF (*epidermal growth factor*), IGF1 *(insulin-like growth factor 1*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) den Zustand von AKT verändern können, wobei der Einfluss von Insulin und IGF am besten beschrieben ist [11]. Ebenfalls sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit Adenosin, Angiotensin II oder Bradykinin interagieren, in der Lage, eine AKT-Aktivierung zu bewirken [6] [16]. In der Folge der Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an ihre membranständigen Rezeptoren kommt es zur Rekrutierung eines oder mehrerer Mitglieder der Phosphoinositid-3-Kinasen-(PI3K)-Familie [17]. Mitglieder der Klasse-1 dieser Familie bewirken anschließend durch eine Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI4,5P2) die Synthese von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3), woraufhin sich in der Regel die Umwandlung in Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI3,4P2) durch die *5`-Phosphatase SH2-domain-containing-inositol-5´-phosphatase* (SHIP) anschließt [17-19]. Mitglieder der Klasse zwei der PI3K-Familie hingegen produzieren, durch eine Phosphorylierung ihres Substrates Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P), Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI3,4P2)[20]. Trotz unterschiedlicher Isoformen von PI3K in unterschiedlichen Zelltypen und

Unterschieden in ihrer Aktivierung kommt es anschließend zum selben Resultat: AKT wird durch die Interaktion der PH-Domäne mit PIP3 oder PI3,4P2 zur Zellmembran bewegt und aktiviert. Die Aktivierung der verschiedenen PI3K bewirkt eine Phosphorylierung von AKT1 an den Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 durch die *Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (*PDK1), was zu einer Aktivierung führt [21]. Auch AKT2 (Threonin 309 und Serin 474) sowie AKT3 (Threonin 305 und Serin 472) benötigen Phosphorylierungen an ähnlichen Positionen, um vollständig aktiviert zu werden. Insbesondere involviert in die Phosphorylierung von AKT an Threonin an Position 308 ist die Kinase PDK1 [22, 23]. Interagiert AKT nicht mit PIP3 oder PI3,4P2, befindet sich die PH-Domäne in der inhibitorischen „PH-In“ Konfiguration. Kommt es zu einer Bindung von AKT1 an PIP3 oder PI3,4P2 bewirkt dies eine Konfigurationsänderung in die „PH-Out“ Konfiguration, was eine Interaktion mit PDK1 und eine Phosphorylierung ermöglicht [24]. Daneben spielt auch mTORC eine Rolle in der Phosphorylierung von AKT [25]. Am Threonin 308 phosphoryliertes AKT ist zwar aktiv, jedoch nur in vermindertem Maße, wohingegen eine zusätzliche Phosphorylierung an Serin 473 zu einer Stabilisierung und einer Maximierung der Aktivität führt [21]. Um eine unbegrenzte Aktivität dieses Signalweges zu verhindern, kommt es in der Folge zur Beendigung durch eine Dephosphorylierung von PIP3 zu PI4,5P2 durch die Phosphatase PTEN [26].

1.1.3 AKT Substrate, Signalwege und Wirkung

Es konnten bereits mehr als 100 AKT-Substrate verschiedener funktioneller Klassen identifiziert werden, wobei es sich unter anderem um Lipid- und Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, metabolische Enzyme, E3-Ubiquitin-Ligasen, Zellzyklus-Regulatoren und Regulatoren von kleinen G-Proteinen handelt. Gemeinsam haben sie, dass AKT sie anhand einer Aminosäuresequenz in der Nähe eines hydrophoben Restes erkennt, an Serin oder Threonin phosphoryliert und so meist aktiviert, teilweise jedoch auch deaktiviert. Im Folgenden werden drei der am besten charakterisierten AKT-Substrate herausgestellt und ihre Wirkungen beschrieben [6]. Das erste bekannte AKT Substrat war die Serin-Threonin-Proteinkinase Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) [27]. Die beiden Isoformen GSK-3α und GSK3β, die über 85% ihrer Sequenz teilen [28], sind dauerhaft und ohne äußere Signale durch Wachstumsfaktoren aktiv. Dabei ist ihre Wirkung zum größten Teil inhibitorisch [28]. Diese inhibitorische Wirkung erstreckt sich unter anderem auf MCL-1 [29-31], ein antiapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie, sowie auf metabolische Enzyme wie die namensgebende Glykogensynthase [32, 33] und den Metabolismus regulierende Transkriptionsfakoren wie c-Myc [34], HIF-1 oder NRF2 [28]. Diese inhibitorischen Phosphorylierungen wirken sich im Folgenden negativ auf das Überleben, die Proliferation und den Metabolismus der Zelle aus. Kommt es hingegen zu einer beispielsweise durch Wachstumsfaktoren induzierten Aktivierung

von AKT, führt dies zu einer Reduktion der Aktivität von GSK-3. Im Rahmen dieses Signalwegs phosphoryliert AKT die GSK-3 und erzeugt so ein intramolekulares Pseudosubstrat, welches die Phosphatbindungsstelle von GSK-3 verschließt und so die Substratbindung an GSK-3 inhibiert. Diese AKT-vermittelte Inhibition der GSK-3-Aktivität wirkt sich folglich positiv auf Überleben, Proliferation und Metabolismus aus [6].

Ein weiteres AKT-Substrat ist die Familie der Forkhead Box O (FOXO) Transkriptionsfaktoren. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren, bestehend aus FOXO 1,3,4 und 6, induzieren, wenn sie im Zellkern lokalisiert sind, die Expression von proapoptotischen Faktoren wie PUMA und Zellzyklusarrest-induzierende Faktoren wie p21. Darüber hinaus wirken sie katabolisch und wachstumsinhibierend [35, 36]. Zudem zeigte sich, dass die FOXO-Isoform FOXO3a die Expression von BIM, einem proapoptotischen Mitglied der BCL-2 Familie, hochreguliert. Ebenfalls steigert FOXO3a die Expression von FASL (FasL-Ligand) und TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand). Dabei handelt es sich um Proteine, die bei Bindung an ihre Rezeptoren Apoptose induzieren [37]. Kommt es zu einer AKT-Aktivierung über PI3K, wird FOXO AKT abhängig an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen bewirken eine Bindung von Phosphatgruppen-bindenden Proteinen, die zu einem nukleären Export von FOXO in das Cytoplasma führt [38, 39]. So wird die Expression von FOXO abhängigen Genen vermindert und dadurch FOXO abhängige Apoptose, Cellzyklusarrest und Katabolismus inhibiert. Über diesen Signalweg wirkt sich AKT-Aktivierung positiv auf Überleben, Wachstum und Proliferation aus [6].

Ein dritter AKT-induzierter Signalweg führt über TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*) und mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) [40]. Aktiviertes AKT ist in der Lage, TSC2 zu phosphorylieren und so zu inhibieren [41-43]. In einem Proteinkomplex mit TSC1 (*Tuberous Sclerosis Complex 1*) und TBC1D7 (*TBC1 Domain Family Member 7*), welcher als TSC-Komplex bezeichnet wird, rekrutiert TSC2 die GTPase RHEB (*Ras homolog enriched in brain*) und sorgt für einen Übergang von seiner RHEB-GTP Form in die RHEB-GDP Form [40]. Da RHE-GTP essentiell für die Aktivierung von mTORC1 ist, ist der TSC-Komplex ein Inhibitor der mTORC-Aktivierung. Durch die AKT-katalysierte inhibitorische Phosphorylierung von TSC2 kommt es so folglich durch eine Inhibition des inhibitorischen TSC-Komplexes zur Aktivierung von mTORC1. Eine weitere Möglichkeit, über die AKT zur Aktivierung von mTORC beitragen kann, ist über die Phosphorylierung des Proteins PRAS40 (*Proline-rich AKT substrate of 40 kDa*). Bei PRAS40 handelt es sich ebenfalls um einen Inhibitor von mTORC, welcher durch eine AKT-abhängige Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 246 in seiner inhibitorischen Wirkung gehemmt wird [44-46]. Eine mTORC-Aktivierung wiederum fördert anabolische Prozesse wie die Lipid-, Protein- und Nukleotidsynthese, während es katabolische Prozesse wie die Autophagie vermindert [6].

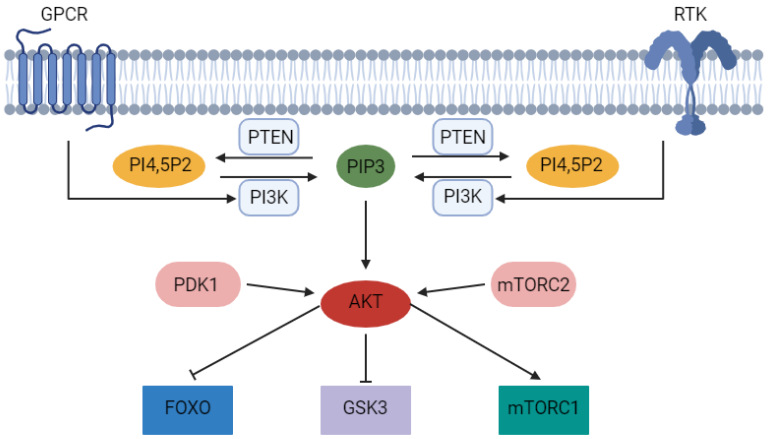


Abb. 2: AKT Aktivierung und Signalwege. In der Abbildung ist vereinfacht die Aktivierung von AKT dargestellt. Durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen kommt zu einer PI3K abhängigen Synthese von PIP3 aus PI4,5P2. PIP3 wiederrum aktiviert AKT über PDK1. Darüber hinaus können auch mTORC2 und PDK1 zu einer AKT Phosphorylierung und Aktivierung beitragen. AKT inhibiert FOXO und GSK3 und aktiviert mTORC1.

1.1.4 AKT im kardialen System

Obwohl alle drei zuvor beschriebenen Isoformen von AKT im Herz exprimiert werden (AKT3 nur in geringem Maße), sind im Myokard vor allem AKT1 und AKT2 von Relevanz [47]. Die beiden Isoformen erfüllen jedoch verschiedene Funktionen. Dabei zeigte sich, dass AKT1 im Gesamtorganismus vor allem für Wachstum von entscheidender Bedeutung ist, da AKT1-Knockout-Mäuse ein deutlich kleineres Körperwachstum aufwiesen [48]. Im Herzen konnte nachgewiesen werden, dass AKT1 mit physiologischer, nicht aber mit pathologischer Hypertrophie assoziiert ist. So konnte gezeigt werden, dass in einem Mausmodell mit einem kardiomyozytären Knockout von AKT1 weder die Stimulation mit IGF noch Schwimmtraining zu kardialer Hypertrophie führten. Wurden die Herzen jedoch einer Drucküberlastung unterzogen, konnte eine kardiale Hypertrophie beobachtet werden [49]. Hingegen zeigte sich, dass es bei einer konstitutiven Aktivierung von AKT1 zu Beginn zu einer physiologischen Hypertrophie kommt, sich jedoch im Verlauf eine pathologische Hypertrophie und in deren Folge eine Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz einstellt [50]. Beim Übergang von physiologischer zu pathologischer Hypertrophie spielt der AKT/mTOR-Signalweg eine Rolle. Ist die Hypertrophie physiologisch, ist er stärker aktiviert und gegensätzlich dazu bei pathologischer Hypertrophie vermindert [51] [52].

Hingegen ist AKT2 am Glukosemetabolismus beteiligt. Mäuse mit einem AKT2-Knockout zeigten eine Insulinresistenz und folglich einen Diabetes mellitus [53]. Auch in Kardiomyozyten zeigte AKT2 einen Einfluss auf Metabolismus und Überleben. Ohne AKT2 verringerte sich die Insulin-abhängige 2-[(3)H]-Desoxyglucose-Aufnahme. Zudem stieg die Apoptose nach ischämischer Herzmuskelverletzung. Es konnte jedoch kein Einfluss von AKT2 auf das

Wachstum gezeigt werden [54]. Wie zuvor beschrieben sind GSK3, FOXO und mTORC1 wichtige Downstreamfaktoren im AKT-Signalweg. So sind diese drei Downstreamfaktoren auch an der AKT-Wirkung im kardialen System beteiligt. Für GSK3 konnte in einem transgenen Mausmodell, welches eine konstitutiv aktive Mutante von AKT exprimiert, eine durch GSK3β-Phosphorylierung induzierte kardiale Hypertrophie und eine Steigerung der Kontraktilität nachgewiesen werden [55]. Auch der Transkriptionsfaktor Myocardin, der im Herzen Hypertrophie induziert, wird durch GSK3β phosphoryliert und so inhibiert [56]. Folglich bewirkt eine Abnahme der GSK3β-Aktivität eine Zunahme der Myocardin-abhängigen Transkription.

Zudem konnte gezeigt werden, dass FOXO eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Herzens einnimmt, da die postnatale Zunahme und nukleäre Akkumulation von FOXO1 und FOXO3a in Kardiomyozyten zu einem Zellzyklusarrest führt [57]. Zudem bewirkt eine FOXO1-Überexpression im Herzen eine abnormale myokardiale Morphologie und folglich ein Absterben in der embryonalen Entwicklungsphase [57]. Auch im postnatalen Herzen ist der PI3K/AKT/FOXO-Signalweg an einer Regulation der Kardiomyozytengröße beteiligt. Dementsprechend geht eine Steigerung der FOXO- und AKT-Phosphorylierung mit einer kardialen Hypertrophie einher, wohingegen eine FOXO3a Überexpression zu einer verringerten Kardiomyozytengröße und einer Abnahme der IGF-1 induzierten Hypertrophie führten [58].

Auch für den AKT regulierten Signalweg über mTORC1 wurden Einflüsse im Herzen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das durch IGF-1 oder Insulin induzierte und von AKT modulierte Wachstum von kardialen Zellen abhängig von mTOR ist [59]. Zudem ist auch die durch Schilddrüsenhormone ausgelöste physiologische Hypertrophie des Herzens mit einer AKT-abhängigen Aktivierung von mTOR assoziiert [60]. Neben der mTOR-Aktivierung über TSC2 spielt im kardialen System auch der Weg über PRAS40 eine Rolle, da auch für ihn gezeigt werden konnte, dass er zu einer Insulin induzierten Aktivierung von mTOR beitragen kann [61].

1.1.5 Das iCMAKT12-Knockoutmodell

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, wie sich ein AKT1- oder ein AKT2-Knockout in Kardiomyozyten auf die Herzfunktion auswirkt, blieb die Frage, welchen kardialen Phänotyp ein simultaner Knockout beider Kinasen bewirken würde. Dazu wurde ein Mausmodell etabliert, in dem beide AKT-Isoformen gleichzeitig und zeitlich gesteuert in Kardiomyozyten ausgeschaltet werden können. Dies erfolgte durch das Cre-LoxP-System, wobei die Expression von MerCreMer unter der Kontrolle des für Kardiomyozyten spezifischen α-MHC

Promotors steht. Bei Cre handelt es sich um eine Rekombinase, welche Gene, die zuvor durch Erkennungsstrukturen (loxP-Sites) flankiert worden sind, rekombinieren und so in ihrer Expression reduzieren kann. Mer ist ein mutierter Östrogenrezeptor, der keine Bindungsaffinität für Östrogen, jedoch eine Affinität für Tamoxifen aufweist. Das Fusionsprotein MerCreMer ist nur bei Exposition zu Tamoxifen in der Lage eine Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern durchzuführen. Nur bei nukleärer Lage kann Cre eine Rekombination der markierten DNA-Abschnitte durchführen [62]. In diesem Modell kann durch die Injektion von Tamoxifen der Knockout von AKT1 und AKT2 induziert werden. Im Doppelknockout zeigte sich, dass die Herzfunktion nach Induktion des Knockouts über die Zeit stark abnahm, wohingegen sie bei Tieren mit Einzelknockout unverändert blieb. So nahm die Pumpfunktion, gemessen an der Ejektionsfraktion, im Doppelknockout von initial 62% auf 37% an Tag 10 und weiter auf 31% an Tag 21 nach Induktion ab. Ebenso verringerte sich die Wanddicke zwischen Tag 14 und 21. Dies zeigt, dass mindestens eine der beiden Isoformen vorhanden sein muss, um die Herzfunktion aufrechterhalten zu können [63]. In Analysen des kardialen Transkriptoms der Doppelknockout-Tiere konnten sehr starke Veränderungen nachgewiesen werden. Zehn Tage nach Knockoutinduktion zeigten sich bereits 933 Gene signifikant verändert, wovon 565 eine mindesten 1,5fache Veränderung gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Diese Zahl stieg bis Tag 21 auf 5552, beziehungsweise 3783 Gene mit mindestens 1,5facher Änderung. Zudem konnte eine gesteigerte Expression von Genen, die mit Autophagie assoziiert sind, beobachtet werden [1].In einer Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen) zeigte sich, dass Gene die mit der mitochondrialen Funktion verbunden sind herunterreguliert waren. Zudem konnten auf Transkriptionsebene Veränderungen im Fettsäuremetabolismus nachgewiesen werden, welche mit einem verringerten Fettsäureumsatz einhergingen. In der Analyse wies der Transkriptionsfaktor p53 von allen identifizierten Upstream-Regulatoren den höchsten positiven Aktivierungs-Z-Score (6,6) und den niedrigsten logP-Wert (1.2×10^{-60}) auf [1]. Beim z-Score handelt es sich um ein statistisches Maß in Transkriptomanalysen, das vorhersagt, ob ein Regulator aktiviert oder inhibiert ist. Dieser wird anhand des Expressionsverhaltens der Ziel-Gene des Regulators im Datensatz im Vergleich zum aus der Literatur bekannten Expressionsprofil desselben Regulators ermittelt. Ein Wert größer als 2 spricht dabei für eine Aktivierung, ein Wert kleiner als −2 für eine Inhibition des Regulators. Der logP-Wert (*p-Value of overlap*) ist ein durch einseitigen exakten Test nach Fisher bestimmter Wert, der die statistische Signifikanz von Genen im Datensatz, welche sich downstream des Upstream-Regulators befinden, bestimmt. Ein niedriger p-Wert spricht hier für statistische Signifikanz. Ein Z-Score von 6,6 und logP-Wert von 1.2×10^{-60} sprechen für eine hoch-signifikante Aktivierung von p53.

1.2 p53

In einem komplexen Organismus wie dem menschlichen oder dem der Maus, in dem alle Zellen über das gleiche Genom verfügen, ist die nach Zelltyp, nach metabolischer Situation oder nach Zellalter abhängige Regulation der Genexpression von entscheidender Bedeutung. Einen großen Teil der Regulation der Transkription wird von Faktoren übernommen, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden [64]. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor ist dabei das Protein p53. Er erfuhr in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit als wichtiger Tumorsuppressor [65]. Auch im Herz-Kreislauf-System konnte gezeigt werden, dass p53 einen regulatorischen Einfluss hat und auch bei Erkrankungen des Herz- Kreislauf-Systems aktiv ist [66].

1.2.1 p53 Struktur

Die Struktur des p53 Proteins kann in fünf Regionen eingeteilt werden [67]. Die erste Region ist die Transaktivatorregion. Sie besteht aus zwei Untereinheiten, der TAD1- (*transactivation domain 1*) und der TAD2- (*transactivation domain 2*) Region, und erfüllt die Aufgabe, verschiedene Kofaktoren von p53 zu binden. So kann diese Region die durch DNA-Schäden induzierte Tumorgenese unterdrücken und durch Bindung der Kofaktoren p21, BAX, NOXA und PUMA Apoptose und Zellzyklusarrest induzieren [68]. Die zweite Region wird aufgrund des hohen Prolinanteils dieser Aminosäure als prolinreiche Region bezeichnet. Sie dient auf der einen Seite der Bindung von p53 an DNA und ist andererseits entscheidend für die Interaktion von p53 mit den Ubiquitin-Ligasen MDM2 und MDM4. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust dieser Region mit einer erhöhten Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation und folglich mit einer geringeren Aktivität von p53 assoziiert ist [69]. Bei der DNA-bindenden Domäne handelt es sich um eine weitere funktionelle Untereinheit des p53 Proteins. Die Aufgabe dieser Region besteht darin, DNA anhand eines sequenzspezifischen Musters zu binden, um so die Wirkung als Transkriptionsfaktor zu ermöglichen. Bei der vierten Region handelt es sich um die Tetramisierungs-Domäne. Diese Region ermöglicht es p53, Oligomere aus vier Molekülen zu bilden. Dies ist für die Bindung an DNA entscheidend [70]. Neben dieser Aufgabe ist die Tetramisierungs-Domäne auch bedeutend für posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung [71]. Als fünfte Region verfügt p53 über eine C-terminale regulatorische Domäne. Zu den regulatorischen Funktionen dieser Domäne gehört, dass sie die Bindung der DNA-bindenden Domäne an DNA inhibiert. Erst die durch Stresssignale induzierten posttranslationalen Veränderungen der C-terminalen Domäne, wie Acetylierung und Phosphorylierung inhibieren diese und ermöglichen eine DNA

Bindung [72] [73]. Darüber hinaus befinden sich in der C-terminalen-Domäne Regionen, die für den nukleären Export beziehungsweise die nukleäre Lokalisation von p53 entscheidend sind. Dies spielt eine wichtige Rolle, da der nukleäre Export p53 einer Mdm2 und Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Degradierung zugänglich macht.

1.2.2 p53 Aktivierung

Unter physiologischen Bedingungen wird die Expression von p53 geringgehalten. Dies geschieht über einen durch p53 selbst regulierten negativen Feedbackmechanismus. p53 induziert dabei die Transkription der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2, welche p53 durch eine Ubiquitinierung einer stetigen proteasomalen Degradierung zugänglich macht [74]. Zur Stabilisierung von p53 stehen verschiedene Signalwege zur Verfügung, welche vor allem durch DNA-Schäden, oxidativen Stress, Hypoxie und die Aktivität von Onkogenen induziert werden. Einer davon ist die Aktivierung über die Proteinkinasen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) (siehe Abbildung 3). Diese werden durch DNA-Schäden, vor allem durch DNA-Doppelstrangbrüche, aktiviert, wobei sowohl die direkte Interaktion mit beschädigter DNA als auch die Interaktion mit DNA-Reparaturproteinen zu einer Aktivierung von ATM und ATR führen kann [75]. Nach ihrer Aktivierung können ATM und ATR p53 über Phosphorylierungen an verschiedenen Stellen stabilisieren und so einer MDM2-abhängigen Degradierung unzugänglich machen [76]. Darüber hinaus sind ATM und ATR in der Lage, die Wirkung von p53 durch Phosphorylierung an der Aminosäure Serin an der 15 Position in p53 zu steigern [77]. Ebenfalls kann die durch DNA-Schäden aktivierte Kinase DNA-PKcs durch Phosphorylierung zu einer Aktivierung von p53 beitragen [78]. Bei DNA-PKcs handelt es sich um eine Serin/Threonin Kinase, welche spezifisch durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird [79]. Sie gehört zur Familie der phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like Kinasen (PIKK), zu der ebenfalls ATM und ATR gehören [80]. Dabei phosphoryliert DNA-PKcs p53 ebenso wie ATM und ATR an der Aminosäure Serin 15, was zu einer veränderten Interaktion von p53 mit MDM2 beiträgt [81]. Zudem ist DNA-PKcs auch durch einen weiteren, indirekten Signalweg in der Lage, p53 zu aktivieren. DNA-PKcs induziert dabei die Phosphorylierung von AKT, welche so wiederum aktiviert wird und in der Lage ist, GSK-3 zu deaktivieren. GSK-3 ist nun nicht mehr fähig, MDM2 zu phosphorylieren und zu aktivieren, was in einer verringerten proteasomalen Degradierung und folglich in einer Akkumulation von p53 mündet [82]. Hier kann auch eine direkte Verbindung zwischen AKT und p53 gezeigt werden, da festgestellt wurde, dass eine AKT-abhängige Phosphorylierung von MDM2 zu einer Abnahme der p53 Proteinmenge führt [83].

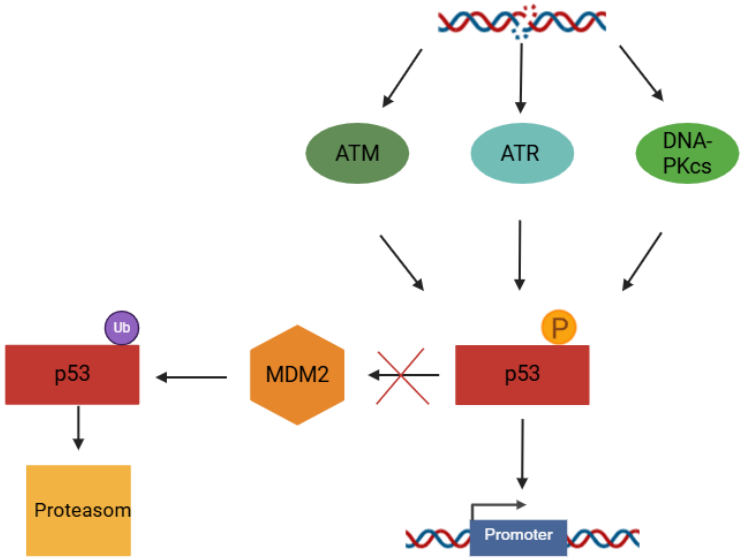


Abb. 3: Aktivierung von p53 durch ATM, ATR und DNA-PKcs. In der Abbildung ist dargestellt wie DNA-Schäden, dargestellt durch DNA-Doppelstrangbrüche, zu einer Aktivierung der Kinasen ATM, ATR und DNA-PKcs führen. Diese phosphorylieren p53 an mehreren Positionen. Die Phosphorylierung beeinflusst die Interaktion von p53 mit MDM2 und inhibiert so die MDM2 abhängige Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von p53. Unter physiologischen Bedingungen steigert p53 die Expression von MDM2, welches wiederum p53 durch Ubiquitinierung dem proteasmalen Abbau zugänglich macht.

1.2.3 p53 Wirkung

In seiner Aufgabe als Tumorsuppressor gehören die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest zu den Schlüsselfunktionen von p53. Die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod, kann über verschiedene Signalwege ausgelöst werden. Dabei werden in der Regel drei große Wege voneinander unterschieden: der intrinsische, der extrinsische und der stressinduzierte Weg über das endoplasmatische Retikulum. Hier konnte gezeigt werden, dass p53 an der Induktion des intrinsischen Wegs eine Bedeutung zukommt. Dieser Weg wird typischerweise durch DNA-Schäden induziert [84]. So zeigte sich, dass p53 durch die Regulation der Transkription von Proteinen der BCL2-Familie am intrinsischen Weg beteiligt ist [85]. Durch die p53 gesteuerte Expression von „BH3-only-Proteinen“ wie PUMA und NOXA, die innerhalb der BCL2 Familie zu den proapoptotischen Faktoren gehören, wird Apoptose begünstigt [86]. Darüber hinaus ist p53 am stressinduzierten Weg der Apoptose über das endoplasmatische Retikulum beteiligt. Es zeigte sich, dass die Bindung von akkumuliertem p53 an die sarco/ER-Ca^{2+}-ATPase (SERCA) deren Zustand ändert, die SERCA-Aktivität stimuliert und so zu einem erhöhten Einstrom von Ca^{2+} in die Mitochondrien führt, was Apoptose induziert [87]. Neben der Induktion von Apoptose gehört die Induktion von Zellzyklusarrest zu den entscheidenden durch p53 regulierten Signalwegen. Da es sich bei Kardiomyozyten in adulten Säugetieren um postmitotische Zellen handelt, die nur eine sehr

geringe Proliferationsrate aufweisen, soll auf das Thema Zellzyklusarrest nur kurz eingegangen werden [88]. Von p53 induzierter Zellzyklusarrest wird durch die transkriptionale Aktivierung von p21 induziert. Dabei bindet p21 CyclinE/Cdk2 und CyclinD/Cdk4 und bewirkt so Zellzyklusarrest in der G_1-Phase [89]. Über seine Effekte in der Apoptose und im Zellzyklusarrest hinaus, beteiligt sich p53 auch an der Regulation von Autophagie. Dabei handelt es sich um einen Prozess, in dem Zellen in Stresssituationen Teile ihrer Cytosols und ihrer zytoplasmatischen Organellen über Autophagosomen und Lysosomen verdauen. Dies ermöglicht es den Zellen neue Substrate zur Energiegewinnung und Proteinbiosynthese freizusetzen und darüber ihre Organellen zu erneuern [90]. Es zeigte sich, dass p53 in der Regulation der Autophagie zwei entgegengesetzte Funktionen, je nach seiner zellulären Lokalisation, einnehmen kann. Im Zellkern lokalisiert kann p53 als Transkriptionsfaktor die Autophagie induzieren [90]. Im Zytoplasma unterdrückt es durch Inhibition von AMPK und Aktivierung von mTORC die Autophagie [91]. Neben diesen drei Funktionen ist p53 ebenfalls an der Regulation der Antiangiogenese und der Nekrose beteiligt. In der Regulation der Angiogenese kommt dem Transkriptionsfaktor HIF-1α eine bedeutende Rolle zu. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1α unterdrück, es akkumuliert unter Hypoxie und induziert durch die Transkription von VEGF die Angiogenese [92, 93]. Es konnte gezeigt werden, dass akkumuliertes p53 die Aktivität von MDM2 steigert, welches wiederum HIF-1α durch Ubiquitinierung der proteasomalen Degeneration zugänglich macht [94] [95] (siehe Abbildung 4). Auf diese Weise kann p53 Angiogenese unterdrücken. Zudem ist p53 an der Induktion von Nekrose beteiligt. Dabei handelt es sich um eine weitere Form des Zelltodes, welche anders als lange angenommen nicht unkontrolliert, sondern reguliert abläuft [96]. Hier zeigte sich, dass p53 an der MPT (*mitochondrial permeability transition*)-abhängigen Nekrose beteiligt ist, da es die mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) öffnen kann. Dies führt zu einer Störung der mitochondrialen Zellatmung, zu einem Anschwellen der mitochondrialen Matrix und so zu einer Zerstörung der mitochondrialen Membran [97] (siehe Abbildung 4). Die p53 abhängige Öffnung der mPTP kann hier über zwei verschiedene Wege ablaufen. Auf der einen Seite kann p53 direkt mit CypD (Cyclophilin D), einem wichtigen Regulator der mPTP interagieren [98] [97]. Auf der anderen Seite kann p53 die Transkription von ARC (*apoptosis repressor with a reduction in caspase recruitment domain*) beeinflussen und so durch eine Reduktion dieses anti-nekrotischen Faktors zur Nekrose beitragen [99].

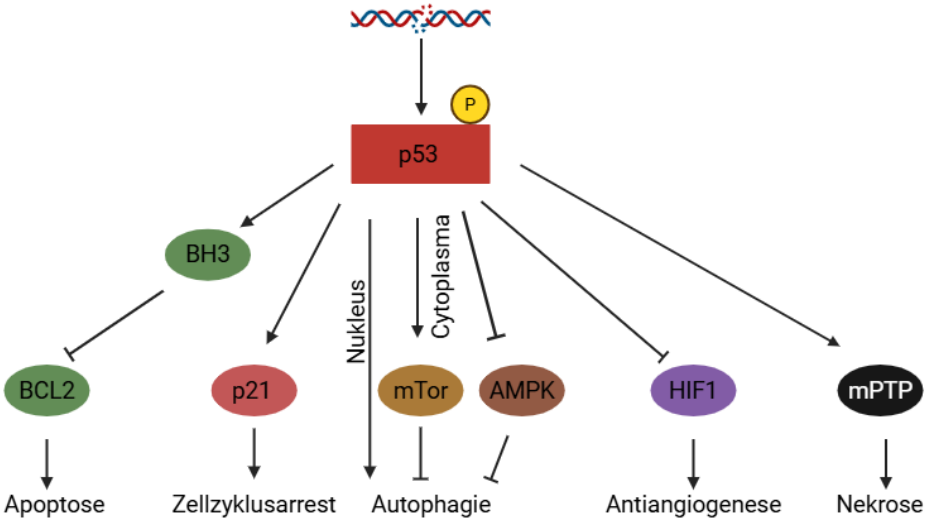


Abb. 4: p53 regulierte Signalwege. In der Abbildung sind vereinfacht die von p53 regulierten Signalwege dargestellt. Durch die Induktion von proapoptotischen BH3 only Proteinen der BCL-2 Familie und die dadurch folglich Inhibition antiapoptotischer Faktoren derselben Familie induziert p53 Apoptose. Unteranderem über den p21-Signalweg ist p53 zudem an der Induktion von Zellzyklusarrest an verschiedenen Stellen des Zellzyklus beteiligt. Die Rolle von p53 in der Autophagie hängt von der Lokalisation in der Zelle ab. Nukleär lokalisiert induziert es Autophagie, wohingegen es im Zytoplasma über mTor und AMPK die Autophagie herunter reguliert**.** Zudem kannt p53 durch Hemmung von HIF1 an der Hemmung von Angiogenese und durch die Öffnung der mPTP an der Induktion von Nekrose beteiligt sein.

1.2.4 p53 im kardiovaskulären System

Neben seiner Rolle als Tumorsuppressor spielt p53 auch eine Rolle in vielen kardiovaskulären Erkrankungen. Wie zuvor beschrieben ist p53 in der Lage, Apoptose zu induzieren, was in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung ist. So zeigte sich, dass es in einem Mausmodell der Drucküberlastungshypertrophie, ein kardiomyozyten spezifischer Knockout von MDM4 mit folglicher p53 Aktivierung zu einer dilatativen Kardiomyoparthie führte. PUMA zeigte sich dabei überexprimiert. Ein zusätzlicher Knockout von PUMA führte zu einer Reduktion der Kardiomyopathie. Zudem konnte ein Knockout von p53 die Überexpression von PUMA verhindern [100]. Auch konnten erhöhte p53-Level in finaler Herzinsuffizienz bei Menschen nachgewiesen werden. Dort zeigte sich p53 mit Apoptose von Kardiomyozyten assoziiert [101]. Auch in der diabetischen Kardiomyopathie, einer weit verbreiteten kardiovaskulären Erkrankung, konnte p53-induzierte Apoptose festgestellt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass der p53-NOXA-Signalweg aktiv ist [102]. In einem Modell der Ischämie und Reperfusion zur Simulation von Infarktereignissen zeigte sich acetyliertes und akkumuliertes p53 an den Promotor des proapoptotischen Protein BAX gebunden, welches auch in diesem Krankheitsbild auf einen Einfluss von p53 hinweist [103]. Ebenfalls reguliert p53 die Proliferation und Seneszenz von Fibroblasten, welche mit kardialer

Fibrose assoziiert sind und so zum Remodeling beitragen. Dieser Einfluss konnte sowohl in Herzinsuffizienz als auch in Drucküberlastungsmodellen gezeigt werden [104]. Darüber hinaus ist auch die Autophagie in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen involviert. Hier zeigte sich, dass in einem Modell der Ischämie und Reperfusion erhöhtes p53 die Autophagie sowohl in den direkt betroffenen als auch in den umgebenden Gebieten des Myokards erhöhte. Dies geschah über die p53 abhängige Expression von Myocardin, welcher als Transkriptionskoaktivator kardiomyozyten- und muskelzellspezifisch Autophagie und Apoptose reguliert [105, 106]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p53 über eine regulatorische Achse mit BNIP3, welches zur Familie der BCL-2 Proteine gehört, zum Autophagie-abhängigen Zelltod von ischämischen Kardiomyozyten beiträgt [107]. Auch für die p53 abhängige Antiangiogenese konnte ein Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden. In einem Mausmodell der kardialen Hypertrophie, welche mittels TAC (*trans-aortic-constriction*) induzierter Drucküberlastung des linken Ventrikels erreicht wurde, zeigte sich, dass die p53 abhängige Unterdrückung von HIF-1 zu dem Übergang von kardialer Hypertrophie zu Herzversagen beiträgt [108]. In einem weiteren Mausmodell zur Untersuchung der diabetischen Kardiomyopathie konnte dargestellt werden, dass das Inhibieren von p53, durch seinen Inhibitor pifithrin-α (PFT-α), zu einer Stabilisierung des HIF-1 Proteins und zu einer Steigerung der HIF-1-abhängigen Genexpression führt. Dies verbesserte die Angiogenese während des Diabetes [109]. Ebenfalls von Bedeutung im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Nekrose, die wie dargestellt auch p53 reguliert sein kann. Auch hier konnte der Einfluss von p53 in einem Ischämie-Reperfusions Modell gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass deutlich erhöhte p53 Spiegel mit einer Verringerung von ARC einhergehen, wobei ARC einen antinekrotischen Faktor darstellt. Dementsprechend ging eine ARC Überexpression mit verringerter Nekrose einher [110]. Den Einfluss von p53 auf das Herz zeigte sich zudem in einem Kardiomyozyten spezifischen p53-Knockoutmodell. Hier konnte 6 Monate nach der Induktion des Knockout eine konzentrische Hypertophie mit gesteigerter myokardialer Wanddicke und vergrößerten Kardiomyozyten beobachtet werden. Zudem kam es zu starken Veränderungen im Transkriptom mit mehr als 5000 verändert exprimierten Transkripten 7 Tage nach Knockout-Induktion. Es wurde festgestellt, dass Gene, die mit Autophagie, Apoptose und Zellzyklus assoziiert sind, herunter reguliert waren. Hingegen zeigten sich Gene, die die mitochondriale Funktion (PGC-1, Pparα) und den Fettsäurestoffwechsel regulieren, gesteigert exprimiert [111].

1.3 Ziele der Arbeit

Im iCMAKT12KO-Modell zeigten sich nach Induktion des Knockouts gravierende phänotypische Veränderungen sowie starke Veränderungen des Transkriptoms, wie unter 1.1.5 beschrieben [63]. Im iCMp53-Knockout-Modell (iCMp53KO) konnten hingegen gegensätzliche Veränderungen des Phänotyps und des Transkriptoms beobachtet werden (siehe Anhang für die Transkriptomveränderungen) [111]. So wies der iCMp53KO eine myokardiale Hypertrophie, der iCMAKT12KO hingegen eine Atrophie auf. Im kardialen Transkriptom wiesen iCMAKT12KO Tiere reduzierte Transkription von mitochondrialen Genen und einen verringerten Fettsäuremetabolismus auf. Das kardiale Transkriptom von iCMp53KO Tieren zeigte hingegen eine gesteigerte Transkription dieser Gene. Die mRNA von Genen, die mit Autophagie assoziiert sind, zeigte sich im iCMAKT12KO gesteigert exprimiert, wohingegen Autophagie-Gene im iCMp53KO herunter reguliert waren. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass p53 im iCMAKT12KO-Modell aktiviert sein könnte und zu den phänotypischen Veränderungen beiträgt. Diese Annahme wurde durch die Zucht und Analyse von iCMAKT12p53-Knockout Mäusen untersucht. Dazu erfolgte sequenzielle kardiale Sonographie von iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO und von wildtypischen Mäusen über einen Zeitraum von drei Wochen.

Ferner war es das Ziel zu untersuchen, wie p53 in den Kardiomyozyten aktiviert werden könnte. Dazu sollte vor allem die Bedeutung des ATM, ATR und DNA-PKcs Weges analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Laborgeräte

Laborgerät	**Beschreibung/Hersteller**
Bildgebungssystem	Odyssey M, Licor-Bioscience
Cycler	Mastercycler nexus gradient, Eppendorf
Deckgläschen	High Precision Cover Glass, Marienfeld
Eismaschine	Ziega ZBE 70-35
FACS Gerät	FACSCanto II, BD Bioscience
FACS Sorting Gerät	BD FACS Symphony-S6, BD Bioscience
FACS Tubes	Falcon
Gewebe-Homogenisatoren	Ultra Turax T18 basic, IKA Tissueruptor, Qiagen

	McIlwain Tissue Chopper, Cavey Laboratory Engeneering
Glasgeräte	Mini-Protean Glass Plates, Biorad Bechergläser 80ml-2000ml, Schott Glassflaschen 100ml-1000ml, Schott Erlenmeyerkolben 500ml, Schott Glassdouncer
Gelkammer	Mini-Protean 3 Cell, Biorad
Gelkamm	Mini-Protan Comp, 0,75cm, 10x und 15x, Biorad
Heizblock	Thermomix comfort, Eppendorf
Heinz-Misch-Platte	IKAMAG RCT, IKA
Inkubator	Heracell VIOS 250i CO_2, Thermo Fischer Scientific
Inkubationsbox Western Blot	Schwarze Inkubationsboxen, Licor
Kryostat	CM1850, Leica
Kühl- und Gefrierschränke	Revco UxF (-80°C), Thermo Fischer Scientific GNP 3056 Premium Nofrost (-20°C), Liebherr Comfort No Frost Kühl-Gefrierkombination (-20°C, 4°C), Liebherr
Mikroplatte	Microplate 96 Well, F Bottom, Greiner
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes 0,5ml, Eppendorf Safe-Lock Tubel 2ml, Eppendorf
Mikroskop	BZ-9000, Keyence Konfokalmikroskop LSM 880, Zeiss
Nitrocellulose-Membran	Amersham Protran 0,45µm NC, Cytiva
Objektträger	HistoBond Microscope slided, Marienfeld
Pipetten	Pipetman 1µl-1000µl, Gilson Glaspipetten 2ml, Hirschmann
Pipettierhilfe	Pipettus, Hirschmann
Reaktionsgefäß	Cellstar-Tubes 50ml, Greiner Cellstar-Tubes 15,l, Greiner
Real time PCR Geräte	qTower3G, Analytik Jena Step one Plus, Applied Bioscience Quant Studio 1, Thermo Fischer Scientific
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020, Thermo Fischer Scientific
Schüttler	KL2, Edmund Bühler ST5, CAT M Zipperer Mini Rocking Plattform, Biometra Rotator SB2, Stuart Rotor-Shake-Genie, Scientific Industries
Spektrophotometer	iMark Microplate Reader, Biorad Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab
Stromquelle Westernblot	Standard Power Pack P25, Biometra
Ultraschall-Bad	Emmi-H30, EMAG
Vortex	Votex-Genie 2, Scientific Industries Reax Top, Heidolph
Wärmeschrank	Typ B6120, Heraeus
Wasserquelle	Milli-Q Ultrapure Water Systems, Merck
Western Blot Transfergerät	Power Blotter, Invitrogen Piercer G2, Thermo Fischer Scientific

Waagen	Präzisionswaage PCB, Kern Präzisionswaage BP121S, Sartorius
Zellkulturschale	Avantor Tissue Culture Dish, VWR
Zellkulturplatte	Cellstar 6 Well Cell Culture Plate, Greiner
Zentrifugen	Mega Star 1.6R, VWR Centrifuge 5415, Eppendorf Centrifuge 5402, Eppendorf Rotilabo-Mini-Zentrifuge, Roth Sorvall MX120+ Micro-Ultracentrifuge, Thermo Fischer Scientific

2.1.2 Verwendete Softwareprogramme

Software	**Hersteller**
BD FacsDiva Software v. 8.0.2.	BD Bioscience, USA
Empiria Studio 2.2 Software	LI-COR Bioscience, USA
EndNote 21	Clarivate Analytics, USA
GraphPad Prims 6	GraphPad Software, USA
Image Studio Lite Ver 5.2	LI-COR Biosciences, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, USA
QuantStudioTM Design & Analysis Software	Applied Biosystems, USA
Vevo LAB 1.7.1	FUJIFILM Visualsonics, Japan
Mircoplatemanager 6	Bio-Rad, USA
NanoDrop 1000 Operating Software	Thermo Fischer Scientific, USA
qPCRsoft 3.4	Analytik Jena, Deutschland
Fiji is just ImageJ	NIH, USA
Ingenuity Pathway Analysis	Qiagen, Niederlande

2.1.3 Chemikalien

Name der Chemikalie	**Hersteller**
Aminocapronsäure	Sigma Aldrich, USA
Acrylamid-Bisarylamid-Stammlösung (40%)	Carl Roth, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Deutschland
APS	Carl Roth, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma Aldrich, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, USA
DAPI Fluoromount G	Southern Biotech, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
DTT	Carl Roth, Deutschland

EDTA	Sigma Aldrich, USA
EGTA	Sigma Aldrich, USA
Essigsäure	Merck, Deutschland
Ethanol	VWR International, USA
Flüssigstickstoff	Linde, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, USA
Glycin	Carl Roth, Deutschland
Hoechst	Thermo Fischer Scientific, USA
Igepal	Sigma Aldrich, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kollagenase I	Worthington, USA
Magnesiumacetat	Sigma Aldrich, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Deutschland
MGT 132	Sigma Aldrich, USA
Beta Mercaptophenol	Sigma Aldrich, USA
Natriumchlorid	VWR International, USA
Natrium Desoxycholat	Merck, Deutschland
Normal Goat Serum	Dianova, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Deutschland
Saponin	Carl Roth, Deutschland
SDS	Sigma Aldrich, USA
Tricin	Carl Roth, Deutschland
Tamoxifen	Sigma Aldrich, USA
Tris	Carl Roth, Deutschland
Triton X 100	Sigma Aldrich, USA
Tween	Sigma Aldrich, USA

2.1.4 Puffersysteme

Für Western Blot verwendete Puffersysteme:

Puffersystem	**Zusammensetzung**
10x Laufpuffer	2 M Glycin 250 mM Tris 1% SDS
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris 1000 mM Tricin
Kathodenpuffer (pH 8,7)	30 mM Tris 300 mM Aminocapronsäure
Laemmli-Puffer (4x)	15 ml 20% SDS 12,5 ml Tris-HCl (pH 6,8; 250 mM) 10 ml Glycerol 5 mg 0,005% Bromphenolblau 100mM DTT
TBS	140 mM Natriumchlorid 20 mM Tris
TBST	140 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 0,2% Tween
Waschlösung	6,7% Essigsäure

	30% Ethanol
Entfärbelösung	0,1 M NaOH 30% Ethanol

Für die Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch Dichtegradientenzentrifugation verwendete Puffersysteme

Puffersystem	**Zusammensetzung**
Aufschlusspuffer Dichtegradientenzentrifugation	320 mM Saccharose 10 mM Tris-HCl 5 mM Calciumchlorid 3 mM Magnesiumacetat 2 mM EDTA 0,5 mM EGTA 1 mM DTT
Aufschlusspuffer Igepal	10mM Tris 150mM NaCl 1% Igepal
2,1 M Saccharosepuffer	2,1 M Saccharose 3 mM Magnesiumacetat 1 mM DTT 10 mM Tris-HCl
2,2 M Saccharosepuffer	2,2 M Saccharose 3 mM Magnesiumacetat 1 mM DTT 10 mM Tris-HCl
Kernlysepuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM Natriumchlorid 2 mM EDTA 1% Igepal 1% Natrium Desoxycholat 4% SDS

Für die Immunhistochemie verwendete Puffersysteme

Puffersystem	**Zusammensetzung**
PBS	140 mM Natriumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid 1,8 mM Kaliumhydrogenphosphat
Permeabilisierungspuffer	0,5% Triton X 100 PBS
Blockierungspuffer	10% NGS 0,2% Saponin PBS
Antikörperpuffer	2% NGS 0,2% Saponin PBS

Für die Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch FACS Sorting verwendete Puffer

Puffersystem	**Zusammensetzung**
Lysispuffer	320 mM Saccharose 10 mM Tris-HCl 5 mM Calciumchlorid 5 mM Magnesiumacetat 2 mM EDTA 0,5 mM EGTA 1 mM DTT
Saccharosepuffer	1 M Saccharose 10 mM Tris-HCl 5 mM Magnesiumacetat 1 mM DTT
Nuclei Storage Puffer	440 mM Saccharose 10 mM Tris-HCl 70 mM Kaliumchlorid 5 mM Magnesiumchlorid
2% BSA/PBS	2% BSA 10 mM PBS

2.1.5 Für die Zellkultur verwendete Substanzen:

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose	Gibco (Thermo Fischer Scientific) USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco (Thermo Fischer Scientific), USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	NEA Non essential amino acids, Merck, Deutschland
PenStrep	Gibco (Thermo Fischer Scientific), USA
L-Glutamin	DMEM Glutamax-I, Gibco (Thermo-Fischer Scientific), USA
EDTA Trypsin	Sigma-Aldrich, USA

2.1.5 Verwendete Kits

Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (78443)	Thermo Fisher Scientific, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific, USA
Pierce BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific, USA
Quantitect Reverse Transcription kit	Quiagen, Deutschland
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Quiagen, Deutschland
REVERT 700 Total Protein Stain	LI-COR Bioscience, USA
Maxima SYBR green/ROX qPCR master mix	Thermo Fischer Scientific, USA

2.1.7 Antikörper

Für Western Blot, Immunhistochemie und FACS verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller-Referenz	Verdünnung	Hersteller
Alpha Actinin	A7811	1:500	Sigma
Anti cardiac Tropinin I	AB47003	1:100	Abcam
ATP5A1	14676	1:1000	Proteintech
DNA-PKcs Phospho S2056	Ab18192	1:500	Abcam
GAPDH	2118	1:1000	Cell Signaling
Histon H2A.X	2595	1:1000	Cell Signaling
Phospho-ATM/ATR Substrat Motiv	6966	1:1000	Cell Signaling
pH2A.X Serin 139	80312	1:1000	Cell Signaling
pH2A.X Serin 139	2577	1:1000	Cell Signaling
H3	9715	1:1000	Cell Signaling
p53	32532	1:500	Cell Signaling
p53	2524	1:1000	Cell Signaling
p53	BML-SA293	1:100	Enzo
p-p53 Serin 15	9284	1:1000	Cell Signaling
PCM-1	HPA023374	1:200	Sigma Aldrich
WGA Alexa Fluor 488	W11261	1:200	Invitrogen

Für Western Blot und Immunhistochemie verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller-Referenz	Verdünnung	Hersteller
Goat anti Rabbit CY3	111-165-144	1:300	Jackson
Goat anti Rabbit AlexaFluor647		1:500	
Goat anti Mouse IgG IR Dye 680RD	926-68070	1:10.000	Licor-Bioscience
Goat anti Rabbit IgG IR Dye 800CW	926-32211	1:10.000	Licor-Bioscience

2.1.8 Primer

Primer		Sequenz
p53 N1	fw	GGGGACTTTGTTTTCGTGGC
p53 N1	rev	CACAGCTAGGGTTCCCTTCG
p53 D2	fw	GATGCAGGGGAGATAGGTGC
p53 D2	rev	TCTTCCCTATCCCACAGGGG
p53 1	fw	CACAAAAAACAGGTTAAACCCA
p53 1	rev	AGCACATAGGAGGCAGAGAC
p53 10	fw	AAGGGGTATGAGGGACAAGG
p53 10	rev	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG
p53	fw	TAGGCCAGCTAGGGCTAGAG
p53	rev	TCGATAAGCTTCGAGGGACC
IGF1 Rezeptor	fw	TCCCTCAGGCTTCATCCGCAA
IGF1 Rezeptor	rev	CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG
AKT2	fw	TGTGGCTCTTGGCTTCCTTT
AKT2	rev	CTGGTGCTACCCTGAATGCT

2.2. Methoden

2.2.1 Das transgene Mausmodell

Die in-vivo-Experimente dieser Arbeit erfolgten an ausgewachsenen, männlichen Tieren der Stämme αMHC-mCm *AKT1$^{fl/fl}$AKT2$^{fl/fl}$* (iCMAKT12KO), αMHC-mCm *AKT1$^{fl/fl}$AKT2$^{fl/fl}$p53$^{fl/fl}$* (iCMAKT12p53KO) und αMHC-mCm *p53$^{fl/fl}$* (iCMp53KO). Als Kontrollen wurden gleichaltrige Geschwistertiere der Genotypen *AKT1$^{fl/fl}$AKT2$^{fl/fl}$*, *AKT1$^{fl/fl}$AKT2$^{fl/fl}$p53$^{fl/fl}$* und *p53$^{fl/fl}$*, die nicht über mCm-Expression verfügten (WT) genutzt. Alle Tiere wurden in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet. Alle Tierversuche und Organentnahmen sind durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, unter den Aktenzeichen G244/19 (Tierversuche) und O16/04 (Organentnahme) genehmigt worden. Die Tiere hatten jederzeit freien und unbegrenzten Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Untersuchung der Herzfunktion und die Entnahme von Organen erfolgte an iCMAKT12KO, iCMAKT12p53KO und iCMp53KO Tieren, des Weiteren wurden wildtypische Tiere, die über normale AKT1/2 und p53 Expression verfügten, zum Vergleich untersucht.

2.2.2 Induktion des Knockouts durch das Cre-LoxP-System

Das Ausschalten von AKT1, AKT2 und p53 aus dem Mausgenom wurde durch das Cre/loxP-System erreicht, welches als erstes in der Bakteriophage P1 entdeckt wurde. Dieses System ist in der Lage, spezifische DNA-Abschnitte, welche zuvor von in gleiche Richtung laufende loxP-Sequenzen flankiert wurden, selektiv auszuschneiden. Die palindromischen loxP-Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase (C) erkannt, welche anschließend den DNA-Abschnitt zwischen den loxP-Stellen ausschneidet [112]. Anschließend bleibt eine hybride loxP-Sequenz im Genom zurück. Um einen Kardiomyozyten-spezifischen Knockout von AKT1, AKT2 und p53 zu erzeugen, erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase in Abhängigkeit des für Kardiomyozyten spezifischen αMHC- Promotors [62]. Um zugleich zu erreichen, dass die Induktion des Knockouts zeitlich kontrolliert stattfindet, wird die Cre-Rekombinase als Fusionsprotein mit zwei mutierten Östrogenrezeptor-Bindungsdomänen *(mutated estrogen receptor,* m) exprimiert. Dabei handelt es sich um Östrogenrezeptoren, die kein murines Östrogen mehr binden können. Sie besitzen jedoch eine Affinität für den selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen. Erst nach Injektion von Tamoxifen, welches an m bindet, kann das mcm-Fusionsprotein vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren, wo die Cre-Rekombinase die Exzision des loxP-flankierten Genabschnitts katalysieren kann [113]. Durch diese beiden Mechanismen wird sichergestellt, dass der Knockout kontrolliert nur in Kardiomyozyten und nur nach Tamoxifeninjektion erfolgt. Zur Zucht der Tiere dieses

Knockout-Modells müssen Tiere, die über loxP-markierte AKT1/2- beziehungsweise loxP-markierte p53-Genabschnitte, verfügen, mit Tieren, die die Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase exprimieren, gekreuzt werden. Die Induktion der Knockouts erfolgte in zwölf Wochen alten, männlichen Tieren. Dazu wurde eine Tamoxifenlösung mit einer Konzentration von 0,5mg/100µl (Tamoxifen (Sigma-Aldrich) und Erdnussöl (Sigma-Aldrich)) hergestellt und den Mäusen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 100µl dieser Lösung intraperitoneal injiziert. Die Injektionen erfolgten durch die MTA Daniela Müller und Prof. Axel Gödecke aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie.

2.2.3 Echokardiographie

Zur Erfassung der Herzfunktion der Versuchstiere wurden repetitive echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Begonnen wurde am ersten Tag der Tamoxifen Injektionen (Tag 0) mit anschließender wöchentlicher Wiederholung (Tag 7, 14 und 21). Die Durchführung der Echokardiographie übernahm Prof. Dr. Dr. Andre Heinen aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, der die Untersuchungen verblindet durchführte. Die Durchführung erfolgte wie von Heinen et al. beschrieben [114]. Nach dem Erfassen der Körpergewichte wurden die Mäuse in einer Narkosebox (Induction Chamber, VetEquiP) durch 3,5 % Isofluran nakotisiert. Während der Sonographie wurde die Narkose duch 2 % Isofluran, über eine Narkosemaske, aufrechterhalten. Ein Isofluran-Verdampfer (Isofluran Vaporizer, VetEquip) diente der Bereitstellung des Narkotikums. Während der Untersuchung lagen die Mäuse in Rückenlage auf einem Tiermultifunktionstisch, die Körpertemperatur konnte kontinuierlich über eine Analsonde gemessen werden. Durch die Heizfunktion des Multifunktionstisches und falls nötig auch durch Infrarotlampen wurde die Körpertemperatur der Tiere konstant auf 37°C gehalten. Des Weiteren wurden über entsprechende Elektroden des Multifunktionstisches das Echokardiogramm (EKG) und die Atemfrequenz der Tiere zur Kontrolle der Narkosetiefe erfasst. Auf den zuvor enthaarten Oberkörper der Maus wurden auf 37°C vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquagel, Parker) aufgetragen und mithilfe eines Ultraschallgerätes (VEVO 2100 Imaging System, FUJIFILM Visual Sonics) über einen 30 MHz Schallkopf (Linear Array Transducer MS400, FUJIFILM Visual Sonics) folgende Echokardiographischen-Aufnahmen zur späteren Auswertung gemacht:

- Parasternale lange Achse (PSLA, *parasternal long axis*): linker Ventrikel in Systole und Diastole im B-Mode (*brightness modulation*)
- Parasternale kurze Achse (SAX, *short axis*): drei Ebenen des linken Ventrikels (Basis, Mitte, Apex) in Systole und Diastole im B-Mode

- Parasternale kurze Achse (SAX, *short axis*): eine Ebene auf mittlerer Höhe des linken Ventrikels im M-Mode (*motion modulation*)

Bei der M-Mode Aufnahme handelt es sich um eine eindimensionale Darstellung kardialer Strukturen im Zeitverlauf. Diese Aufnahme dient dazu die Wanddicken, LVAW *(left ventricular anterior wall*) und LVPW (*left ventricular posterior wall*), sowie den Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID, *left ventricular internal diameter*) zu bestimmen. Aus diesen Werten kann dann auf die Myokardmasse des linken Ventrikels zurückgeschlossen werden. Die B-Mode Aufnahme ermöglicht die zweidimensionale Darstellung linksventrikulärer Strukturen. Diese werden benötigt um in der kurzen Achse (Sax) den Flächeninhalt des linken Ventrikels während Diastole und Systole, an der Basis, der Mitte und des Apex des Ventrikels zu bestimmen. Zudem kann im B-Mode in der langen Achse (PSLA) die Länge des linken Ventrikels in Diastole und Systole, von der Aortenklappe bis zum Apex bestimmt werden. Aus den so gemessenen Längen und Flächeninhalten, kann das verwendete Auswertungsprogramm(Vevo LAB 1.7.1, FUJIFILMS Visual Sonics) zunächst anhand der Simpson Methode das enddiastolische Volumen (EDV) und das endsystolische Volumen (ESV) berechnen. Bei der Simpson Methode handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung von kardialen Volumina anhand von zweidimensionalen Echokardiographie-Aufnahmen [115]. Die dafür angewandten Formeln sind im Folgenden aufgezeigt.

Bestimmung des EDV und ESV anhand der Simpson Methode:

ESV in µl = (A Sys Apex + A Sys Mitte + A Sys Basis) * l Sys /3

EDV in µl = (A Dia Apex + A Dia Mitte + A Dia Basis) * l Dia/3

A	=	Fläche
I	=	Länge
Dia	=	Diastolisch
Sys	=	Systolisch

Über das ESV und das EDV berechnete die Software folgende weitere Parameter:

- Schlagvolumen (SV) in µl = EDV – ESV
- Herzzeitvolumen (HZV) in ml/min = SV * Herzfrequenz
- Ejektionsfraktion (EF) in % = (EDV – ESV) / EDV * 100

Des Weiteren wurden die beiden kardialen Funktionsgrößen fraction area change (FAC, Flächenänderung) und fractions shortening (FS, Verkürzungsfraktion) des linken Ventrikels bestimmt. Dazu gebrauchte die Software die folgenden Formeln:

FAC (in %) = ((A Dia Mitte – A Sys Mitte) / (A Dia Mitte)) * 100

A = Flächeninhalt

Sys = Systole

Dia = Diastole

FS (in %) = ((I Dia – I Sys) / (I Dia)) * 100

I = Ventrikellänge

Sys = Systole

Dia = Diastole

Die M-Mode Aufnahme der mittventrikulären parasternalen kurzen Achse wurde zudem zur Messung des Durchmessers des Ventrikellumens (LVID), sowie der Durchmesser der Ventrikelwände (LVAW und LVPW) in Systole und Diastole genutzt. Auch wurde die Bewegung der Wände in vier aufeinander folgenden Herzzyklen nachgezeichnet. Daraus konnte anhand der folgenden Formel die linksventrikuläre Masse bestimmt werden.

Linksventrikuläre Masse (LV Mass Cor (LV Trace)) in mg = 1,053 * 0,8* (durchschnittliche Durchmesser der äußeren Wand in Diastole)^3 – (durchschnittliche Durchmesser der inneren Wand in Systole)^3

Die dabei entstandenen Bilder wurden mittels des Computer Programms VevoLab 1.1.7 verblindet ausgewertet und die Daten im Folgenden mittels GraphPad Prims 6 analysiert. Die erhobenen Parameter wurden graphisch dargestellt, wobei zum einen die Entwicklung der myokardialen Funktion über den zeitlichen Verlauf gezeigt wurde. Zum anderen wurden sie am Endpunkt der Messung nach 21 Tagen mit einander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte durch zwei-faktorielle Varianzanalyse (*two way Anova*) mit anschließendem Schnelltest nach Tukey (*Tukeys multiple comparisons test*). Hierbei wurde das Signifikanz-Niveau wie folgt angegeben: ns=nicht signifikant, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

2.2.4 Organentnahme

Die Tiere wurden durch zervikale Überstreckung getötet. Im Anschluss wurde mittels einer Schere und einer Pinzette der Brustkorb eröffnet, das Herz frei präpariert, von der Aorta getrennt und entnommen. Darauf wurden die Herzen in eiskalten PBS gewaschen, um letzte Reste von Blut aus den Hohlräumen zu entfernen. Dann wurden die Vorhöfe auf Klappenebene entfernt, sodass nur noch die Ventrikel blieben. Abhängig von der Analyse die sich anschließen sollte, wurden die Herzen weiter zerkleinert oder im Ganzen eingefroren. Die Durchführung der zervikalen Überstreckung und der Organentnahme erfolgte durch die technischen Assistentinnen des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie Daniela Müller und Julia Albrecht, sowie durch Prof. Dr. Dr. Andre Heinen.

2.2.5 Zellkultur

Verwendete Zelllinien

Es wurde die Zelllinie NIH3T3 verwendet. Dabei handelt es sich um eine murine Fibroblasten Zelllinie [116].

Kultivierung von NIH3T3-Zellen

Die Zellen wurden, nachdem sie in flüssigen Stickstoff gelagert waren, zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Im Anschluss wurden sie in 5ml Medium in einem 15ml Reaktionsgefäß suspendiert und für 5 Minuten bei 800rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1ml Medium aufgenommen und auf eine 10cm Zellkulturschale mit 9ml weiterem Medium gegeben. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO_2. Wurde ein Wachstum von 70-80 % der Schale erreicht, wurde das Medium entfernt. Dann wurden die Zellen durch Inkubation in trypsinhaltigen Medium für 5 Minuten gelöst und erneut in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 1ml Medium aufgenommen und erneut auf Zellkulturschalen gegeben.

Zusammensetzung des Mediums für die Zellkultur:

DMEM High Glucose	500ml
FBS	58ml
PenStrep	5,8ml
Glutamax-I	11,6ml
Nicht-Essentiale Aminosäuren	5,8ml

MG132-Behandlung und Zellernte für Proteinanalyse

6 Stunden vor der Zellernte wurde dem Medium der Zellen 3µM, 6µM oder 12µM MG132 hinzugefügt. Nach dieser Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5ml Lysispuffer (100mM NaCl, 10mM TRIS pH 7,4 und 1% Igepal) hinzugefügt und das Zellmaterial mit einem Spatel von der Zellkulturplatte entfernt. In einem 2ml Reaktionsgefäß wurde die Probe für 5 Minuten bei 4°C und 13.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverarbeitet, das Pellet verworfen. Es schloss sich die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, an.

2.2.6 Proteinfraktionierung aus Herzgewebe

Zur Proteinfraktionierung aus Herzgewebe wurde ein Protokoll verwendet, welches nur einen Zentrifugationsschritt enthielt. Dabei wurde das Herzgewebe zunächst mittels Ultra-Turax oder Tissue Ruptor und anschließend mittels Glas-Douncer aufgeschlossen (Aufschlusspuffer Igepal, siehe 2.1.4), anschließend für 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 4%-SDS-Puffer (siehe 2.1.4, Kernlysepuffer) aufgenommen.

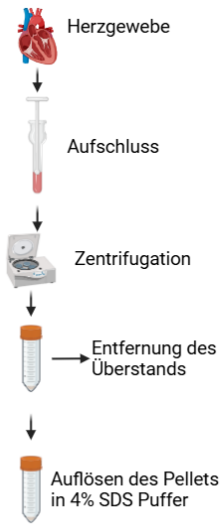


Abb. 5: In der Abbildung ist der Arbeitsablauf der Methode zur Fraktionierung von Proteinen aus Herzgewebe mittels einfacher Zentrifugation dargestellt.

2.2.7 Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolation kardiomyozytärer Zellkerne aus dem Lysat von Teilen der linken Ventrikel von Herzen wurde eine Differentialzentrifugation mittels unterschiedlich molarer Saccharosepuffer verwendet [117, 118]. Ein Überblick dazu ist der Abbildung 6 zu entnehmen. Zunächst wurde Gewebe des linken Ventrikels adulter Mäuse in Lysispuffer für 40s mittels Ultra Turax (IKA) und anschließend durch acht Stöße eines Glasdouncers aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Gewebe wurde dann durch einen 100µm und ein 70µm Filter aufgereinigt, um gröbere Partikel zu entfernen. In der Folge wurde die erste Zentrifugation bei 4°C und 1000g für zehn Minuten durchgeführt. Das in dieser Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in einem 2,1 molaren Saccharosepuffer aufgenommen. In einem Ultrazentrifugen-Röhrchen wurde ein Kissen aus 2,2 molaren Saccharosepuffer angelegt und in der Folge der 2,1 molare Puffer, in dem das Pellet gelöst wurde, auf dieses Kissen pipettiert. Dann erfolgte die Ultrazentrifugation bei 4°C und 30.000g für eine Stunde. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig aus dem Zentrifugenröhrchen abpipettiert und das unten im Röhrchen befindliche Kernpellet in 0,32 molarer Saccharoselösung gewaschen. Zur erneuten Pelletierung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 1000g für zehn Minuten. Folgend wurde das gewaschene Pellet in einem Lysispuffer mit 4% SDS aufgenommen, gelöst und die DNA für fünf Minuten im eiskalten Ultraschallbad fragmentiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 16.000g für zehn Minuten. Es schloss sich dann die Analyse der Kernproteine, wie unter 2.2.9 dargestellt, an.

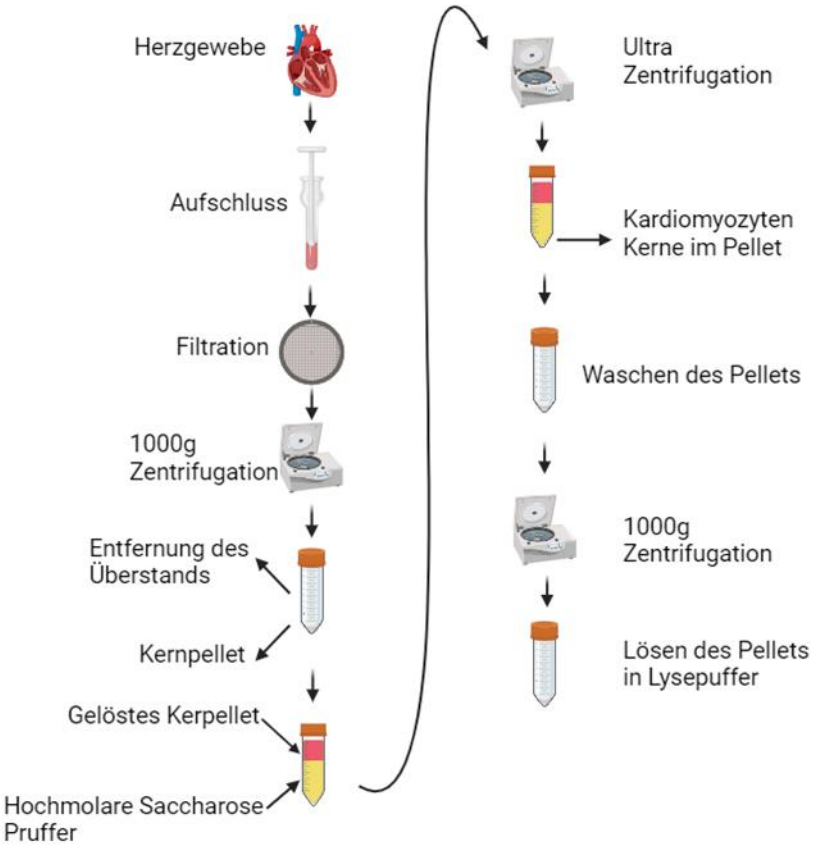


Abb. 6: In der Abbildung ist der methodische Ablauf der Isolation von kardiomyozytären Zellkernen anhand einer Dichtegradientenzentrifugation dargestellt. Diese Methode wird anhand eines modifizierten Protokolls von Bergmann et al [117] durchgeführt, wobei zwei verschieden konzentrierte Saccharose Puffer den Dichtegradienten erzeugen, über den kardiomyozytäre von nicht kardiomyozytären Zellkernen getrennt werden können.

2.2.8 Isolation von kardiomyozytären Zellkernen durch FACS-Sorting

Eine weitere Methode zur Isolation kardiomyozytärer Zellkerne stellt die des FACS-Sortings dar. Dabei wurden zunächst Herzen entnommen und die Aorta kanüliert. Über die Kanüle wurden die Herzen zunächst mit Heparin-Lösung (200µl Herparin in 50ml PBS), anschließend mit Kollagenase-I-Lösung (17mg Kollagenase I in 10ml PBS) perfundiert. Anschließend wurden die Herzen mittels einer Rasierklinge zerkleinert und in PBS-Lösung aufgenommen. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 500g für zwei Minuten. Daraufhin wurde das Pellet in 2ml Erythrozyten Lysispuffer aufgenommen, für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Lyse dann durch Hinzugabe von 2ml PBS beendet. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (jeweils bei 4°C und 500g für fünf Minuten). Zum weiteren Aufschluss wurde das Pellet in 5ml Lysispuffer (siehe 2.1.4) aufgenommen und durch 35 Stöße mit dem Glasdouncer zerkleinert. Weiter wurde das aufgeschlossene Material durch eine Passage durch einen 40µm und 70µm Filter aufgereinigt und dann bei 4°C und 1200g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde

anschließend in 2ml Saccharose-Puffer (siehe 2.1.4) aufgenommen. In einem Falcon-Röhrchen wurden 4ml des Saccharose Puffers (siehe 2.1.4) vorgelegt, das gelöste Pellet darauf pipettiert und bei 4°C und 1000g für zehn Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in Nuclei Storage Puffer gewaschen und aufgenommen. In den nächsten Schritten erfolgte die Färbung der kardiomyozytären Zellkerne. Dafür wurde ein gegen PCM-1 gerichteter Antikörper (Sigma-Aldrich) in der Konzentration 1:200 hinzugegeben und bei 4°C unter Rotation für 45 Minuten inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4°C, fünf Minuten 1200g) wurde das Pellet zweimal in Nuclei Storage Puffer gewaschen. Des Weiteren wurde mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti Rabbit IgG AlexaFluor647) gefärbt, zentrifugiert und zwei Mal in Nuclei Storage Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellkerne in 2% BSA/PBS Lösung aufgenommen und zur Färbung aller Zellkerne Hoechst-Färbung in der Konzentration 1:2000 hinzugefügt. Es wurde zweimal in 2% BSA/PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das FACS-Sorting, wobei die PCM-1 und Hoechst positiven Zellkerne isoliert wurden [119]. Es schloss sich die Untersuchung von DNA, wie unter 2.2.9 beschrieben, an. Für einen Überblick des Arbeitsablaufs siehe Abbildung 7.

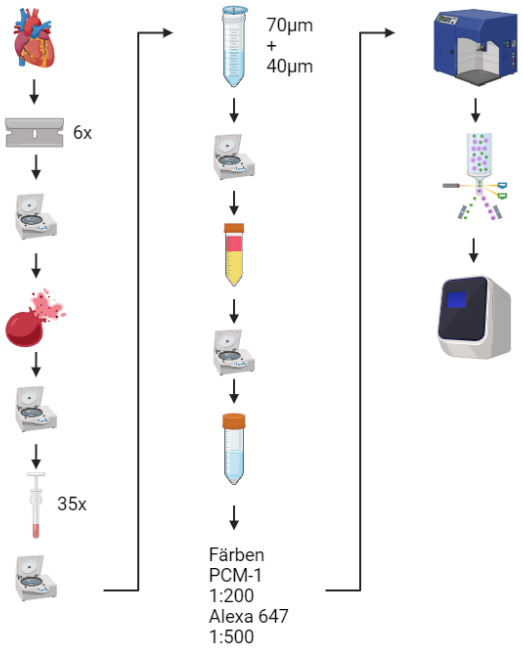


Abb. 7: In der Abbildung ist der methodische Ablauf der Isolation von kardiomyozytären-Zellkernen durch FACS-Sorting nach PCM-1- und Hoechst-Färbung der Zellkerne dargestellt.

2.2.9 Analyse von Proteinen

2.2.9.1 Western Blot

Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA Assay)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der in der Isolation von Zellkernen, Lyse von Herzen und Zellkultur gewonnen Proteinproben wurde der BCA-Test (bicinchoninic acid, Bichichoninsäure) nach Smith [120] verwendet. Hierzu wurde nach der Anleitung des Herstellers (Thermo Fischer Scientific) verfahren. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen als Standard auf einer 96-Well-Platte angelegt. Hierzu wurde als Protein BSA verwendet. Zu diesem Standard wurden 3µl des Lysispuffers, in dem sich die jeweilige Probe befand, pipettiert. Zur Bestimmung der Konzentration der Proben wurden zunächst 25µl steriles Wasser vorgelegt und anschließend 3µl der Probe hinzugegeben. Die Bestimmung der Konzentration der Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. Zudem wurde in zwei Wells steriles Wasser und der verwendete Lysispuffer, jedoch kein Protein pipettiert. Diese beiden Bestimmungen dienten der Schaffung eines Referenzwertes der Absorption, die die gebrauchten Reagenzien ohne Zusatz von Protein erzeugen. Anschließend wurde in alle gebrauchten Wells 200µl eines 50:1 Gemisches aus Pierce Protein Assay Reagent A und B (Thermo Fisher Scientific) pipettiert und die Wellplatte für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte durch ein Spektralphotometer bei 570nm (iMark Microplate Reader, Bio-Rad). Mit Hilfe der Standardreihe und einer hieraus erzeugten Eichkurve konnte die Software Microplate Manager 6 (Bio-Rad) aus der Absorption der Proben die Proteinkonzentration berechnen.

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese kann eine Auftrennung von Proteinen aus einem Proteingemisch anhand der molekularen Größe des Proteins erreicht werden [121]. Hierzu mussten die zu untersuchenden Proteinproben zunächst für die Gelelektrophorese vorbereitet werden. Dies geschah, indem die Proben in Abhängigkeit der im BCA Test gemessenen Proteinkonzentration durch Verdünnung mit dem jeweiligen Lysispuffer und 4x Lämmli-Puffer auf die gewünschte Konzentration, meist 1µg/µl, eingestellt wurden. Die im Lämmli-Puffer enthaltenen Substanzen DTT und SDS, sowie 10-minütiges Erhitzen auf 95°C führen zu einer Denaturierung der Proteine. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden SDS-Acrylamid-Gele, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, nach dem unten zu sehenden Schema hergestellt. Der Anteil an Acrylamid der Gele richtete sich dabei nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Zur Untersuchung von kleinen Proteinen wurden Gele mit 15%

Acrylamid, zu Untersuchung von Proteinen mittlerer Molekulargröße Gele mit 10% Acrylamid verwendet. Die zuvor gegossenen Gele wurden mit Proben beladen. Hierfür wurden die Gele in einer SDS-Page Kammer befestigt und diese mit Laufpuffer befüllt. Folgend wurden 20µg Protein, bei einer Konzentration von 1µg/µl entsprechend 20µl, in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zudem wurden in die erste Tasche der linken Seite des Gels 3µl einer Proteinstandardleiter (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) gegeben. Für die Gelelektrophorese wurde die Kammer an eine Spannungsquelle angeschlossen und eine Spannung von 120 V eingestellt. Die Proteintrennung erfolgte unter Beobachtung, bis der Blaumarker den unteren Rand erreichte – je nach Gelkonzentration nach etwa 60 bis 120 Minuten.

Tabelle: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Volumina zur Herstellung von zwei kleinen Gelen)

	2 Trenngele 10%	**2 Trenngele 15%**	**2 Sammelgele**
H2O	5ml	3,75ml	3,7ml
40% Acrylamid	2,5ml	3,75ml	625µl
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5ml	2,5ml	-
1 M TRIS (pH 6,8)	-	-	625µl
10% SDS	100µl	100µl	50µl
TEMED	20µl	20µl	10µl
APS	25µl	25µl	15µl

Western Blot Analyse

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurden zuvor in Anoden- und Kathodenpuffer eingelegte Whatman-Paper, jeweils ein dünnes und ein dickes Paper pro Pol, auf die Anode beziehungsweise Kathode eines Western Blot Transfergerätes (Invitrogen Power Blotter oder Pierce G2 Fast Blotter) gelegt. Das Gel und die Membran wurden anschließend zwischen die Whatman-Paper gelegt und die Proteine anschließend bei konstanter Stromstärke von 1,3 A für 7 bis 10 Minuten transferiert. Nach erfolgtem Transfer wurden die Membranen für 10 Minuten bei 37°C getrocknet und anschließend für 5 Minuten in TBS rehydriert. Dann erfolgte die Färbung der Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Kit Revert 700 Total Protein Stain (Li-Cor Bioscience). Hierzu wurde nach Vorgabe des Herstellers verfahren. Zur Reduktion nicht-spezifischer Antikörperbindungen erfolgte das Blocking der Membran in 5% Nonfat-Drymilk in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die Antikörper wurden dazu den

Herstellerangaben entsprechend in BSA in TBST oder Nonfat-Drymilk in TBST verdünnt. Nach Inkubation über Nacht wurde die Membran dreimal 15 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Inkubation des sekundären Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurden die sekundären Anti-Mouse-IgG- und Anti-Rabbit-IgG-Antikörper markiert, mit den Fluoreszenzfarbstoffen IR Dye 680RD und 800CW im Verhältnis 1:10000 bis 1:50000 in Blockingpuffer verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Membran gegeben. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde erneut dreimal 10 Minuten in TBST und einmal 10 Minuten in TBS gewaschen bevor die Membran gescannt wurde. Der Scan der Antiköperfärbung erfolgte wie der Scan der Gesamtproteinfärbung mit Hilfe eines Bildgebungssystems (Odyssey, Li-Cor Biosciences), das Licht der Wellenlänge 700nm (rot) und 800nm (grün), von den mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten sekundären Antikörpern emittiert wird, detektiert. Abschließend wurden die erzeugten Bilder mit Hilfe einer Software (Image Studio Lite Ver 5.2 oder Empiria Studio 2.2, beide LI-Cor Biosciences) analysiert. Dabei wurde die Gesamtproteinfärbung zur Normierung der Antikörperfärbung genutzt.

2.2.9.2 Immunhistochemie

Einblocken von Herzen

Aus durch Überstreckung getöteten Mäusen wird durch vorsichtiges Präparieren des Brustkorbs das Herz entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Durch Zusammendrücken des Herzens mit einer Pinzette wurden Reste von Blut aus den Hohlräumen entfernt und das Herz kurz auf einem Papiertuch getrocknet. Anschließend wurden die Herzen mit dem Apex nach oben in mit O.C.T. (Tissue Teck) gefüllte Aluminium-formen gegeben, welche dann mit O.C.T. aufgefüllt wurden.Danach wurden die Herzen in auf Trockeneis gekühltem Methylbutan bei -30°- -40°C eingefroren und im Anschluss bei 80°C gelagert.

Anfertigung kryostatischer Schnitte

Zur Anfertigung der kryostatischen Schnitte wurde das Gewebe von -80°C für eine Stunde oder über Nacht auf -22°C erwärmt. Der Kryostat wurde ebenfalls auf diese Temperatur temperiert. Anschließend wurden die eingeblockten Herzen im Kryostat befestigt und solange Schnitte verworfen, bis die Schnitte die Herzen im Querschnitt auf Höhe der Ventrikel darstellten. Danach wurden jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger gelegt und mit einem unbeheizten Haartrockner bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger mit den

getrockneten Schnitten wurden in verklebten Objektträgerkästen zusammen mit Trockenperlen bei -20°C aufbewahrt.

WGA und immunhistochemische Färbung der Schnitte

In der Vorbereitung der Färbung wurden die bei -20°C gelagerten Schnitte über Nacht auf 4°C und anschließend für eine Stunde auf Raumtemperatur erwärmt. Dann erfolgte die Fixierung der Schnitte mittels 4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS. Anschließend wurden die Schnitte für zweimal zehn Minuten mit PBS unter konstanter Bewegung auf einem Schüttler gewaschen. Im nächsten Schritt wurde zur Vorbereitung der Färbung eine Permeabilisierung der Schnitte durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,5% Triton X in PBS inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Blockierung durch 10% NGS (Normal Goat Serum) in PBS/Saponin 0,2% für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Es schloss sich die Färbung mit dem ersten Antiköper an. Dazu wurden die Antikörper gegen pH2A.X (Cell Signaling 2577) oder pDNA-PKcs (Abcam AB18192) 1:1000 in PBS/Saponin 0,2% + 2% NGS verdünnt und auf die Schnitte gegeben, welche anschließend in der feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zwei Mal zehn Minuten in PBS/Saponin 0,2% gewaschen. Dann folgte die Färbung mit dem zweiten Antikörper, der sich gegen den ersten Antikörper richtete, und WGA. Bei WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) handelt es sich um ein Lectin, einer Gruppe von Proteinen, die Kohlenhydrate binden. WGA bindet die Kohlenhydrate N-Acetylglucosamin und Sialinsäure welche sich auf der Zelloberfläche befinden [122, 123]. Daher dient die WGA Färbung der Darstellung der Zelloberfläche und der Zellgrenzen [124] [125]. Zur Färbung wurde WGA-Alexa488 (1:200) in PBS/Saponin 2% + 2% NGS verdünnt. Zu dieser Verdünnung wurde zudem der sekundär-Antikörper zur Färbung von pH2A.X hinzugegeben (Goat-Anti-Rabbit-CY3, 1:300). Die Schnitte wurden dann im Dunklen für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte für jeweils 15 Minuten in PBS im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Als letzter Schritt wurden die Schnitte mit Fluoromount D mit 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Southern Biotech) zur Darstellung der Zellkerne eingedeckt und bei 4°C getrocknet [126].

Mikroskopie und Auswertung

Die Mikroskopie der gefärbten Schnitte erfolgte durch konfokale Mikroskopie am Center of Advanced Imaging (CAI) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dabei wurde das Mikroskop LSM 880 Airyscan der Firma Zeiss verwendet. Die Bildbearbeitung und Auswertung mittels Fiji [127] erfolgt in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Hänsch des CAI. Der Arbeitsablauf der Bildanalyse wird unter 3.1.3 beschrieben.

2.2.10 PCR Analyse von RNA und DNA

Isolation von RNA aus Herzgewebe der Maus

Die Isolation von RNA aus murinen Herzgewebe erfolgte mithilfe des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits (Qiagen). Dabei wurde nach Vorgabe des Herstellers verfahren. Nach der Isolation wurde die RNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (Nanodrop ND-1000 Spectrometer, Peqlab). Dabei wurde auf das Absorption-Verhältnis von 260/280 nm Wellenlänge geachtet, welches die Reinheit von RNA gegenüber Protein anzeigt. Dabei sollte das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

cDNA Synthese durch reverse Transkription

Nach der RNA-Isolation erfolgte die Transkription in cDNA (complementary DNA). Hierzu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurde 1µg mRNA in RNase-freiem Wasser verdünnt, bis ein Probevolumen von 20µl vorlag. Anschließend wurde die genomische DNA durch den gDNA-Puffer abgebaut. Die mRNA wurde dann durch reverse Transkription in cDNA überführt. Dies erfolgte für 15 Minuten bei 42°C. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Die entstandene cDNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

Isolation von DNA aus Kardiomyozyten-Zellkernen

Da beim FACS-Sorting nur eine geringe Anzahl an kardiomyozytären Zellkernen isoliert werden konnte, musste die DNA mittels eines Protokolls, das für geringe DNA-Mengen ausgelegt ist, isoliert werden [128]. Dazu wurde das Kernpellet zunächst in 100µl Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM NaCl, 6.25 mM $MgCl_2$, 0.045% NP40, 0.45% Tween-20) überführt. Anschließend wurde Proteinase K in einer Konzentration von 20mg/ml hinzugefügt. Dann erfolgte eine Inkubation bei 56°C für eine Stunde. Anschließend wurde der Proteinaseverdau durch eine 15-minütige Inkubation bei 95°C beendet. Mit der in diesem Schritt gewonnen DNA wurde anschließend, wie im nächsten Punkt beschrieben, in der quantitativen Real-Time PCR weiter verfahren.

Quantitative Real-Time PCR

Zur quantitativen Untersuchung der Expression der zu analysierenden Gene wurden quantitative Echtzeit-PCRs (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) durchgeführt. Das Prinzip dieser Untersuchung beruht darauf, dass sich der im verwendeten Kit (primaQuant CYBR, SYBRGreen Mastermix mit ROX, Steinbrenner) befindende Farbstoff SYBR Green an doppelsträngige DNA anlagert und ein Fluoreszenzsignal abgibt. Nimmt im Verlauf der Zyklen der PCR die Menge der doppelsträngigen DNA des Zielgens zu, steigt im

gleichen Maße das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes, sodass das gemessene Signal der Fluoreszenz mit der Menge an synthetisierter DNA korreliert. Für die Zusammensetzung des Ansatzes siehe die untenstehende Tabelle.

Tabelle: Zusammensetzung des Ansatzes einer qPCR-Reaktion

SYBRGreen Mastermix mit ROX	10µl
RNAse freies H2O	7µl
cDNA	1µl
Primer forward	0,9µl
Primer reverse	0,9µl

Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte am qTower3 (Analytik Jena) oder am StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Zunächst wurden die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde das folgende Schema für 40 Zyklen durchlaufen. Das Schema bestand daraus, dass die Proben zunächst zur Denaturierung der DNA für 15 Sekunden auf 95°C erhitzt wurden, bevor bei 60°C für eine Minute die Elongation stattfand. Abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung der Spezifität der während der PCR entstandenen Produkte durchgeführt [129].

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe von Software. Bei Gebrauch des qTower3 wurde qPCRsoft 3.4 (Analytik Jena) verwendet. Im Fall des StepOnePlus™ Real-Time PCR System wurde die StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems™) genutzt. Ausgewertet wurde an Hand der X0-Methode, welche die X0-Werte der verschiedenen Proben ins Verhältnis setzt und so angibt in welche Probe zu Beginn der PCR welche Menge der mRNA des Zielgenes vorhanden war [130] [131]. Die Gleichung der Berechnung der X0-Werte lautet:

$$X0 = 1/(2^{\mathrm{ct(mean)}})$$

Die für X0-Methode benötigten CT-Werte (Threshold Cycle) ergeben sich aus der Anzahl an Zyklen, die während der PCR einer cDNA durchlaufen werden müssen, bevor das Fluoreszenzsignal einer Probe eine definierte Schwelle überschreitet. Dieser Schwellenwert muss sich in der logarithmischen Amplifikationsphase der PCR befinden. Da die Proben in Dreifachbestimmung gemessen wurden, ergab sich der CT Wert aus dem Mittel aller drei Einzelbestimmungen. Die berechneten X0 Werte der Proben wurden anschließend an den X0 Wert eines Housekeeper-Gens oder Referenzgenes, welches im gleichen PCR Ansatz amplifiziert wurde, normiert. Als Housekeeper wurde zum einen ein Gen auf genomischer DNA (IGF-Rezeptor, siehe 3.2.3) oder ein unabhängiger Abschnitt des Zielgenes (p53, siehe 3.2.4) verwendet.

2.2.11 RNA Sequenzierung:

Aus Herzgewebe von iCMp53KO, iCMAKT12p53KO, iCMAKT12KO und wildtypischen Mäusen wurde RNA wie im Punkt 2.2.10 beschrieben isoliert. Zur Eliminierung von DNA wurde diese mittels DNAse auf den Isolations-Säulen enzymatisch abgebaut. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mittels Nanodrop ND-1000 ermittelt und durch Verdünnung auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die RNA-Proben wurden dann am Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf sequenziert. Dabei erfolgte die Sequenzierung mittels *Sequencing by Synthesis* auf der Illumina Sequenzierungs-Plattform NextSeq2000 (Illumina Inc, San Diego, CAL, USA). In dieser Sequenzierung-Methode können simultan diverse Genabschnitte auf einer Sequenzierungsplattform (Flowcell) sequenziert werden. Hierzu wird die RNA zunächst in cDNA überführt und die cDNA anschließend fragmentiert. An die DNA-Fragmente werden Adapter angehängt, die mit an der Oberfläche der Flowcell gebundenen kurzen DNA-Abschnitten interagieren und so die DNA-Fragmente an die Flowcell binden. Anschließend werden die gebundenen DNA-Fragmente amplifiziert, sodass in einer Region der Flowcell dasselbe DNA-Fragment vielfach vorzufinden ist. Diese Regionen der Flowcell mit identischen DNA-Abschnitten werden als Cluster bezeichnet. Diese ermöglichen es, viele DNA-Abschnitte zur gleichen Zeit zu sequenzieren. Zur eigentlichen Sequenzierung werden die an der Flowcell gebundenen DNA-Abschnitte, die einzelsträngig vorliegen, durch eine Polymerase amplifiziert. Dabei werden mit Fluoreszenz-Molekülen markierte Nucleotide gebraucht. Jedes Nucleotid (A, C, G, T) verfügt dabei über eine unterschiedliche Farbe. Lagert sich ein solches Nucleotid an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang, wird ein messbares Lichtsignal emittiert. Die Reihenfolge der gemessenen Lichtsignale entspricht damit der gegenläufigen Sequenz des DNA-Fragments. Nach Beendigung der Sequenzierung wird die Reihenfolge der Fluoreszenz-Signale ausgewertet und zu Sequenzen (Reads) zusammengefasst. Die Reads können dann mit einem Referenzgenom derselben Spezies abgeglichen, identifiziert und assembliert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR in iCMAKT12KO-Herzen

Zunächst beschäftigte sich diese Arbeit mit den möglichen Wegen, auf denen p53 im iCMAKT12KO-Modell aktiviert werden könnte. Ein Weg der Aktivierung von p53 erfolgt über die Proteinkinasen ATM und ATR. Diese stabilisieren p53 durch Phosphorylierung, die dazu führt, dass p53 nicht mehr durch MDM2 ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut werden kann. Um zu prüfen, ob es eine gesteigerte Aktivität von ATM und ATR in Herzen von

iCMAKT12KO-Tieren im Vergleich zu Herzen wildtypischer Tiere gab, wurden zunächst Western Blots durchgeführt, die das Substratmotiv von ATM und ATR in iCMAKT12KO-Herzen und wildtypischen Herzen verglichen. Der verwendete Antikörper (Cellsignaling CS6966) bindet dabei eine hydrophobe und negativ geladene Erkennungssequenz für ATM und ATR in Substraten der beiden Kinasen, falls diese phosphoryliert ist. Von den Phosphorylierungen der ATM- und ATR-Erkennungssequenzen können somit Rückschlüsse auf die Aktivität der beiden Kinasen gezogen werden. Es zeigte sich eine stärkere Signalintensität für den Substratmotivantikörper in Herzen von Tieren mit iCMAKT12KO im Vergleich zu wildtypischen Tieren (siehe Abbildung 8). Dies konnte besonders in der Auswertung des Signalbereichs hoher Molekulargewichte (HMW) (70-100kDa) beobachtet werden. Hier konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Signalintensität des Antikörpers in Proben von Tieren mit zunehmender Dauer nach Induktion des Knockouts nachgewiesen werden.

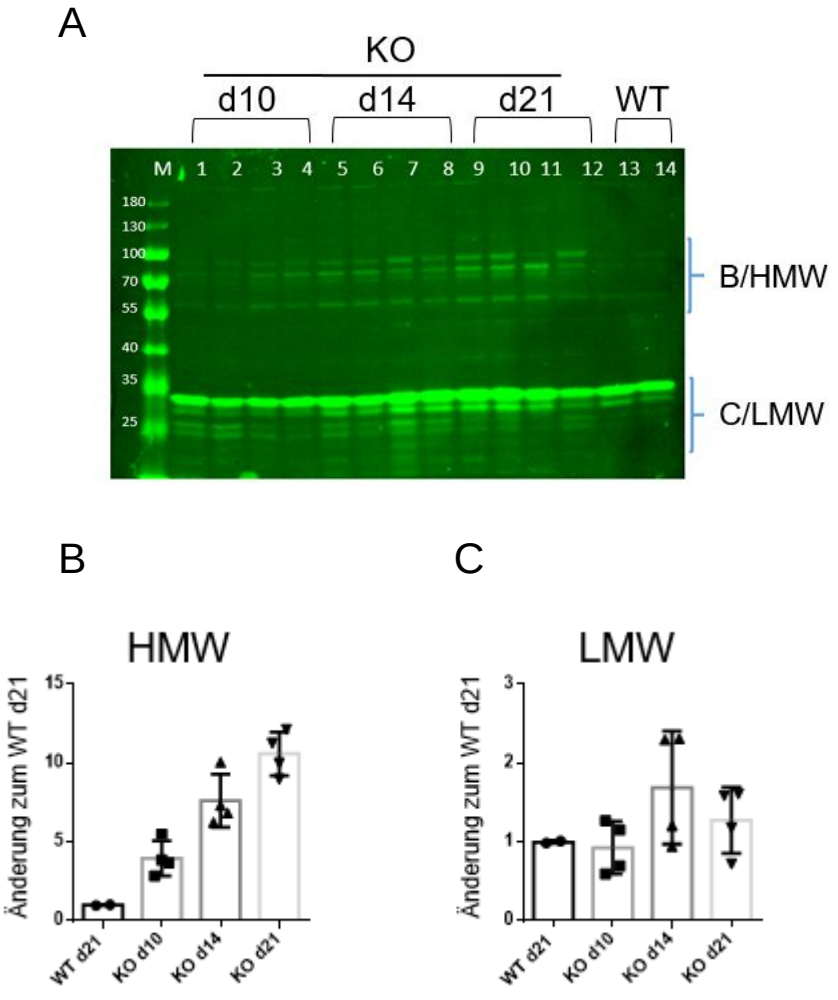


Abb. 8: phospho-ATM- und ATR-Substratmotiv Western Blots von Proteinextrakten aus Herzen von iCMAKT12KO-Tieren und wildtypischen Tieren, entnommen am 10.,14. und 21. Tag nach KO-Induktion A: Western Blot Membran mit Darstellung der beiden Auswertungsbereiche (Probe 1-4: iCMAKT12KO d10, Probe 5-8: iCMAKT12KO d14, Probe 9-12: iCMAKT12KO d21, Probe 13 und 14: WT) B Darstellung der quantitativen Auswertung des Signalbereichs hoher Molekulargewichte (HMW) C Darstellung der Auswertung des Signalbereichs niedriger Molekulargewichte (LMW), beide normiert auf TPS. Dabei wurde der WT auf der ersten Position analysiert und anschließend die Proben der KO-Herzen als „fold change“ gegenüber dem WT dargestellt.

3.1.1 Etablierung der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation Kardiomoytyzen-Zellkernen

Um den Hinweis auf gesteigerte ATM- und ATR-Aktivität in iCMAKT12KO-Herzen zu validieren, erfolgte die Analyse eines spezifischen Substrats von ATM und ATR. Da, wie unter 3.3.1 beschrieben, keine Darstellung von p53 in Western Blot-Analysen gelang, wurde auf ein alternatives ATM- und ATR-Substrat zurückgegriffen. Das Histon H2A.X wird ebenfalls in Abhängigkeit von ATM und ATR phosphoryliert [132] [133]. Um die Aktivität von ATM und ATR zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung des Histons H2A.X mit zwei unabhängigen Methoden (Western Blot und Immunhistochemie) geprüft.

Zur Analyse der Phosphorylierung des Histons H2A.X im Western Blot wurde zunächst versucht, Lysate zu nutzen, die aus dem gesamten Herzen generiert wurden. Dabei zeigte sich jedoch, dass in diesen Proben durch Western Blot Analysen nur ein sehr schwaches Signal für pH2A.X nachgewiesen werden konnte, sodass eine Quantifizierung nicht möglich war (siehe Abbildung 9). Das Histon H2A.X besitzt dabei eine Masse von 15,143 kDa (UniProt).

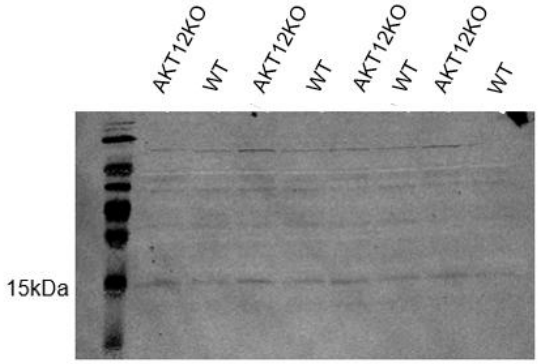


Abb. 9: Western-Blot nicht fraktionierter Proteinextrakte aus Herzen von wildtypischen und iCMAKT12KO-Tieren. Dabei wurde der Antikörper Cellsignaling CS2577 pH2A.X verwendet.

Daher wurde zunächst versucht über ein einfaches Protokoll, das einen Zentrifugationsschritt enthielt (siehe für das Protokoll in Material und Methoden unter 2.2.6 und Abbildung 5) eine Konzentrierung der Zellkerne und damit der Histon-Proteine zu erreichen. Da es sich bei Zellkernen um das größte Organell der Zelle handelt und Zellkerne eine hohe Dichte aufweisen, war davon auszugehen, dass sie sich nach der Zentrifugation im Pellet befinden. Die Mitochondrien und das Cytoplasma hingegen weisen eine geringere Dichte auf und sollten sich im Überstand nach der Zentrifugation befinden [134]. Verglich man Proteinproben aus dem Pellet und aus dem Überstand dieser Methode, konnte eine vollständige Anreicherung der Kerne im Pellet erreicht werden, da Histon H3 fast ausschließlich im Pellet zu finden war.

Dies ging einher mit einer erheblichen Abtrennung zytoplasmatischer und mitochondrialer Proteine, da eine erhebliche Reduktion von zytoplasmatischen (GAPDH) und mitochondrialen (ATP5A1) Proteinen erreicht wurde (s. Nachweis von GAPDH und ATP5A1 im Western Blot aus Proben der Pellets gegenüber Proben des Überstandes (siehe Abbildung 10D und E)). Es zeigte sich jedoch,dass neben Proteinen aus dem Zellkern, nachgewiesen durch Histon H3, ein bedeutender Anteil von Proteinen des kontraktilen Apparates, nachgewiesen durch α-Actinin und Troponin I, ebenfalls im Pellet enthalten waren (siehe Abbildung 10A-C).

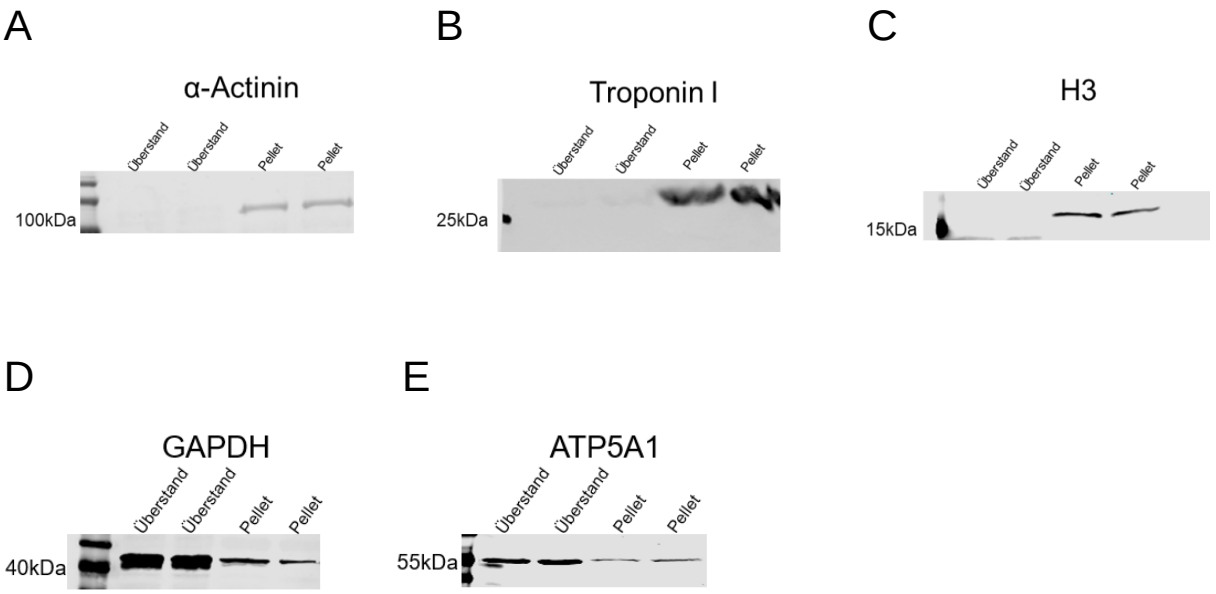


Abb. 10: Western Blot verschiedener Proteine zwischen Überstand und Pellet im Western-Blot nach Aufschluss und Zentrifugation. A und B zeigen mit α-Actinin und Troponin I Proteine des kontraktilen Apparats. In C ist mit dem Histon H3 ein Protein des Zellkerns nachgewiesen. D und E zeigen mit GAPDH und ATP5A1 zytoplasmatische beziehungsweise mitochondriale Proteine**.**

Um eine höhere Anreicherung von Proteinen des Zellkerns zu erreichen, wurde daher auf eine, auf Dichtegradienten-Zentrifugation beruhende, Methode zurückgegriffen die im Vorfeld von Bergmann et al. beschrieben wurde [117]. Für den genauen Arbeitsablauf dieser Methode siehe den Material- und Methodenteil unter 2.2.7. Zunächst wurde durch Entnahme von Material nach verschiedenen Schritten der Methode mikroskopisch geprüft, ob ein effektiver Aufschluss des Herzgewebes gelang. Hierzu wurden während des Aufschluss Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen (zunächst nach der Homogenisierung mittels Ultra Turax und Glasdouncer, dann nach Filtration durch 100µm und 70µm Filter und zuletzt nach der Dichtegradientenzentrifugation). Diese Proben wurden zur Beurteilung der Partikelgröße im Durchlicht und durch Färbung mit DAPI mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass es zu einer schrittweisen Zerkleinerung des Gewebes kam und nach dem letzten Schritt vermehrt Zellkerne isoliert vorlagen (siehe Abbildung 11). In Western-Blot-Analysen der

Proben zeigte sich, dass deutliche Signale sowohl für Histon H2A.X als auch für pH2A.X dargestellt werden konnten (siehe Abbildung 12). Auch fiel hier auf, dass in der Gesamtprotein-Färbung (TPS, *total protein stain*) eine deutliche Bande im Bereich um 15kDa zu sehen war. Da Histon-Proteine in diesem Größenbereich liegen, wurde vermutet, dass es sich um die Histon-Protein-Fraktion handeln könnte. Da sich die Methode als geeignet zur Konzentrierung von Histon-Proteinen zeigte, wurden mittels dieses Vorgehens aus Herzen von wildtypischen (n=4) und iCMAKT12KO-Mäusen (n=4), die am 21. Tag nach Induktion des Knockouts entnommen wurden, Proteinproben generiert, deren Analyse im Folgenden beschrieben wird.

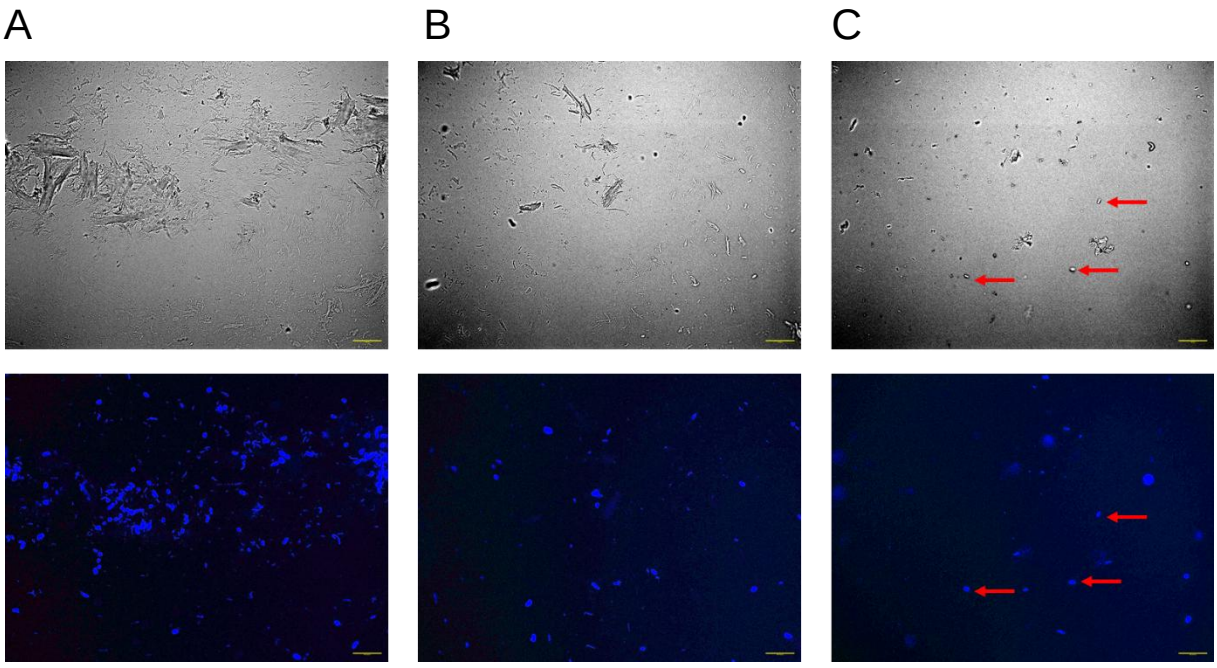


Abb. 11: Mikroskopische Untersuchung der Partikelgröße nach verschiedenen Schritten der Methode nach Bergmann A Partikelgröße nach Gewebehomogenisierung (im unteren Bild gefärbt mit DAPI, oben im Durchlicht) B Partikel nach Filtration (erneut unten DAPI gefärbt und oben im Durchlicht). C Partikel aus dem Pellet nach Dichtegradienten-Zentrifugation (unten DAPI, oben Durchlicht). Die roten Pfeile markieren dabei beispielhaft Zellkerne. Der Größenstandard liegt bei 100µm.

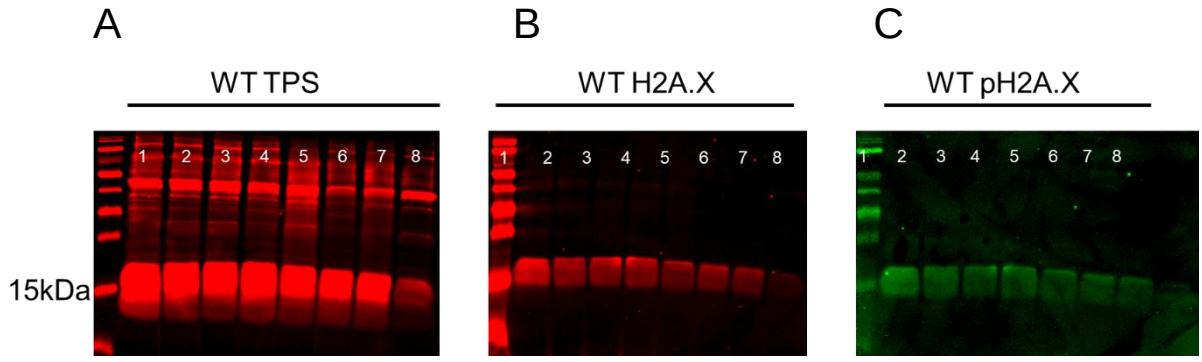


Abb. 12: Western Blot mit Proteinproben die aus dem Pellet der Dichtegradientenzentrifugations-Methode nach Bergmann erzeugt wurden. A) Gesamtproteinfärbung mittels *REVERT 700 Total Protein* Stain (Licor) B) Färbung mittels Antikörper gegen H2A.X (Cell Signaling 2595) und Goat anti Rabbit IgG IR Dye 800CW (Licor) C) Färbung mittels Antikörper gegen pH2A.X (Cell Signaling 80312) und Goat anti Mouse IgG IR Dye 680RD (Licor). Dabei wurden jeweils 20µg Proteinextrakt, die aus halben Herzen wildtypischer Mäuse gewonnen wurden, eingesetzt. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, wurden Proteinproben die an zwei verschiedenen Tagen gewonnen wurden, gebraucht (Proben 1-4: 4-mal ein halbes Herz vom Tag 1, 5-8: 4-mal ein halbes Herz vom Tag2).

3.1.2. Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR mittels Western Blot

Die Western Blot Analyse der Protein-Isolate aus den Pellets, die mittels Dichtegradienten-Zentrifugation nach Bergmann erzeugt wurden, erfolgte durch einen Antikörper die Darstellung des nicht phosphorylierten Histon H2A.X (Cell Signaling 2595, Kaninchen) und durch einen zweiten Antikörper die Darstellung von pH2A.X (Ser139) (Cell Signaling 80312, Maus). Dabei wurde alternierend ein Proteinisolat aus dem Herzen eines wildtypischen Tiers und eines iCMAKT12KO-Herzens aufgetragen (siehe Abbildung 13A). Die Signalintensität beider Färbungen wurde in der Software Empiria Studio 2.2 gemessen und in GraphPad Prism 6 statistisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Grad der Phosphorylierung zwischen den Proben der verschiedenen Tiere stark schwankte. Wurde das Verhältnis der Phosphorylierung der beiden Gruppen mittels ungepaarten t-Tests miteinander verglichen, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 13C). Es konnte daher im Western Blot kein statistisch signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung des Histons H2A.X an Serin 139 zwischen wildtypischen Tieren und Tieren mit kardiomyozytären Knockout von AKT1 und AKT2 festgestellt werden.

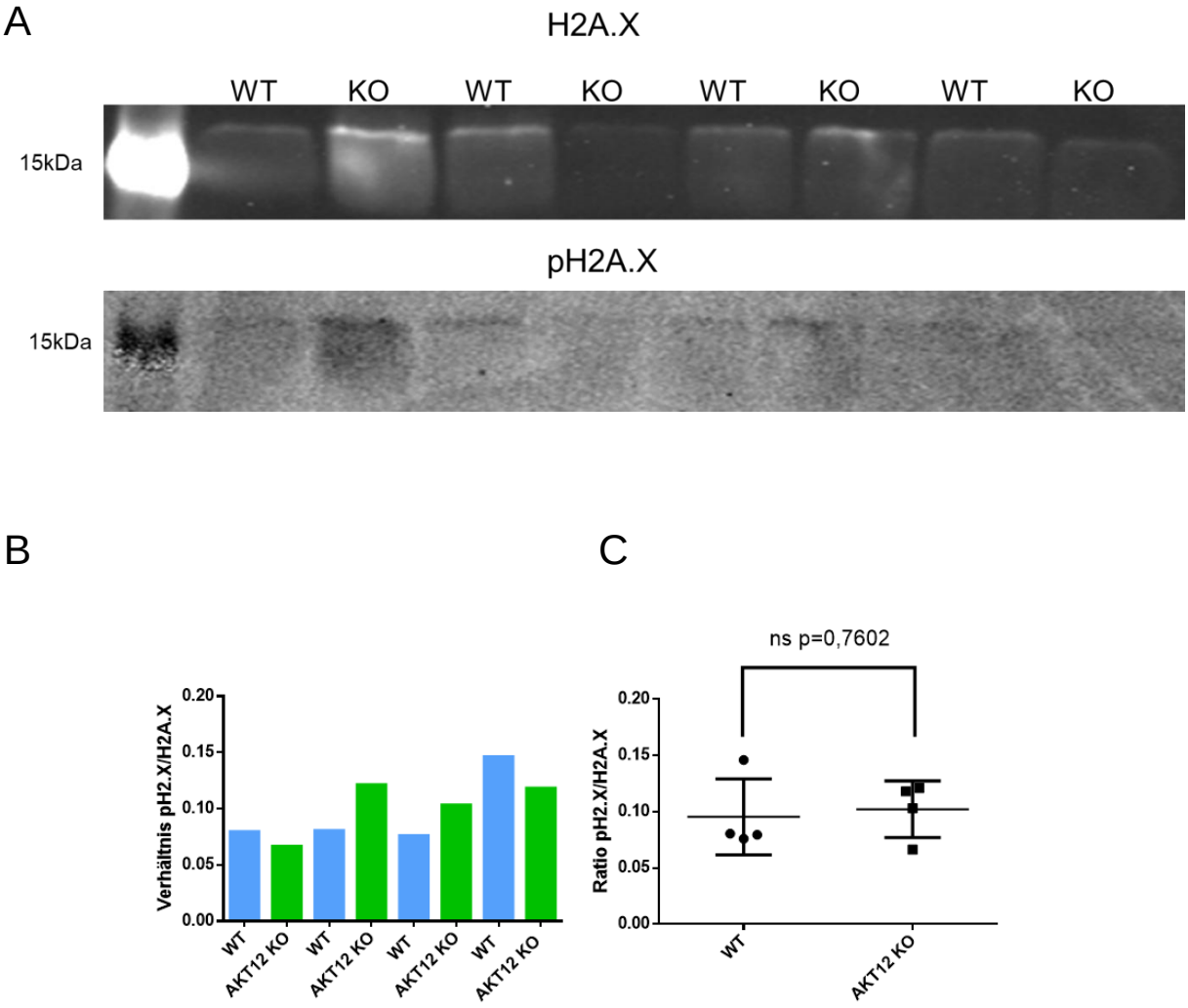


Abb. 13: A: Western Blot des Histon H2A.X und pH2A.X in Proteinextrakten aus konzentrierten Zellkernen (jeweils 15µg Probeneinsatz, H2A.X Antikörper Cellsignaling 2595 und pH2A.X Antikörper Cellsignaling 80312) B und C Darstellung des Vergleichs der Phosphorylierung des Histons H2A.X im Western Blot zwischen wildtypischen- und iCMAKT12KO-Tieren. Ebenfalls die statistische Analyse des Vergleichs beider Gruppen. Dieser Erfolgte mittels ungepaarten t-Test (*unpaired t test*). Es zeigte sich ein p-Wert von 0,7602 und ein 95% Konfidenz-Intervall von -0,04477 bis 0,05822, sodass die Differenz im Grad der Phosphorylierung zwischen den beiden Gruppen als statistisch nicht signifikant angenommen wurde.

3.1.3 Untersuchung der Aktivität von ATM/ATR mittels Immunhistochemie

Um den Grad der Phosphorylierung des Histons H2A.X durch eine zweite Methode zu prüfen, erfolgte eine Analyse mittels Immunfluoreszenz. Dazu wurden Kryostat-Schnitte des linken Ventrikels wildtypischer- und iCMAKT12KO-Mäuse gefärbt. Es erfolgte eine Färbung mittels Antikörper gegen pH2A.X (Cell Signaling 2577, Kaninchen) mit anschließender Färbung durch den sekundären Antikörper (Jackson *Goat anti Rabbit CY3*, 111-165-144). Zudem wurden die Schnitte zur Darstellung der Zellumrisse mit WGA Alexa Fluor 488 (Invitrogen) gefärbt, da sie

die Identifizierung von Kardiomyozyten-Zellkernen vereinfacht und zu einer höheren Sensitivität und Spezifität bei der Differenzierung von nicht-kardiomyozytären Zellkernen beiträgt [135]. Darüber hinaus wurde zur Darstellung der Zellkerne mit DAPI (DAPI mit Fluoromount G, Southern Biotech) gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch konfokale Mikroskopie am Centre of Advanced Imaging (CAI) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dabei wurde das Mikroskop LSM880 von Zeis verwendet.

Zur Auswertung der Bilder wurden zunächst Zellkerne von Kardiomyozyten identifiziert, elektronisch aus dem Bild „herausgeschnitten“ und separat gespeichert. In diesen Bildern erfolgte dann die Analyse durch ein Makro im Bildbearbeitungssystem Fiji [127], welches in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sebastian Hänsch und Frau Dr. Miriam Bäumers vom CAI entwickelt wurde. Dieses Makro identifiziert anhand der Färbung mit DAPI die Zellkerne und bestimmt die Fläche, die ein Signal für DAPI aufweist (blau, siehe Abbildung 14). Diese Fläche wurde als die Gesamtfläche des Zellkerns angenommen. Anschließend identifizierte das Programm die Fläche des Zellkernes, die ein positives Signal für pH2A.X zeigte (rot). Innerhalb des Makros kann dabei auf verschiedene eingespeicherte automatische Schwellenwerte (Thresholds) zurückgegriffen werden. Diese legen fest, ab welcher Intensität ein Signal als positiv gewertet wird. Schwächere Signale werden vom Schwellenwert aussortiert. Da die verschiedenen Schwellenwerte Signale ab einer unterschiedlichen Signalintensität als positiv werten, hat die Auswahl des Schwellenwerts einen Einfluss auf die vom Makro gemessene Fläche der Zellkerne. Durch Division der pH2A.X-positiven Fläche durch die Gesamtfläche des Zellkerns, ergab sich ein Verhältnis, welches zwischen den Zellkernen aus Bildern wildtypischer Tiere und Zellkernen aus Bildern der Tiere mit AKT1- und AKT2-Knockout verglichen werden konnte.

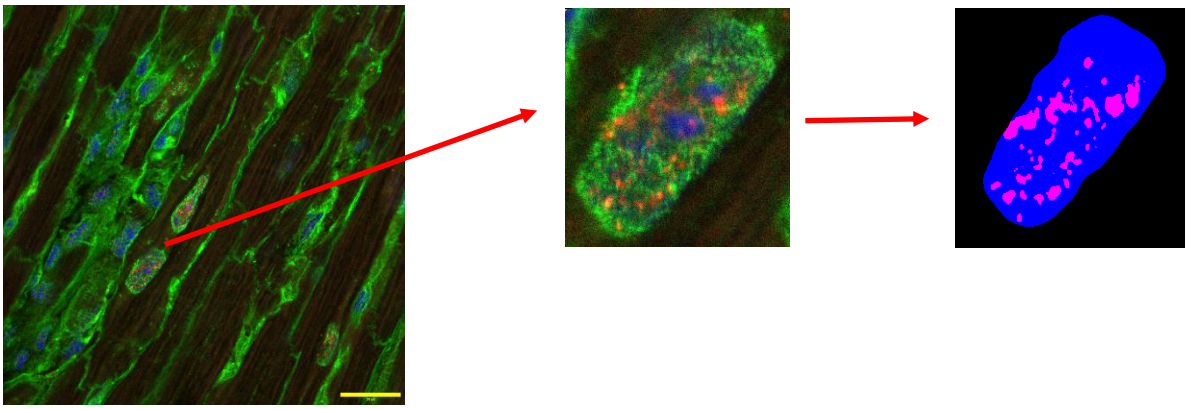


Abb. 14: Darstellung des Arbeitsablaufs zur Analyse des Phosphorylierungsgrades des Histons H2A.X mittels Fiji in immunhistochemischen Bildern. Auf der linken Seite ist ein immunhistochemisch gefärbtes Bild von Myokards zu sehen. Dabei ist in Grün die Färbung mittels WGA, in Blau DAPI und in Rot pH2A.X dargestellt. Der Größenstandard entspricht 10 µm.In der Mitte ist ein kardiomyozytärer Zellkern dargestellt. Rechts abgebildet ist derselbe kardiomyozytäre Zellkern nach der Bearbeitung durch das Makro in FIJI.

Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis zwischen der pH2A.X-positiven Fläche zur Gesamtfläche des Zellkernes starken Schwankungen unterworfen war. So wiesen Zellkerne desselben Herzens bereits sehr starke Unterschiede in diesem Verhältnis auf. Auch fiel auf, dass zwischen den Tieren erhebliche Unterschiede herrschten. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen wurden daher jeweils wildtypische- und Knockout-Herzen, die sich auf demselben Objektträger befanden, einander gegenübergestellt. Verglich man jeweils das gemittelte Verhältnis der pH2A.X-positiven Fläche zur Gesamtfläche der Zellkerne eines wildtypischen Tieres mit einem iCMAKT12KO-Tier am 21. Tag nach Induktion des Knockouts, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 15A). Die Auswertung erfolgte dabei wieder in GraphPad Prism 6. Die statistische Analyse erfolgte durch ungepaarten t-Test, wobei ein Ergebnis ab einem p-Wert<0,05 als statistisch signifikant angenommen wurde.

Da das in Fiji verwendete Makro die Signalintensität des DAPI-Signals, ab der das Signal als positiv gewertet wird, mittels eines automatisierten Threshold (*Huang*) definiert, wurde geprüft, ob die Verwendung eines anderen Schwellenwertes (*Otsu*) zu einem anderen Ergebnis führt (Siehe Abbildung 15B). Ebenfalls wurde geprüft, ob sich das Ergebnis ändert, wenn die Fläche der Zellkerne manuell definiert wird (siehe Abbildung 15C). Auch unter Verwendung dieser beiden Methoden zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der H2A.X-Phosphorylierung zwischen wildtypischen und iCMAKT12KO-Herzen.

Dieses Ergebnis ist kongruent mit den Ergebnissen der Analyse mittels Western-Blot und zeigt, dass die im Substratmotiv-Western-Blot nachgewiesene stärkere Aktivität von ATM und ATR in Herzen mit iCMAKT12KO gegenüber wildtypischen Herzen in der Analyse der Phosphorylierung von H2A.X in Zellkernen von Kardiomyozyten nicht festgestellt werden konnte.

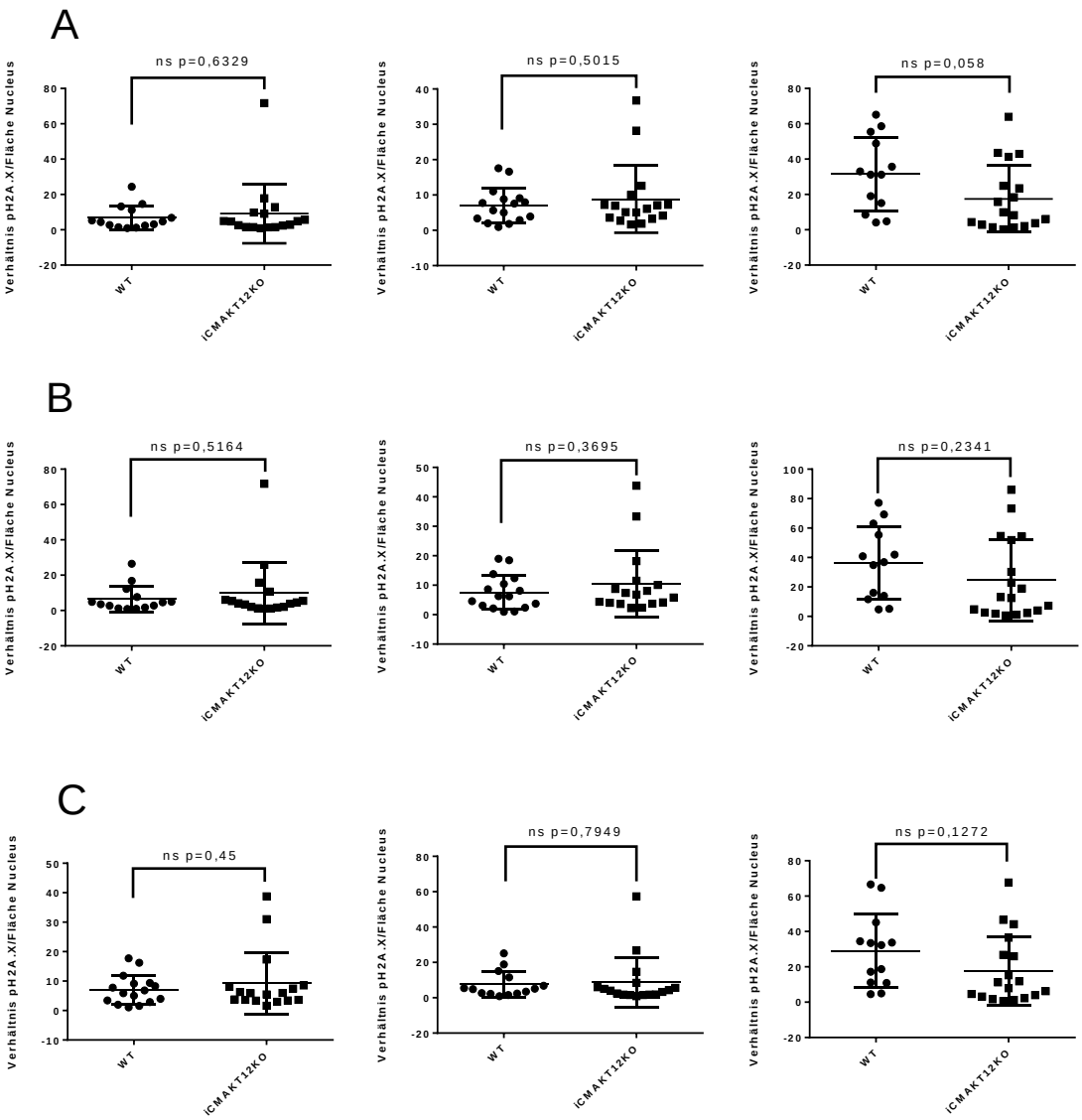


Abb. 15: Vergleich von wildtypischen Tieren und iCMAKT12KO A: Vergleich von wildtypischen und iCMAKT12KO Tieren am Tag 21 im Parameter des Verhältnisses der pH2A.X-positiven Fläche zur Gesamtfläche der kardiomyozytären Zellkerne, unter Verwendung des Threshold *Huang*. B: Vergleich der pH2A.X-positiven Fläche zur Gesamtfläche der kardiomyozytären Zellkerne derselben Tiere unter Verwendung des Threshold *Otsu* C: Vergleich der pH2A.X-positiven Fläche zur Gesamtfläche der kardiomyozytären Zellkerne derselben Tiere unter manueller Definition der Zellkernfläche. Es wurden jeweils ein Herz eines wildtypischen Tieres und ein Herz eines iCMAKT12KO Tieres verglichen, die sich auf demselben Objektträger befanden.

3.2 Untersuchung der DNA-PKcs Aktivität in iCMAKT12KO-Herzen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist neben ATM und ATR auch die Kinase DNA-PKcs in der Lage, p53 zu phosphorylieren und so zu aktivieren. Um die Aktivität von DNA-PKcs in Herzen von Mäusen mit iCMAKT12KO zu untersuchen, wurden ebenfalls immunhistochemische Bilder angefertigt und analysiert. Dazu wurden Kryostat-Schnitte linker Ventrikel von wildtypischen und iCMAKT12KO-Mäusen gefärbt, die am 21. Tag nach Induktion des Knockout entnommen worden waren. Es erfolgte eine Färbung mittels DAPI zur Darstellung der Zellkerne und eine Färbung mit WGA Alexa Fluor 488 zur Darstellung der Zellmembran. Hier wurde mittels eines Antikörpers gegen phospho-DNA-PKcs (phosphoryliert am Serin 2056, Abcam) gefärbt. Dieser Antikörper wurde verwendet, da DNA-PKcs in Folge der Interaktion mit DNA eine Autophosphorylierung an dieser Aminosäure durchführt [136]. Liegt diese Autophosphorylierung vor, spricht es für eine Aktivität der Kinase, welche für die Phosphorylierung von p53 notwendig ist.

Das Erzeugen der Bilder erfolgte erneut mittels konfokaler Mikroskopie am Center of Advanced Imaging. Die Bildbearbeitung und Auswertung erfolgten über Fiji, mittels des zuvor beschriebenen Arbeitsablaufs im Makro. Dabei wurden erneut Herzen miteinander verglichen, die sich auf demselben Objektträger befanden. Es wurde ein Verhältnis zwischen der Fläche mit Signal für phospho-DNA-PKcs und der Gesamtfläche der kardiomyozytären Zellkerne (gemessen an der Fläche, die ein positives Signal für DAPI zeigte) erhoben. Dann wurden die Verhältnisse der Zellkerne zwischen Wildtyp und iCMAKT12KO-Tieren verglichen. Das Verhältnis aller analysierten Zellkerne eines Herzens wurde gemittelt und mit dem Verhältnis aller Zellkerne eines Herzens mit unterschiedlichem Genotyp verglichen. Die statistische Analyse wurde über GraphPad Prism 6 durchgeführt, wobei ein ungepaarter t-Test (statistische Signifikanz ab $p<0,05$) verwendet wurde.

Es zeigte sich, dass es eine sehr große Varianz innerhalb eines Herzens gab. Sowohl in wildtypischen Tieren als auch in iCMAKT12KO-Tieren konnten im selben Individuum sowohl sehr hohe als auch niedrige Verhältnisse zwischen phospho-DNA-PKcs-positiver Fläche und Gesamtfläche eines Zellkernes beobachtet werden. Verglich man nun die Tiere paarweise, zeigte sich, dass es entweder keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen gab, oder dass ein signifikant höherer Wert in wildtypischen Tieren vorlag (siehe Abbildung 16).

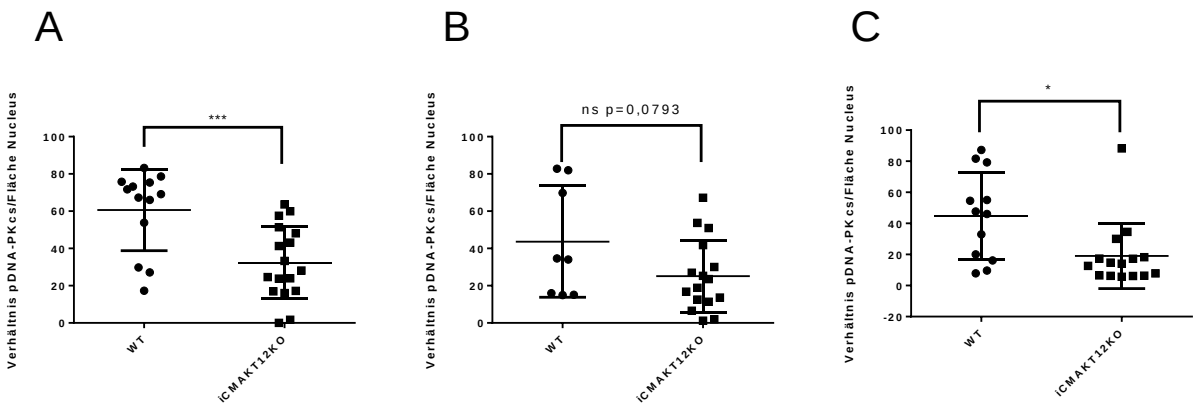


Abb.16: Vergleich von wildtypischen und iCMAKT12KO-Herzen am 21. Tag nach Knockout Induktion im Verhältnis zwischen pDNA-PKcs-positiver Fläche und der Gesamtfläche des Zellkerns. Verglichen wurden dabei Herzen, die sich auf demselben Objektträger befanden. Die beiden unter A verglichenen Herzen zeigten dabei einen statistisch signifikanten Unterschied zugunsten des Wildtyps (p=0,0009). Ebenfalls konnte im Vergleich der Herzen unter C ein statistisch signifikant stärkeres Signal von pDNA-PKcs im wildtypischen Tier (p=0,0115) nachgewiesen werden.

3.3 Charakterisierung des iCMp53KO

3.3.1 p53 Western-Blot

Da im weiteren Verlauf der Untersuchungen ein dreifach-KO für AKT1, AKT2 und p53 genutzt werden sollte um mögliche funktionelle Unterschiede im Vergleich zum letalen iCMAKT12KO zu identifizieren, wurden im Folgenden Methoden etabliert, die es erlauben, einen erfolgreichen p53 KO darzustellen. Dazu wurde zunächst versucht, eine Reduktion von p53 in Herzgewebe von iCMAKT12p53KO-Tieren auf Proteinebene nachzuweisen. Aufgrund der aus Publikationen bekannten variablen Sensitivität und Spezifität von kommerziell erhältlichen p53-Antiköpern im Western Blot wurde zunächst eine Positivkontrolle geschaffen [137, 138]. Dazu wurden kultivierte NIH3T3-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Wie beschrieben wird p53 MDM2-abhängig ubiquitiniert und anschließend vom Proteasom degradiert [74]. Der Inhibitor MG132 hemmt als Substrat-Analogon reversibel das 26S Proteasom [139]. Eine Inhibition des Proteasoms sollte zu einer Akkumulierung von p53 in den Zellen und damit verbunden zu einer höheren Konzentration des Proteins und so zu einer verbesserten Darstellung in Western Blot Analysen führen.

Wie in Abbildung 17A und 17B dargestellt, zeigte die Western Blot Analyse dementsprechend ein deutliches Signal für p53 aus Proteinextrakten der behandelten NIH3T3-Zellen. Dabei konnte sowohl für den Antikörper CS2524 als auch für den Antikörper CS32532 (beide Cellsignaling) Sensitivität und Spezifität für p53 nachgewiesen werden. Dabei wurde ebenfalls gezeigt, welche Konzentration von MG132 für eine effektive Inhibierung des Proteasoms notwendig ist. Ab einer Konzentration von 6µM im Zellkulturmedium konnte p53 mit beiden

Antikörpern nachgewiesen werden. Daher war von einer Funktionalität der Antikörper gegen p53 auszugehen. Im nächsten Schritt wurden Proteinextrakte aus Herzen wildtypischer Mäuse im Western Blot mit den beiden zuvor beschriebenen Antikörpern untersucht. Wie in Abbildung 17C zu sehen, konnte p53 in diesen Proben nicht nachgewiesen werden.

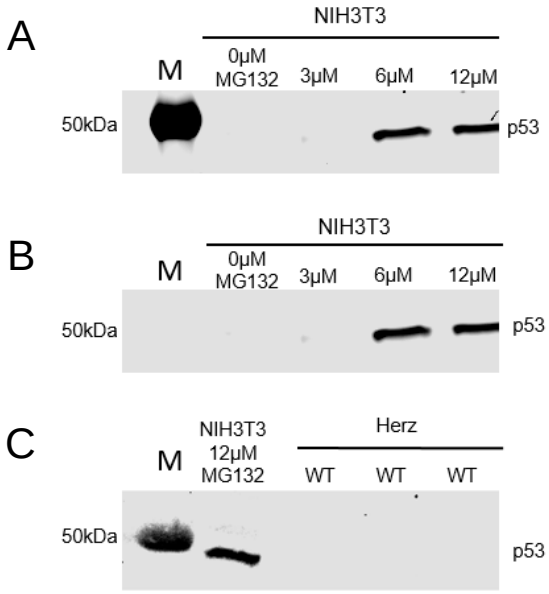


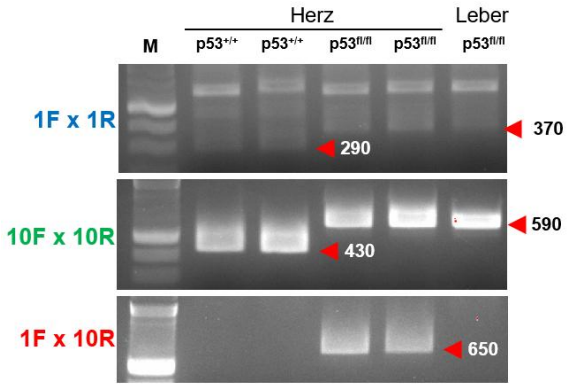
Abb.17: A: p53 Western Blot von Proteinextrakten aus NIH3T3-Zellen (30µg Protein), nach Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (3-12µM). Nachweis mit den p53-Primärantikörper Cell Signaling CS2524 B: p53 Western-Blot ebenfalls von NIH3T3-Zellen nach MG132-Behandlung (3-12µM). Hier Färbung mit dem p53-Antikörper Cell Signaling CS32532 C: p53 Western Blot von Proteinextrakten aus MG132 behandelten NIH3T3-Zellen (30µg Protein) und Proteinproben aus Herzen wildtypischer Mäuse (30µg Protein). Nachweis mit dem Antikörper CS2524 (Cell Signaling).

3.3.2 Untersuchung der p53-Deletion durch PCR an Herz-DNA

Da im Western Blot kein Nachweis von p53 aus Herzlysaten gelang und somit eine Charakterisierung des p53-Knockouts auf Proteinebene nicht möglich war, wurde anschließend ein Knockout-Nachweis sowie eine Quantifizierung auf DNA-Ebene angestrebt. Zur Untersuchung, ob es nach Tamoxifen-Behandlung zu einer Deletion im p53-Locus in Herzgewebe von p53KO-Mäusen kommt, wurde eine PCR an DNA aus Herzgewebe dieser Tiere im Vergleich zu wildtypischen Tieren durchgeführt. Hierzu kamen zwei Primerpaare zum Einsatz: 1-Forward/ 1-Reverse (1F/1R) sowie 10-Forward/ 10-Reverse (10F/10R) (Abbildung 18C). Diese amplifizieren den Bereich der beiden LoxP-Sites innerhalb des p53-Locus. Dies führt dazu, dass das PCR-Produkt aus Herzgewebe, welches über beide LoxP-Sites verfügt, länger ist als das Produkt aus nicht-gefloxten Herzgewebe (siehe Abbildung 18A). Kommt es durch die Tamoxifen-Behandlung zu einer Cre-abhängigen Rekombination im p53-Locus,

kann durch die Primerkombination 1 Forward und 10 Reverse ein PCR-Fragment erzeugt werden, das ausschließlich in Zellen mit Cre-Expression und LoxP-Sites im p53-Locus nachweisbar ist. Eine Quantifizierung dieser Rekombination ist jedoch auf diesem Weg nicht möglich. Wie in Abbildung 18A und 18B dargestellt, kam es nach Tamoxifen-Behandlung zu einer spezifischen Rekombination im p53-Locus im Herzgewebe von αMHC-mCm *p53*$^{fl/fl}$ -Mäusen. Im Vergleich dazu konnte weder im Lebergewebe dieser Mäuse noch im Herzgewebe von *p53*$^{+/+}$-Tieren eine Rekombination nachgewiesen werden. Dass in Herzgewebe von αMHC-mCm *p53*$^{fl/fl}$ –Mäusen neben dem Signal bei ca. 650bp auch Signale bei ca. 370bp und 590bp nachgewiesen werden konnten, ist dadurch zu erklären, dass Herzgewebe nicht ausschließlich aus Kardiomyozyten besteht. Es liegen daneben viele weitere Zelltypen (wie Fibroblasten und Endothelzellen) vor. Diese verfügen zwar über LoxP-Sites im p53-Locus, jedoch nicht über eine Expression von Cre. Daher kann in Herzgewebe von αMHC-mCm *p53*$^{fl/fl}$ -Mäusen ein längeres PCR-Produkt der Primerpaare 1-Forward / 1-Reverse und 10-Forward/ 10-Rerverse als in Herzgewebe von *p53*$^{+/+}$-Tieren nachgewiesen werden. Diese können auch nach Behandlung mit Tamoxifen nachgewiesen werden, da es in nicht-kardiomyozytären Zellen durch das Fehlen von Cre zu keiner Rekombination im p53-Locus kommt.

A



B

Primer	p53+/+ Herz	αMHC-mCm p53fl/fl +Txf Herz	αMHC-mCm p53fl/fl +Txf Leber
1Fx1R	ca. 290bp	ca. 370bp (von nicht kardiomyozytären Zellen)	ca. 370bp
10Fx10R	ca. 430bp	ca. 590bp (von nicht kardiomyozytären Zellen)	ca. 590bp
1Fx10R	-	ca. 650bp	-

WT = $p53^{+/+}$
KO = αMHC-mCm $p53^{fl/fl}$

C

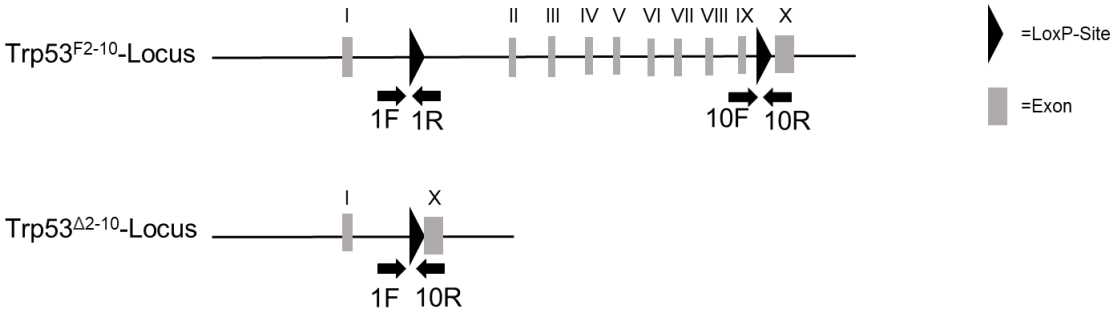


Abb 18: Ergebnisse der PCR zur Untersuchung der Deletion. A und B: DNA-Gelelektophorese. Das PCR-Produkt des Primerpaares 1F/10R, welches für eine Deletion im p53-Locus spricht, kann nur in DNA aus Herzgewebe von Mäusen, die über gefloxtes p53 und mCm unter αMHC-Promotor Kontrolle verfügen, nachgewiesen werden. In DNA aus Lebergewebe dieses Genotyps und in DNA von *p53*$^{+/+}$-Mäusen konnte das PCR-Produkt nicht nachgewiesen werden C: Schematische Darstellung der Lage der Primer p53 1F/ 1R und p53 10F/ 10R im p53-Locus**.** Dabei ist oben die Lage der Primer im p53-Locus vor Rekombination dargestellt. Unten ist der verkürzte p53-Locus nach Rekombination zu sehen. Nach der Rekombination befinden sich die Bindungssequenzen der Prime 1F und 10R in räumlicher Nähe voneinander.

3.3.3 Quantifizierung der Deletion durch PCR auf Herz-DNA

Im nächsten Schritt erfolgte eine Quantifizierung der Deletion durch quantitative real-time-PCR (qPCR) an DNA aus Herzgewebe. Hierzu wurden zwei Primerpaare eingesetzt: AKT2-Forward/ AKT2-Reverse (AKT2 fw/rev) sowie p53-Forward/ p53-Reverse (p53 fw/rev). Die Primer sind jeweils in der Region um die LoxP-Site ihrer Zielgene lokalisiert (siehe Abbildung 19A). Kommt es infolge der Tamoxifen-induzierten, Cre-vermittelten Rekombination zu einer Exzision der Genabschnitte zwischen den LoxP-Sites, verringert sich die Menge der verfügbaren Templates für die jeweiligen Primerpaare. In der qPCR wurde daher die Menge an LoxP-Template mit und ohne Cre-Aktivierung bestimmt. Neben der Analyse des p53-Locus wurde auch der AKT2-Locus erfasst, da im iCMAKT12KO-Modell aufgrund des bekannten,

ausgeprägten kardialen Phänotyps und aufgrund von Western-Blot-Daten von einer hohen Effizienz des AKT2-KO ausgegangen werden kann [63]. Daher kann die Genexzision am AKT2-Locus als Referenz herangezogen werden. Zur Normalisierung wurde eine genomische PCR an einem unabhängigen Referenzlocus durchgeführt. Hierfür wurde das Gen des IGF-Rezeptors verwendet, dessen Genomkopienzahl unabhängig von Cre-Aktivität ist. Die qPCR-Analyse ergab, dass sich das LoxP-Template im AKT2-Locus durch Cre-Aktivierung um 25 % reduzierte, während die Reduktion im p53-Locus lediglich 6,4 % betrug (siehe Abbildung 19B). Die Gendeletion im p53-Locus ist weniger effizient als im AKT-Locus. Es ist jedoch zu beachten, dass die verwendete DNA aus dem gesamtem Herzgewebe isoliert wurde. Das Herzgewebe besteht neben Kardiomyozyten auch aus Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen und glatten Muskelzellen, die keine Cre-Expression aufweisen, da Cre unter Kontrolle des αMHC-Promotors ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert wird. In diesen Zelltypen erfolgt demnach keine Cre-vermittelte Exzision der LoxP-Sites, was die gemessene Exzisionsrate relativiert.

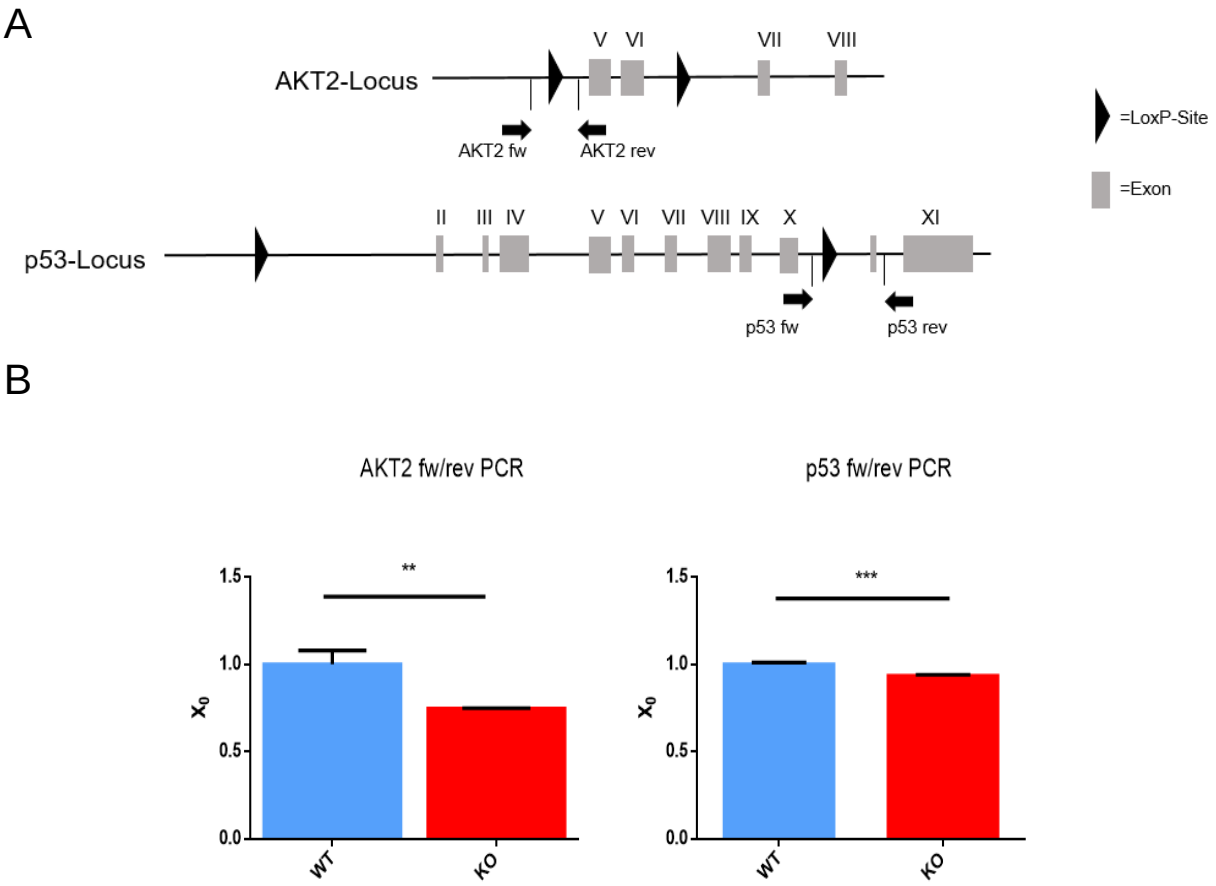


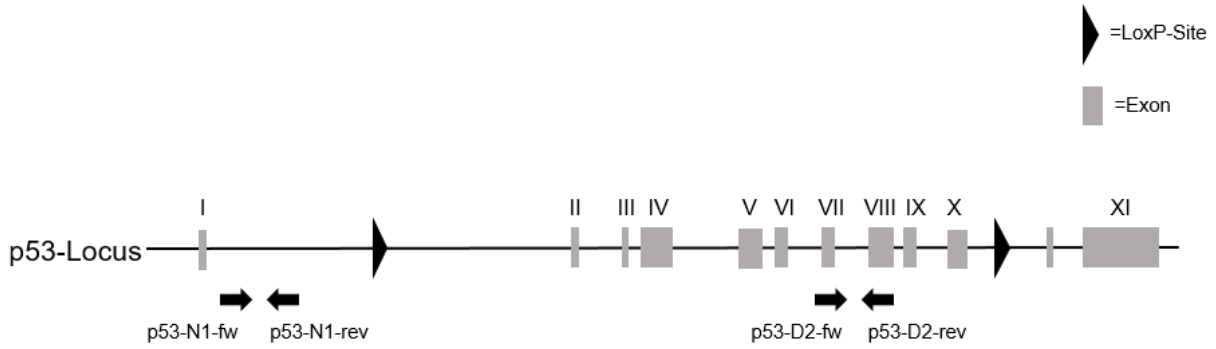
Abb. 19: A: Lage der Primer-Paare im p53- und AKT2-Locus. Die Primerpaare flankieren jeweils eine LoxP-Site im p53- und AKT2-Locus. B: Darstellung des Ergebnisses und statistische Auswertung der PCR Untersuchung der Deletion der LoxP-Sites im AKT2- und p53-Locus. Verglichen wurde DNA aus Herzen von αMHC-mCm *AKT1$^{fl/fl}$ AKT2 $^{fl/fl}$ p53$^{fl/fl}$*-Tieren nach Tamoxifen-Behandlung (KO, n=3) und DNA aus Herzen von Vergleichstieren des selben Genotyps die nicht mit Tamoxifen behandelt wurden (WT, n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und ergab für beide PCRs statistisch signifikante Ergebnisse. Für die PCR der AKT2 LoxP-Site ergab sich ein p=0,0057, in der PCR der p53 Lox-P-Site ein p=0,0005, im Vergleich von WT und Knockout-Herzen.

3.3.4 Quantifizierung der Deletion durch DNA-PCR nach FACS-Sorting Anreicherung

Um den Einfluss nicht-kardiomyozytärer Zellen zu verringern, wurden Zellkerne von Kardiomyozyten durch FACS-Sorting angereichert. Dabei wurde nach dem unter 2.2.8 aufgeführten Protokoll vorgegangen. Zur Markierung der kardiomyozytären Zellkerne wurde ein gegen Pericentriolar material 1 (PCM-1) gerichteter Antikörper (Sigma-Aldrich) verwendet. Bei PCM-1 handelt es sich um ein zentrosomales Protein, welches sich in Kardiomyozyten perinukleär anlagert und daher für die durchflusszytometrische Identifizierung von kardiomyozytären Zellkernen genutzt werden kann [140]. Aus den isolierten Zellkernen wurde DNA gewonnen und für die anschließende PCR verwendet. In der DNA-PCR wurden zwei Primerpaare eingesetzt. Das Primer-Paar p53-D2-forward (p53-D2-fw)/ p53-D2-reverse (p53-

D2-rev) liegt im deletierten Bereich des p53-Locus, sodass die Menge an Template entsprechend der Deletionseffizienz abnehmen sollte. Das zweites Primerpaar p53-N1-forward (p53-N1-fw)/ p53-N1-reverse (p53-N1-rev) liegt in einem Bereich des p53-Locus, welcher von der Cre-abhängigen Exzision nicht betroffen ist und kann daher als „Housekeeper“ dienen. Der Abbildung 20A kann die Lage der Primer im p53-Locus entnommen werden. Wie in Abbildung 20B dargestellt, konnte nachgewiesen werden, dass es sich um einen partiellen p53-KO handelt, da die Deletionseffizienz in den Herzmuskelzellen bei nur etwa 50% liegt.

A



B

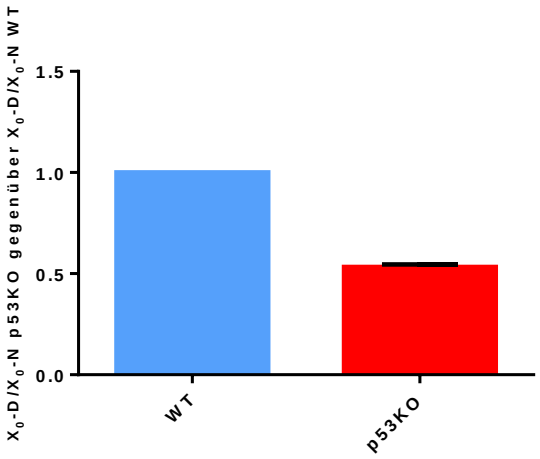
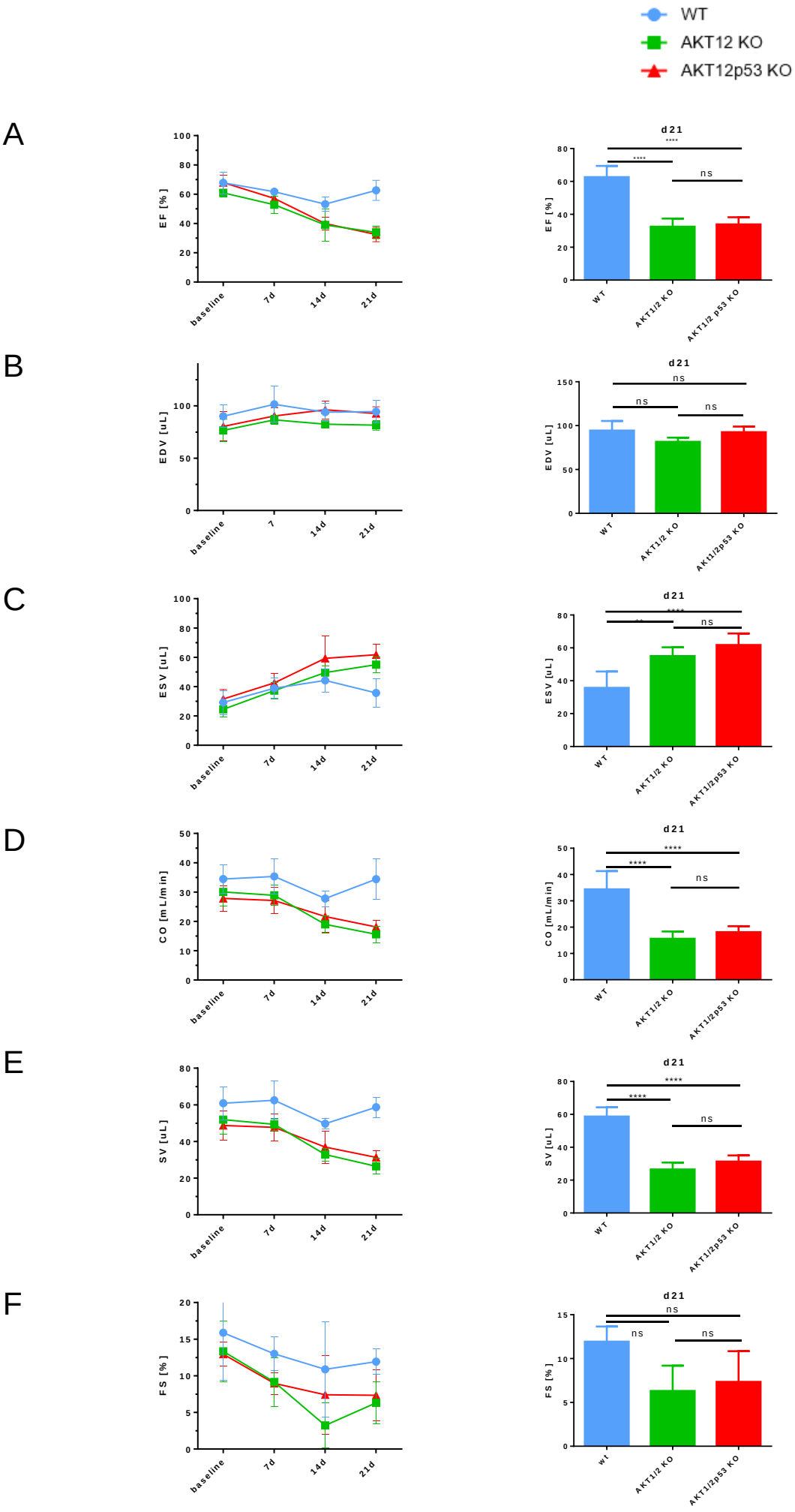


Abb. 20: A: Darstellung der Lage der Primerpaare p53-N1-fw/p53-N1-rev und p53-D2-fw/p53-D2-rev im p53-Locus B: Darstellung des Ergebnisses der PCR Untersuchung der p53-Deletion auf DNA aus isolierten kardiomyozytären Zellkernen. Dabei wurde die DNA aus den kardiomyozytären Zellkernen eines wildtypischen Tieres (Genotyp: αMHC-mCm p53 $^{+/+}$, n=1) und die DNA aus kardiomyozytären Zellkernen von p53KO-Tieren (Genotyp αMHC-mCm *p53* $^{fl/fl}$+Tamoxifen, n=3) gebraucht. Die Auswertung der PCR erfolgte indem der X_0-Wert des Primerpaares D2fw/D2rev durch den X_0-Wert des Primerpaares N1fw/Nrev (X_0-D/X_0-N) geteilt wurde. Das Ergebnis dieser Rechnung wurde für den Wildtyp auf 1 gesetzt. Anschließend wurde ebenfalls der X_0-D/X_0-N für die PCR der p53KO-Herzen bestimmt und am Wert für den Wildtyp gemessen. Die Änderung gegenüber dem X_0-D/X_0-N des Wildtypes wurde graphisch dargestellt Dabei zeigte sich eine Reduktion von 50% im p53KO gegenüber dem Wildtyp.

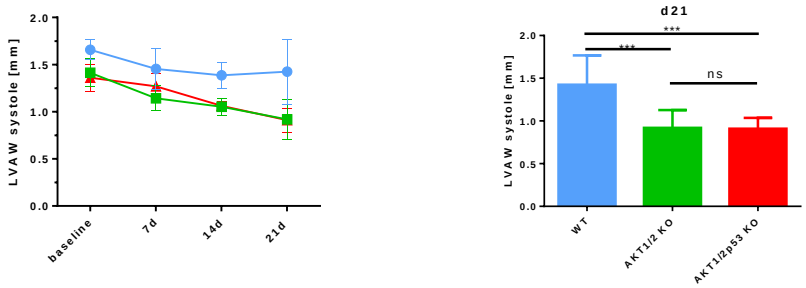
3.4 Echokardiographische Untersuchung von iCMAKT12p53KO-, iCMAKT1/2KO- und WT-Mäusen

Um den Einfluss von p53 auf die Herzfunktion von Mäusen mit myokardialem Knockout von AKT1 und AKT2 zu untersuchen, erfolgte die echokardiographische Analyse von αMHC-mCm *AKT1*$^{fl/fl}$*AKT2*$^{fl/fl}$*p53*$^{fl/fl}$- (iCMAKT12p53KO) Tieren. Obwohl nur ein inkompletter Knockout von p53 in Kardiomyozyten erreicht werden konnte (siehe 3.3.4), sollte betrachtet werden, ob ein simultaner kardiomyozytärer AKT1-, AKT2- und p53-Knockout zu einer veränderten Herzfunktion gegenüber Tieren, die über einen iCMAKT12KO verfügen, führt. Hierzu wurden wildtypische Mäuse (n=5), iCMAKT12KO- (n=6) und iCMAKT12p53KO- (n=6) Mäuse mittels intraperitonealer Injektionen von Tamoxifen behandelt, um eine Induktion des Knockouts zu bewirken. Am ersten Tag der Injektion erfolgte die erste echokardiographische Messung der narkotisierten Tiere. Die Echokardiographie wurde anschließend nach 7, 14 und 21 Tagen wiederholt (zur Durchführung der Echokardiographie sie 2.2.3 im Material- und Methodenteil).

In der Darstellung der Herzfunktion über den zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass die Tiere aller drei Genotypen am ersten Tag der Tamoxifen-Injektionen annähernd identische Herzfunktionen in Parametern wie der Ejektionsfraktion, des Herzzeitvolumen und des Schlagvolums aufwiesen. Wie in Abbildung 21 dargestellt, verschlechterte sich die myokardiale Funktion der iCMAKT12KO- und der iCMAKT12p53KO-Tiere anschließend kontinuierlich, wohingegen die Herzfunktion der wildtypischen Tiere über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen konstant blieb. Auffällig zeigte sich, dass sich der Verlauf der Kurven, die die Entwicklung der Herzfunktion über die Zeit der iCMAKT12KO- und der iCMAKT12p53KO-Tiere darstellt, sehr stark glich. So konnte in funktionellen Parametern wie der Ejektionsfraktion (EF), dem endsystolischen Volumen (ESV), dem Herzzeitvolumen (CO (*Cardiac Output*)), dem Schlagvolumen (SV (*Stroke Volume*)) und der linksventrikulären Wanddicke der Diastole und der Systole (LVAW (*Left Ventricular Anterior Wall Thickness*)) am 21. Tag nach Knockoutinduktion ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen wildtypischen und iCMAKT12KO-Tieren, sowie zwischen wildtypischen und iCMAKT12p53KO-Tieren, festgestellt werden. Es ergaben sich hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen iCMAKT12KO und iCMAKT12p53KO. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, wiesen weitere funktionelle Parameter wie das enddiastolische Volumen (EDV) und die fraktionelle Verkürzung (FS (*Fraction Shortening*) keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Genotypen auf. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der additive partielle Knockout von p53 keinen relevanten Einfluss auf die myokardiale Funktion von iCMAKT12KO-Mäusen hat.


WT
AKT12 KO
AKT12p53 KO
A
EF [%]
baseline
7d
14d
21d
d21
ns
WT
AKT1/2 KO
AKT1/2 p53 KO
B
EDV [uL]
AKT11/2p53 KO
C
ESV [uL]
AKT1/2p53 KO
D
CO [mL/min]
E
SV [uL]
F
FS [%]
wt

G



H

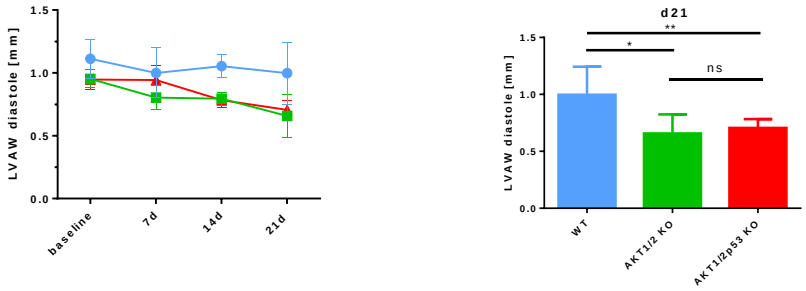


Abb. 21.: Darstellung der funktionellen Daten von iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO- und wildtypischen Mäusen über den zeitlichen Verlauf von drei Wochen, sowie Vergleich der funktionellen Daten am Tag 21. A) Ejektionsfraktion B) enddiastolisches Volumen C) endsystolisches Volumen D) Herzzeitvolumen E) Schlagvolumen F) fraktionelle Verkürzung G) anteriore Wanddicke des linken Ventrikels in der Systole H) anteriore Wanddicke des linken Ventrikels in der Diastole. Die statistische Analyse erfolgte mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse (two way Anova) mit anschließendem Schnelltest nach Tukey (Tukeys multiple comparisons test). Hierbei wurde das Signifikanz-Niveau wie folgt angegeben: ns=nicht signifikant, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

3.5 Kardiale Transkriptomanalyse von iCMp53KO-, iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO- und wildtypischen-Mäusen

Um die vier in der Überschrift genannten Genotypen auf Transkriptions-Ebene vergleichen zu können, wurde eine auf RNA-Sequenzierung beruhende Transkript-Expressions-Analyse durchgeführt. Bei den wildtypischen Tieren handelte es sich um *AKT1*$^{fl/fl}$ *AKT2*$^{fl/fl}$ *p53*$^{+/+}$-Tiere, die nicht über die Expression von Cre verfügten. Es wurde aus Herzen von Mäusen der genannten Genotypen RNA isoliert und diese mittels *Sequencing by Synthesis* sequenziert. Die bei der RNA-Sequenzierung erhaltenen reads wurden quantifiziert und die erhaltenen TPM Werte mit Hilfe der Software Qlucore Omics Explorer analysiert. Mittels hierarchischer Cluster-Analyse wurden die Expressmessionsmuster der insgeamt 16 Proben (4 Replikate pro Genotyp) nach ihrer Ähnlickeit sortiert (Abbildung 22).

Dabei zeigte sich, dass WT und iCMp53KO klar in zwei separate Untergruppen segregierten. Von diesen beiden Gruppen setzten sich iCMAKT12KO und iCMAKT12p53 KO deutlich ab. Dabei fiel auf, dass es ier zu keiner klaren Trennung der beiden Genotypen anhand ihrer Expressionsmuster kam, was auf nur geringe Unterschiede in den Expressionsprofilen hindeutete.

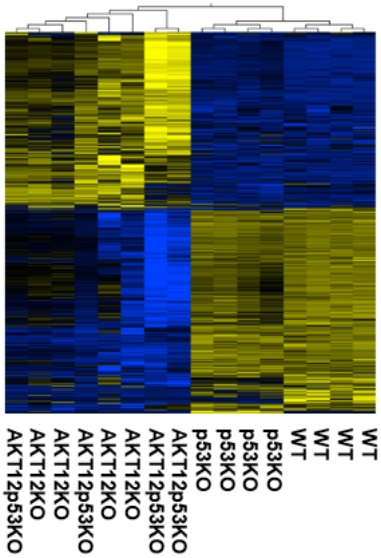


Abb. 22: Hierarchische Clusteranalyse der Expressions-Profile im Vergleich zwischen wildtypischen, iCMp53KO, iCMAKT12KO und iCMAKT12p53KO (n=4) am 21. Tag nach Beginn der Tamoxifen-Behandlung. Dabei steht eine gelbe Färbung für herauf regulierte und eine blaue Färbung für herunter regulierte Gene.

Signifikant unterschiedliche Gene wurden anschließend durch Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen) ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass der Knockout von AKT1 und AKT2 in iCMAKT12KO zu einer massiven Veränderung im kardialen Transkriptom führte. Es zeigten sich 3048 Gene im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert. Diese Veränderungen im kardialen Transkriptom konnten in diesem Maße auch schon in vorausgegangenen Microarray-Analysen des Transkriptoms von iCMAKT12KO im Vergleich zu wildtypischen Mäusen beobachtet werden [1]. Eine Analyse mittels der Funktion „Canonical Pathways“ ergab wie bereits bekannt, dass vor allem mitochondriale Funktionen herunterreguliert wurden (TCA cycle, oxidative Phosphorylierung) und dass ribosomale Funktionen und vor allem Wege der Translations Initiation und Elongation stark heraufreguliert wurden (siehe Abbildung 23).

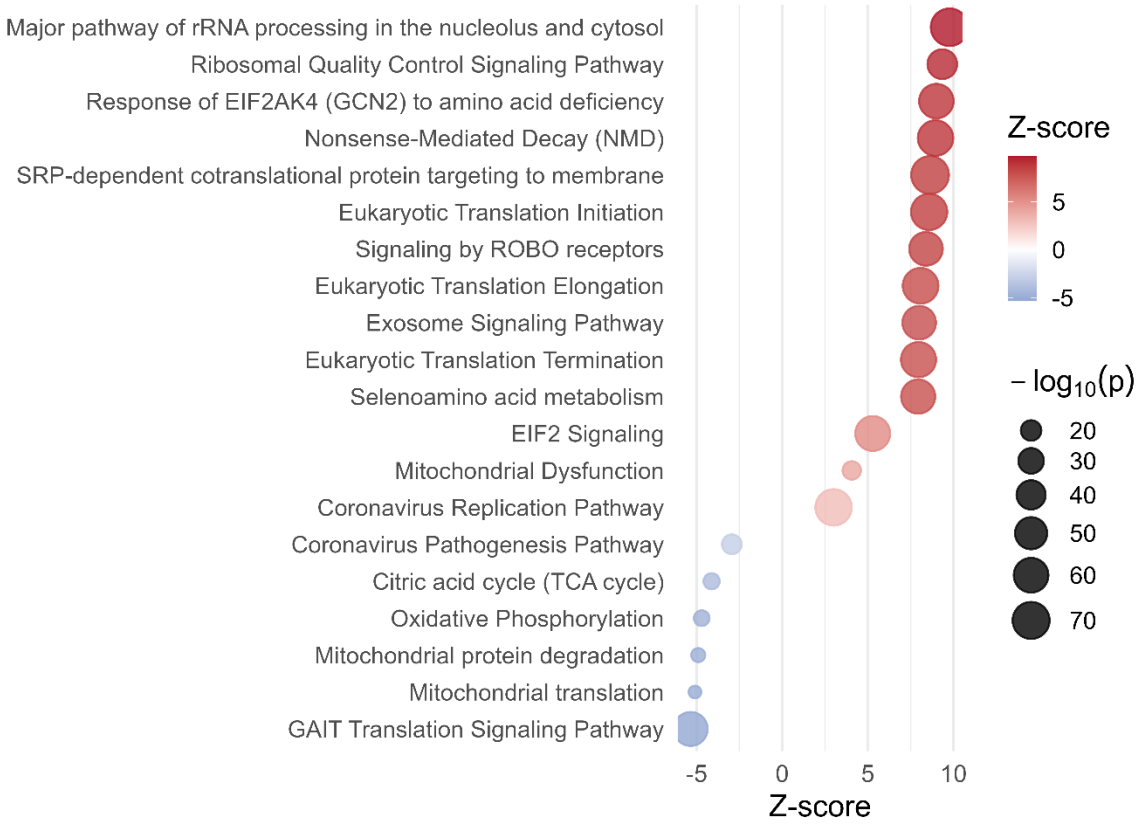


Abb. 23: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Analyse von iCMAKT12KO-Herzen mittels der Funktion „Canonical Pathways“. Ein positiver Z-Score (in rot dargestellt) spricht dabei für heraufregulierte Pathways. Ein negativer Z-Score (in blau dargestellt) hingegen für einen Pathway der herunterreguliert wurde. Dabei zeigten sich mitochondriale Funktionen deutlich herunterreguliert.

Im Hinblick auf die partielle Inaktivierung von p53 wurden die Expressionsprofile von iCMp53KO- und WT-Herzen separat analysiert, um den dominanten Effekt durch den AKT Doppelknockout zu eliminieren. Eine erneute Clusteranalyse zeigte dann klare Unterschiede in den kardialen Genexpressionsprofilen der Herzen beider Genotypen (siehe Abbildung 24).

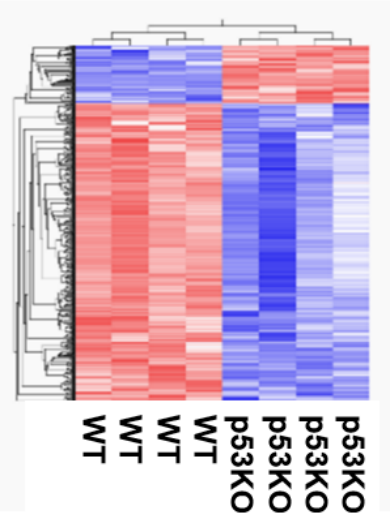


Abb. 24: Hierarchische Clusteranalyse der Expressions-Profile im Vergleich zwischen wildtypischen und iCMp53KO Tieren (n=4) am 21. Tag nach Beginn der Tamoxifen-Behandlung. Dabei ist auf der rechten Seite das kardiale Transkriptom-Profil von iCMp53KO Tieren und links das von wildtypischen Tieren zu sehen. Die blaue Färbung steht dabei für herunter regulierte, die rote für herauf regulierte Gene.

Beim Vergleich der Transkriptionsdaten von Herzen des iCMp53KO und wildtypischen Tieren zeigte sich ein Unterschied in der Expression von 743 Transkripten. In der IPA-Analyse führte die Funktion „Canonical Pathways“ zur Identifizierung von 13 möglichen Signalwegen, die durch die Inaktivierung von p53 verändert waren (Abbildung 24). Interessanterweise wurde trotz der nur partiellen Inaktivierung des p53-Gens „Tp53 regulates metabolic genes“ (9,4% des Gensets, $-\log_{10}p$ =3.33, Z-score -2.828) als signifikant herunterregulierter Signalweg identifiziert. Ferner gehörten die Signalwege „Cardiac Conduction“ (9,2% des Gensets), und „Transcriptional regulation of MecP2“ (11,1% des Gensets) zu den am stärksten herunterregulierten Signalwegen (siehe Abbildung 25).

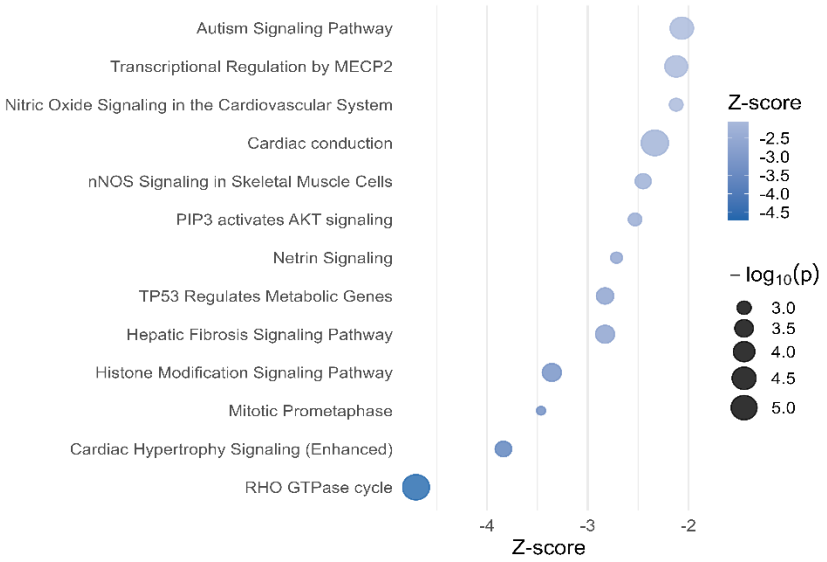


Abb. 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse von iCMp53-Herzen mittels der Funktion „Canonical Pathways“ im Verglich zum Transkriptom wildtypischer Herzen. Auch hier zeigt ein negativer Z-Score (in blau) einen herunterregulierten Pathway. Dabei zeigten sich trotz partiellen p53-KO der Signalweg „Tp53 regulates metabolic genes“ herunterreguliert.

Da sich gezeigt hatte, dass der partielle p53KO das kardiale Genexpressionprogramm modulierte, wurde überprüft, ob der zusätzliche KO von p53 in iCMAKT12KO-Herzen die Genexpression modulierte. Der Vergleich der kardialen Transkriptexpression von iCMAKT12KO- und iCMAKT12p53KO-Tieren, ergab keine relevante Expressionsveränderung zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Abbildung 22). Es fand sich lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der MicroRNA miR-450b ($p=1,4*10^{-10}$), sodass die p53 Inaktivierung die extremen Expressionveränderungen im iCMAKT12KO Akt1/Akt2 KO nicht wesentlich beeinflusst haben.

4. Diskussion

Induzierbare, kardiomyozyten-spezifische AKT1 und AKT2 Doppel-knockout Mäuse, iCMAKT12KO, entwickeln eine schnell voranschreitende Atrophie der Kardiomyozyten, die zur Herzinsuffizienz führt [1]. Interessanterweise ergaben Analysen des kardialen Transkriptoms, dass vermutlich eine Aktivierung von p53 zu den weitreichenden Veränderungen im kardialen Transkriptom dieser Mäuse beiträgt. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass Inaktivierung von p53 in kardiomyozyten zur Hypertrophie führt [111], also den entgegengesetzten Phänotyp zur Atrophie in iCMAKT12KO Herzen auslöst. Ziel dieser Arbeit war es daher zu prüfen, ob sich eine p53 Aktivierung in iCMAKT12KO Herzen tatsächlich nachweisen lässt und inwieweit eine zusätzliche Inaktivierung von p53 in iCMAKT12KO Herzen zur Funktionsverbesserung führt.

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es konnte im phospho-Substratmotiv-Western-Blot eine stärkere Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO-Herzen im Vergleich zu wildtypischen Herzen nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch keine stärkere Phosphorylierung des Histons H2A.X in kardiomyozytären Zellkernen in Herzen mit iCMAKT12KO gegenüber wildtypischen Tieren

- Es zeigte sich keine stärkere Aktivität der DNA-PKcs in Herzen des iCMAKT12KO-Genotyps gegenüber wildtypischen Tieren

- Es konnte in αMHC-mCm $p53^{fl/fl}$ –Mäusen, nach Induktion des Knockouts mittels Tamoxifen, nur ein partieller Knockout von p53 in Kardiomyozyten festgestellt werden

- Ein simultaner Knockout von p53, AKT1 und AKT2 in Kardiomyozyten führte im Beobachtungszeitraum von drei Wochen nicht zu einer Verbesserung der Herzfunktion vom iCMAKT12p53KO-Tieren gegenüber iCMAKT12KO-Tieren

- In der Analyse des Transkriptoms zeigen sich klare Unterschiede zwischen Tieren mit iCMp53KO und wildtypischen Tieren. Tiere des iCMAKT12KO-Genotyps und Tiere mit iCMAKT12p53KO hingegen zeigen ein vergleichbares Transkriptom

4.1 Untersuchung der Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO Herzen

Die beiden phosphatidylinositol-3-(PI-3)-kinase-like Kinasen (PIKK) ATM und ATR sind in der Lage, p53 zu stabilisieren und zu aktivieren. Werden sie durch die Interaktion mit DNA oder mit DNA-Reparatur-Proteinen im Rahmen von DNA-Schäden, wie DNA-Doppelstrangbrüchen induziert, sind sie durch Phosphorylierung von p53 an verschiedenen Stellen fähig, p53 einem Abbau durch das Proteasom unzugänglich zu machen und die Aktivität von p53 zu steigern [75] [76] [77]. Damit stellen ATM und ATR einen der bekanntesten Wege zur Aktivierung von p53 dar. Unter der Vermutung, die anhand von Transkriptions-Analysen erhoben wurde, dass p53 in iCMAKT12KO-Herzen aktiv sein könnte, stellt sich die Frage, auf welchem Weg die Aktivierung von p53 in diesem Mausmodell ablaufen könnte. Die durchgeführte Substratmotiv-Western-Blot-Analyse für ATM und ATR zeigte eine gesteigerte Aktivität der beiden Kinasen in iCMAKT12KO- im Vergleich zu wildtypischen Herzen (siehe 3.1, Abbildung 8).

Phospho-Substratmotiv-Antikörper sind jedoch nicht spezifisch, da die Kinase-Substrat-Selektivität von der Aminosäuresequenz um die Phosphorylierungsstelle abhängig ist [141]. Der verwendete Antikörper (Cellsignaling 6966) erkennt dabei, laut Herstellerangabe, die Aminosäuresequenz pS/pT QG (phospho-Serin (pS), phospho-Threonin (pT), Glutamin (Q), Glycin (G). Diese Aminosäuresequenz wird jedoch auch von weiteren PIKK-Kinasen erkannt und phosphoryliert [142] [143].

Daher wurde durch die Untersuchung der Phosphorylierung des Histons H2A.X, wobei es sich um ein Phosphorylierungsziel von ATM und ATR handelt, geprüft, ob eine gesteigerte Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO Herzen gegenüber wildtypischen Herzen vorliegt. [132] [133].

Die Analyse der Phosphorylierung von H2A.X erfolgte dabei zunächst im Western Blot. Dabei zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz im Verhältnis von phosphorylierten H2A.X zu nicht-phosphorylierten H2A.X aus Proteinisolaten von iCMAKT12KO-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen am Tag 21 nach Tamoxifen-Behandlung (vergleiche 3.1.2). Dabei wurden Proteinproben eingesetzt, die aus zuvor aufkonzentrierten Kardiomyozyten-Zellkernen extrahiert worden sind. Hierin liegt ein Unterschied der beiden Analysen. Wurden in den Western-Blots zur Darstellung des Substratmotivs von ATM und ATR Lysate aus dem gesamten Herzen verwendet, die folglich neben Proteinen aus dem Zellkern auch Proteine

des Cytoplasmas, der Zellorganellen und des kontraktilen Apparats aller im Herzen enthaltenden Zelltypen enthalten, erfolgte die Untersuchung in dieser Arbeit aus fraktionierten Protein-Isolaten.

Betrachtet man die Substratmotiv-Westernblots fällt zudem auf, dass es einen besonders großen Unterschied in der Signalintensität zwischen Proben aus wildtypischen Tieren und Proben aus iCMAKT12KO-Tieren bei den größeren Proteinen im Bereich zwischen 55kDa und 100kDa gab. In der Analyse der kleinen Proteine ergaben sich hingegen keine eindeutigen Differenzen zwischen den Proben wildtypischer und Knockout-Herzen am Tag 21 nach Tamoxifen-Behandlung (siehe hierfür 3.1, Abbildung 8).

Das Histon H2A.X liegt mit einem Molekulargewicht von 15 kDa (UniProt) vermutlich außerhalb des Bereichs beider ausgewerteter Signale. Doch selbst wenn es innerhalb eines der ausgewerteten Signale gelegen hätte, wäre sein Einfluss auf das Signal fraglich gewesen. Wie unter 3.1.1 dargestellt ist im Western Blot aus nicht fraktionierten Proteinproben des gesamten Herzens nur mit einer sehr geringen Signalintensität von Histon-Proteinen zu rechnen. Dies ist dadurch zu erklären, dass Histon-Proteine nur einen Anteil von 1-2% aller Proteine einer Zelle ausmachen. Darüber hinaus gibt es neben dem Histon H2A.X viele weitere Vertreter der Histon-Proteine [144]. So konnte gezeigt werden, dass das Histon H2A.X nur etwa 10% aller H2.A-Histon Proteine ausmacht [145]. Damit ist anzunehmen, dass es nur einen sehr geringen Anteil in einem Protein-Extrakt des gesamten Herzens ausmachen kann. Da zudem nur phosphoryliertes H2A.X betrachtet werden soll, ist davon auszugehen, dass dieses modifizierte Histon-Protein einen noch geringeren Anteil am Gesamtprotein einer Zelle darstellen könnte. Daher bleibt fraglich, ob die fehlende Repräsentation von pH2A.X im ATM-ATR-Substratmotiv Western Blot überhaupt einen Einfluss auf die geringe Differenz in der Signalintensität des unteren Signals des Substratmotivs hat.

Des Weiteren ist anzumerken, dass Herzgewebe neben Kardiomyozyten weitere Zelltypen enthält. So konnte gezeigt werden, dass im adulten Myokard nur 20-50% aller Zellen Kardiomyozyten sind, während es sich bei der Mehrheit um nicht-kardiomyozytäre Zellen handelt [146, 147]. Werden nun unfraktionierte Proteinextrakte aus Herzgewebe analysiert, werden neben Proteinen aus Kardiomyoyzen auch Proteine anderer Zelltypen betrachtet. Da es sich bei dem Knockout von AKT1 und AKT2 um einen kardiomyoyzten-spezifischen Knockout handelt, bei dem die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des für Kardiomyozyten spezifischen αMHC-Promoters steht, sind die anderen Zelltypen, die im Myokard vorzufinden sind, nicht von dem Knockout betroffen. Im Western Blot, der das Substratmotiv von ATM und ATR betrachtete, wurden dementsprechend auch Proteine anderer Zelltypen analysiert.

Neben den bereits erwähnten Arbeiten von Bergmann et al. wurde auch in weiteren Veröffentlichungen [148-151] eine Konzentration von Zellkernen über Dichtegradienten-Zentrifugation beschrieben. Bhattacharyya et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass eine Dichtegradientenzentrifugation von aufgeschlossenem kardialem Gewebe über einen 2,2M Saccharose-Puffer zu einer beinahe ausschließlichen Isolation von Kardiomyozyten-Zellkernen führt. Dies zeigte sich sowohl über den Nachweis von Kardiomyozyten-spezifischen Genen in qPCR-Analysen als auch über Immunfärbung der Zellkerne [151]. Allerdings schloss sich in allen Protokollen eine weitere Aufreinigung kardiomyozytärer Zellkerne durch FACS-Sorting oder Immunpräzipitation an, um eine definitive Isolation von Kardiomyozyten-Zellkernen zu erreichen. Eine solche weitere Aufreinigung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz erfolgter Dichtegradienten-Zentrifugation geringe Mengen nicht-kardiomyozytärer Zellkerne analysiert wurden.

Um den Einfluss anderer Zelltypen auf die Untersuchung der H2A.X Phosphorylierung weiter auszuschließen wurde daher das phosphorylierte Histon H2A.X in immunhistochemischen Bildern, welche konfokal-mikroskopisch gewonnen wurden, untersucht. Dabei wurde zunächst die Gesamtfläche eines Zellkernes bestimmt. Anschließend wurde die Fläche des Zellkernes definiert, die ein Signal für die Färbung mittels eines pH2A.X-Antikörpers aufwies. Im Anschluss wurde das Verhältnis beider Flächen berechnet. Abschließend erfolgte dann der Vergleich dieses Verhältnisses zwischen Zellkernen aus wildtypischen Herzen und aus Herzen von iCMAKT12KO-Tieren (siehe 3.1.3, Abbildung 15).

Da gezeigt werden konnte, dass eine Färbung von Glykoproteinen der Zellmembran zu einer sensitiven und spezifischen Identifizierung von Kardiomyozyten-Zellkernen in immunhistochemischen Bildern von Herzgewebe führt [135], kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Analyse ausschließlich Kardiomyozyten-Zellkerne untersucht worden sind.

Auch in dieser zweiten Methode konnte, wie unter 3.1.4 dargestellt, kein statistisch signifikanter Unterschied in der H2A.X-Phosphorylierung zwischen Kardiomyozyten-Zellkernen von iCMAKT12KO-Tieren zu wildtypischen Tieren am 21. Tag nach Tamoxifen-Behandlung festgestellt werden. Die vermutete höhere Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO-Herzen im Vergleich zu wildtypischen Herzen bezog sich allerdings auf die phospho-Substratmotiv-Analyse der beiden Kinasen aus Proteinextrakten des gesamten Herzens. In dieser Analyse wurden dementsprechend auch Proteine anderer Zelltypen untersucht. Dass anhand der Phosphorylierung des ATM- und ATR-Substrats H2A.X keine stärkere Aktivität von ATM und ATR in Kardiomyozyten von iCMAKT12KO-Herzen gegenüber wildtypischen Herzen nachgewiesen werden konnte, lässt offen, ob die beiden Kinasen in anderen Zelltypen eine veränderte Aktivität aufweisen könnten.

Ebenfalls muss man anmerken, dass H2A.X nicht nur durch ATM und ATR phosphoryliert werden kann. Es unterliegt vielen posttranslationalen Modifikationen, die in einem komplexen Zusammenspiel vorliegen. So kann auch die phosphatidylinositol-3 -(PI-3)-kinase-like Kinase (PIKK) DNA-PKcs H2A.X an der Aminosäure Serin 139 phosphorylieren [152].

Darüberhinaus wird das Histon posttranslational nicht nur phosphoryliert, sondern auch durch Phosphatasen dephosphoryliert. Es konnten einige an der Histon-H2A.X-Dephosphorylierung beteiligten Phosphatasen identifiziert werden. Bei einer der identifizierten Phosphatasen handelt es sich um Wild-type p53 inducible protein 1 (Wip1). Diese wird p53-abhängig exprimiert [153]. Das zeigt, dass die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von H2A.X in einem komplexen Zusammenspiel erfolgt und, dass p53 auch an der Dephosporylierung beteiligt sein kann.

Zudem werden die Kinasen ATM und ATR vor allem durch DNA Schäden aktiviert [75] weswegen die Phosphorylierung von H2A.X einen typischen, sensitiven und frühen Marker für DNA-Schäden darstellt [154]. Auch konnte in Studien, die Herzinsuffizienz anhand von Mausmodellen untersuchen, eine gesteigerte H2A.X-Phosphorylierung und ATM-Aktivität festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass eine durch Angiotensin-II-induzierte kardiale Hypertrophie in Mäusen zu einer signifikant höheren Phosphorylierung von H2A.X und ATM im Vergleich mit unbehandelten Mäusen führte [155]. In einer weiteren Studie konnte ebenfalls festgestellt werden, dass neben einer Behandlung mit Angiotensin-II auch eine kardiale Hypertrophie, welche durch transversale Aortenkonstriktion erreicht wurde, zu einer höheren H2A.X- und ATM-Phosphorylierung im Mausmodell führt [156]. Auch dies spricht für eine ATM-Aktivierung und darauffolgender H2A.X-Phosphorylierung durch DNA-Schäden in diesem Mausmodell. Allerdings unterschieden sich beide Modelle deutlich vom iCMAKT12KO-Modell darin, dass eine kardiale Hypertrophie durch mechanische oder Rezeptor-Liganden Behandlung erreicht wurde. Im iCMAKT12KO-Modell hingegen kommt es zu einer Kardiomyozyten-Atrophie durch eine Reduktion der AKT1- und AKT2-Aktivität in den kardiomyozytären Zellen. Ob im iCMAKT12KO analog zu den zuvor beschriebenen Modellen von einer ATM- und ATR- Aktivierung durch DNA-Schäden ausgegangen werden kann, bleibt daher fraglich.

Ebenfalls ist die Induktion von p53-Aktivität nicht ausschließlich über DNA-Schäden möglich. Auch metabolische Veränderungen und oxidativer Stress können zu einer Phosphorylierung und folglich zu einer Aktivität von p53 führen [157] . Im iCMAKT12KO-Modell konnte nachgewiesen werden, dass unter Abwesenheit von AKT1 und AKT2 der Stoffwechsel erheblichen Veränderungen unterliegt. Sowohl der Fettsäure- als auch der Glukosestoffwechsel zeigten hier starke Alterationen[1], sodass hier ein weiterer Weg der Aktivierung von p53 im iCMAKT12KO-Modell liegen könnte.

4.2 Untersuchung der DNA-PKcs Aktivität in iCMAKT12KO Herzen

Neben ATM und ATR ist auch die Kinase DNA-PKcs in der Lage p53 durch Phosphorylierung posttranslational zu verändern. Diese Phosphorylierungen führen dabei ebenfalls zu einer Stabilisierung von p53 und verringern den proteasomalen Abbau des p53-Proteins. Dabei zeigte sich, dass DNA-PKcs p53 an Serin 15 phosphorylieren kann und damit eine gemeinsame Phosphorylierungsstelle mit ATM aufweist [158]. Ebenfalls konnte eine DNA-PKcs-abhängige Phosphorylierung von p53 an Serin 9 und Threonin 18 nachgewiesen werden [159]. Damit handelt es sich bei DNA-PKcs-abhängigen Phosphorylierungen um einen weiteren Weg auf dem p53 aktiviert werden kann, der auch Überschneidungen mit dem ATM-ATR-abhängigen Aktivierungsweg besitzt.

Zur Überprüfung, ob p53 im iCMAKT12KO-Modell über eine Phosphorylierung durch DNA-PKcs aktiviert werden könnte, erfolgte eine Analyse der DNA-PKcs-Aktivität im Vergleich zwischen iCMAKT12KO- und wildtypischen Herzen. Die DNA-PKcs führt im Anschluss an die Ku70/Ku80-abhängige Bindung an DNA Autophosphorylierungen an Aminosäure-Clustern um Serin 2056 und Threonin 2609 durch [160] [136]. Daher wurde für die Analyse ein Antikörper verwendet, der an pDNA-PKcs Serin 2056 bindet, um die aktivierte Isoform darzustellen. Dabei muss angemerkt werden, dass zwar die aktive Form der DNA-PKcs vorliegen muss, um die Autophosphorylierung an Serin 2056 durchzuführen, die dortige Phosphorylierung aber nicht mit einer gesteigerten Aktivität der Kinasedomäne von DNA-PKcs assoziiert ist [161]. Ob eine Phosphorylierung an Serin 2056 mit einer gesteigerten p53-Phosphorylierung durch DNA-PKcs korreliert, ist daher unklar.

In der immunhistochemischen Analyse der DNA-PKcs-Phosphorylierung im Vergleich zwischen myokardialen Zellkernen wildtypischer Tiere und iCMAKT12KO-Tiere konnte kein signifikanter Unterschied oder eine signifikant höhere DNA-PKcs-Phosphorylierung in wildtypischen Tieren festgestellt werden.

Dabei kann angemerkt werden, dass die Aktivierung von DNA-PKcs hauptsächlich durch DNA-Schäden und dabei im Besonderen durch DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst wird. Anschließend spielt sie eine große Rolle in der DNA-Reparatur durch non-homologous-end-joining (NHEJ) [162]. Da es sich bei adulten Kardiomyozyten um postmitotische Zellen handelt, die nur eine geringe Teilung aufweisen [88], spielt die DNA-PKcs in diesen Zellen weniger eine Rolle in Zellzyklusregulierung als bei der Antwort auf Stresssignale.

So konnte gezeigt werden, dass durch DNA-PKcs aktiviertes p53 Apoptose induzieren kann [163]. Generell ist die Aktivität von DNA-PKcs im Zusammenhang mit Apoptose sehr gut beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Fibroblasten und Thymozyten durch ionisierende Strahlung ausgelöste starke DNA-Schäden zu einer p53-abhängigen Apoptose

führen, die durch DNA-PKcs ausgelöst wird [164, 165]. Zudem wurde auch in Herzmuskelzellen ein Zusammenhang von DNA-PKcs-Aktivität und Apoptose nachgewiesen. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Herzmuskelschädigung durch Ischämie und Reperfusion zu einer posttranslationalen Phosphorylierung und somit Aktivierung von DNA-PKcs führt. Eine Ablation der DNA-PKcs hingegen führte in diesem Modell zu einer Reduktion von mitochondrialer Apoptose und so zu einer Abnahme der Infarktgröße und der kardialen Dysfunktion durch einen verringerten Tod von Kardiomyozyten [166]. Auch in einem Modell der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie wurde gezeigt, dass DNA-PKcs-Aktivität mit myokardialer Apoptose und gestörter mitochondrialer Funktion assoziiert ist [167]

Im iCMAKT12KO-Modell konnten in der Analyse des Transkriptoms zwar Hinweise auf eine gestörte mitochondrale Funktion gefunden werden, jedoch konnten im Transkriptom keine Hinweise auf gesteigerte Apoptose von Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. In einer TUNEL-Färbung mit anschließender konfokaler Mikroskopie ergaben sich hier keine eindeutigen Hinweise auf eine gesteigerte Apoptose von Kardiomyozyten im iCMAKT12KO-Herzen [1]. Dadurch könnte zu erklären sein, warum es zu keinem stärkeren immunhistochemischen Nachweis von aktivierter DNA-PKcs in Herzen von iCMAKT12KO-Tieren gegenüber wildtypischen Tieren kam. Weshalb jedoch eine statistisch signifikant stärkere Aktivität in zwei von den untersuchten wildtypischen Tieren im Vergleich zu parallel untersuchten iCMAKT12KO-Tieren kam, bleibt fraglich.

4.3 Einfluss von p53 auf die myokardiale Funktion von iCMAKT12KO-Mäusen

Die Proteinkinasen AKT1 und AKT2 spielen eine zentrale Rolle in der intrazellulären Verarbeitung von extrazellulären Signalen. Dabei sind sie am Signalweg wichtiger Wachstumsfaktoren wie IGF, EGF, PDGF und Insulin beteiligt [11]. Durch aktivierende und inhibitorische Phosphorylierungen ihrer Downstream-Effektoren wie mTORC, FOXO und GSK3 wirken sie sich positiv auf den Stoffwechsel, das Wachstum und das Überleben der Zelle aus [6]. Dementsprechend kommt es nach einer induzierten kardiomyozytären Deletion von AKT1 und AKT2 zu einer raschen Atrophie und vermehrter Autophagie der Kardiomyozyten, die mit einer schnell progredienten Herzinsuffizienz einhergeht. Die Herzinsuffizienz zeigte sich an einer stark verringerten Ejektionsfraktion und einer Abnahme der ventrikulären Wanddicke [63]. Sie ist bereits nach durchschnittlich 24,4 Tagen nach Induktion des Knockouts letal für die betroffenen Tiere. Neben dem fulminanten Phänotyp lassen sich auch starke genotypische Veränderungen in iCMAKT12KO-Herzen beobachten. So konnten in der kardialen Transkriptomanalyse von iCMAKT12KO-Tieren am 21. Tag nach

Induktion 5552 Gene mit veränderter Transkription gegenüber wildtypischen Tieren nachgewiesen werden [1].

Dieser myokardiale Phänotyp ließ sich auch in dieser Arbeit beobachten. Die iCMAKT12KO-Tiere entwickelten nach Induktion des Knockouts eine schwere Einschränkung der myokardialen Funktion. Diese zeigte sich an funktionellen Parametern wie der Ejektionsfraktion und am Herzzeitvolumen. Ebenfalls kam es zu einer Abnahme der Wanddicke des Myokards, welche darauf hinweisen könnte, dass es zu vermehrter Atrophie von myokardialen Zellen kommt (siehe 3.4, Abbildungen 21).

Bei p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher als Tumorsuppressor bekannt wurde. Durch seine Eigenschaft, im aktivierten Zustand Autophagie, Atrophie, Zellzyklusarrest, Antiangiogenese und Nekrose zu fördern, bedingt er einen Stillstand im Wachstum und Teilung bis hin zum Untergang der Zelle [168]. Dies ist im Rahmen entarteter tumoröser Zellen von Bedeutung, es konnte aber auch ein Einfluss von p53 auf Kardiomyozyten beobachtet werden. So zeigte sich, dass eine Deletion von p53 in Kardiomyozyten zu einer Hypertrophie, einer Zunahme der myokardialen Wanddicke und zu einem erhöhten Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht führt [111]. Vergleicht man das kardiale Transkriptom des kardiomyozytären AKT12KO und des kardiomyozytären p53KO, wie in Abbildung 26 im Anhang dargestellt, konnten zudem entgegengesetzte Veränderungen in vielen Genen festgestellt werden. Ebenfalls konnte in Daten des kardialen Transkriptoms von iCKAKT12KO-Herzen ein hoher positiver Aktivierungs-Z-Score (6,6) und ein niedriger logP-Wert (1.2×10^{-60}) für die Aktivierung von p53 beobachtet werden. Dieser dem iCMAKT12KO entgegengesetzte Geno- und Phänotyp führte zur Hypothese, dass eine simultane Deletion von p53, AKT1 und AKT2 in Kardiomyozyten, zu einer verbesserten myokardialen Funktion gegenüber Tieren mit iCMAKT12KO führen könnte. Ebenfalls sollte durch den zusätzlichen Knockout von p53 geprüft werden welchen Einfluss dies auf das kardiale Transkriptom von Tieren mit iCMAKT12p53KO hat.

Es zeigte sich jedoch im Beobachtungszeitraum von 21 Tagen keine funktionelle Überlegenheit der iCMAKT12p53KO-Tieren gegenüber iCMAKT12KO-Tieren. Die Tiere beider Knockout-Gruppen wiesen dieselben schweren Einschränkungen in der Herzfunktion im Vergleich zu wildtypischen Tieren auf. Der simultane Knockout von p53 schien also keinen positiven Einfluss auf die Funktion der Kardiomyozyten im iCMAKT12KO-Modell zu haben.

Vergleicht man nun das iCMp53KO-Modell der Arbeitsgruppe um Mak [111] mit dem iCMAKT12KO-Modell [1] [63], lassen sich einige Unterschiede beobachten. So wurde im iCMp53KO-Modell ein Beobachtungszeitraum von sechs Monaten beschrieben. Zwar ließen sich bereits 7 Tage nach Tamoxifen-Behandlung große Unterschiede im kardialen

Transkriptom von *p53*$^{fl/fl}$-Tieren nachweisen (es zeigten sich 5221 Gene verändert exprimiert im Vergleich zu *p53*$^{+/+}$-Tieren). Jedoch kam es erst drei Monate nach Induktion des Knockouts zu einer Hypertrophie des Myokards. Eine Änderung im Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht konnte zudem erst ab dem vierten Monat nach Tamoxifen-Behandlung festgestellt werden. Erhebliche phänotypische Änderungen wurden sogar erst sechs Monate nach Tamoxifen-Behandlung beobachtet. Ebenfalls wurden Differenzen im funktionellen Parameter *fractional shortening* (fraktionelle Verkürzung) im Vergleich zwischen Tieren, die mit Tamoxifen behandelt wurden und unbehandelten Tieren, erst fünf Monate nach Knockout-Induktion beobachtet [111]. Es scheint daher so, dass die massiven und schnell eintretenden Veränderungen im kardialen Transkriptom vom iCMp53KO-Mäusen nur zu einem sich langsam entwickelnden Phänotyp führen.

Im iCMAKT12KO hingegen kommt es nach Gabe von Tamoxifen zu einer sehr schnellen und fulminanten Entwicklung des kardialen Phänotyps, die bereits nach etwa 3,5 Wochen zum Versterben der Tiere führt. Obwohl der kardiomyozytäre p53KO [111] und der kardiomyozytäre AKT12KO ähnlich schnelle und starke Veränderungen im kardialen Transkriptom aufweisen, die zudem in entgegengesetzte Richtung verlaufen, scheint es so, dass es sich beim iCMAKT12KO im Vergleich zum iCMp53KO um einen schnelleren und dominanteren Phänotyp handelt, der durch einen langsameren Phänotyp im iCMp53KO nicht entscheidend beeinflusst werden kann. Es muss aber angemerkt werden, dass phänotypische Veränderungen wie Atrophie und Hypertrophie unspezifisch sind. Jedoch konnten auch die fulminanten Veränderungen im kardialen Transkriptom von iCMp53KO –Tieren, die von Mak et al. beschrieben wurden, hier nicht beobachtet werden (siehe dazu 4.4).

Darüber hinaus wird beschrieben, dass im iCMp53KO nach viertägiger intraperitonealer Tamoxifen-Gabe eine p53-Ablation mit hoher Rekombinationseffizienz erreicht werden konnte. Diese konnte über Western Blot Analysen auf Proteinebene nachgewiesen werden [111]. In dieser Arbeit gelang hingegen kein Nachweis von p53 im Western Blot, sodass die Charakterisierung des Knockouts von p53 auf DNA-Ebene erfolgte. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach Tamoxifen-Gabe im p53-Locus von αMHC-mCm *p53*$^{fl/fl}$-Tieren zu einer Rekombination kommt, und dass sich die Menge an von loxP-Sites flankierter genomischer p53-DNA in αMHC-mCm *p53*$^{fl/fl}$ -Tieren nach Tamoxifen-Gabe gegenüber wildtypischen Tieren verringerte. In PCR-Analysen auf DNA aus isolierten Kardiomyozyten-Zellkernen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sich das p53-Template in αMHmCm *p53*$^{fl/fl}$-Tieren gegenüber dem Wildtyp nur um etwa 50% reduzieren ließ (siehe dazu 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4). Hingegen konnte für AKT2 eine deutlich stärkere Gendeletion beobachtet werden (siehe 3.3.3). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die loxP-Sites im p53-Locus deutlich weiter auseinanderliegen als die loxP-Sites im AKT2-Locus. Es liegt beim iCMp53KO in dieser Arbeit

daher nur ein partieller p53-Knockout vor. Aufgrund dessen kann geschlussfolgert werden, dass ein partieller kardiomyozytärer Knockout von p53 keinen Einfluss auf den Phänotyp im iCMAKT12KO-Modell hat. Welchen Einfluss ein Knockout von p53 mit höherer Effizienz auf iCMAKT12KO-Tiere hätte, bleibt daher fraglich.

Anzumerken ist, dass in dieser Arbeit dasselbe genetische Modell wie in der Arbeit von Mak et al. [111] verwendet wurde, welches ursprünglich auf der Arbeit von Marino et al. beruht [169]. Da Marino et al. einen Knockout von p53 in Astrozyten (*external granular layer* Zellen, (EGL)) erreichen wollten, wurde die Expression von mCm unter die Kontrolle eines für diesen Zelltypus spezifischen Deletor (*glial fibrillary acidic protein* (GFAP)) gestellt. Mak et al. nutzten den $p53^{fl/fl}$ Locus aus diesen Tieren, um nach Kreuzung mCm αMHC-abhängig, spezifisch in Kardiomyozyten zu exprimieren. Warum in dieser Arbeit trotz des gleichen methodischen Vorgehens nur ein partieller Knockout von p53 in Kardiomyozyten erreicht werden konnte bleibt unklar.

4.4 Vergleich des kardialen Transkriptoms zwischen iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO, iCMp53KO und wildtypischen Mäusen

Zur Untersuchung des Transkriptoms erfolgte die Sequenzierung von mRNA, die aus Herzgewebe von iCMAKT12KO-, iCMAKT12p53KO, iCMp53KO und wildtypischen Mäusen am 21. Tag nach Induktion des Knockouts isoliert wurde. Dabei zeigte sich, dass in Herzen von iCMAKT12KO-Mäusen 3048 Gene differentiell gegenüber wildtypischen Tieren exprimiert wurden (siehe 3.5). Dies entspricht den Veränderungen im Transkriptom, die bereits in vorherigen Arbeiten festgestellt wurden. Hier zeigten sich 3783 Gene mit mindestens 1,5-facher Änderung differentiell exprimiert [1]. Daran zeigt sich, dass der in dieser Arbeit beschriebene kardiomyozytäre iCMAKT12KO dem von Gödecke et al. beschriebenen Knockout entspricht.

Ebenso konnten im Vergleich zwischen dem iCMp53KO und wildtypischen Herzen Unterschiede festgestellt werden. Hier zeigten sich 743 Gene verändert. Auch zeigte sich in der Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen), dass der Signalweg „Tp53 regulates metabolic genes“ mit 9,4% des Gensets verändert war, was dafür spricht, dass p53 in iCMp53KO-Herzen in seiner Aktivität beeinflusst wird (siehe 3.5). Jedoch entsprechen die in dieser Arbeit beobachteten kardialen Transkriptomveränderungen nicht denen, die von Mak et al. in der Analyse von iCMp53KO-Mäusen festgestellt worden sind. Hier zeigten sich bereits sieben Tage nach Tamoxifen-Behandlung 5221 Gene verändert, wenn man Tamoxifen-behandelte *p53*$^{fl/fl}$-Tiere mit unbehandelten Tieren verglich. Nach vier Wochen zeigten sich noch immer 5172 Gene im Vergleich der beiden Gruppen verändert [111]. Festzuhalten sind hier die

unterschiedlichen Zeitpunkte, an denen die Analysen stattfanden (nach 7 Tagen bei Mak et al., nach 21 Tagen in dieser Arbeit), sowie der nur partielle p53-Knockout, der in dieser Arbeit erreicht werden konnte. Ob durch einen kardiomyozytären p53-Knockout mit höherer KO-Effizienz die gleichen kardialen Transkriptionsveränderungen wie sie von Mak et al. beschrieben wurden, erreicht werden könnten, bleibt daher offen.

Zudem zeigte der Signalweg „Transcriptional regulation of MecP2“, mit 11,1% veränderten Genen im Genset, sogar eine stärkere Herunterregulierung als p53. Bei MecP2 (methyl-CpG–binding protein 2) handelt es sich um ein Protein, welches spezifisch methylierte DNA erkennt und bindet [170]. Es ist sowohl in der Lage, die Transkription von DNA zu unterdrücken als auch in der Lage, die Expression von Genen durch Bindung von Koaktivatoren zu steigern [171]. Im Zusammenhang mit dem Herzkreislaufsystem konnte gezeigt werden, dass MecP2 sowohl im Menschen als auch in der Maus in Herzinsuffizienz unterdrückt ist. Zudem ist es an der Entwicklung der Herzinsuffizienz und der Regulation von metabolischen Prozessen im Herz beteiligt. [172] [173]. In Neuronen konnte zudem ein Zusammenhang von p53 und MecP2 nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass ein Verlust von MecP2 zu einer Aktivierung von p53 führt [174]. Ebenfalls konnte in Brustkrebszellen eine funktionelle Verbindung von MecP2 und p53 gezeigt werden, da hier MecP2 zu einer Ubiquitinierung und damit zu einem proteasomalen Abbau von p53 führt [175]. Da sich diese MecP2-p53-Interaktionen jedoch auf andere Zelltypen beziehen und es eher einen Einfluss von MecP2 auf p53 als andersherum zu geben scheint, bleibt der Nachweis des herunterregulierten MecP2-Signalwegs im Transkriptom von iCMp53KO-Herzen von fraglicher Bedeutung.

Vergleicht man zudem die beiden Genotypen iCMAKT12KO und iCMAKT12p53KO, zeigten sich sehr große Ähnlichkeiten im Transkriptom. Ein signifikanter Unterschied konnte nur für die microRNA mir-450b festgestellt werden. Bei microRNAs handelt es sich um kurze, nicht kodierende RNA-Moleküle, die an der Genregulation beteiligt sind. Durch die Bindung von komplementärer mRNA können sie deren Translation inhibieren oder deren Abbau fördern und so deren Expression posttranskriptionell regulieren [176]. Für die microRNA mir-450b konnte auf Zellkulturebene eine Bedeutung im Herzen nachgewiesen werden. So konnte in einem Hypoxie/Reoxyginierungs-Modell mit Kardiomyozyten festgestellt werden, dass mir-450b im Rahmen des PI3K/AKT-Signalwegs an einer Reduktion von Apoptose und oxidativem Stress beteiligt ist [177]. Da es sich jedoch um das einzige Gen handelt, für das eine signifikante Differenz in der Expression zwischen iCMAKT12KO- und iCMAKT12p53KO-Herzen festgestellt wurde, bleibt dessen Bedeutung fraglich. Betrachtet man im Vergleich die starken Ähnlichkeiten im kardialen Transkriptom der beiden Knockout-Genotypen, kann eher nicht von einem relevanten Unterschied ausgegangen werden.

Wie bereits beschrieben, zeigten sich in der Transkriptomanalyse von iCMAKT12KO-Herzen im Vergleich zu Herzen wildtypischer Tiere am Tag 21 nach Induktion des Knockout über 3000 Gene verändert exprimiert. Davon zeigten sich über 1700 heraufreguliert [1]. Auch konnte beobachtet werden, dass Transkriptionsfaktoren wie FOXO1 und cMyc gesteigert exprimiert wurden. Weitere Transkriptionsfaktoren wie PPARGC1A und PPARA wiesen hingegen eine verminderte Expression auf. Insgesamt zeigten sich also nach Inaktivierung von AKT in Kardiomyozyten eine weitreichende Verschiebung der regulatorischen Netzwerke, die nicht nur direkt von AKT kontrolliert werden, sondern auch indirekt infolge einer veränderten Signaltransduktion der AKT abhängigen Wege beeinflusst wurden. Es ist also davon auszugehen, dass weitere Upstream-Regulatoren an der Regulation des Transkriptoms beteiligt sind und somit zu dem kardialen Phänotyp der iCMAKT12KO-Tiere beitragen. Somit bleibt fraglich, ob ein p53 KO alleine die starken Transkriptom-Veränderungen entscheidend beeinflussen kann.

Zudem wurde für die Analyse des kardialen Transkriptoms RNA verwendet, die aus gesamten Herzen isoliert wurde. Damit wurde neben den Veränderungen des Transkriptoms der Kardiomyozyten auch das Transkriptom weiterer Zelltypen abgebildet. In Myokard kommen neben Herzmuskelzellen auch Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Immunzellen und Endothelzellen vor [147]. In einem Mausmodellen der Drucküberlastungs-Hypertrophie konnte gezeigt werden, dass sich neben dem Transkriptom der Kardiomyozyten auch das Transkriptom von Endothelzellen und Fibroblasten ändert [178]. Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls in einem Mausmodell mit Herzinsuffizienz mit erhaltender Ejektionsfraktion gemacht werden [179]. Das zeigt, dass Transkriptomveränderungen, die in RNA des gesamten Herzens beobachtet werden, von Herzmuskelzellen, jedoch auch von weiteren Zelltypen ausgelöst sein können. Besonders da bekannt ist, dass die verschiedenen Zelltypen des Herzens miteinander kommunizieren [180] [181], ist es denkbar, dass der Knockout von AKT1 und AKT2 in Kardiomyozyten nicht nur zu Veränderungen im kardiomyozytären Transkriptom, sondern auch zu einem veränderten Transkriptom von weiteren Zelltypen des Herzens führt. Dies könnte insbesondere von Bedeutung sein, da Kardiomyozyten nur eine Minderheit der Zellen des Herzens (in etwas 25-35% aller Zellen) ausmachen [182]. Veränderungen des Transkriptoms in nicht-kardiomyozytären Zelltypen könnten daher einen großen Einfluss auf das kardiale Transkriptom ausüben.

4.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte im phospho-Substratmotiv-Western-Blot eine gesteigerte ATM- und ATR-Aktivität in iCMAKT12KO Herzen gegenüber wildtypischen Herzen nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Aktivierung von p53 hindeutet. Anhand der Phosphorylierung des ATM- und ATR-Substrats Histons H2.X konnte jedoch kein Unterschied in der Aktivität von ATM und ATR in iCMAKT12KO-Herzen im Vergleich zu wildtypischen Herzen gezeigt werden. Sowohl in der Western Blot- als auch in der immunhistochemischen Untersuchung konnten keine statistisch signifikate Differenz in der Phosphorylierung des Histons H2A.X im Vergleich zwischen wildtypischen und iCMAKT12KO-Herzen festgestellt werden.

Ebenfalls konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und iCMAKT12KO-Herzen oder eine statistisch höhere Aktivität der DNA-PKcs in wildtypischen Tieren festgestellt werden.

Dennoch zeigte sich in der Transkriptom-Analyse von iCMp53KO Herzen ein verändertes Transkritionsprofil, was auch eine verändert p53 Aktivität infolge der knockout Induktion hindeutet.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ein zusätzlicher partieller Knockout von p53 in Kardiomyozyten, die auch einen Knockout von AKT1 und AKT2 aufwiesen, die Herzfunktion über einen Beobachtungszeitraum von drei Wochen nicht verbesserte. Mäuse des Genotyps iCMAKT12p53KO wiesen in diesem Zeitraum dieselben schweren Einschränkungen der myokardialen Funktion auf, die auch von Tieren des Genotyps iCMAKT12KO gezeigt wurden.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Gödecke, S., et al., *Loss of cardiomyocyte AKT signaling causes deterioration of lipid metabolism and cellular atrophy.* Metabolism, 2026. **180**: p. 156619.
2. Hanks, S.K. and T. Hunter, *The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1.* The FASEB Journal, 1995. **9**(8): p. 576-596.
3. Leroux, A.E., J.O. Schulze, and R.M. Biondi, *AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development.* Seminars in Cancer Biology, 2018. **48**: p. 1-17.
4. Coffer, P.J. and J.R. WOODGETT, *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families.* European journal of biochemistry, 1991. **201**(2): p. 475-481.
5. Jones, P.F., et al., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(10): p. 4171-4175.
6. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network.* Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
7. Konishi, H., et al., *Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of 3 types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and βγ subunits of G proteins.* Biochemical and biophysical research communications, 1995. **216**(2): p. 526-534.
8. Jones, P.F., T. Jakubowicz, and B.A. Hemmings, *Molecular cloning of a second form of rac protein kinase.* Cell regulation, 1991. **2**(12): p. 1001-1009.
9. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(19): p. 9267-9271.
10. Walsh, K., *Akt signaling and growth of the heart.* Circulation, 2006. **113**(17): p. 2032-4.
11. Hanada, M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 3-16.
12. Tyers, M., et al., *Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets.* Nature, 1988. **333**(6172): p. 470-3.
13. Frech, M., et al., *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, 1997. **272**(13): p. 8474-81.
14. Peterson, R.T. and S.L. Schreiber, *Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family.* Curr Biol, 1999. **9**(14): p. R521-4.
15. Andjelkovic, M., et al., *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.* J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
16. New, D.C., et al., *G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis.* FEBS J, 2007. **274**(23): p. 6025-36.
17. Vanhaesebroeck, B., et al., *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 329-41.
18. Franke, T.F., et al., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate.* Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
19. Guilherme, A., et al., *Regulation of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 5'-Phosphatase Activity by Insulin*.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(47): p. 29533-29536.
20. Hawkins, P.T. and L.R. Stephens, *Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways.* Biochem Soc Trans, 2016. **44**(1): p. 307-14.
21. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.* EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
22. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.* Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.

23. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B.* Science, 1997. **277**(5325): p. 567-70.
24. Calleja, V., et al., *Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition.* PLoS Biol, 2009. **7**(1): p. e17.
25. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.* Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
26. Auger, K.R., et al., *PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells.* Cell, 1989. **57**(1): p. 167-75.
27. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.* Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
28. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models.* Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 40.
29. Ding, Q., et al., *Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 4006-17.
30. Maurer, U., et al., *Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1.* Molecular Cell, 2006. **21**(6): p. 749-760.
31. Morel, C., et al., *Mcl-1 Integrates the Opposing Actions of Signaling Pathways That Mediate Survival and Apoptosis.* Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(14): p. 3845-3852.
32. Parker, P.J., F.B. Caudwell, and P. Cohen, *Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo.* Eur J Biochem, 1983. **130**(1): p. 227-34.
33. Rylatt, D.B., et al., *Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase.* Eur J Biochem, 1980. **107**(2): p. 529-37.
34. Welcker, M., et al., *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9085-90.
35. van der Vos, K.E. and P.J. Coffer, *The extending network of FOXO transcriptional target genes.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(4): p. 579-92.
36. Webb, A.E. and A. Brunet, *FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control.* Trends Biochem Sci, 2014. **39**(4): p. 159-69.
37. Caporali, A., et al., *Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes.* Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 299-311.
38. Brunet, A., et al., *Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor.* Cell, 1999. **96**(6): p. 857-868.
39. Kops, G.J., et al., *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B.* Nature, 1999. **398**(6728): p. 630-4.
40. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.* Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
41. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling.* Nature Cell Biology, 2002. **4**(9): p. 648-657.
42. Potter, C.J., L.G. Pedraza, and T. Xu, *Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2.* Nature Cell Biology, 2002. **4**(9): p. 658-665.
43. Manning, B.D., et al., *Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway.* Molecular Cell, 2002. **10**(1): p. 151-162.
44. Haar, E.V., et al., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40.* Nature Cell Biology, 2007. **9**(3): p. 316-323.
45. Kovacina, K.S., et al., *Identification of a Proline-rich Akt Substrate as a 14-3-3 Binding Partner*.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(12): p. 10189-10194.

46. Sancak, Y., et al., *PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase.* Molecular Cell, 2007. **25**(6): p. 903-915.
47. Matsui, T. and A. Rosenzweig, *Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2005. **38**(1): p. 63-71.
48. Cho, H., et al., *Akt1/PKBα Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice*.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
49. DeBosch, B., et al., *Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth.* Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-2104.
50. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
51. Kemi, O.J., et al., *Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 356-68.
52. Shiojima, I., et al., *Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status.* J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37670-7.
53. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta).* Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
54. DeBosch, B., et al., *Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival.* J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32841-51.
55. Condorelli, G., et al., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(19): p. 12333-12338.
56. Badorff, C., et al., *Glycogen synthase kinase 3β inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation.* Circulation research, 2005. **97**(7): p. 645-654.
57. Evans-Anderson, H.J., C.M. Alfieri, and K.E. Yutzey, *Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors.* Circ Res, 2008. **102**(6): p. 686-94.
58. Skurk, C., et al., *The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20814-23.
59. McMullen, J.R., et al., *The Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Induces Physiological Heart Growth via the Phosphoinositide 3-Kinase(p110α) Pathway*.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(6): p. 4782-4793.
60. Kenessey, A. and K. Ojamaa, *Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways.* J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20666-20672.
61. Proud, C.G., *Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery.* Biochem J, 2007. **403**(2): p. 217-34.
62. Sohal, D.S., et al., *Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein.* Circulation Research, 2001. **89**(1): p. 20-25.
63. Goedecke, S., et al., *AKT signaling is essential for functional and structural integrity of the heart.* The FASEB Journal, 2017. **31**: p. lb149-lb149.
64. Latchman, D.S., *Gene regulation.* Bmj, 1992. **304**(6834): p. 1103-5.
65. Lane, D.P., *p53, guardian of the genome.* Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-16.
66. Men, H., et al., *The regulatory roles of p53 in cardiovascular health and disease.* Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(5): p. 2001-2018.
67. Harris, C.C., *Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(20): p. 1442-55.
68. Brady, C.A., et al., *Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression.* Cell, 2011. **145**(4): p. 571-83.

69. Berger, M., et al., *A role for the polyproline domain of p53 in its regulation by Mdm2.* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3785-90.
70. Halazonetis, T.D. and A.N. Kandil, *Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants.* EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5057-64.
71. Maki, C.G., *Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(23): p. 16531-16535.
72. Hupp, T.R., et al., *Regulation of the specific DNA binding function of p53.* Cell, 1992. **71**(5): p. 875-86.
73. Liu, Y., et al., *Facilitated search for specific genomic targets by p53 C-terminal basic DNA binding domain.* Cancer Biol Ther, 2004. **3**(11): p. 1102-8.
74. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2.* Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
75. Wahl, G.M. and A.M. Carr, *The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(12): p. E277-86.
76. Lavin, M.F. and N. Gueven, *The complexity of p53 stabilization and activation.* Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(6): p. 941-950.
77. Kim, S.T., et al., *Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members.* J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37538-43.
78. Chiruvella, K.K., Z. Liang, and T.E. Wilson, *Repair of double-strand breaks by end joining.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a012757.
79. Lees-Miller, S.P., Y.R. Chen, and C.W. Anderson, *Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(12): p. 6472-81.
80. Davis, A.J., B.P.C. Chen, and D.J. Chen, *DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway.* DNA Repair, 2014. **17**: p. 21-29.
81. Achanta, G., et al., *Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage.* Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8723-9.
82. Boehme, K.A., R. Kulikov, and C. Blattner, *p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7785-90.
83. Chibaya, L., et al., *Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(4).
84. Dong, Y., et al., *Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease.* J Mol Cell Cardiol, 2019. **136**: p. 27-41.
85. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53.* Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-40.
86. Delbridge, A.R., et al., *Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies.* Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 99-109.
87. Giorgi, C., et al., *p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca2+-dependent manner.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(6): p. 1779-84.
88. Johnson, J., S. Mohsin, and S.R. Houser, *Cardiomyocyte Proliferation as a Source of New Myocyte Development in the Adult Heart.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
89. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis.* Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1169-74.
90. Tasdemir, E., et al., *Regulation of autophagy by cytoplasmic p53.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 676-87.
91. Maiuri, M.C., et al., *Autophagy regulation by p53.* Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 181-5.
92. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation.* Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
93. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.* Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.

94. Joshi, S., A.R. Singh, and D.L. Durden, *MDM2 regulates hypoxic hypoxia-inducible factor 1alpha stability in an E3 ligase, proteasome, and PTEN-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-dependent manner.* J Biol Chem, 2014. **289**(33): p. 22785-22797.
95. Zhou, C.H., et al., *Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 13834.
96. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.* Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 663-9.
97. Vaseva, A.V., et al., *p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis.* Cell, 2012. **149**(7): p. 1536-48.
98. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death.* Nature, 2005. **434**(7033): p. 652-658.
99. Xu, T., et al., *ARC regulates programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of mPTP opening.* Redox Biology, 2019. **20**: p. 414-426.
100. Mandl, A., et al., *Puma deletion delays cardiac dysfunction in murine heart failure models through attenuation of apoptosis.* Circulation, 2011. **124**(1): p. 31-9.
101. Song, H., et al., *Increased p53 protein expression in human failing myocardium.* J Heart Lung Transplant, 1999. **18**(8): p. 744-9.
102. Su, D., et al., *ROCK1/p53/NOXA signaling mediates cardiomyocyte apoptosis in response to high glucose in vitro and vivo.* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(4): p. 936-946.
103. Gogna, R., et al., *p53's choice of myocardial death or survival: Oxygen protects infarct myocardium by recruiting p53 on NOS3 promoter through regulation of p53-Lys(118) acetylation.* EMBO Mol Med, 2013. **5**(11): p. 1662-83.
104. Burke, R.M., et al., *Small proline-rich protein 2B drives stress-dependent p53 degradation and fibroblast proliferation in heart failure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(15): p. E3436-E3445.
105. Wang, D., et al., *Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor.* Cell, 2001. **105**(7): p. 851-62.
106. Ma, X., et al., *Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury.* Circulation, 2012. **125**(25): p. 3170-81.
107. Wang, E.Y., et al., *p53 mediates autophagy and cell death by a mechanism contingent on Bnip3.* Hypertension, 2013. **62**(1): p. 70-7.
108. Sano, M., et al., *p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload.* Nature, 2007. **446**(7134): p. 444-8.
109. Gu, J., et al., *Inhibition of p53 prevents diabetic cardiomyopathy by preventing early-stage apoptosis and cell senescence, reduced glycolysis, and impaired angiogenesis.* Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 82.
110. Xu, T., et al., *ARC regulates programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of mPTP opening.* Redox Biol, 2019. **20**: p. 414-426.
111. Mak, T.W., et al., *p53 regulates the cardiac transcriptome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(9): p. 2331-2336.
112. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites.* Journal of Molecular Biology, 1981. **150**(4): p. 467-486.
113. Littlewood, T.D., et al., *A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins.* Nucleic Acids Research, 1995. **23**(10): p. 1686-1690.
114. Heinen, A., et al., *Echocardiographic Analysis of Cardiac Function after Infarction in Mice: Validation of Single-Plane Long-Axis View Measurements and the Bi-Plane Simpson Method.* Ultrasound in Medicine & Biology, 2018. **44**(7): p. 1544-1555.
115. Parisi, A.F., et al., *Approaches to determination of left ventricular volume and ejection fraction by real-time two-dimensional echocardiography.* Clinical Cardiology, 1979. **2**(4): p. 257-263.

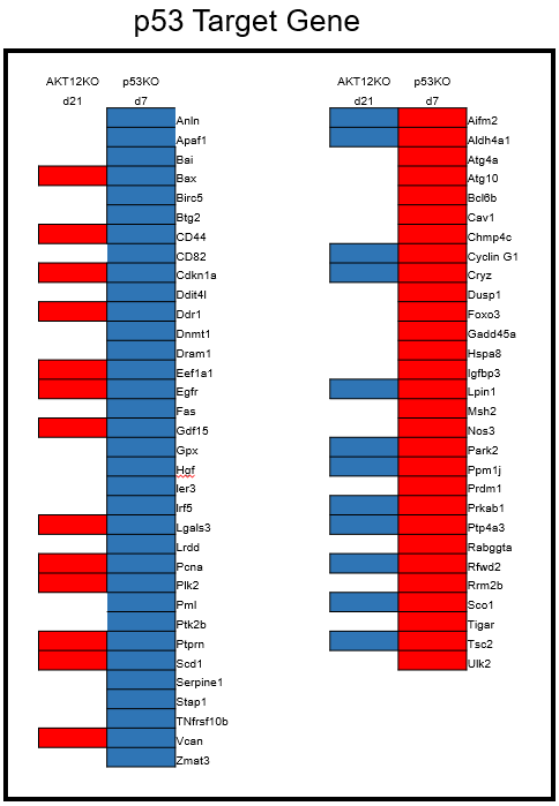
116. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.* The Journal of cell biology, 1963. **17**(2): p. 299-313.
117. Bergmann, O. and S. Jovinge, *Isolation of Cardiomyocyte Nuclei from Post-mortem Tissue.* JoVE, 2012(65): p. e4205.
118. Bergmann, O., et al., *Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover.* Experimental Cell Research, 2011. **317**(2): p. 188-194.
119. Cui, M. and E.N. Olson, *Protocol for Single-Nucleus Transcriptomics of Diploid and Tetraploid Cardiomyocytes in Murine Hearts.* STAR Protocols, 2020. **1**(2): p. 100049.
120. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
121. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
122. Bhavanandan, V.P. and A.W. Katlic, *The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. The role of sialic acid.* J Biol Chem, 1979. **254**(10): p. 4000-8.
123. Monsigny, M., et al., *Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?* Eur J Biochem, 1980. **104**(1): p. 147-53.
124. Gonatas, N.K. and S. Avrameas, *Detection of plasma membrane carbohydrates with lectin peroxidase conjugates.* J Cell Biol, 1973. **59**(2 Pt 1): p. 436-43.
125. Huet, C. and J. Garrido, *Ultrastructural visualization of cell-coat components by means of wheat germ agglutinin.* Experimental Cell Research, 1972. **75**(2): p. 523-527.
126. Dann, O., et al., *Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols.* Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1971. **749**(1): p. 68-89.
127. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
128. van der Burg, M., et al., *Standardization of DNA isolation from low cell numbers for chimerism analysis by PCR of short tandem repeats.* Leukemia, 2011. **25**(9): p. 1467-70.
129. Arnemann, J., *Schmelzkurvenanalyse*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 2121-2121.
130. Sasse, A., et al., *Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure.* The Journal of Gene Medicine, 2003. **5**(10): p. 876-882.
131. THOMSEN, R., et al., *ANALYSIS OF qPCR DATA BY CONVERTING EXPONENTIALLY RELATED Ct VALUES INTO LINEARLY RELATED X0 VALUES.* Journal of Bioinformatics and Computational Biology, 2010. **08**(05): p. 885-900.
132. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(45): p. 42462-42467.
133. Ward, I.M. and J. Chen, *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(51): p. 47759-47762.
134. *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*, ed. J.M. Graham and D. Rickwood. 1997: Oxford University Press.
135. Ang, K.L., et al., *Limitations of conventional approaches to identify myocyte nuclei in histologic sections of the heart.* Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(6): p. C1603-9.
136. Chen, B.P.C., et al., *Cell Cycle Dependence of DNA-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Response to DNA Double Strand Breaks *.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(15): p. 14709-14715.
137. Bonsing, B.A., et al., *Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry.* Cytometry, 1997. **28**(1): p. 11-24.
138. Turpeinen, M., et al., *Comparison of anti-p53 antibodies in immunoblotting.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **293**(2): p. 850-856.

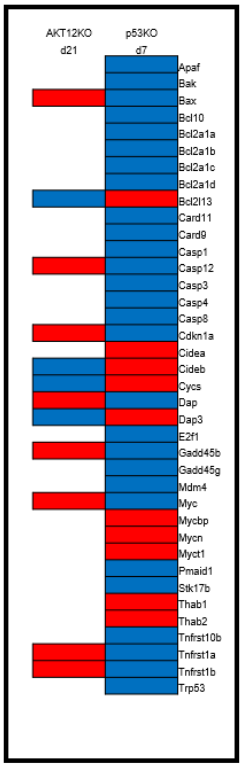
139. Lee, D.H. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists.* Trends in Cell Biology, 1998. **8**(10): p. 397-403.
140. Auchampach, J., et al., *Measuring cardiomyocyte cell-cycle activity and proliferation in the age of heart regeneration.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2022. **322**(4): p. H579-h596.
141. White, C.D. and A. Toker, *Using phospho-motif antibodies to determine kinase substrates.* Curr Protoc Mol Biol, 2013. **Chapter 18**: p. Unit 18.20.
142. Lu, H., et al., *DNA-PKcs-dependent phosphorylation of RECQL4 promotes NHEJ by stabilizing the NHEJ machinery at DNA double-strand breaks.* Nucleic Acids Research, 2022. **50**(10): p. 5635-5651.
143. Langer, L.M., et al., *Structure of substrate-bound SMG1-8-9 kinase complex reveals molecular basis for phosphorylation specificity.* Elife, 2020. **9**.
144. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the Histone Code.* Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-1080.
145. Yuan, J., R. Adamski, and J. Chen, *Focus on histone variant H2AX: to be or not to be.* FEBS Lett, 2010. **584**(17): p. 3717-24.
146. Rubart, M. and L.J. Field, *Cardiac regeneration: repopulating the heart.* Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 29-49.
147. Graham, C. and P. Sethu, *Myocardial Fibrosis: Cell Signaling and In Vitro Modeling*, in *Cardiovascular Signaling in Health and Disease*, N.L. Parinandi and T.J. Hund, Editors. 2022, Springer Copyright 2022, The Author(s). Cham (CH). p. 287-321.
148. Monroe, T.O., et al., *YAP Partially Reprograms Chromatin Accessibility to Directly Induce Adult Cardiogenesis In Vivo.* Developmental Cell, 2019. **48**(6): p. 765-779.e7.
149. Hill, M.C. and J.F. Martin, *Epigenetic Assays in Purified Cardiomyocyte Nuclei*, in *Cardiac Regeneration: Methods and Protocols*, K.D. Poss and B. Kühn, Editors. 2021, Springer US: New York, NY. p. 307-321.
150. Bergmann, O., et al., *Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart.* Cell, 2015. **161**(7): p. 1566-1575.
151. Bhattacharyya, S., et al., *PAN-INTACT enables direct isolation of lineage-specific nuclei from fibrous tissues.* PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0214677.
152. Mukherjee, B., et al., *DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells.* DNA Repair (Amst), 2006. **5**(5): p. 575-90.
153. Freeman, A.K. and A.N.A. Monteiro, *Phosphatases in the cellular response to DNA damage.* Cell Communication and Signaling, 2010. **8**(1): p. 27.
154. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer.* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 957-67.
155. Takahashi, T., et al., *Cardiac Nuclear High-Mobility Group Box 1 Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting DNA Damage Response.* JACC Basic Transl Sci, 2019. **4**(2): p. 234-247.
156. Nakada, Y., et al., *DNA Damage Response Mediates Pressure Overload–Induced Cardiomyocyte Hypertrophy.* Circulation, 2019. **139**(9): p. 1237-1239.
157. Beyfuss, K. and D.A. Hood, *A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle.* Redox Report, 2018. **23**(1): p. 100-117.
158. Lees-Miller, S.P., et al., *Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5041-9.
159. Soubeyrand, S., C. Schild-Poulter, and R.J. Haché, *Structured DNA promotes phosphorylation of p53 by DNA-dependent protein kinase at serine 9 and threonine 18.* Eur J Biochem, 2004. **271**(18): p. 3776-84.
160. Chan, D.W., et al., *Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks.* Genes Dev, 2002. **16**(18): p. 2333-8.

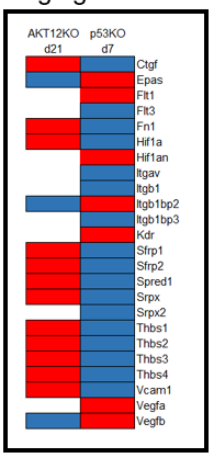
161. Nagasawa, H., et al., *Coordination of the Ser2056 and Thr2609 Clusters of DNA-PKcs in Regulating Gamma Rays and Extremely Low Fluencies of Alpha-Particle Irradiation to G(0)/G(1) Phase Cells.* Radiat Res, 2017. **187**(2): p. 259-267.
162. Jette, N. and S.P. Lees-Miller, *The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis.* Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2015. **117**(2): p. 194-205.
163. Cooper, A., et al., *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration.* Nature, 2013. **498**(7454): p. 376-379.
164. Wang, S., et al., *The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(4): p. 1584-1588.
165. Woo, R.A., et al., *DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase, and is mediated by the latent population of p53.* The EMBO Journal, 2002. **21**(12): p. 3000-3008.
166. Zhou, H., et al., *DNA-PKcs promotes cardiac ischemia reperfusion injury through mitigating BI-1-governed mitochondrial homeostasis.* Basic Res Cardiol, 2020. **115**(2): p. 11.
167. Ma, M., et al., *The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit promotes sepsis-induced cardiac dysfunction through disrupting INF-2-dependent mitochondrial dynamics.* Int J Med Sci, 2024. **21**(4): p. 714-724.
168. Vousden, K.H. and C. Prives, *Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53.* Cell, 2009. **137**(3): p. 413-431.
169. Marino, S., et al., *Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum.* Genes Dev, 2000. **14**(8): p. 994-1004.
170. Baubec, T., et al., *Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family.* Cell, 2013. **153**(2): p. 480-92.
171. Chahrour, M., et al., *MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription.* Science, 2008. **320**(5880): p. 1224-9.
172. Mayer, S.C., et al., *Adrenergic Repression of the Epigenetic Reader MeCP2 Facilitates Cardiac Adaptation in Chronic Heart Failure.* Circ Res, 2015. **117**(7): p. 622-33.
173. Wang, C., et al., *The Effect of Mecp2 on Heart Failure.* Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **47**(6): p. 2380-2387.
174. Ohashi, M., et al., *Loss of MECP2 Leads to Activation of P53 and Neuronal Senescence.* Stem Cell Reports, 2018. **10**(5): p. 1453-1463.
175. Nejati-Koshki, K., et al. *The Epigenetic Reader Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MeCP2) Is an Emerging Oncogene in Cancer Biology*. Cancers, 2023. **15**, DOI: 10.3390/cancers15102683.
176. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.* Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(7): p. 522-531.
177. Zhan, J., et al., *Role and mechanism of the lncRNA SNHG1/miR-450b-5p/IGF1 axis in the regulation of myocardial ischemia reperfusion injury.* Mol Med Rep, 2022. **25**(5): p. 176.
178. Froese, N., et al., *Analysis of myocardial cellular gene expression during pressure overload reveals matrix based functional intercellular communication.* iScience, 2022. **25**(3): p. 103965.
179. Lanzer, J.D., et al., *Single-cell transcriptomics reveal distinctive patterns of fibroblast activation in heart failure with preserved ejection fraction.* Basic Res Cardiol, 2024. **119**(6): p. 1001-1028.
180. Wagner, J.U.G. and S. Dimmeler, *Cellular cross-talks in the diseased and aging heart.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2020. **138**: p. 136-146.
181. Colliva, A., et al., *Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease.* J Physiol, 2020. **598**(14): p. 2923-2939.
182. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition.* Circulation Research, 2016. **118**(3): p. 400-409.

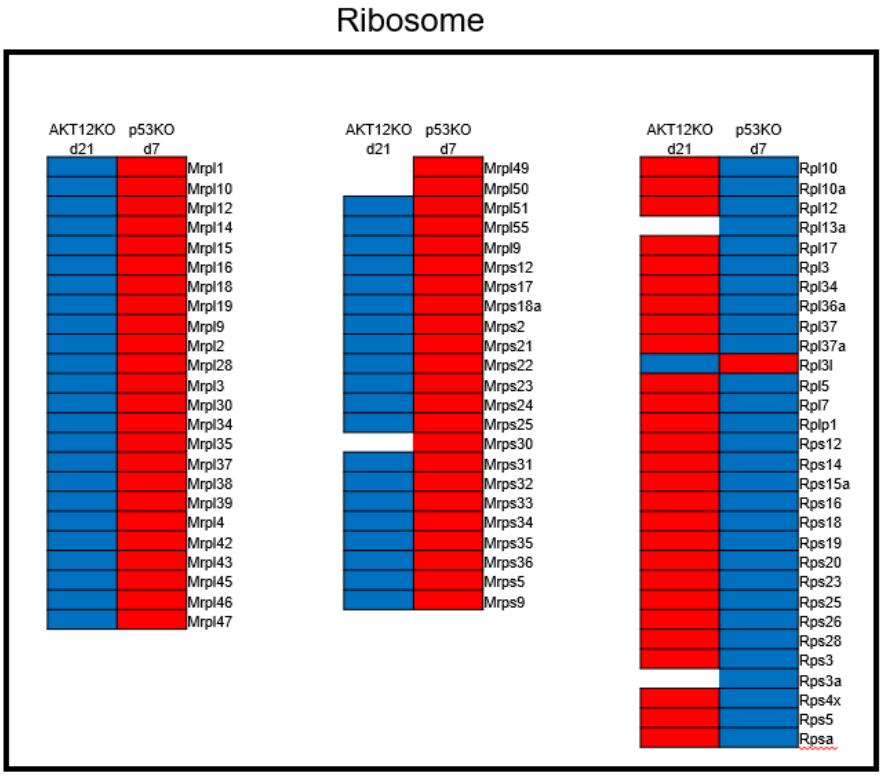
183. Ludger Hauck (2017). *Genome-wide transcriptome analyses of transgenic mice, that express Cre recombinase flanked by mutated estrogen receptors (MerCreMer; mcm), and carry loxP-flanked sequences of p53 and Mdm2 was performed in the presence and absence of Tamoxifen*. *BioStudies*, E-MTAB-5441. Retrieved from https://www.ebi.ac.uk/biostudies/ArrayExpress/studies/E-MTAB-5441

6. Anhang

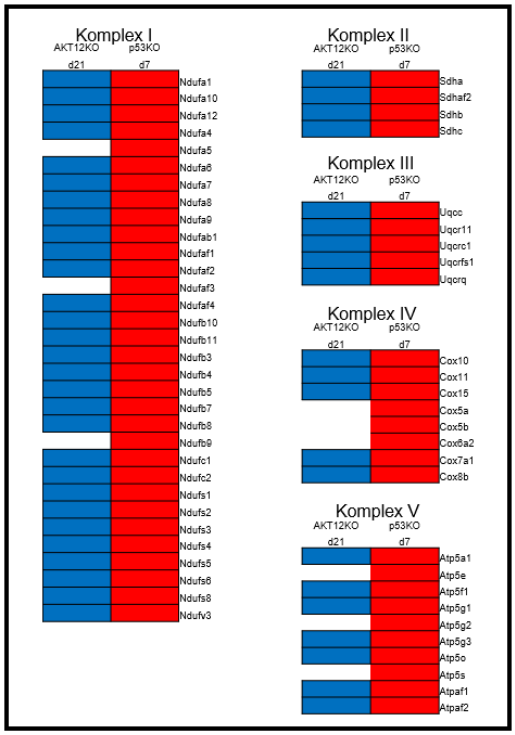

p53 Target Gene
AKT12KO d21
p53KO d7
Anln
Apaf1
Bai
Bax
Birc5
Btg2
CD44
CD82
Cdkn1a
Ddit4l
Ddr1
Dnmt1
Dram1
Eef1a1
Egfr
Fas
Gdf15
Gpx
Hgf
Ier3
Irf5
Lgals3
Lrdd
Pcna
Plk2
Pml
Ptk2b
Ptprn
Scd1
Serpine1
Stap1
TNfrsf10b
Vcan
Zmat3
Aifm2
Aldh4a1
Atg4a
Atg10
Bcl6b
Cav1
Chmp4c
Cyclin G1
Cryz
Dusp1
Foxo3
Gadd45a
Hspa8
Igfbp3
Lpin1
Msh2
Nos3
Park2
Ppm1j
Prdm1
Prkab1
Ptp4a3
Rabggta
Rfwd2
Rrm2b
Sco1
Tigar
Tsc2
Ulk2


Apoptose
AKT12KO d21
p53KO d7
Apaf
Bak
Bax
Bcl10
Bcl2a1a
Bcl2a1b
Bcl2a1c
Bcl2a1d
Bcl2l13
Card11
Card9
Casp1
Casp12
Casp3
Casp4
Casp8
Cdkn1a
Cidea
Cideb
Cycs
Dap
Dap3
E2f1
Gadd45b
Gadd45g
Mdm4
Myc
Mycbp
Mycn
Mycl1
Pmaid1
Stk17b
Thab1
Thab2
Tnfrst10b
Tnfrst1a
Tnfrst1b
Trp53

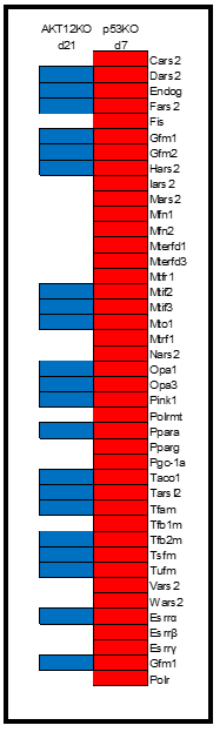

Angiogenese
AKT12KO d21
p53KO d7
Ctgf
Epas
Flt1
Flt3
Fn1
Hif1a
Hif1an
Itgav
Itgb1
Itgb1bp2
Itgb1bp3
Kdr
Sfrp1
Sfrp2
Spred1
Srpx
Srpx2
Thbs1
Thbs2
Thbs3
Thbs4
Vcam1
Vegfa
Vegfb


Ribosome
AKT12KO d21
p53KO d7
Mrpl1
Mrpl10
Mrpl12
Mrpl14
Mrpl15
Mrpl16
Mrpl18
Mrpl19
Mrpl9
Mrpl2
Mrpl28
Mrpl3
Mrpl30
Mrpl34
Mrpl35
Mrpl37
Mrpl38
Mrpl39
Mrpl4
Mrpl42
Mrpl43
Mrpl45
Mrpl46
Mrpl47
Mrpl49
Mrpl50
Mrpl51
Mrpl55
Mrpl9
Mrps12
Mrps17
Mrps18a
Mrps2
Mrps21
Mrps22
Mrps23
Mrps24
Mrps25
Mrps30
Mrps31
Mrps32
Mrps33
Mrps34
Mrps35
Mrps36
Mrps5
Mrps9
Rpl10
Rpl10a
Rpl12
Rpl13a
Rpl17
Rpl3
Rpl34
Rpl36a
Rpl37
Rpl37a
Rpl3l
Rpl5
Rpl7
Rplp1
Rps12
Rps14
Rps15a
Rps16
Rps18
Rps19
Rps20
Rps23
Rps25
Rps26
Rps28
Rps3
Rps3a
Rps4x
Rps5
Rpsa

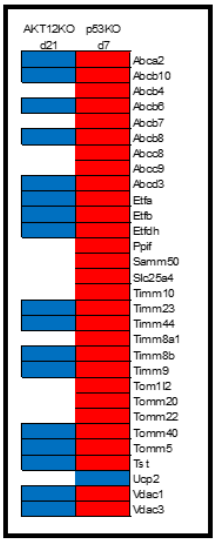
Atmungskette



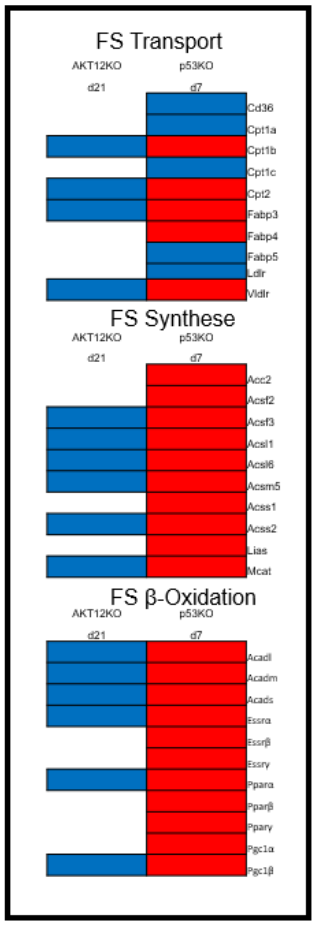
Mitochondriale Biogenese



Mitochondrialer Transport



Fettsäure Stoffwechsel



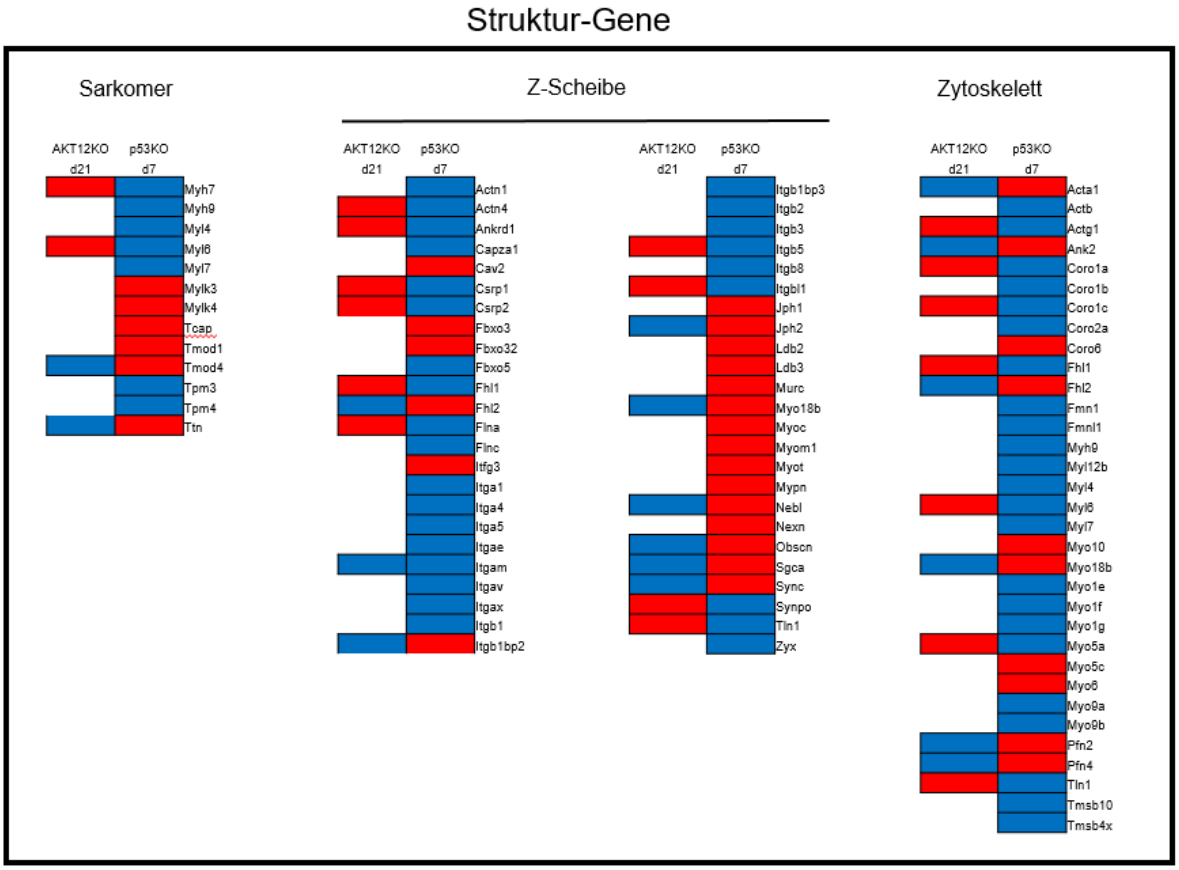


Abb. 26: Exemplarischer Vergleich des kardialen Transkriptoms zwischen kardiomyozytären p53KO [111] [183] am 7. Tag nach Tamoxifen-Behandlung und kardiomyzytären iCMAKT12KO am 21. Tag nach Induktion. Diese wurden schematisch dargestellt. Rot steht dabei für eine gesteigerte Expression, blau für herunter regulierte Gene. Es zeigen sich dabei entgegengesetzte Veränderungen im kardialen Transkriptom im Vergleich zwischen den beiden Genotypen.

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke für die Chance in seinem Institut zu promovieren und die sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich bei dir für die Aufnahme ins IRTG1902 bedanken. Ich konnte mich jederzeit mit Fragen und Anliegen an dich wenden und deine Tür stand immer offen. Zudem konnte man sich auch in stressigen Zeiten immer auf dich verlassen. Dies schätzte ich sehr.

Zudem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Judith Haendeler für Co-Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich zudem bei Frau Dr. Stefanie Gödecke bedanken. Du hast es geschafft mich während der gesamten Promotion motiviert zu halten und mir geholfen in Momenten der Rückschläge weiterzumachen. Auch möchte ich dir für die sehr geduldige und detaillierte Korrektur meiner Arbeit danken.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Andre Heinen für die Durchführung der echokardiographischen Aufnahmen und die Unterstützung im Umgang mit den Versuchstieren.

Zudem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie und des IRTG1902 für die tatkräftige Unterstützung während meiner gesamten Promotion und das angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima im Institut. Besonders möchte ich dabei Frau Dr. Anne Hemmers, Frau Katharina Kutolsko, Herrn Dr. Andre Spychalla und Frau Dr. Olesia Omelchenko für die alltägliche Unterstützung im Labor danken. Zudem möchte ich mich bei Frau Daniela Müller, Frau Susanne Küsters, Frau Sevgi Bongartz und Frau Julia Albrecht für die hervorragende Einarbeitung in die Labormethoden und für die Unterstützung mit den Versuchstieren bedanken.

Abschließend möchte ich allen meinen Freundinnen und Freunden sowie meiner Familie für die Unterstützung während der Promotion danken. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen.