

Regulation des Katabolismus von verzweigt-kettigen
Aminosäuren durch die lange nicht-kodierende RNA
mito-lnc

Regulation of the branched chain amino acid
catabolism via the long noncoding RNA *mito-lnc*

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium –

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich für Biologie und Chemie (FB 08)

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

M. Sc. Maria Weiß

Bad Nauheim, September 2020

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Böttger

Zeitgutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

Datum der Disputation:

„Vulnerability is not winning or losing;
it's having the courage to show up and be seen
when we have no control over the outcome.

Vulnerability is not weakness;
it's our greatest measure of courage.”

-- Brené Brown; Rising Strong

Eidestattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bad Nauheim den 11.09.2020

Zusammenfassung

Die funktionelle Analyse von langen, nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) und ihrer Rolle bei der Regulation der metabolischen Homöostase liefern bedeutsame Einblicke in diverse metabolische Regelkreise. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine lncRNA namens *mito-lnc*, welche direkt in die Regulation des essentiellen, verzweigtkettigen Aminosäure (*branched chain amino acid*; BCAA) Metabolismus involviert ist und daher eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase hat.

Die Gruppe der BCAAs umfasst die drei Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, deren Katabolismus eine essentielle Rolle im humanen Stoffwechsel spielt. Die ersten beiden Schritte des Katabolismusweges der BCAAs sind für alle drei Aminosäuren gleich. Zuerst erfolgt der Transaminaseschritt über die *branched chain amino acid transaminase 2* (BCAT2). Die entstehenden Ketoazide werden dann vom *branched chain ketoacid dehydrogenase* (BCKD) Komplex dehydrogenisiert. Der BCKD Komplex ist das Schlüsselenzym bei der Regulation des katabolischen BCAA Fluxes. Mutationen des BCKD Komplexes gehen einher mit schwerwiegenden, oft tödlich verlaufenden Erkrankungen, wie der Ahornsirupkrankheit (Maple syrup urine disease; MSUD).

Wir konnten zeigen, dass die mitochondriell lokalisierte lncRNA *mito-lnc* mit dem BCKD Komplex interagiert und den katabolischen BCAA Flux reguliert. Molekularbiologische Interaktionsstudien bestätigen die alpha-Untereinheit der BCKDH als direkten Interaktionspartner für *mito-lnc*. Die *in vivo* Deletion des genomischen Lokus von *mito-lnc* in der Maus führt schließlich zu einer Verringerung der Aktivität des BCKD Komplexes im Herzen der KO-Mäuse und resultiert in der Akkumulation freier BCAAs im Gewebe. Zusätzlich entwickeln die *mito-lnc* KO-Mäuse weitere Störungen im kardialen Stoffwechsel. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass der Verlust von *mito-lnc* nicht mit einer Veränderung der Zusammensetzung des BCKD Komplexes einhergeht, ebenso konnte eine potentielle Transportfunktion von *mito-lnc* für dessen Interaktion ausgeschlossen werden. Daher vermuten wir für *mito-lnc* eine Funktion als putativer allosterischer Aktivator der E1-Untereinheit des BCKD Komplexes. In Folge der BCAA-Akkumulation zeigen die *mito-lnc* KO-Mäuse eine Aktivierung des mTORC1 Komplexes. Die Aktivierung des mTOR Signalweges resultiert schließlich in der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie in den *mito-lnc* KOMäusen. Die *mito-lnc* induziert also eine Erhöhung des katabolischen Fluxes der BCAAs und sichert die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase.

Summary

The functional analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) and their role in the regulation of metabolic homeostasis are constantly providing meaningful insights into various metabolic control mechanisms. This Thesis describes the function of *mito-lnc*, a lncRNA, which is directly involved in the regulation of essential branched chain amino acid (BCAA) metabolism and thus plays a pivotal role in maintaining metabolic homeostasis.

The group of BCAAs includes the three amino acids valine, leucine and isoleucine, whose catabolism plays an essential role in human metabolism. The first two steps of the catabolic pathway of BCAAs are identical for all three amino acids. First, the transaminase step is carried out via the branched chain amino acid transaminase 2 (BCAT2). The resulting ketoacids are then further processed by the branched chain ketoacid dehydrogenase (BCKD) complex. The BCKD complex is the key enzyme in the regulation of the catabolic BCAA flux. Mutations in the BCKD complex are associated with severe and often lethal diseases, such as maple syrup urine disease (MSUD).

We demonstrated that the mitochondrially localized lncRNA *mito-lnc* interacts with the BCKD complex and regulates the catabolic BCAA flux. Molecular biological interaction studies provided the alpha-subunit of BCKDH as a direct interaction partner of *mito-lnc*. *In vivo* deletion of the genomic locus of *mito-lnc* in mice resulted in the reduction of the BCKD complex activity in KO mice hearts as well as accumulation of free BCAAs in the tissue. Moreover, *mito-lnc* KO mice developed various other disorders associated with the cardiac metabolism. Mechanistically, we showed that the loss of *mito-lnc* is not associated with a change in the composition of the BCKD complex and were able to exclude a potential transport function of *mito-lnc* for its interactome. For these reasons, we suspected that *mito-lnc* might be a putative allosteric activator of the E1 subunit of the BCKD complex, therefore increasing the levels of most amino acids in the heart of the *mito-lnc* KO mice. Furthermore, BCAA accumulation activated the mTOR complex which led to the development of cardiac hypertrophy in the *mito-lnc* KO mice. Finally, it may be concluded that *mito-lnc* induces an increase in the catabolic flux of BCAAs and ensures the maintenance of metabolic homeostasis.

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Lange, nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) und ihre Rolle in der metabolischen Homöostase.....	1
1.2 Metabolismus und Stoffwechselerkrankungen	4
1.3 Der Aminosäure Metabolismus.....	7
1.4 Der BCAA Metabolismus	10
1.4.1 Verzweigt-kettige Aminosäuren - BCAAs (Branched-Chain Amino Acids).....	10
1.4.2 Der BCAA Katabolismus	11
1.4.3 Die Regulation des BCAA Katabolismus.....	14
1.4.4 BCAAs und ihre Rolle als Signalmoleküle.....	14
1.5 mTORC1 – ein zentraler Spieler in der metabolischen Homöostase	16
1.6 Zielsetzung.....	19
2. Methoden.....	20
2.1 Generierung der verwendeten Mauslinien, Genotypisierung und Haltung	20
2.1.1 Tierhaltung.....	20
2.1.2 Generierung einer konstitutiven Knockout Linie.....	20
2.1.4 Methoden zur Genotypisierung von Mauslinien	27
2.2 Tierversuche und Tötung.....	29
2.2.1 Tiertötung	29
2.2.2 Fütterungsversuche	29
2.3 Histologische Analyse von Mausgeweben	30
2.3.1 Einfrieren von Gewebe	30
2.3.2 Einfrieren von Gewebe für Kryoschnitte mittels Pentan-Isobutanol	30
2.3.3 Anfertigen von Kryoschnitten	30
2.3.4 Histologische Färbung von Herz Gewebeschnitten mittels WGA	31

2.3.5. Immunhistochemische Analyse mittels HIKARI KIT	31
2.3.6 Succinat-Dehydrogenase Färbung	32
2.3.7 Isolierung von adulten Kardiomyozyten	32
2.4 Molekularbiologische Experimente.....	33
2.4.1 RNA Extraktion aus dem Gewebe oder aus Zellen	33
2.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion	34
2.4.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	34
2.4.4 RT-PCR zur quantitativen Analyse von RNA.....	34
2.4.5 Affymetrix® GeneChips®	34
2.4.6 Sequenzierung nach Sanger	34
2.4.7 Proteinanalyse mittels Western Blotting.....	35
2.4.8 Proteinextraktion für eine Immunopräzipitation	37
2.4.9 Immunopräzipitation	38
2.4.10 RNA-Pulldown	38
2.4.15 Zellfraktionierung.....	40
2.4.16 RNA-Fluoreszenz- <i>In-situ</i> -Hybridisierung (RNA-FISH).....	40
2.4.17 RNA <i>in-situ</i> Hybridisierung Proximity Ligation Assay (rISH-PLA)	40
2.4.17 Kultivierung und Differenzierung von immortalisierten Zelllinien	41
2.4.18 BCKDH-Aktivitäts Assay.....	42
2.4.19 Metabolomics	43
2.5 Statistische Auswertungen und Analysen	44
2.5.1 Transkriptomanalyse mittels GSEA.....	44
2.5.2 Auswertung der histologischen Analysen mittels ImageJ	44
2.5.3 Statistische Auswertungen der Daten	45
2.5.4 Standardisierung der Daten mittels z-Transformation.....	46
3. Ergebnisse	47

3.1 Kandidatenvalidierung.....	47
3.2 Charakterisierung von <i>mito-lnc</i>	48
3.2.1 in-silico Analyse.....	48
3.2.2 Lokalisierung von <i>mito-lnc</i>	53
3.2.2 Interaktion von <i>mito-lnc</i>	56
3.3 Charakterisierung des <i>in vivo</i> LOF Modells	59
3.3.1 Die Generierung von <i>mito-lnc</i> KO-Mäusen mittels CRISPR/CAS9n	59
3.3.2 Phänotypische Analyse des LOF-Modells	62
3.3.3 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in einer kardialen Hypertrophie	63
3.3.4 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer transkriptionellen Deregulation von Genen involviert im BCAA Metabolismus.....	66
3.3.5 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer verringerten Effizienz im BCAA Katabolismus.....	68
3.3.6 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in einer Störung des metabolischen Gleichgewichts.....	71
3.3.6 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer Aktivierung von mTOR.....	74
3.4 Die Analyse der Funktion von <i>mito-lnc</i>	77
3.4.1 Die erhöhte Supplementierung von BCAAs in <i>mito-lnc</i> KO-Mäusen resultiert in einer verstärkten Akkumulation an freien BCAAs im Serum.....	77
3.4.2 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu keiner Mislokalisierung von mitochondrialen Proteinen.....	80
3.4.3 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in keiner Veränderung der Komplexzusammensetzung von BCKDC	82
3.5 Eine Rückkreuzung in den genetischen C57BL/6J Hintergrund hat eine Regression des kardialen Phänotyps zur Folge.....	84
4. Diskussion.....	88
4.1 Kandidatenvalidierung.....	88

4.1 <i>mito-lnc</i> ist eine mitochondriell-assoziierte lncRNA	88
4.2 Der BCKD Komplex ist der Interaktionspartner von <i>mito-lnc</i>	89
4.3 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> induziert eine kardiale Hypertrophie	90
4.4 Die Aktivität des BCKD Komplexes wird reguliert von <i>mito-lnc</i>	92
4.5 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in Veränderungen im Metabolithaushalt.....	93
4.5.1 Aminosäuren.....	94
4.5.3 α -Ketoglutarat und BAIBA.....	95
4.5.3 Hydroxyprolin, Thioprolin und CoASH's	97
4.6 mTORC1-der Mediator bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie?.....	97
4.7 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> induziert eine Akkumulation der glykolytischen Muskelfasern	100
4.8 Die Funktion von <i>mito-lnc</i>	102
4.8.1 Die <i>mito-lnc</i> hat keine Transportfunktion.....	102
4.8.2 Der Verlust von <i>mito-lnc</i> geht nicht einher mit der Änderung der Komplezzusammensetzung	102
4.9 Die Analyse von <i>mito-lnc</i> im Vergleich von C57BL/6J- und 129/SvJ-Mäusen	104
4.10 Ausblick.....	106
5. Literaturverzeichnis.....	109
6. Verzeichnisse.....	119
6.1 Abkürzungsverzeichnis	119
6.2 Abbildungsverzeichnis	126
6.3 Tabellenverzeichnis	128
7. Appendix.....	130
7.1 Materialien	130
7.2 Anhang: Abbildungen	137
Danksagung	146

1. Einleitung

1.1 Lange, nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) und ihre Rolle in der metabolischen Homöostase

Lange Zeit galt hinsichtlich der Genexpression das Dogma DNA → RNA → Protein. Doch mit der Entdeckung der Funktion von diversen nicht-kodierenden Genen folgte ein Wandel in der Wissenschaft gefolgt von einem großen sich ergebenden Pool an Möglichkeiten zur Ursachenanalyse in der Medizinforschung und damit einhergehend die Entwicklung neuer Therapieansätze für diverse Krankheitsbilder. Im Gegensatz zu vielen protein-kodierenden Genen sind lncRNAs äußerst Spezies- und Gewebespezifisch exprimiert und zudem sehr flexibel in ihrer Funktion auf Basis ihrer Molekülstruktur. [20-22]

Nicht-kodierende RNAs lassen sich anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften und Funktionsweisen in unterschiedliche Klassen einstufen. Ihre Klassifizierung kann nach ihrer Größe, ihrer genomischen Lokalisierung, oder ihren strukturellen Eigenschaften erfolgen. Nicht-kodierende RNAs ≤200 bp Nukleotidlänge werden als kleine, nicht-kodierende RNAs bezeichnet. Zu ihnen gehören die *transfer RNAs* (tRNAs), *small nucleolar RNAs* (snoRNAs), *small nuclear RNAs* (snRNAs), *piwi protein-associated RNAs* (piRNAs) und *microRNAs* (miRNAs). RNAs ≥200 bp gelten als lange, nicht-kodierende RNAs. Die Gruppe der nicht-kodierenden RNAs, länger als 200 bp beinhaltet die ribosomale RNA (rRNA) und die langen, nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs). Zu den lncRNAs werden auch *antisense RNAs* (AS-RNAs), sowie *enhancer RNAs* (eRNAs) gezählt. Des Weiteren werden lncRNAs auch als regulatorische RNAs bezeichnet, während rRNAs zur Gruppe der *housekeeping RNAs* gezählt werden. Die lncRNAs werden über ihre Länge, ihre intergenomische Lokalisierung und ihre Exon/Intron Struktur definiert und dementsprechend in verschiedene Klassen aufgeteilt (Abb. 1.1). Ein Faktor bei der Charakterisierung von lncRNAs ist das Kodierungspotential. Dieses beruht unter anderem auf dem Vorhandensein und der Länge der offenen Leserahmen (ORF's) der entsprechenden RNA. Die meisten lncRNAs haben nur äußerst kurze oder gar keine ORF's innerhalb ihrer Basenabfolge und folglich ein niedriges Kodierungspotential. [28] Sie werden, wie auch mRNAs, von der RNA Polymerase II (RNA PolII) transkribiert und können gespleißt werden. Weiterhin haben auch lncRNAs eine 5' cap und sind polyadenyliert. Meist sind sie jedoch deutlich schwächer exprimiert als protein-kodierende mRNAs. Ihre Molekülstruktur bietet die Möglichkeit für ein großes

Spektrum an Interaktionspartnern. Die Interaktion von lncRNAs kann mit DNA und RNA Molekülen sowie mit Proteinen erfolgen und erweitert so das Funktionsspektrum der langen, nicht-kodierenden RNAs (Abb. 1.1). Die Möglichkeiten zur Lokalisierung von lncRNAs bieten weitere Optionen zur Expression ihrer diversen regulatorischen Funktionen. Die lncRNAs spielen dadurch eine besonders interessante Rolle bei der Regulation der nuklearen und extranuklearen Genexpression sowie auch bei diversen metabolischen Prozessen. [20-28]

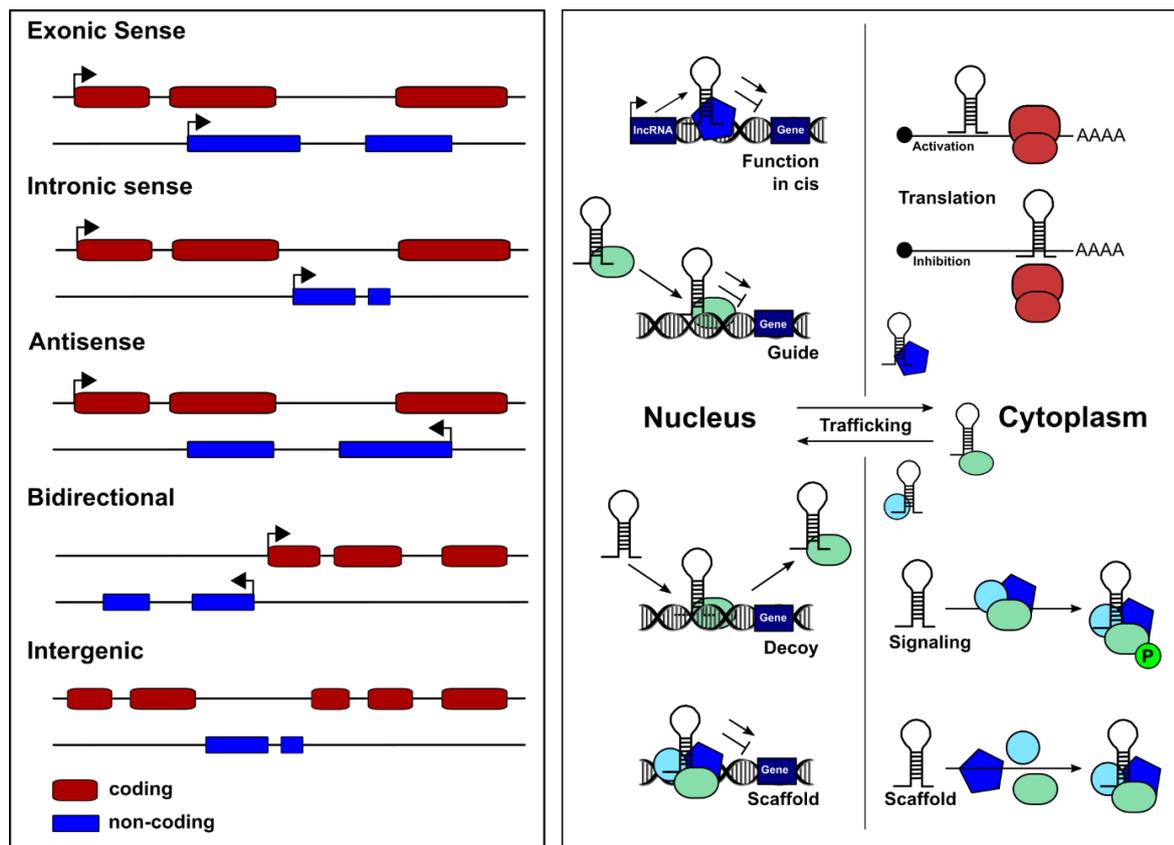


Abb. 1.1 Klassifizierung und Funktion von lncRNAs. (A) Klassifizierung von lncRNAs über ihre genomische Lokalisierung. Die lncRNAs (Blau), die in Leserichtung mit Exonen von protein-kodierenden Genen (Rot) überlappen, werden als exonisch *sense* bezeichnet. Liegen diese im intronischen Bereich des kodierenden Gens sind sie intronisch *sense*. *Antisense* lncRNAs überlappen mit protein-kodierenden Genen, werden jedoch in dessen *antisense* Richtung transkribiert. Bidirektionale lncRNAs teilen sich häufig eine Promotorregion mit dem <1 kb *upstream* liegenden protein-kodierenden Nachbarn, werden aber entgegengesetzt transkribiert. Die lncRNAs, welche zwischen zwei protein-kodierenden Genen lokalisiert sind, werden als intergenische lncRNAs bezeichnet. (B) Die Funktionsweise von lncRNAs ist vielfältig und hängt zudem stark von deren zellulärer Lokalisierung ab. Im Nukleus beeinflussen sie die Transkription ihrer jeweiligen Zielgene über spezifische RNA-DNA und RNA-Protein Interaktionen. Im Zytoplasma können lncRNAs einerseits die Expression ihrer Zielgene durch RNA-RNA Interaktion regulieren, andererseits liefern RNA-Protein Interaktionen weitere Möglichkeiten zur Regulation von Signalwegen. [verändert nach 89,28]

Die Regulation der metabolischen Homöostase über lncRNAs ist sehr vielfältig, genau wie die individuellen Funktionen der einzelnen RNAs (Abb. 1.2). Abhängig vom Zeitpunkt der Expression, sowie der Lokalisierung, konnte für metabolisch exprimierte lncRNAs häufig eine Korrelation deren Funktion mit diversen physiologisch, pathologischen Veränderungen festgestellt werden. [26-28] Besonders prominent sind dabei lncRNAs, die spezifisch in der Leber und im Fettgewebe exprimiert werden [26]. Diese stehen gehäuft im Zusammenhang mit Adipositas, Insulin Resistenz (IR) und kardiovaskulären Krankheiten (CVDs) in Folge unterschiedlicher metabolischer Veränderungen [26]. Besonders im Fettgewebe exprimierte lncRNAs spielen metabolisch eine bedeutende Rolle, da das Fettgewebe besonders wichtig bei der Aufrechterhaltung der Energiebilanz des Körpers ist. Die meisten im Fettgewebe beschriebenen lncRNAs sind regulatorisch bei der Adipogenese, sowie auch dem Metabolismus der Adipozyten aktiv. [26, 29-31] Für Neat1 konnte zum Beispiel eine kernlokalisierte Interaktion mit miR-140 zur Inhibierung der Adipogenese gezeigt werden [32].

Auch unabhängig von der gewebespezifischen Expression können lncRNAs die metabolische Homöostase des Körpers regulieren [26]. Die lncRNA H19 kodiert für zwei miRNAs, welche eine Rolle bei der Muskelregeneration spielen. Gleichzeitig reduziert H19 auch die Expression von Klasse II HDACs (*Histone Deacetylases*), welche eine wichtige Rolle bei der Adipogenese spielen und nimmt somit Einfluss auf den Energiehaushalt des Körpers. Als ein weiteres Beispiel für organübergreifende Funktionsweisen von lncRNAs kann erneut Neat1 genannt werden. Wie bereits erwähnt spielt diese eine wichtige Rolle bei der Adipogenese. Für Neat1 konnte jedoch zusätzlich eine starke Expression im Gehirn gezeigt werden, wo sie im Zusammenhang mit der Synapsenbildung steht. [26,32-33]

Im Herzmuskel wurden bereits einige besonders in der Entwicklung beteiligte lncRNAs beschrieben. Bis heute jedoch keine, die im direkten Zusammenhang mit der Regulation des kardialen Metabolismus steht. Ähnlich sieht dies auch in der Skelettmuskulatur aus. Obwohl einige der beschriebenen lncRNAs im Zusammenhang mit ihrer Rolle in der Muskeldifferenzierung auch einen Einfluss auf deren Physiologie und somit einen putativen Effekt auf den Metabolismus haben, konnte bislang keine muskuläre lncRNA mit direkter metabolisch-regulatorischer Funktion gezeigt werden. [26]

Die Leber spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase. Folglich ist die Erforschung von lncRNAs, involviert in die Regulation des

hepatischen Stoffwechsels weitaus fortgeschrittener [26]. Die lncRNA SRA (*steroid receptor RNA activator*) wurde beschrieben bei der Regulation der Fettsäure beta-oxidation in der Leber beteiligt zu sein [34].

Diese Beispiele metabolisch involvierter lncRNAs spiegeln die Komplexität der Funktion von lncRNAs und damit einhergehend auch die putativen Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für eine Vielzahl metabolischer Erkrankungen.

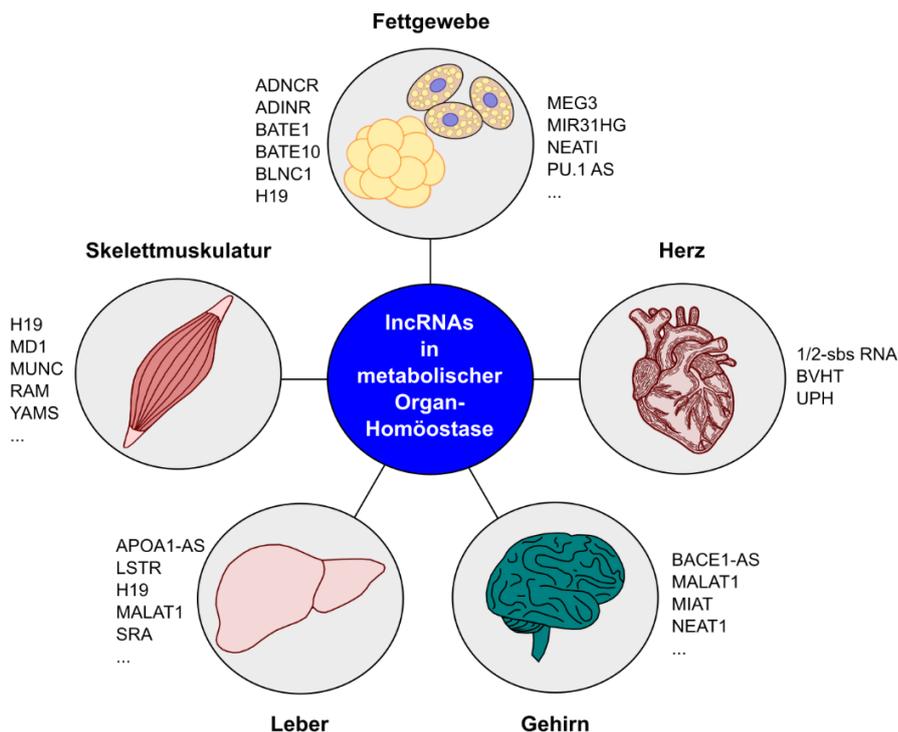


Abb. 1.2: Übersicht metabolisch relevanter lncRNAs. Die lncRNAs, die spezifisch in metabolisch aktiven Organen exprimiert werden, spielen häufig auch eine Rolle in diversen Regulationsmechanismen der metabolischen Homöostase. [verändert nach 26]

1.2 Metabolismus und Stoffwechselerkrankungen

Der Begriff Metabolismus beschreibt bildungssprachlich Prozesse der Umwandlung und Veränderung. In der Biologie wird darunter der Stoffwechsel eines Organismus beschrieben. Stoffwechselprozesse sind überlebenswichtige Vorgänge zur Energiespeicherung und der Erhaltung der Körpersubstanz. Die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase des Körpers erfordert eine enge Zusammenarbeit der aktiv am metabolischen Flux beteiligten Organe. Dazu gehören vor allem die Leber, die Skelettmuskulatur, das Fettgewebe und auch das Herz. Charakterisiert wird der Begriff

Metabolismus durch die Umsetzung oder den Abbau von Nahrung und deren Umwandlung in diverse Metabolite. Dabei werden anaboler und kataboler Stoffwechsel unterschieden (Abb. 1.3). Katabole Reaktionen liefern Energie gespeichert in Metaboliten, wie zum Beispiel ATP, welche wiederum für anabole Stoffwechselprozesse verwendet werden. Über die Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate, Fette und Proteine werden im Katabolismus unter anderem zu Glukose, Pyruvat und Acetyl-CoA umgesetzt. Diese Metabolite können im Anabolismus zur Synthese essentieller Bestandteile verstoffwechselt werden. Glukose wird in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt, welches für die Produktion von Acetyl-CoA benötigt wird. Zentral im Metabolismus befindet sich der TCA-Zyklus. Dieser beinhaltet Anabole, wie auch katabole Stoffwechselprozesse. Die Aufrechterhaltung der metabolischen Körperhomöostase erfordert eine strenge Regulation der metabolischen Prozesse des Körpers und somit eine, gut aufeinander abgestimmte, interorganische Kommunikation. Ermöglicht wird dies über ein großes Netzwerk vielfältiger Signalkaskaden. Hinzu kommt die individuelle Organspezifität. Jedes Organ hat seine eigenen Bedürfnisse hinsichtlich der Eigen-Versorgung von Nährstoffen und Metaboliten, sowie als auch, mit seiner Funktion in der gesamten metabolischen Körperhomöostase. [1-10]

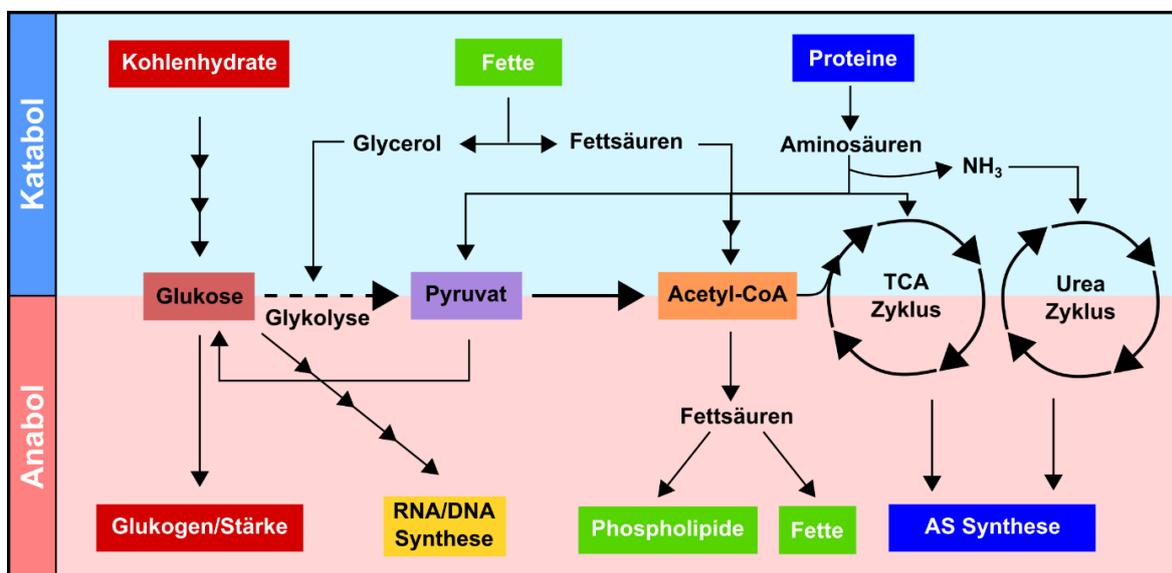


Abb. 1.3: Übersicht des anabolen und katabolen Stoffwechsels. Über die Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate, Fette und Proteine werden im Katabolismus unter anderem zu Glukose, Pyruvat und Acetyl-CoA umgesetzt. Diese Metabolite können im Anabolismus zu Synthese körperwichtiger Bestandteile, wie Glukogen, Phospholipiden, Fetten, RNA/DNA und Aminosäuren verstoffwechselt werden. Zentral im Metabolismus befindet sich der TCA-Zyklus. Dieser beinhaltet Anabole, wie auch katabole Stoffwechselprozesse. [verändert nach 204]

Viele chronische Stoffwechselerkrankungen wie zum Beispiel Diabetes, Insulin Resistenz (IR) oder Adipositas zeigen Störungen im Metabolithaushalt. und gehen einher mit einer pathologischen Veränderung der metabolischen Rate der betroffenen Organe. Die Veränderungen des metabolischen Fluxes, sowie der Metabolitkonzentrationen kann vor allem Folgeerkrankungen des kardiovaskulären Systems nach sich ziehen (Abb. 1.4). Das Extrembeispiel metabolischer Störungen ist dabei das metabolische Syndrom. Von diesem spricht man beim Auftreten mehrerer metabolischer Gesundheitsrisiken. Dazu zählt man im Allgemeinen Diabetes, Adipositas, Bluthochdruck und erhöhte Blutfettwerte, auch als „tödliches Quartett“ bezeichnet. Das metabolische Syndrom ist prädestiniert für die Entwicklung von kardiovaskulären Krankheiten (CVDs) und Schlaganfällen. Ursachen sind häufig ein ungesunder Lebensstil, wie zum Beispiel die falsche Ernährung im Zusammenhang mit akutem Bewegungsmangel, aber auch genetische Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Wichtig ist jedoch, dass bereits jedes dieser Risikofaktoren allein schon ein erhöhtes Risiko bergen kann an CVD zu erkranken. Bis heute sind die zu Grunde liegenden molekularbiologischen Ursachen der Entstehung des metabolischen Syndroms allerdings nicht vollständig geklärt. [11-19]

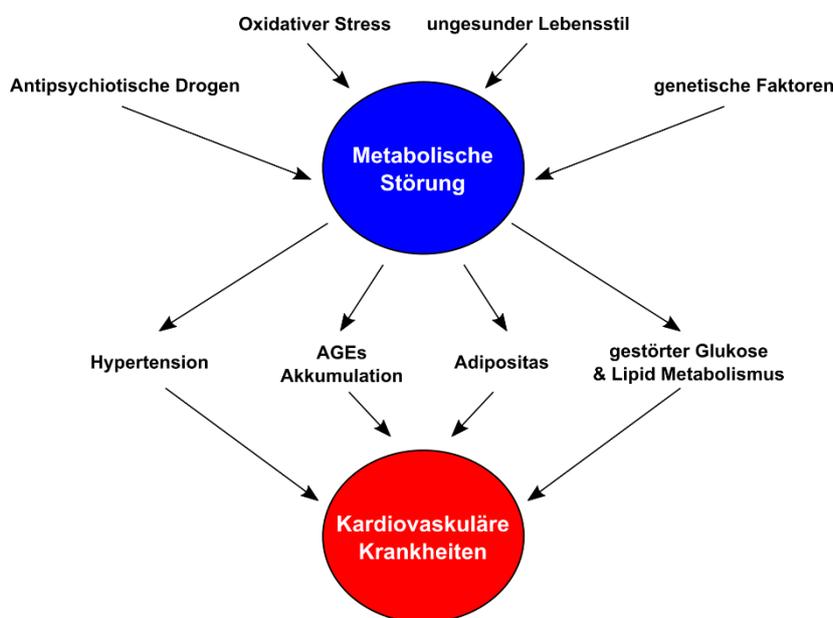


Abb. 1.4: Kardiovaskuläre Krankheiten als Resultat metabolischer Störungen. Diverse äußere Faktoren wie oxidativer Stress, antipsychotische Drogen, ein ungesunder Lebensstil oder die Genetik können den Stoffwechsel negativ beeinflussen. Solche metabolischen Störungen können Sekundäreffekte, wie

Bluthochdruck, Gewichtszunahme, AGE Akkumulierung, sowie zu Störungen im Glukose- und Lipidstoffwechsel zur Folge haben. Die langfristige Folge ist meist eine pathologische Störung des Herz-Kreislaufsystems. [verändert nach 17,18,86]

1.3 Der Aminosäure Metabolismus

Einen wichtigen Anteil bei der metabolischen Homöostase spielt der Aminosäurestoffwechsel. Aminosäuren (AS) bilden den Grundstein der Proteinbiosynthese und damit auch für das Zellwachstum. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Stickstoffhaushalt und bei der Signalwirkung zur Regulation der metabolischen Homöostase. Auch im Energiehaushalt und dem Kohlenhydratstoffwechsel sind Aminosäuren nicht weg zu denken.

Aminosäuren sind organische Kohlenstoffverbindungen mit mindestens einer Amino- ($-NR_2$) und Carboxygruppe ($-COOH$). Hinsichtlich der Position der Aminogruppe zur Carboxygruppe bilden Aminosäuren eine α -, β -, oder γ -Struktur aus. Die Klasse der α -Aminosäuren beinhaltet die proteinogenen Aminosäuren, welche zur Proteinbildung verwendet werden. Es gibt 20 Aminosäuren, die zu den kanonischen und proteinogenen Aminosäuren gezählt werden (Tabelle 1.1). Neun von ihnen sind für den Menschen essentiell und müssen über die Nahrung aufgenommen werden. Zu ihnen zählen Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin. Aminosäuren haben mindestens zwei funktionelle Gruppen und eine Seitenkette „R“ (mit Ausnahme Glycin), welche entscheidend für das chemische Verhalten und die Eigenschaften der Aminosäuren sind. Die Kombination von basischer Aminogruppe und saurer Carboxygruppe machen so aus Aminosäuren gleichzeitig Säure und Base. Aminosäuren haben auf Basis ihrer Seitenkette unterschiedliche Eigenschaften und werden daher in aliphatische, aromatische, amidierete, hydroxylierte, schwefel-enthaltende, sowie basische und saure Aminosäuren unterteilt. [35-42]

Tabelle 1.1: Übersicht der 20 kanonischen, proteinogenen AS

Name	Abk.	Symbol	Seitenketten
Alanin	Ala	A	Aliphatische
Glycin	Gly	G	Aliphatische
Isoleucin	Ile	I	Aliphatische
Leucin	Leu	L	Aliphatische
Prolin	Pro	P	Aliphatische
Valin	Val	V	Aliphatische
Asparagin	Asn	N	Amidierte
Glutamin	Gln	Q	Amidierte
Phenylalanin	Phe	F	Aromatische
Tryptophan	Trp	W	Aromatische
Tyrosin	Tyr	Y	Aromatische; Hydroxylierte
Serin	Ser	S	Hydroxylierte
Threonin	Thr	T	Hydroxylierte
Arginin	Arg	R	Basische
Histidin	His	H	Basische
Lysin	Lys	K	Basische
Aspartat	Asp	D	Saure
Glutamat	Glu	E	Saure
Cystein	Cys	C	Schwefel-enthaltende
Methionin	Met	M	Schwefel-enthaltende; Aliphatische

[verändert nach 83,84,90,205]

Auch die nicht-proteinogenen Aminosäuren spielen eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Körperhomöostase. Diese werden größtenteils aus den 20 proteinogenen α -Aminosäuren gebildet. Einige der nicht-proteinogenen Aminosäuren wie GABA oder BAIBA fungieren als Neurotransmitter und haben eine essentielle Signalwirkung, welche nicht nur auf das Nervensystem begrenzt ist. Weitere nennenswerte, nicht-proteinogen Aminosäuren sind zum Beispiel Thyroxin, DOPA (Dihydroxyphenylalanin) und Ornithin. [43-46]

Als Aminosäurestoffwechsel bezeichnet man den allgemeinen Vorgang des Abbaus, sowie der Produktion von Aminosäuren (Abb. 1.5). Der Abbau von Aminosäuren beginnt meist mit deren Deaminierung zu α -Ketoaziden unter Abspaltung der Aminogruppe, welche später in den Harnstoffzyklus eingebracht wird. Die α -Ketoazide werden unter anderem zur Produktion von Fettsäuren, Ketonkörpern und Glukose verwendet. Im Zusammenhang mit ihrem Abbau wird daher eine weitere Unterteilung in ketogene, glukogene und gemischt keto- und glukogene Aminosäuren vorgenommen. Die Abbauprodukte ketogener Aminosäuren werden in den Zitrat-Zyklus eingespeist, während der Abbau glukogener Aminosäuren der Glukoneogenese zu Gute kommt. [39,46-47]

Veränderungen im Aminosäure Haushalt stehen häufig im Zusammenhang mit diversen pathologischen Veränderung des menschlichen Körpers. So sind Krankheiten wie das metabolische Syndrom und dessen Folgeerkrankungen assoziiert mit Veränderungen im

Aminosäurehaushalt. In diesem Zusammenhang konnten vor allem Störungen der aromatischen und verzweigtkettigen Aminosäure gezeigt werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Level der Aminosäure Isoleucin, Tyrosin und Phenylalaninwaren im Zuge kardiovaskulärer Krankheiten (CVD's) pathologisch verändert waren. [35-37, 203]

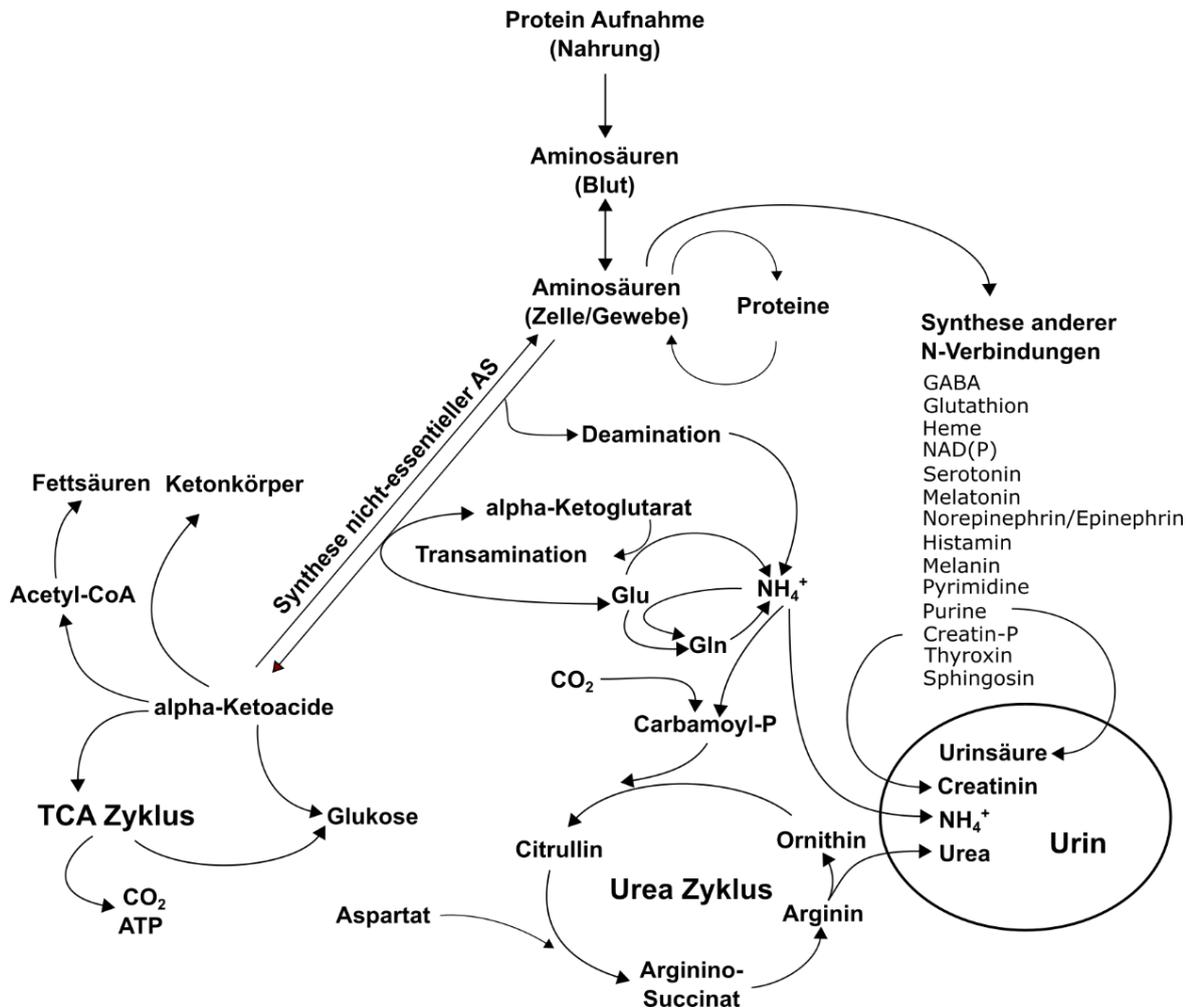


Abb.: 1.5: Schematische Darstellung des Aminosäurestoffwechsels. Die Degradierung von Aminosäuren beginnt mit deren Aufnahme über die Nahrung in den Organismus. Die aufgenommenen Aminosäuren werden deaminiert bzw. transaminiert, wobei α -Ketoglutarat zu Glutamat umgewandelt wird und α -Ketoazide entstehen. Diese werden vom Körper weiter verwendet und zur Synthese von Ketonkörpern, Fettsäuren oder Glukose genutzt. Auch im TCA-Zyklus werden Ketoazide verwendet. Der abgespaltene Stickstoff der katabolisierten Aminosäuren geht wiederum in den Urea Zyklus ein, oder wird direkt als NH_4^+ über den Urin ausgeschieden. Aminosäuren können außerdem zur Synthese weiterer Stickstoffhaltiger Verbindungen verwendet werden. Darunter zum Beispiel die Neurotransmitter GABA, Melatonin oder Serotonin. Auch zur Synthese von Purinen und Pyrimidinen werden Aminosäuren benötigt. [verändert nach 206]

1.4 Der BCAA Metabolismus

1.4.1 Verzweigt-kettige Aminosäuren - BCAAs (*Branched-Chain Amino Acids*)

Die drei BCAAs Leucin, Valin und Isoleucin gehören zu den essentiellen Aminosäuren (AS). BCAAs machen etwa 35 % der essentiellen Aminosäuren in Säugetieren aus. Die funktionelle Gruppe aller BCAAs ist verzweigt-kettig, klein und hydrophob (Abb. 1.6 A). Der BCAA Metabolismus ist in allen Lebensformen sehr ähnlich und überwiegend konserviert. Der Abbau von BCAAs findet vor allem in der Leber, der Niere, der Skelettmuskulatur, im adipogenen Gewebe und dem Herzen statt. Doch auch im zentralen Nervensystem (ZNS) spielen BCAAs eine essentielle Rolle. Im ZNS sind BCAAs essentiell für die Neurotransmittersynthese, die Proteinsynthese und die Regulation der Nahrungsaufnahme. [48-51]

Der Abbau von BCAAs dient unter anderem der Produktion von Acetyl-CoA, welches vor allem in den Tricarbonsäure (TCA) Zyklus eingespeist wird. BCAAs sind zudem wichtige Stickstofflieferanten für die Synthese von Alanin und Glutamin im Skelettmuskel. Sie sind außerdem für die Glutaminsäure-Neurotransmittersynthese im ZNS von essentieller Bedeutung. BCAAs und ihre Intermediate wirken auch als Signalmoleküle und haben so einen Einfluss auf diverse Stoffwechselprozesse, wie der Proteinbiosynthese, oder der Insulin Sekretion. Da es sich bei BCAAs um essentielle Aminosäuren handelt, muss deren Aufnahme, sowie ihr Abbau vom Organismus präzise im Gleichgewicht gehalten werden. Die Menge an freien BCAAs kann in zwei unterschiedliche Pools aufgeteilt werden, den zirkulierenden Anteil im Blut und den Anteil im Gewebe. Über die Nahrung aufgenommene BCAAs befinden sich zunächst zirkulierend im Blut, von wo aus sie dann den verschiedenen Organen im Körper zur Verfügung gestellt werden. Ungenutzt werden die BCAAs über den Urin wieder ausgeschieden. Interessanterweise kann so bei sehr geringen BCAA Konzentrationen deren oxidativer Katabolismus erhöht werden, um eine Vergeudung der essentiellen Aminosäuren so gering wie möglich zu halten. Dies ermöglicht die schnelle Verarbeitung der Aminosäuren, um so die aufgenommenen BCAAs effizient nutzen zu können. [48,50,60]

1.4.2 Der BCAA Katabolismus

Der gesamte oxidative Prozess des BCAA Katabolismus (Abb. 1.6 C) findet in der inneren Membran an der inneren Oberfläche der Mitochondrien statt. Der Katabolismus aller drei BCAAs beginnt zunächst mit der Transaminierung durch die *branched chain* amino-Transferasen (BCATs). Der Prozess der Transaminierung ist dabei reversibel. Es existieren zwei Isoenzyme der BCAT, die BCAT1 (cBCAT) und die BCAT2 (mBCAT). Während die BCAT1 ein zytoplasmatisches Protein ist, stellt die BCAT2 ein mitochondriales Protein dar. Die BCAT1 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, während die BCAT2 ubiquitär, mit Ausnahme der Leber, exprimiert wird. Beide Isozyme sind Vitamin B6 oder Pyridoxalphosphat abhängig. Die aus der Transaminierung resultierenden alpha-Ketoazide (BCKAs) werden im folgenden Schritt, irreversibel, durch den *branched chain amino acid dehydrogenase* (BCKDH) Komplex oxidiert. Der BCKDH Komplex katalysiert dabei eine oxidative Decarboxylierung, wobei eine CoA-Gruppe, unter CO₂ Abspaltung, kovalent an das oxidierte Ketoazid gebunden wird. Der BCKDH Komplex (Abb. 1.6 B) besteht aus drei Untereinheiten (E1, E2, E3). Die E1 Untereinheit ist eine Thiamin-abhängige Decarboxylase, welche als alpha2/beta2 Heterotetramer vorliegt. Kodiert wird diese vom *Bckdha* und *Bckdhb* Gen. Die E2 Untereinheit des BCKD Komplexes ist eine Lipoate-abhängige Dihydrolipoyl Transacylase, welche vom *Dbt* Gen kodiert wird. DBT ist zuständig für den Transfer der Acyl-Gruppe an das Coenzym A. Die E3-Untereinheit ist eine FAD-abhängige Dihydrolipoyl Dehydrogenase, welche vom *Dld* Gen kodiert wird. DLD ist zuständig für den Transfer des Elektrons zu NAD⁺. Der Katabolismus im Anschluss an die Decarboxylierung der α -Ketoazide ist spezifisch für jedes der drei BCAAs (Abb. 1.6 C). [48,50,52-54]

Die Metabolite des BCAA Katabolismus gehen in das CoA-Addukt ein, um im Anschluss im TCA-Zyklus, in die Ketogenese einzutreten. Jedoch können manche Metabolite den beschriebenen katabolischen Stoffwechselweg der BCAAs verlassen. Diese sind jedoch nur geringfügig untersucht und bei Weitem nicht vollends verstanden. Im Falle des Valin und Leucin Stoffwechsels sind zudem einige Besonderheiten zu erwähnen. Im Falle von Leucin wird im letzten Schritt des Stoffwechselweges Acetyl-CoA und Acetoacetat gebildet. Acetoacetat kann ohne Eintritt in den TCA-Zyklus, also vor der eigentlichen Ketonoxidierung, aus der Mitochondrien Matrix diffundieren. Ein weiteres nennenswertes Intermediat ist β -Hydroxy-Butyrat (3-HIB). 3-HIB ist ein Produkt des Valin Katabolismus, welches durch die Abspaltung des Coenzym A von β -Hydroxyisobutyryl-CoA entsteht. Im

weiteren Verlauf des Valin Katabolismus wird das Coenzym A an Methylmalonat-Semialdehyd erneut gebunden. [48,50,55-57]

Die Ketogenese der BCAAs liefert zusätzlich 3-Hydroxyazide. Diese entstehen vor der Produktion von Propionyl-CoA oder 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und werden als 3-Hydroxyazide (*3-Hydroxy-2-Methylbutyric Acid*, *3-Hydroxy-2-Ethylpropionic Acid*, *3-Hydroxy-Isovaleric Acid*) freigesetzt. Auch bei der Synthese diverser Lipide sind BCAAs involviert. So wird der Kohlenstoff von Leucin und Isoleucin auch für die *de-novo* Lipogenese in Adipozyten verwendet. Adipozyten nutzen unter anderem Propionyl-CoA und Malonyl-CoA um, mit Hilfe der Fettsäure Synthase, ungeradkettige Fettsäuren zu generieren (Crown, Marze et al. 2015). Die Synthese von verzweigt-kettigen Fettsäuren erfolgt ebenfalls mittels der Fettsäure Synthase, welche Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA und 2-Methylbutyryl-CoA als Substrate verwendet. Diese speziellen Lipide sowie die erwähnten Metabolite des Stoffwechselweges der BCAAs konnten in sehr geringen Konzentrationen im Serum oder dem Urin von gesunden Menschen detektiert werden. Ihre genaue Bedeutung bei der metabolischen Homöostase ist allerdings immernoch unklar. [48,50,55,58-59, 201]

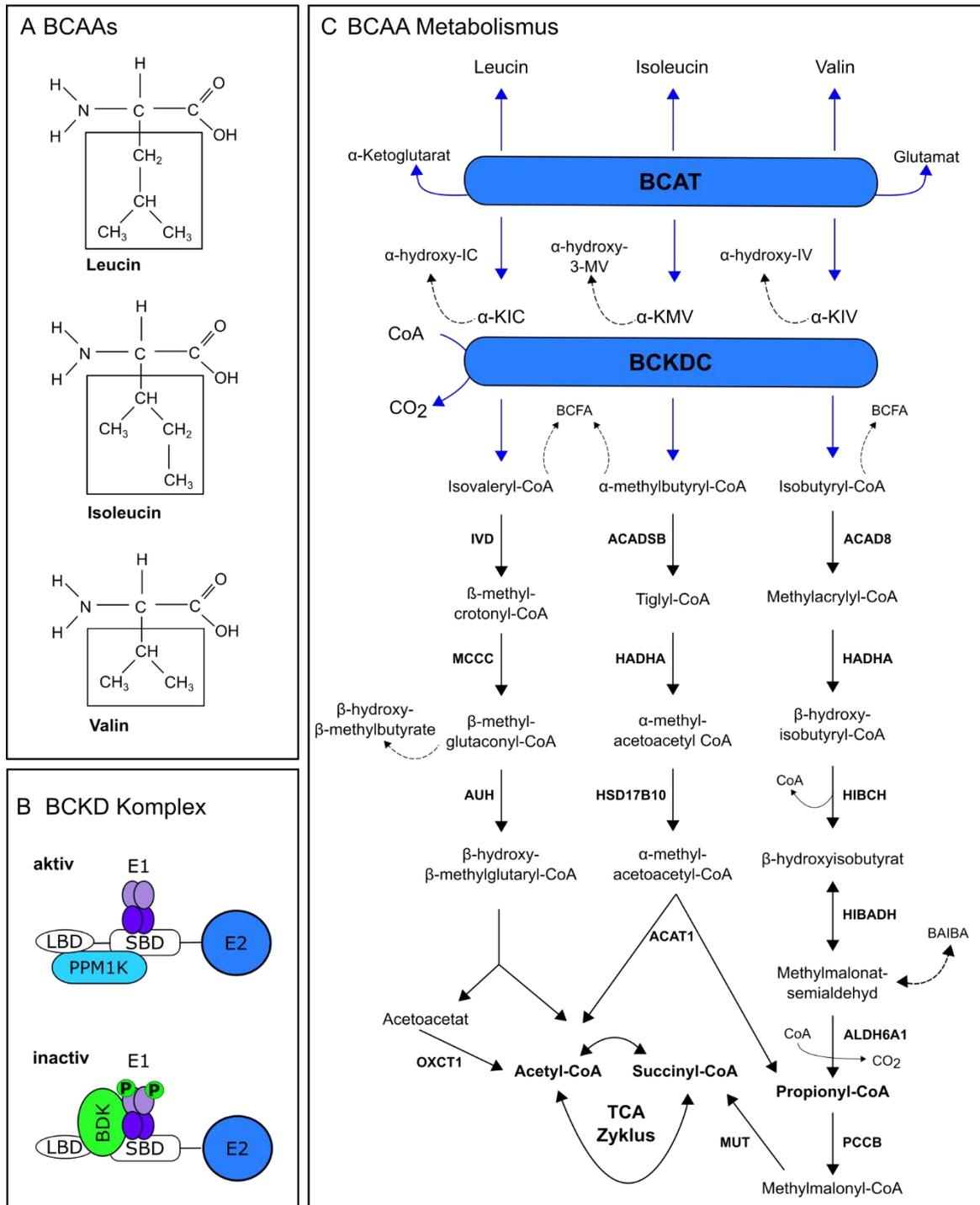


Abb. 1.6: BCAA Metabolismus. (A) Strukturformeln der essentiellen BCAAs Leucin, Isoleucin und Valin. (B) Vereinfachte Darstellung der Untereinheiten E1 und E2 des BCKD Komplexes. Der BCKD Komplex besteht aus drei Untereinheiten (E1, E2, E3). Die Untereinheiten E1 (BCKDH) und E3 (DLD) befinden sich alternierend um den E2 (DBT) Kern des Komplexes. Die E1 Untereinheit wird aus dem Heterodimer der BCKDH gebildet. Diese kann am Serin 293 phosphoryliert werden. Die Aktivität des BCKD Komplexes wird über diese Phosphorylierung gesteuert. Im unphosphorlierten Zustand ist der Komplex aktiv. Die Kinase BDK phosphoryliert die E1 Untereinheit und inaktiviert den Komplex. Die Phosphatase PPM1K ist wiederum für die Dephosphorylierung und damit einhergehenden Aktivierung des BCKD Komplexes verantwortlich. (C) Detaillierte Übersicht über den BCAA Metabolismus. [verändert nach 53,62,85,206,207]

1.4.3 Die Regulation des BCAA Katabolismus

Die Aktivität des BCAA Metabolismus wird hauptsächlich von der Aktivität des BCKD Komplexes bestimmt. Diese wird über die Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung der BCKDHA (E1) am Serin 293 reguliert. Die Phosphorylierung führt zur Inaktivierung der Hydrogenase und wird über die BCKDH Kinase (BDK) katalysiert. Die Kinase kann allosterisch durch die verzweigt-kettigen Ketoazide (BCKAs) inhibiert werden, was in einem positiven *feedbackloop* resultiert. Ist die Konzentration der Ketoazide hoch, wird deren Oxidation durch die Inhibierung der Kinase erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transaminase BCATm physikalisch mit der E1 Untereinheit des BCKDH Komplexes assoziiert ist. Diese Enzyme bilden ein sogenanntes Metabolon, ein organisierter supramolekularer Komplex der die Übertragung der α -Ketoazide von der BCATm auf die E1-Untereinheit des BCKDH Komplexes ermöglicht. Diese Interaktion erhöht die Aktivität der BCKDH und steht in Konkurrenz mit der inaktivierenden Kinase. Die Interaktion zwischen der E1 Untereinheit des BCKDH Komplexes mit der BCATm wird durch die Phosphorylierung destabilisiert. Auch Metabolite wie NADH und die Acyl-CoAs haben eine regulatorische Wirkung auf die Aktivität der BCKDH, allerdings eine inhibierende. [48,50,60]

Die Phosphoregulatorisch wirksamen Enzyme, BDK und PPM1K spielen auch im Lipid Metabolismus, bei der Regulation der ATP-Zitrat Lyase eine essentielle Rolle. Dies suggeriert einen interessanten regulatorischen Zusammenhang zwischen dem BCAA und dem Lipid Metabolismus und verdeutlicht die wichtige Rolle des BCAA Stoffwechsels im Metabolithaushalt. [48,50,61-62]

1.4.4 BCAAs und ihre Rolle als Signalmoleküle

Wie bereits erwähnt fungieren BCAAs und ihre Metabolite nicht nur als Kohlenstoffquelle bei der Ketogenese, sondern auch als wichtige Signalmoleküle und allosterische Regulatoren. Leucin ist dabei die AS mit der, bis heute größten, zugeschriebenen Bedeutung. So reguliert Leucin zum Beispiel die Insulin Sekretion durch die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase (GDH). Auch bei der Regulation der Proteinsynthese und dem Zellwachstum spielt Leucin, auf Grund seiner aktivierenden Wirkung auf mTOR (*mechanistic/mammalian Target Of Rapamycin*), eine essentielle Rolle (Abb. 1.7). [48,50]

Eine weitere wichtige Signalwirkung von Leucin ist die allosterische Aktivierung der GDH. Die GDH katalysiert die oxidative Deaminierung von Glutamat zu α -Ketoglutarat (α -KG). Das ADP (Adenosine 5'-Diphosphat) aktiviert die GDH während GTP (Guanosin 5'-Triphosphat) eine inhibierende Wirkung hat. Die Aktivität der GDH führt schlussendlich zur Produktion von ATP und α -KG. Bei sinkenden Glukose Konzentrationen steigt das Level von ADP, was eine Aktivierung der GDH zur Folge hat. Die Signalwirkung von ATP führt so zu einer Inhibierung der KATP Kanäle. Die daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran induziert anschließend die Freisetzung von Insulin. Die aktivierende Wirkung von Leucin auf die GDH beruht auf einer direkten Bindung, welche deren Affinität zu ADP erhöht. Dies steigert die ATP Produktion und die daraus resultierende Insulin Sekretion. Auch das Ketoazid von Leucin, α -KIC (Ketoisocaproat), ist bekanntermaßen ein Stimulator zur Insulin Sekretion. Dies beruht auf dem Vorgang der reversiblen Transaminierung, was die Produktion von Leucin und α -KG zur Folge hat. [48,50, 67]

Doch nicht nur Leucin hat eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung, die Katabolite von Valin zeigen ebenfalls parakrine und endokrine Signalfunktionen. Dazu gehören 3-HIB und BAIBA. 3-HIB entseht in Folge der Abspaltung des kovalent gebundenen CoAs und kann so die mitochondriale Matrix verlassen. Im Skelettmuskel hat 3-HIB eine parakrine Wirkung und steigert die transendotheliale Aufnahme von Fettsäuren über die endotheliale Kapillarwand in die Myofibrillen. Der, dem zu Grunde liegende Mechanismus ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Diese Signalwirkung liefert jedoch ein hervorragendes Beispiel für das Zusammenspiel zwischen dem BCAA- und dem Fettsäurestoffwechsel. Ein weiteres, dem Valin Metabolism entspringendes Signalmolekül, ist BAIBA. Es ist ein Nebenprodukt, entstanden aus Methylmalonyl-Semialdehyd, welches im Äquilibrium mit 3-HIB vorliegt und daher kein direktes Valin Metabolit bildet. BAIBA wird hauptsächlich vom Skelettmuskel sekretiert und wirkt sowohl parakrin als auch endokrin. In muskulären Adipozyten und dem distalen Fettgewebe induziert BAIBA die Expression von UCP1 über PPAR α . Zudem wurde BAIBA im Zusammenhang mit dem Erhalt von Osteozyten und der Kontrolle der Fibroblastenproliferation in der Niere genannt. Auch hier sind die grundlegenden Mechanismen der Wirkung von BAIBA als Signalmolekül noch weitgehend unerforscht. [48,50,55,59,68]

Störungen und Mutationen im BCAA Metabolismus stehen schon länger im Zusammenhang mit weit verbreiteten Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus, Adipositas und

verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen sowie dem Metabolischen Syndrom. Die Zusammenhänge sind jedoch nach wie vor weithin unverstanden und unerforscht. Auch angeborene Gendefekte des BCAA Metabolismus, die in Krankheiten wie der Ahornsirupkrankheit (*Maple Syrup Urine Disease* (MSUD)) resultieren, stehen im Fokus der Forschung. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen des pathologisch veränderten BCAA Metabolismus könnte neue Erkenntnisse und somit Behandlungsmethoden für oft tödlich verlaufende Krankheiten liefern. [48,50,69]

1.5 mTORC1 – ein zentraler Spieler in der metabolischen Homöostase

Die konservierte Serin/Threonine Kinase mTOR ist bekannt als ein Master Regulator für Zellwachstum, Proliferation, metabolische Homöostase, Autophagie und vieles mehr (Abb. 1.7) [70]. Die Proteinkinase wurde erstmals 1994 und 1995 von Brown, E., Sabatini, D. und Sabers, C. charakterisiert und isoliert [71,72,73]. Es konnte gezeigt werden, dass mTOR in Form zweier unterschiedlicher Multiproteinkomplexe, mTORC1 und mTORC2, vorliegt [70]. Diese entstehen durch die Interaktion von mTOR mit spezifischen Adaptorproteinen, wodurch die Komplexe unterschiedliche Signalwirkungen aufweisen [74]. Beide Komplexe haben trotzdem die gleiche Kernzusammensetzung [75]. So enthalten beide Komplexe die Proteine mTOR, mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*) und DEPTOR (*DEP-domain containing mTOR interacting protein*) [74,75]. Des Weiteren setzt sich der mTORC1 Komplex aus Raptor (*regulatory-associated protein of TOR*) und PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*) zusammen [63]. Der mTORC2 Komplex enthält zusätzlich zu den Kernkomponenten noch Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*stress-activated protein kinase-interacting protein 1*) und PROTOR1/2 (*protein observed with rictor 1 and 2*) [76]. Beide Komplexe haben spezifische zelluläre Funktionen, wobei mTORC1 der, bis heute besser untersuchte und verstandene Komplex ist [70].

Der mTOR Komplex wird unter anderem über diverse Umweltfaktoren wie AS, Stress oder Wachstumsfaktoren reguliert und trägt dadurch zum Erhalt der zellulären Homöostase bei [70,75]. Hauptsächlich ist mTORC1 für seine aktivierende Wirkung auf die Proteinbiosynthese und die damit verbundene Induktion der Zellproliferation und des Zellwachstums bekannt [70]. Der mTORC1 wird unter anderem durch den Signalweg der PI3K (phosphoinositide 3-Kinase)-AKT-TSC (*Tuberous sclerosis*)-RHEB (*Ras homolog enriched in brain*), über die Wachstumsfaktoren Insulin und IGF (*insulin-like growth*

factors), reguliert [75]. Die Aktivierung von RHEB erhöht folglich die Aktivität von mTORC1 (Mao and Zhang 2018). Zunächst erfolgt über PI3K-Akt die inhibierende Phosphorylierung von TSC1, welches als GAP (*GTPase-activating Protein*) für RHEB fungiert [76]. RHEB wird wiederum durch die Inhibierung von TSC1 aktiviert [76]. Des Weiteren wird der mTORC1 Komplex auch über AS aktiviert, welche die Rag Familie der GTPasen stimuliert und zu einer Translokation von mTORC1 in das Lysosom zur Folge hat [77]. Diese Aktivierung von mTORC1 erfolgt ebenfalls über RHEB [77].

Die Signalwirkung von Leucin auf die mTORC1 Signalkaskade ist vielseitig und immernoch nicht vollständig untersucht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Signalwirkung abhängig von der Regulation der RAG Proteine ist. Eine Regulationsachse ist dabei die Signalwirkung von Sestrin über den GATOR1/2 (*GAP activity toward RAGs*) Komplex. Sestrin2 induziert die Freisetzung von GATOR1 aus dem GATOR1/2 Komplex, was schließlich zur Inaktivierung von mTORC1 über RAG führt. Wird Sestrin nun durch Leucin inhibiert, kommt es zur Formierung des GATOR1/2 Komplexes, was wiederum die Aktivierung des mTOR Komplexes zur Folge hat. Ein weiterer Regulationsweg von mTORC1 über Leucin erfolgt über die LRS (leucyl-tRNA synthetase). Die LRS bindet RAG und fungiert als Aktivator in Form eines GAPs für die Rag GTPase, was zur Aktivierung von mTORC1 führt. Für Leucin konnte zusätzlich eine inhibierende Wirkung auf die AMPK (*AMP-activated protein kinase*) und damit die Aktivierung von mTOR gezeigt werden, was eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Aktivität von mTOR über Leucin darstellt. [48,50,63-66]

Als Folge der Aktivierung von mTORC1 kommt es zur Phosphorylierung der S6K1 (*ribosomal S6 Kinase*) und 4E-BP1 (eIF4E (*protein synthesis initiation factor 4E*)-binding Protein 1), was eine Erhöhung der Translationsrate zur Folge hat [76]. Zusätzlich stimuliert der mTORC1 die Nukleotidsynthese über die Steigerung der Expression von MTHFD2 [76]. Die regulatorische Wirkung von aktiviertem mTORC1 auf den Metabolismus führt über SREBP1 und PPAR γ zu einer erhöhten de novo Lipogenese [78]. Glykolyse und Glukoseaufnahme werden wiederum HIF1 α (*hypoxia-inducible factor*)-abhängig erhöht [79]. Der mTORC1 spielt auch bei der Proteindegradierung eine wichtige Rolle. Im aktivierten Zustand phosphoryliert mTOR die Kinase ULK1 (*Unc-51 like autophagy activating Kinase*) [70]. Die Phosphorylierung von ULK1 verhindert dessen Aktivierung durch die AMPK (*adenosine 5'-monophosphate-activated protein Kinase*) [80]. Da ULK1 für die Bildung des Autophagosomes verantwortlich ist, führt dessen Inhibierung durch mTORC1 unter

homöostatischen Nährstoffbedingungen zur Induktion des Autophagosoms [80]. Die Regulation der Lysosomformierung über mTORC1 findet durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors EB (TFEB) statt [81]. Aktiviert wird TFEB durch seine nukleare Translokation und führt dann zur Expression lysosomaler und autophagischer Gene [81]. Die Dysregulation von mTORC1 induziert eine Vielfalt an pathologischen Veränderungen im gesamten Organismus [75]. Es konnte gezeigt werden, dass mTORC1 bei Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus und Adipositas eine wesentliche Rolle spielt [76] Auch bei der Entwicklung von Herz- Kreislauferkrankungen und deren Folgen ist der mTOR Signalweg involviert [70].

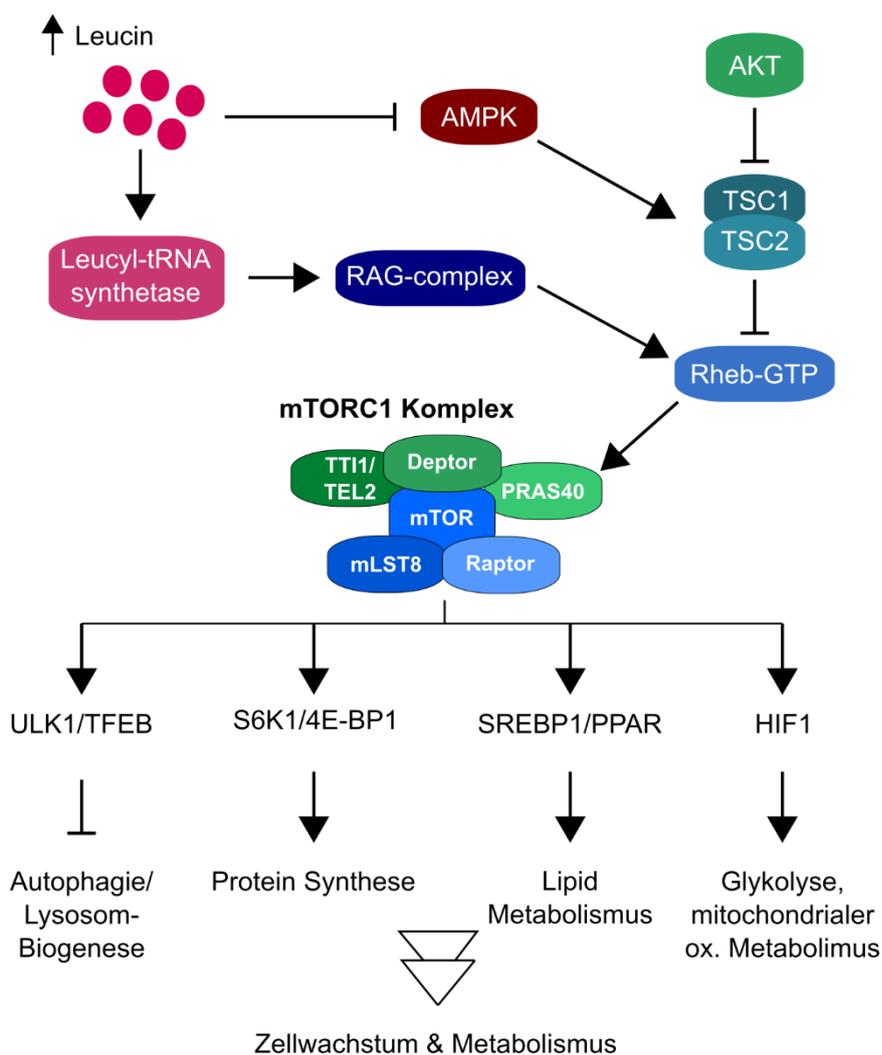


Abb. 1.7:
Schematische Übersicht der Signalwirkung von mTORC1 in Zellwachstum und Metabolismus. Der mTORC1 ist ein Proteinkomplex bestehend aus den Untereinheiten Deptor, mTOR, PRAS40, TTI1/TEL2, mLST8 und Raptor. Reguliert wird dieser Komplex über unterschiedliche Signalkaskaden. AMPK führt zur Aktivierung von TSC und TSC2, was eine Inhibierung von mTORC1 zur Folge hat. Akt und der RAG-Complex aktivieren mTORC1 direkt, oder indirekt, über die Aktivierung von Rheb-GTP. Dies

führt zur Aktivierung von mTORC1 und zur Hochregulation mTORC1-abhängiger Zielproteine. Folglich kommt es zur Steigerung der Proteinsynthese, sowie des Fettsäurestoffwechsels und der Glykolyse. Autophagie und Lysosombiogenese werden über die mTORC1/ULK1 Signalwirkung geblockt. Diese Signalkaskade über mTORC1 resultiert in der Regulation von Zellwachstum und Metabolismus. [verändert nach 87,88]

1.6 Zielsetzung

Die Erforschung metabolisch aktiver lncRNAs im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen könnte neue Einsichten in die Welt der nicht-kodierenden RNAs liefern und gleichzeitig neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung metabolischer Erkrankungen aufzeigen. Für die Kandidatenvalidierung wurden lncRNAs mit spezifischer Expression in metabolisch aktiven, kontraktilen Geweben gewählt. Die Generierung verschiedener KO-Mauslinien zur *loss-of-function* Analyse der lncRNAs, zeigte für *mito-lnc* einen kardialen Phänotyp. Im Zuge dieser Arbeit soll die Ursache des kardialen Phänotyps unter Verlust von *mito-lnc* analysiert werden. Die Analyse des *loss-of-function* Mausmodells soll Hinweise auf die Funktion und die mechanistische Wirkweise von *mito-lnc* liefern. Zur phänotypischen Analyse gehören Untersuchungen, vorallem im Herzen, aber auch im Skelettmuskel und dem braunen Fettgewebe der KO-Mäuse. Transkriptomdaten sollen zusätzlich Aufschluss über die Funktion von *mito-lnc* auf transkriptioneller Ebene liefern. Analysen auf Proteinbasis sollen diese erweitern. Molekularbiologische *in vitro* Analysen zur Charakterisierung von *mito-lnc*, zur Bestimmung der Lokalisierung und der Interaktionspartner von *mito-lnc*, sind essentiell für die Analyse der Funktion von *mito-lnc*. Die Analyse der Funktion von *mito-lnc* könnte neue Einblicke in die Welt der lncRNAs und ihre Rolle bei der Entstehung kardialer Hypertrophie liefern.

2. Methoden

Die verwendeten Materialien sind entweder im jeweiligen Abschnitt genannt, oder dem Anhang zu entnehmen.

2.1 Generierung der verwendeten Mauslinien, Genotypisierung und Haltung

Alle beschriebenen Tierversuche wurden wie im TVA B2-1207 beschrieben durchgeführt. Als Modellorganismus dienten generierte Mäuse, welche eine konstitutive Deletion der lncRNA *mito-lnc* (AK079912) aufweisen. Zusätzlich wurde eine Mauslinie generiert welche eine poly-A-Sequenz im ersten Exon der lncRNA enthält und somit zum verfrühten Transkriptionsstop der *mito-lnc* führt. Für die Generierung der Mauslinien zur Analyse von *mito-lnc* wurde das Crispr/Cas9 bzw. das Crispr/Cas9n System verwendet. Im Zuge der Kandidatenvalidierung auf *in vivo* Ebene wurden zudem *knockout* Mäuse mittels klassischer homologer Rekombination generiert.

2.1.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in ventilierten Käfigen (Aero Cage-Mouse IVC Green Line, Techniplast Italien) gehalten. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Haltungstemperatur betrug zwischen 22-23 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 bis 48 %. Zur Simulation eines zirkadianen Rhythmus wurde der Tierstall in der Zeit von 19 Uhr bis sieben Uhr verdunkelt und zusätzlich jeweils eine Stunde Dämmerung simuliert. Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Tierschutzbestimmungen entsprechend der gehaltenen Spezies.

2.1.2 Generierung einer konstitutiven Knockout Linie

Zur Generierung eines konstitutiven Knockout Modells im Zuge der Kandidatenvalidierung wurde der genetische Ziellokus durch homologe Rekombination in mES-Zellen mit einer Neomycinkassette ausgetauscht. Die Klonierungsstrategie sowie die Generierung der KO-Plasmide für die homologe Rekombination wurde bereits in meiner Masterthesis: „Funktionelle Analyse muskelspezifischer lncRNAs“ beschrieben [202] ([Anhang Abb. 7.1](#)). Die Transfektion und die Aufarbeitung der mES-Zellen wurde von Sonja Krüger übernommen. Zur Überprüfung der homologen Rekombination wurde ein Southernblot unter Verwendung Genspezifischer Sonden durchgeführt.

2.1.2.1 Southernblot zur Überprüfung der genomischen Manipulation

Die Methode des Southernblots wird zur Detektion von genetischer Indel-Manipulation verwendet. Mittels spezifischem Restriktionsverdau wurde die genomische DNA der mES-Zellen fragmentiert und gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte homologe Rekombination induziert eine Veränderung in der Fragmentlänge der Ziel-DNA und kann so mittels spezifischer DNA-Sonden verifiziert werden. Dafür wird die mittels Restriktionsverdau fragmentierte DNA auf eine Nylonmembran übertragen und die Detektion erfolgt anschließend mittels der genspezifischen, radioaktiv-markierten ($\alpha^{32}\text{P}$) DNA-Sonden. [90]

Die Selektion der passenden Restriktionsenzyme in Verbindung mit dem Design der DNA-Sonden für die verschiedenen Zielloki erfolgte Bioinformatisch. Die Tabelle # umfasst die mittels klassischer homologer Rekombination generierten Mausstämme mitsamt den dazugehörigen Restriktionsenzymen und genspezifischen Sonden, sowie die spezifischen Fragmentlängen. Der Restriktionsverdau, sowie die DNA-Sonden wurden zunächst auf wildtypischer ES-Zell DNA getestet. Im Anschluss wurde das Protokoll mit den putativ rekombinierten mES-Zellen zur Verifizierung der Insertion der Neomycinkassette durchgeführt. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme war darauf zu achten, dass die Fragmentlängen möglichst in dem Bereich von 2-12 kb lagen und der Unterschied zwischen wildtypischem und knockout DNA-Fragment Minimum 1 kb beträgt. Zur Generierung der DNA-Sonde wurden Primer designt, welche zur Amplifikation der DNA-Sonde (200-300 bp) homolog im Bereich des geschnittenen Zielfragments, aber außerhalb des bereits im Reperaturplasmid enthaltenem genomischen Bereichs dienten. Die Amplifikation erfolgte mittels Pfuusion Taq (Thermo Scientific™ #F549L) entlang der Herstellerangaben. Das PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch auf einem 2%-tigem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Gelextraktion (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (#Macherey Nagel #740609.240C) aufgereinigt.

Für den Southernblot wurde die extrahierte ES-Zell DNA Ü.N. bei 37 °C unter Verwendung des spezifischen Enzyms verdaut und anschließend auf einem 0,7%igem Agarose Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der zu übertragende Gelbereich wurde dokumentiert und schließlich in 0,25 N HCl für 15 Minuten inkubiert. Dies diente durch die Induktion von Strangbrüchen in der DNA zu ihrem verbesserten Transfer auf die Nylonmembran. Anschließend wurde das Gelstück in 0,4 M NaOH aufbewahrt. Der eigentliche Blotaufbau

war wie folgt: 2 Lagen Chromatographie Papier (Whatman Blottingpapier #3030-931 – 58x68 cm) wurden auf einen Stapel saugfähiges Papiers der Größe entsprechend des zu blottenden Gelstücks platziert. Eine weitere Lage Chromatographie Papier wurde in 0,4 M NaOH getränkt und oben auf dem Stapel positioniert. Es folgte die, mit 0,4 M NaOH benetzte Nylonmembran (Amersham Biosciences #RPN203B) und darauf das Agarosegel. Der Aufbau wurde anschließend mit Folie (Roth #1255.1) bedeckt und im Bereich des Gels ausgeschnitten, sodass ein Fenster entstand. Es folgten erneut zwei Lagen mit 0,4 M NaOH getränktem Blottingpapier. Auf beiden Seiten des Gesamt-Konstruktes wurde jeweils ein mit 0,4 M NaOH gefüllter Behälter platziert und aus zwei Lagen Blottingpapier eine Brücke über den Blot gebildet. Der gesamte Blotaufbau wurde schließlich mit Folie bedeckt (Abb. 2.1). Der Transfer erfolgte für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Der entstehende Sog diente der Übertragung der DNA auf die Membran. Abschließend wurde die Membran in 2xSSC gewaschen und konnte an dieser Stelle auch in Folie eingewickelt bei -20 °C gelagert werden.

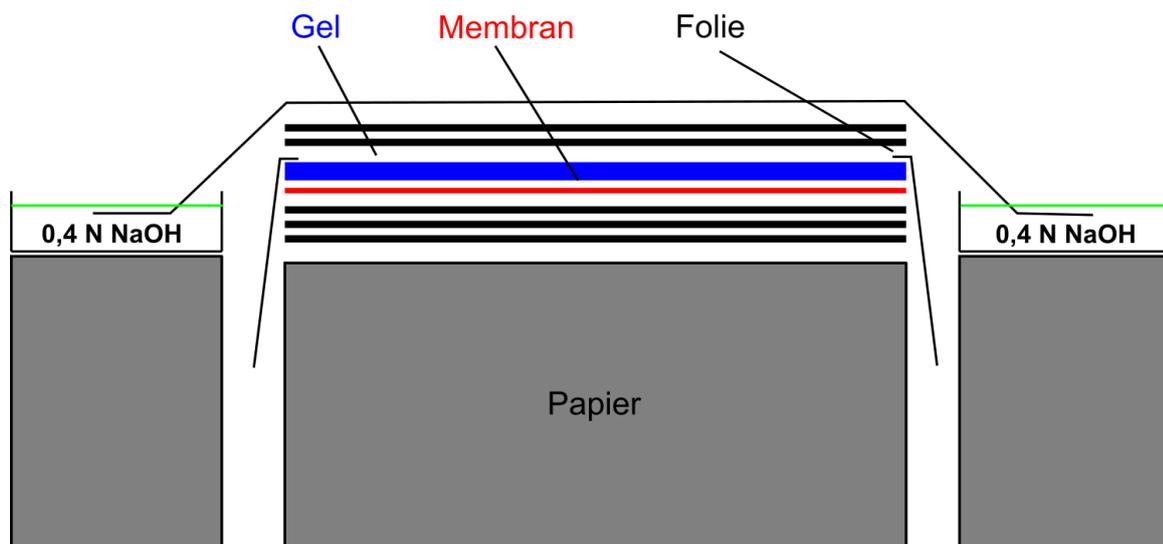


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southernblots. Auf einem Stapel saugfähigem papier wurden 3 Lagen Chromatographie Papier platziert. Es folgten die in 0,4 M NaOH getränkte Membran sowie das Agarosegel. Das Gel wird mit Folie bedeckt, ein fenster in der Größe des Gels ausgeschnitten und das Ganze mit 2 Lagen NaOH getränktem Chromatographie Papier bedeckt. Über diesen Aufbau wird eine Brücke zur Verbindung der NaOH enthaltenden Vorratsgefäße platziert. Der Gesamtaufbau wird mit Folie komplett bedeckt.

Für die Hybridisierung wurde die Membran zunächst in 50 ml Church & Gilbert Puffer (0,5 M NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 7 % SDS) mit Heringssperma-DNA (Sigma Aldrich #D7290-5X1ML) (200 mg/ml) bei 65 °C prähybridisiert. Die HS-DNA wurde vor der Zugabe

bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und direkt im Anschluss auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierung erfolgte rotierend bei 65 °C für 2-3 Stunden.

Für die Hybridisierung musste die DNA-Sonde radioaktiv markiert werden. Dafür wurden jeweils 45 ng (in 30 µl ddH₂O) der aufgereinigten DNA Sonden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und direkt auf Eis runtergekühlt. Für die Markierung der Sonden wurde je Ansatz 10 µl Oligo-labeling Puffer, 2 µl BSA (10 mg/ml), 5 µl [α 32P]dCTP (Perkin Elmer #NEG013H100 UC) und 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl) (Promega #M2201) dazugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um überschüssige Nukleotide zu entfernen wurden die markierten DNA-Sonden über NAP-5 Columns (SephadexTM G-25 DNA Grade GE Healthcare #17-0853-02) aufgereinigt. Dafür wurden diese mit 10 ml Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ Puffer (pH 6,8; 10 mM) equilibriert. Die Ansätze der DNA-Sonden wurden mittels Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ Puffer (pH 6,8; 10 mM) auf ein Volumen von mindesten 100 µl pro Probe gebracht und auf die Säule geladen. Schließlich wurden die DNA-Sonden mittels Zugabe von 1 ml Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ Puffer (pH 6,8; 10 mM) eluiert. Die radioaktiv-markierten Sonden wurden schließlich erneut denaturiert und zu der Prähybridisierungslösung der Southernblot gegeben. Die Hybridisierung erfolgte Ü.N. bei 65 °C. Am Folgetag wurde der Blot dreimal für jeweils 15 Minuten mit Waschpuffer (40 mM NaH₂PO₄ Puffer pH 6,76; 1 % SDS) gewaschen und schließlich in Folie eingewickelt und mit einem Film in Imager-Platten (BAS-MP 20405) für circa 5 Tage inkubiert. Der Film wurde mit einem Auslesegerät (BAS-2500 Fujifilm) ausgewertet.

2.1.2.2 Generierung eines LOF in vivo Mausmodells mittels CRISPR/CAS9

Die Generierung der konstitutiven Deletion der *mito-Inc* erfolgte mittels des Crispr/Cas9n Systems. Die Verwendung zielgerichteter Nukleasen zur genomischen Manipulation von *in vivo* Tiermodellen findet auf Grund der hohen Präzision immer mehr Zuspruch und liefert eine hervorragende Alternative zur klassischen homologen Rekombination. Die hohe Präzision, Variabilität und Effizienz, sowie der vergleichsweise geringere Zeitaufwand machten das CRISPR/CAS9-System zum Mittel der Wahl zur Generierung der *in vivo* LOF Mausmodelle zur Analyse der Funktion von *mito-Inc*. [91]

Das CRISPR/CAS-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) ist Teil des adaptiven Immunsystems bei Mikroben. Seine Funktion basiert auf der Aktivität der RNA-gesteuerten Endonuklease Cas9 und dem damit einhergehenden Abbau der Fremd-DNA. Durch die Verwendung spezifischer homologer gRNAs induziert die Cas9 einen

Doppelstrangbruch etwa 3 bp *upstream* der PAM Sequenz und induziert so die endogenen Reparaturprozesse der Zelle (Abb. 2.2). Über das sogenannte *non-homologous end joining* kommt es gehäuft zu Mutationen wie Deletionen oder Insertionen, kurz Indel Mutationen. Wird zusätzlich ein Reparaturplasmid oder ssOligonukleotid verwendet wird der Reparaturprozess der homologen Rekombination aktiviert. [91--93]

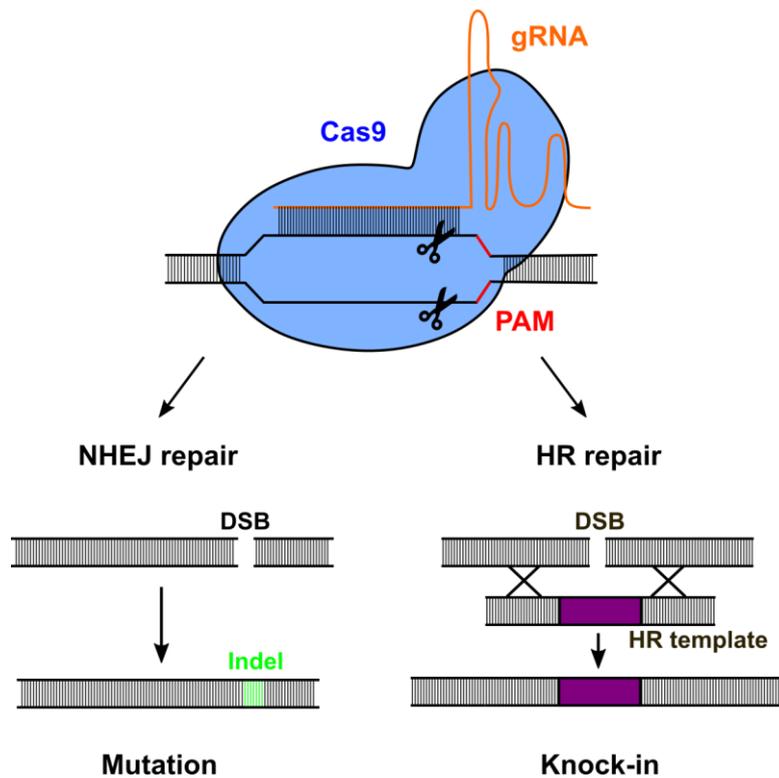


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Cas9-medierten genomischen Manipulation Die gRNA führt die Endonuklease Cas9 an den Ziellokus. Dort induziert die Cas9 einen DSB etwa 3 bp upstream der PAM Sequenz. Die Reparatur des Strangbruches erfolgt entweder über das Prinzip des NHEJ oder mittels eines Reparaturtemplates über homologe Rekombination. [verändert nach 95]

Zur vollständigen genomischen Deletion von *mito-Inc* (Abb. 2.3) wurde eine Mutante der Cas9 verwendet, die Cas9n. Die verwendete Cas9n ist eine Mutante der Cas9 mit einer Aspartat zu Alanine (D10A) Mutation in der RuvC katalytischen Untereinheit. Dadurch wird im Vergleich zur wildtypischen Cas9 nur ein Einzelstrangbruch an der entsprechenden Zielregion im Genom verursacht. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit von off-target Effekten deutlich, da die putativ induzierten Einzelstrangbrüche fehlerfrei repariert werden können. [91,94]

Für die Induktion einer vollständigen genomischen Deletion der *mito-Inc* wurden vier sgRNAs (*single guide RNAs*) verwendet. Jeweils ein paar 5' und 3' der genomischen Region der IncRNA mit einem *offset* von weniger als 20 bp. Das Design der sgRNAs erfolgte mittels des CRISPR Design Tools [208]. Pro verwendeter sgRNA wurden zwei Oligonukleotide designiert, jeweils ein *sense* und ein *antisense* Oligonukleotid. 5' des designierten Oligos wurde,

falls nicht bereits vorhanden ein Guanin angefügt, da der U6 RNA Polymerase III Promotor ein Guanin als erste Base des Transkriptes bevorzugt (Ran et al. 2013). Das *sense* Oligonukleotid wurde zusätzlich mit einem CACC und das *antisense* Oligonukleotid entsprechend mit einem AAAC Überhang versehen um eine Ligation in den mit *Bbs*I geschnittenen Vektor zu ermöglichen. [91-93]

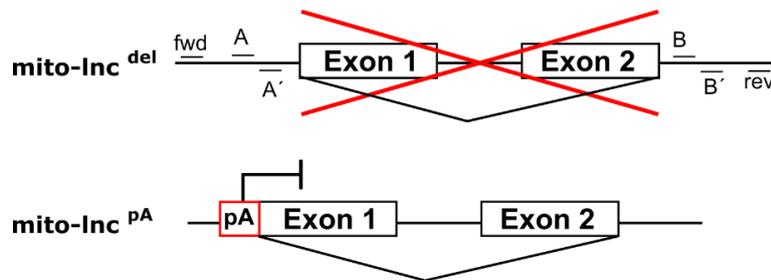


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des genomischen Lokus von *mito-lnc* der generierten LOF Mausmodelle. Die vollständige genomische Deletion von *mito-lnc* (*mito-lnc^{del}*) wurde mittels

der Cas9n Mutante unter Verwendung von vier sgRNAs induziert. Die Insertion der 2xpA-Sequenz innerhalb des ersten Exons von *mito-lnc* (*mito-lnc^{pA}*) erfolgte mittels wildtypischer Cas9 in Kombination mit einem homologen, die pA-Sequenz enthaltendes ssOligo zur Induktion des Reparaturmechanismus der homologen Rekombination.

Zunächst erfolgte die Klonierung der entsprechenden sgRNAs in das Cas9n Plasmid. Die entsprechenden *sense* und *antisense* Oligonukleotide wurden hybridisiert. Dafür wurden diese in 10 µl Wasser gelöst und jeweils 1 µl mit 7 µl H₂O und 1 µl Annealing-Puffer (50 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA) in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben. Für die Hybridisierung wurde der Ansatz in kochendes Wasser gegeben und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Dafür wurden 10 µg des Plasmids p889 mit *Bbs*I für 3 h bei 37 °C verdaut und im Anschluss mittels *Shrimp Alkaline Phosphatase* (NEB #M0371S) dephosphoryliert um eine Religierung der Vektorenden zu vermeiden. Die Auftrennung erfolgte zuerst gelelektrophoretisch und der linearisierte Vektor wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (#Macherey Nagel #740609.240C) aufgereinigt. Die Ligation der Oligonukleotide in den Vektor erfolgte über Nacht mittels einer T4-Ligase (Promega GmbH, Madison, WI, USA) bei 16 °C. Der Ligationsansatz wurde am Folgetag über eine Dialysemembran entsalzt und anschließend in die Bakteriensuspension (*XL1-blue*; Dh10a) gegeben und in Elektroporationsküvetten (Bio Rad Küvetten; 1 mM) überführt. Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF für 4 Sekunden. Anschließend wurden die Bakterien in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml

SOC-Medium überführt. Und für 1h bei 37 °C schüttelnd (600 rpm) inkubiert, bevor sie auf Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert werden konnten.

Zur Überprüfung der Insertion wurde die Plasmid DNA mittels Minipräparation aufgereinigt und anschließend mit einem spezifischen Primer sequenziert. Für die Minipräparation wurden je 5 ml LB-Medium (Roth) mit entsprechendem Antibiotikum, mit je einer Einzelkolonie der entsprechenden Bakterien, angeimpft und über Nacht (ü.N.) schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurden je 2 ml der Bakterienkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl P1 resuspendiert und anschließend mit 300 µl P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 300 µl P3 hinzugeben und die Reaktion für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und 850 µl der klaren Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 80 % des Volumens an Isopropanol (600 µl) hinzugegeben, der Ansatz invertiert und erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in T1/10E mit 0,5 µl RNase/1 ml T1/10E für 30 Minuten bei 50-55 °C gelöst und im Anschluss mit der Sangermethode (Absatz 2.4.6) sequenziert.

Die resultierenden Vektoren wurden mittels Maxipräparation mit dem Plasmid DNA Purification“ Kit NucleoBond® Xtra Maxi (Marcherey-Nagel) aufgereinigt und für die Transfektion in mES-Zellen verwendet. Die Transfektion der mES-Zellen wurde von Sonja Krüger durchgeführt. Dafür wurden jeweils 0,5 µg der Vektoren p894/895/898/899 verwendet. Für die Transfektion wurde Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific #L3000008) verwendet. Anschließend wurde die ES-Zell DNA extrahiert und mittels semiquantitativer PCR mit spezifischen Primern auf die gewünschte Deletion geprüft. Zur weiteren Validierung wurden die putativ positiven PCR Fragmente nach Sanger sequenziert (Absatz 2.4.6) und die positiven Klone zur Generierung einer Mauslinie verwendet.

2.1.2.3 Generierung der polyA-Mauslinie mittels CRISPR/CAS9

Für die Generierung der polyA-Mauslinie ([Abb. 2.3](#)) wurde das CRISPR/CAS9 System verwendet um mit Hilfe eines einzelsträngigen Oligonukleotides eine doppelte Polyadenylierungs(polyA)-Sequenz innerhalb des ersten Exons von *mito-lnc* zu inserieren und damit einen verfrühten Transkriptionsstop zu induzieren. Dafür wurde die wildtypische Version der Cas9 verwendet, welche einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA induziert. Das Design der sgRNAs sowie die Generierung der Cas9 Plasmide erfolgte wie in 2.2.1.2

beschrieben. Das generierte Plasmid wurde p914 genannt. Das verwendete Reparatur Oligonukleotid (TB995) enthielt eine doppelte polyA-Sequenz flankiert mit 70 bp langen homologen Armen. Die Transfektion in mES-Zellen erfolgte mit der Transfektionsreagenz Lipofectamine 3000® und wurde von Sonja Krüger entlang der Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 1,5 µg Oligonukleotid (TB995) und 0,5 µg Plasmid (p914) eingesetzt. Die Validierung der Insertion erfolgte wie in 2.1.2.2 beschrieben mittels semiquantitativer PCR und Sanger Sequenzierung (Absatz 2.4.6).

2.1.4 Methoden zur Genotypisierung von Mauslinien

2.1.4.1 DNA Extraktion zur Maus Genotypisierung

DNA aus Schwanzbiopsien extrahiert. Der Verdau der Schwänze erfolgte mit 500 µl Tail-Lyse Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS) mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) (Sigma Aldrich #P2308) über Nacht bei 55 °C. Im Anschluss wurden die Proben invertiert und für 15 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Dafür wurde das Gemisch invertiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entsalzung wurde das DNA Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem der Ethanol vollständig abgenommen und das Pellet 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wurde, wurde die DNA in 10 µl T_{1/10}E Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0) über Nacht bei 55 °C gelöst.

2.1.4.2 Genotypisierungen der verwendeten Mauslinien

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte mittels semiquantitativer PCR und anschließender Gelelektrophorese. Die verwendeten Primer und erwarteten Produktgrößen der DNA Fragmente sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt. Die PCR Reaktionsansätze wurden wie folgt pipettiert:

Tabelle 2.1: PCR Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs	1 µl
100 pmol Hinprimer	1 µl
100 pmol Rückprimer	1 µl
100 pmol Rückprimer (Mutante)	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
DNA-Template	1 µl
H ₂ O	38,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2.2: PCR Programm zur Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	5 Minuten
35x Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
35x Annealing	X °C	30 Sekunden
35x Elongation	72 °C	45 Sekunden
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten
Ende	4 °C	∞

Tabelle 2.3: PCR-Fragmente Produktlängen der Genotypisierungen

Mauslinie	Primer	KO-Allel (bp)	WT-Allel (bp)
895	MA254xMA265	-	591
895	MA442	470	-
914	MA401xMA234	-	365
914	MA401xMA234	412	-
874	MA251xMA252		201
874	TB495	274	
850 3´	MA242xMA245		345
850 3´	TB497	228	
850 5´	MA239xMA241		240
850 5´	TB495		419

2.2 Tierversuche und Tötung

Alle beschriebenen Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mit männlichen Mäusen durchgeführt. Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

2.2.1 Tiertötung

Sofern nicht anders angegeben wurden die Tiere zur Entnahme von Gewebeproben durch zervikale Dislokation getötet. Der Brustkorb wurde geöffnet und das Tier mit 10 ml 1x PBS durch den linken Herzventrikel perfundiert bis eine Entfärbung der Leber zu erkennen war.

2.2.2 Fütterungsversuche

Die Tiere wurden ab einem Alter von 6-8 Wochen über einen Zeitraum von 8 Wochen mit Spezialfutter gefüttert. Für die Fütterungsversuche wurde den Tieren BCAA-reiches (1,35 % L-Valin; 1,2 % L-Isoleucin; 1,8 % L-Leucin) oder BCAA-freies Futter (Sniff-S7507-E054) gegeben. Die Kontrollgruppe erhielt Kontrollbasisfutter (Sniff #S7507-E050). Den Tieren wurde Futter sowie Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt und während des Versuches

verblieben die Tiere in den Haltungsräumen. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und ihr Erscheinungsbild überprüft.

2.3 Histologische Analyse von Mausgeweben

2.3.1 Einfrieren von Gewebe

Zur Kryokonservierung von Gewebe wurden die Tiere wie in 2.2.2.1 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert. Das benötigte Gewebe wurde anschließend entnommen und in 4 % Paraformaldehyd (PFA) (Sigma Aldrich ,6148-1KG) für 1 Stunde auf Eis fixiert. Danach wurde das Gewebe für 2 Stunden bei 4 °C in 15 % Succhrose in 1 x PBS und anschließend über Nacht bei 4 °C in 30 % Succhrose dehydriert. Am Folgetag wurde das Gewebe für mindestens 24 Stunden bei 4 °C in Tissue Tek (Surgipath, FSC 22 Clear #3801480) gelegt bevor es auf Trockeneis in Tissue Tek eingebettet werden konnte.

2.3.2 Einfrieren von Gewebe für Kryoschnitte mittels Pentan-Isobutanol

Die Pentan-Isobutanol Methode zum Einfrieren von Gewebe für Kryoschnitte diente der Vermeidung von Kryoartefakten in kryokonservierten Skelettmuskeln. Dabei wird ein, mittels flüssigem Stickstoff heruntergekühltes, Pentan-Isobutanol Gemisch verwendet. Die dafür benötigte Kältekammer setzte sich aus einer äußeren, mit flüssigem Stickstoff gefüllten, Styroporkammer und einer inneren Kammer aus Metall zusammen. Die innere Metallkammer wurde zu 60 % mit Isobutanol (Roth #CP09.1) gefüllt. Um eine Kondensierung des Pentans zu ermöglichen wurde dieses durch ein Rippenrohr geleitet, welches in einer weiteren, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporkammer positioniert wurde. Das flüssige Pentan wurde dann in das Isobutanol geleitet bis die innere Kammer vollständig gefüllt war. Anschließend konnten die entnommenen Muskeln in der Kältelösung kryokonserviert werden und in einem 2 ml *safelock* Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff verwahrt werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.3 Anfertigen von Kryoschnitten

Zur immunohistochemischen Analyse wurden Gewebeschnitte von 8-10 µm dicke angefertigt. Dafür wurde eine Kryostat (CM1950, Leica) verwendet. Die Kammer wurde zunächst auf -24 °C runtergekühlt und die Temperatur des Schnitthalters sollte -27 °C betragen. Die Schnitte konnten direkt verwendet werden oder wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Histologische Färbung von Herz Gewebeschnitten mittels WGA

Für die immunohistologische Färbungen mittels WGA wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden anschließend mit einem Pap-Pen (Fettstift) (Kisker Biotech #MKP-1) umrandet und für 10 Minuten mit Fixans (4 % PFA, 1 % Natrium-Desoxycholat (Sigma Aldrich #1171273), 10 % NP40 (Sigma Aldrich #127087-87-0) nachfixiert. Im Anschluss wurden die Proben 3mal für jeweils 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Danach wurde Blockierlösung (3 % Normales Ziegen Serum (NGS) (Sigma Aldrich #G9023-5ML) 20 % BSA, 10 % NP-40, 1x PBS) auf die Proben gegeben und das Ganze für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Blockierlösung gegen die Antikörperlösung (20 % BSA, 10 % NP-40 in 1x PBS) ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Proben 3mal für jeweils 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in Antikörperlösung inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Dapi gefärbt (1:1000 in 1x PBS). Es folgten erneut 3 Waschschrte. Zum Schluss wurden die Proben mit Fluoromount W (Serva #21634.01) bedeckt und jeweils ein Deckgläschen aufgesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.3.5. Immunhistochemische Analyse mittels HIKARI KIT

Für die immunohistologischen Färbungen wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden anschließend mit einem Pap-Pen (Fettstift) (Kisker Biotech #MKP-1) umrandet und für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Sigma # 6148-1KG) fixiert. Im Falle von isolierten Kardiomyozyten wurden diese mit 1xPBS gewaschen und direkt fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 Minuten mit 0,3% Triton X-100 (Sigma #X100-100ML) in 1xPBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschrte mit 3 % BSA in 1xPBS schüttelnd für 10 Minuten bei RT. Im Anschluss wurden die Proben für 60 Minuten mit Blockierlösung (0,01% Triton X-100 in 1xPBS, 1/10 Blocking One (Nakalai #03953-95) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Proben erneut mit 1xPBS gewaschen und anschließend der entsprechende Primärantikörper in Solution A (Nakalai #02272-74) verdünnt. Die Proben wurden schließlich Ü.N. bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben mit 0,01%igem Triton X-100 in 1xPBS dreimal für jeweils 10 Minuten schütteln

gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in Solution B (Nakalai # 02297-64) für 60 Minuten bei RT. Die Proben wurden anschließend erneut mit 0,01 % ZTriton X-100 in 1xPBS gewaschen und schließlich für 5 Minuten mit Dapi (1:1000 in 1xPBS) gefärbt und noch einmal gewaschen. Die Proben wurden dann mit Fluoromount W (Serva #21634.01) bedeckt und jeweils ein Deckgläschen aufgesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

2.3.6 Succinat-Dehydrogenase Färbung

Zur Analyse der Mitochondrienverteilung innerhalb der Muskelfasern des Mausmodells wurde eine Succinat-Dehydrogenase Färbung durchgeführt. Diese beruht auf der Aktivität der Dehydrogenase, welche im aktiven Zustand ein Substrat zu einem blauen Farbstoff umsetzt und so das Mitochondriennetzwerk sichtbar macht. Muskeln wurden wie in Absatz 2.2.3.2 beschrieben gewonnen, eingefroren und im Kryotom geschnitten. Für die Färbung wurden die Schnitte in SDH-Färbelösung (10 % 0,2 M KH_2PO_4 , 38 % 0,2 M Na_2HPO_4 , 50 % 0,2 Bernsteinsäure, 2 % 10%-ige NBT-Lösung (Roche #10214221) für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert und 3mal mit 1xPBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit Fluoromount W (Serva #21634.01) eingedeckt und im Anschluss Lichtmikroskopisch analysiert. [158]

2.3.7 Isolierung von adulten Kardiomyozyten

Die Isolierung der adulten Kardiomyozyten wurde von Sylvia Thomas und Kerstin Richter durchgeführt.

Zunächst wurde den Tieren 100 μl heparin und 100 $\mu\text{l}/10$ g Körpergewicht Ketamin/Xylarium (4 ml NaCl 0,9 %, 0,5 ml Ketamin, 0,25 ml Xylarium) intraperitoneal gespritzt. Die Anästhesie wurde überprüft und der Brustkorb geöffnet und Herz und Lunge entnommen. Die Lungenflügel wurden mit Stecknadeln befestigt und der Thymus wurde entfernt. Die Aorta wurde anschließend freipräpariert und die Kanüle unterhalb des ersten Abgangs festgeknotet. Das Herz wurde dann mit 1 ml Perfusionspuffer (Calcium-freier Puffer (NaCl 113 mM, KCl 4,7 mM, Na_2HPO_4 0,6 mM, KH_2PO_4 0,6 mM, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, NaHCO_3 12 mM, KHCO_3 10 mM, Taurin 30 mM, HEPES 10 mM), 2,3-Butanedione monoxime 10 mM, Glukose 5,5 mM) gespült und die Lunge sowie überschüssiges Gewebe entfernt. Im Anschluss wurde die Kanüle luftblasenfrei an der Langendorf Apparatur fixiert und das Herz mit circa 15 ml Perfusionspuffer durchgespült. Es folgte die Zugabe des

Enzympuffers (Perfusionspuffer, Liberase DH 0,25 mg/ml, Trypsin 0,27 mg/ml, CaCl₂ 23,2 µM). Das Perfusat wurde ab diesem Moment gesammelt und wiederverwendet. Im Zuge des Verdaus sollte das anschwellen und ausblassen. Sobald erste Myozyten im Perfusat auszumachen waren wurde das Herz von der Apparatur genommen und die Gefäße, sowie die Ventrikel entfernt. Das Gewebe wurde dann in Enzympuffer mit zwei Pinzetten vorsichtig zerkleinert und das Gemisch mit einer 10 ml Pipette in ein 50 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Absetzen der Zellen wurde der Überstand entfernt und das Pellet in circa 10 ml Stoppuffer (Perfusionspuffer, FCS 5 %, CaCl₂ 12,5 µM) resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die isolierten Zellen Schritt für Schritt mit CaCl₂ versetzt (50 µl 10mM, 50 µl 10 mM, 100 µM 10 mM, 30 µl 100 mM, 50 µl 100 mM), wobei nach jeder neuen Zugabe der Ansatz gemischt und für mindestens 4 Minuten inkubiert wurde. Abschließend wurden die Zellen pelletiert und in frischem Medium (M199: Creatin x H₂O 5 mM; L-Creatin x HCl 2 mM, Taurin 5 mM, HEPES 25 mM, Pen-strep 1 %, IST Supplements 1 %, AraC 10 µM, FCS 5 % pH 7,3) resuspendiert. Ausplattiert wurden die Kardiomyozyten auf zuvor mit Laminin (40 µg/ml in 1x PBS) beschichteten Platten. Nach zwei Stunden Ruhephase musste das Medium erneut ausgetauscht werden.

2.4 Molekularbiologische Experimente

2.4.1 RNA Extraktion aus dem Gewebe oder aus Zellen

Zur Extraktion von RNA aus Gewebe wurden die Mäuse wie in 2.2.2.1 beschrieben getötet und mit 1x PBS über den linken Herzventrikel perfundiert. Eine erfolgreiche Perfusion zeigte sich dabei durch eine Entfärbung der Leber. Das benötigte Gewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol (Thermo Scientific #15596026) überführt. Zu jeder Probe wurde jeweils eine autoklavierte Stahlkugel (5 mM) gegeben. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte dann mit Hilfe einer Schwingmühle (Retsch, mM301) und der zugefügten Stahlkugel bei maximaler Intensität für 5 Minuten. Für die Extraktion von RNA aus Zellen wurden diese einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 700 µl Trizol resuspendiert. Die darauffolgende Aufreinigung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Es wurde nur ein zusätzlicher Waschschrift mit 75 % Ethanol durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte mit dem Nanodrop 2000 (Thermo Scientific #ND-2000).

2.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion

Zur RNA Analyse wurde diese mittels der reversen Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben. Pro Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zur Herstellung von cDNA wurde das PrimeScript™ RT reagent Kit (3RR037A) von Takara verwendet. Danach konnte die fertige cDNA für semiquantitative oder q RT-PCRs verwendet werden.

2.4.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Zur Aufreinigung von DNA wurde diese auf einem Agarosegel (plus Ethidiumbromid) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für eine Extraktion wurde die DNA mittels UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung aus dem Gel erfolgte mittels dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Marchery Nagel #740609.250) nach Anweisung des Herstellers.

2.4.4 RT-PCR zur quantitativen Analyse von RNA

Zur quantitativen Analyse von cDNA wurden q RT-PCRs durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Einbaus eines Farbstoffes im Zuge der Vervielfältigung der cDNA. Dafür wurde das Blue S'Green qPCR Kit von Biozym (#F410-L/F415-L) in Kombination mit dem Step One Plus System (#437660) von Thermo Scientific verwendet. Die PCR wurde nach Hersteller Angaben angesetzt, wobei alle Proben stets als technische Triplikate aufgetragen wurden. Zur Kontrolle der Primerbindung und deren Spezifität wurde in jedem PCR Durchgang eine Schmelzkurve mit durchgeführt.

2.4.5 Affymetrix® GeneChips®

Die Transkriptionsanalysen mittels der transcriptom array 1.0 ST (P/N 902513) Plattform von Affymetrix wurde von Sylvia Thomas durchgeführt. Die RNA wurde wie in Absatz 2.4.1 beschrieben isoliert. Die experimentelle Durchführung erfolgte entlang dem Protokoll P/N 703174 Rev. 2. Für die weitere Aufarbeitung der RNA sowie die Waschschrte im experimentellen Verlauf wurde das GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit (P/N 900720) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines modifizierten t-Tests.

2.4.6 Sequenzierung nach Sanger

Zur Überprüfung diverser DNA Sequenzen im Zuge von Genmanipulation und Klonierungsarbeiten wurden diese mittels Sanger Sequenzierung durch SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) analysiert. Die galt für DNA Sequenzen mit Fragmentlängen von maximal 1 kb. Dafür wurden jeweils 200 ng PCR Produkt oder entsprechend 1,4 µg Plasmid DNA mit 25 pmol eines spezifischen Primers in einem Gesamtansatz von 15 µl gegeben. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit der Software Seqman Pro (DNA Star) und Meg Align (DNA Star).

2.4.7 Proteinanalyse mittels Western Blotting

2.4.7.1 Proteinextraktion

Zur Extraktion von Proteinen aus Gewebe wurden die Tiere wie in 2.2.2.1 getötet und mit 1x PBS perfundiert. Anschließend wurde das benötigte Gewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Pro 100 mg Gewebe wurden 300 µl Protein-Extraktionspuffer gegeben (0,1 M Tris/HCl pH 8,0 (Roth #9090.4), 0,01 M EDTA pH 8,0 (Roth #8040.3), 10 % SDS (Roth #8040.3), 1xProtease Inhibitor Cocktail (Complete mini (Roche #04 693 132 001))). Zum Gewebeaufschluss wurden die Proben mit einem Sonifizierstab (Sonolab) mit den Einstellungen 35 % Power und Cycle 5 für 20 Sekunden sonifiziert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von jeder Probe wurden 10 µl zur Proteinbestimmung entnommen und 4 µl DTT pro 100 µl Protein-Extraktionspuffer zu den Proteinlysaten gegeben. Die Lysate wurden für 1 Minute bei 96 °C aufgeköcht und bei -80 °C gelagert.

2.4.7.2 Bradford Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte colormetrisch mittels des Bradford Assays. Dazu wurde das DC Protein Assay Kit (5000111, Biorad) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die Standardkurve wurde der Proteinstandard von Sigma Aldrich (#P0834) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometers (#51119000, Thermo Scientific).

2.4.7.3 Western Blotting

Soweit nicht anders angegeben wurden die Proteinlysate so verdünnt, dass jeweils 10 µg Protein in 10 µl pro Probe eingesetzt wurde. Die Proben wurden jeweils 4:1 mit Laemmli Puffer versetzt und 1 Minute bei 96 °C aufgeköcht. Zunächst wurden Polyacrylamid Gele

gegossen. Diese bestanden aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Soweit nicht anders angegeben wurden 9%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Das Trenngel bestand aus 2,1 ml Polyacrylamid (37,5:1, 30 %) (Roth #3029.2), 2 ml 3,5x Bis(2-hydroxyethyl)aminotris(hydroxymethyl)methan (BisTris pH 6,5) (Sigma Aldrich #B9754), 2,9 ml ddH₂O, 25 µl Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma Aldrich #A3678) und 7 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylamin (TEMED) (Sigma Aldrich #T9281). Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen: 0,29 ml Polyacrylamid (37,5:1, 30 %), 0,5 ml 3,5x BisTris (pH 6,5), 0,96 ml ddH₂O, 8 µl APS und 3 µl TEMED. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkassette gegeben und mit Isopropanol bedeckt um eine gerade Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entsorgt und das Sammelgel in die Gelkassette gegeben und ein Kamm eingesetzt. Der Aufbau der Gelkammer war folgendermaßen: Die Gele wurden in die Kammer (X-cell SureLock™ Mini-Cell, EI0001) eingesetzt und mit einem Gelfixierungskeil in die Fassung geklemmt. Der Raum zwischen den Gelen wurde mit frischem MES Puffer (50 mM MES, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA) bis zur Bedeckung der Geltaschen gefüllt. Die äußere Kammer wurde mit bereits benutztem MES Puffer befüllt. Im Anschluss wurden die Proteinproben (2.2.4.8.1) vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurden 5 µl eines bereits gefärbter Protein Markers (#A8889, Applichem) (10 – 245 kDa) verwendet. Das Gel lief zunächst für 15 Minuten bei 75 Volt, so konnten die Proteine in das Sammelgel einlaufen. Danach wurde die Gelkammer auf Eis gestellt und die Proteine bei 180 Volt aufgetrennt.

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (GE Healthcare, ProtranBA85) erfolgte mit Hilfe eines Xcell IITM Blot Modul (Thermo Scientific, #EI9051). In das Blot Modul wurden zunächst mit Transferpuffer (20 % Methanol, 0,5 M Bicine, 0,5 M BisTris, 20,5 mM EDTA) getränkte Blotschwämme (Novex®, *life technologies* #EI9052) gelegt. Im Anschluss wurde die Gelkammer auseinander gebaut und die Gelkassette mit einem Gel-Messer aufgebrochen. Das Gel wurde auf ein mit Transferpuffer getränktes Chromatin-Papier (Whatman #3030704) übertragen und auf die Blotschwämme drapiert. Auf das Gel wurde dann die mit Transferpuffer getränkte Nitrocellulose Membran gelegt und darauf erneut ein Transferpuffer getränktes Chromatin-Papier gelegt. Anschließend wurde Blot-Modul mit weiteren in Transferpuffer getränkten Blotschwämmen gefüllt und diese in die Kammer gesteckt. Die innere Kammer wurde mit Transferpuffer und die äußere

Kammer mit ddH₂O befüllt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte im Anschluss für 2 Stunden bei 30 Volt.

Die Membran wurde mittels RedAlert™ (Merck #71078) gefärbt und damit die Proteinmenge auf der Membran zu detektieren. Zur Dokumentation wurde die Membran gescannt und nach Bedarf entsprechend des gewünschten Molekulargewichts geschnitten. Anschließend wurde die Membran für 20 Minuten mit ddH₂O rehydriert. Das Blocken der Membran erfolgte für 1 Stunde in 3 % BSA (Sigma Aldrich #A7284-500ml) in 1x TBS-T (Tris Buffered Saline (Sigma Aldrich #T6664-10PAK), 1 % Tween20 (Sigma Aldrich #P1379)). Anschließend folgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (2.1.5) in 3 % BSA in 1x TBS-T bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran sechsmal für jeweils 5 Minuten in 1x TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper in 3 % BSA in 1x TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde im Anschluss erneut sechsmal für jeweils 5 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Abschließend folgte ein einstündiger Waschschrift in 1x TBS-T bei Raumtemperatur. Die Detektion des Antikörpersignals erfolgte mit Hilfe des Pico (#35065) oder Femto-Kits (#34095) in einem ChemiDoc-Imaging System (BioRad #1708280). Alternativ wurde aus das LI-COR System (LI-COR #) zur Visualisierung der spezifischen Antikörperbindung über Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Das Li-COR System wurde zur Detektion der Proteine BDK und PPM1k im m.TA der *mito-Inc* KO-Tiere verwendet.

2.4.8 Proteinextraktion für eine Immunopräzipitation

Zur Analyse des Interaktoms der *mito-Inc* wurde eine Immunopräzipitation mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden Proteine aus Herzen von wildtypischen und Mutanten Mäusen extrahiert. Die Tiere wurden wie in 2.2.2.1 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert. Anschließend wurde das benötigte Gewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Mörser aufgebrochen, wobei darauf zu achten war alle Geräte und Proben auf Trockeneis zu lagern um ein auftauen der Gewebeproben zu vermeiden. Die pulverisierten Herzen wurden in 1 ml RIPA Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % NP-40, 0,25 % Natrium-Desoxycholat, 150 mM NaCl, 1x Protease Inhibitor Cocktail III (Merck #539134, 1 U RNasin [Promega # N2611]) überführt und wie in 2.2.4.8.1 beschrieben mit

einem Sonifizierstab weiter aufgebrochen. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration wie in 2.2.4.8.2 beschrieben bestimmt und das fertige Lysat bis zum Verwenden bei -80 °C gelagert.

2.4.9 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden je Ansatz 30 µl G-Sepharose-beads (Sigma Aldrich #P3296-5ML) und 1 mg Protein eingesetzt. Die Beads wurden zunächst zweimal mit RIPA Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 30 Sekunden bei 12500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Beads für eine Stunde bei 4 °C rotierend mit Blockierlösung (RIPA Puffer, 3 % BSA) inkubiert. Parallel dazu wurden die Proteinlysate ebenfalls für eine Stunde bei 4 °C mit 30 µl Beads rotierend inkubiert um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Sekunden bei 12500 rpm zentrifugiert und die „vorgereinigten“ Lysate zu den geblockten beads gegeben. Pro Ansatz wurden 2 µg des entsprechenden Antikörpers zugegeben und das Ganze über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben 3mal mit RIPA Puffer gewaschen und nach der letzten Zentrifugation in 100 ml RIPA Puffer resuspendiert. Zur Validierung der Immunopräzipitation wurden je 20 µl entnommen und mit 10 µl 4x Lämmli versetzt und ein Westernblot (2.2.2.4.8.3) gemacht.

2.4.10 RNA-Pulldown

Zur Analyse des Interaktoms von *mito-lnc* wurden RNA-Pulldown Experimente durchgeführt. Dafür wurde *mito-lnc* und weitere Kontroll-lncRNAs *in vitro* transkribiert, biotinyliert und an beads gebunden mit Proteinlysaten inkubiert. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte massenspektrometrisch. Als Kontroll-RNAs dienten AK086006 und AK010044. Die Amplifikation der lncRNAs erfolgte mittel Phusion® Polymerase (Thermo Scientific #F530L). Für die *in vitro* Transkription wurde das T7 RiboMAXX™ Express Large Scale RNA Production System (P1320) von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte entlang der Herstellerangaben mit Ausnahme der Transkriptionszeit, welche auf 2 Stunden erhöht wurde. Die Biotinylierung erfolgte mit dem Pierce™ RNA 3'End Desthiobiotinylation Kit (#20163) von Thermo Scientific. Die

Abschießende Aufreinigung der RNA erfolgte mittels der mini Quick Spin RNA Columns von Roche (#11814427001). Der RNA-Pulldown erfolgte mit dem Pierce™ Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit (#20164) von Thermo Scientific. Die Proteine wurden jedoch nicht laut Herstellerangaben eluiert. Die Aufreinigung der Proben zur Analyse mittels Massenspektrometer wurde von Sylvia Jeratsch durchgeführt. Die Bioinformatische Auswertung erfolgte durch Johannes Graumann. Die statistische Auswertung erfolgte mittels FDR (*false discovery rate*) Methode. Zusätzlich wurde ein zweiseitiger T-Test durchgeführt.

2.4.14 Isolation von Mitochondrien aus Mausgewebe

Für die Isolierung von kardialen Mitochondrien wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und mit 1xPBS perfundiert. Das Herz wurde entnommen und in PBD (1xPBS pH 7,4; 10 mM EDTA) überführt. Das Gewebe wurde anschließend mit einer Schere zerkleinert und zweimal mit eiskaltem PBD gewaschen. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann in 5 ml eiskaltem PBD-T (PBD, 0,05 % Trypsin (I)) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten (4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Gewebepellett in 50-10 ml IBm1 pH 7,4 (6,7 ml Succhrose (1 M), 5 ml Tris/HCl (1 M), 5 ml KCl (1 M), 2 ml BSA (10 %) ad. 100 ml ddH₂O) resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch durch 10 Stöße mit einem Teflonpistil bei 1600 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 700 g für 10 (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Mitochondrien und wurde in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen aus Glas überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 g für 10 Minuten (4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellett in 5 ml eiskaltem IBm2 pH 7,4 (25 ml Succhrose (1 M), 3 ml EGTA/Tris (1 M), 1 ml Tris/HCl (1 M) ad. 100 ml ddH₂O) resuspendiert und erneut für 10 bei 8000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellett, welches die isolierten Mitochondrien enthält 1:1 in Mitoprep-Puffer (0.225 M Mannitol, 0.075 M Succhrose, 20 mM HEPES, pH 7.4) resuspendiert und 1 µl Digitonin (10 mg/ml) (Sigma #D141) hinzugegeben. Zusätzlich wurden 0,5 µl RNase A (Sigma #R6513) dazugegeben sorgfältig gemischt und der Ansatz für 20 Minuten bei 27 °C inkubiert. Abschließend folgte eine Zentrifugation bei 11000 g für 5 Minuten (4 °C). Der Überstand wurde so sorgfältig wie möglich entfernt bevor die isolierten Mitochondrien für weiterführende Experimente verwendet werden konnten. [96]

2.4.15 Zellfraktionierung

Zur Analyse von nuklearer und wurden Kardiomyozyten wie in 2.3.7 beschrieben isoliert und zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellett wurde in 100 µl Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40) resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben gelegentlich angeschnickt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1000 x g für 3 Minuten bei 4 °C. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion und die RNA wurde wie in 2.2.4.1 beschrieben extrahiert. Das Pellett wurde noch weitere zweimal mit Puffer A gewaschen. Zum Schluss folgte ein Waschschriff mit dem Puffer B (1 % Tween-40, 0,5 % Desoxycholinsäure in Puffer A) und eine abschließende Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C. Das Pellett wurde in 700 µl Trizol resuspendiert und die nukleare RNA wie in 2.4.1 extrahiert.

2.4.16 RNA-Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (RNA-FISH)

Zur weiteren Validierung der Lokalisierung von *mito-lnc* wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Mittels Genspezifischer, Fluorophor-gekoppelten RNA-Antisense-Sonden für *mito-lnc* und Kontroll-RNAs konnte die Lokalisierung von *mito-lnc* mikroskopisch ausgemacht werden. Die RNA-FISH wurde mit dem ViewRNA ISH Cell Assay Kit von Affymetrix (#QVC0001) durchgeführt. Die Antisense-Sonde für *mito-lnc* (VB1-18013) war Alexa594 gekoppelt. Die beiden Kontrollen ATP6 (#VB43113886) und CoxI (VB4-17070) waren Alexa488 gekoppelt. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop von Zeiss ()

2.4.17 RNA in-situ Hybridisierung Proximity Ligation Assay (rISH-PLA)

Zur Validierung der Daten der RNA-Pulldown Experimente zur Interaktion von *mito-lnc* mit dem BCKD Komplex wurde eine rISH-PLA durchgeführt. Diese Methode basiert auf der spezifischen Bindung von RNA-Sonden gegen die Ziel-RNA in Kombination mit spezifischen Antikörpern gegen das putative Interaktionsprotein. Liegt eine Interaktion zwischen RNA und Protein vor wird mit dieser Methode ein spezifisches, mikroskopisch detektierbares Signal gebildet. Für die Durchführung dieses Experimentes wurden zunächst adulte Kardiomyozyten von knockout und wildtypischen Mäusen isoliert (siehe Absatz 2.3.7) Für die Durchführung des Experimentes wurde das Protokoll von Roussis, 2016 [165]

verwendet. Das Design der RNA-Sonden erfolgte mit dem Stellaris Designer [209]. Die Durchführung des Protokolls wurde von Dr. rer. nat. Christian Schutt übernommen.

2.4.17 Kultivierung und Differenzierung von immortalisierten Zelllinien

2.4.17.1 C2C12 Zellen

Für *in vitro* Analysen wurde die immortalisierte C2C12 Zelllinie, ein Subklon einer immortalisierten Myoblastenzelllinie, verwendet. Die C2C12 Zellen wurden aus einem C3H Mausmuskel isoliert und immortalisiert [97]. Diese Myoblasten zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus und sind zudem in der Lage zu fusionieren und so zu kontrahierenden Muskelfasern zu differenzieren. In der Proliferationsphase wurden die Zellen in Wachstumsmedium (DMEM High Glucose (Thermo Scientific #11965-092), 1 % PSG (Penicillin, Streptomycin, Glutamin (Thermo Scientific #10378016), 10 % fötales Kälberserum (FCS) (Sigma Aldrich #F7524-500ML)) gehalten. Da die Zellen ab einer Konfluenz von 90-100 % von alleine differenzieren wurde bei Bedarf statt DMEM *High Glucose* DMEM *Low Glucose* (Thermo Scientific #11965-092) für das Wachstumsmedium (1 % PSG, 10 % FCS) verwendet. Zur Induktion einer vollständigen Differenzierung der C2C12 Zellen wurden die Zellen in Differenzierungsmedium (DMEM High Glucose, 2 % Pferdeserum (Horse Serum (HS)) (Thermo Scientific #16050130), 1 % PSG) gehalten. Um die Zellen in Kultur zu halten mussten die Zellen ab einer Konfluenz von circa 80 % gesplittet werden. Dafür wurden diese mit 1x PBS gespült und 10 Minuten bei 37 °C mit Trypsin (Sigma Aldrich #T4549) inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinierung mit der gleichen Menge an Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen in ein Falkontube überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden während der gesamten Kultivierungszeit in einem 37 °C Inkubator bei 10 % CO₂ gehalten. Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese, wie beim Splitten trypsiniert und in Wachstumsmedium mit 10 % DMSO in Kryogefäße überführt. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei -80 °C gelagert bevor sie für eine Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.4.17.2 Immortalisierte braune Preadipocyten (BAT Zellen)

Die braunen Maus-Preadipocyten wurden von Markus Krüger nach Kahn (ref) isoliert und immortalisiert. Für die Kultivierung wurden die Zellen in Wachstumsmedium (DMEM High Glucose (Thermo Scientific #11965-092), 1 % PSG (Penicillin, Streptomycin, Glutamin (Thermo Scientific #10378016), 10 % fötales Kälberserum (FCS) (Sigma Aldrich #F7524-500ML)) auf Zellkulturplatten ausplattiert. Für die Differenzierung wurden die Zellen in Differenzierungsmedium (Wachstumsmedium (500 ml), 50 µl T3 (10 µM), 10 µl Insulin (1 mM Sigma #I-6634) passagiert und für 4 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen durch den Austausch des Differenzierungsmediums mit Induktionsmedium (Differenzierungsmedium, 0,125 M Indomethacin (Sigma #I-7378), 2 mg/ml Dexamethason (Sigma #D-1756), 0,25 M IBMX (Sigma # I-5879) für 2 Tage induziert und dann erneut bis zur vollständigen Differenzierung in braune Adipozyten in Differenzierungsmedium kultiviert. Dabei sollte das Medium alle zwei Tage gewechselt werden. Die Zellen sollten nach 10 Tagen vollständig ausdifferenziert sein und morphologisch einen sehr hohen Anteil an kleinen Lipiddroplets aufweisen. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen trypsiniert, mit 1x PBS gewaschen und Kryomedium (DMEM high Glucose, 20 % FCS, 10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.18 BCKDH-Aktivitäts Assay

Ziel des Versuches war es die spezifische Aktivität der BCKDH in adulten Mäusen zu bestimmen. Der Ablauf des Versuches basierte auf der Methode von White et al. 2016 [61] und wurde Gewebespezifisch angepasst. Dafür wurde ¹⁴C-markiertes KIV verwendet, welches im Zuge des BCAA Metabolismus über den BCKDC zu ¹⁴CO₂ umgewandelt wird. Die Tiere wurden wie in 2.2.2.1 beschrieben getötet und mit 1x PBS perfundiert. Das benötigte Gewebe wurde entnommen und mit eisgekühltem 1x PBS gespült. Anschließend wurde das Gewebe in Puffer H (30 mM KPi monobasic pH 7,5, 3 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM KIV, 3 % FCS, 5 % Triton X-100, 1 µM Leupeptin in ddH₂O) homogenisiert. Dafür wurde das Gewebe zunächst mit einer Schere in Puffer H zerkleinert und dann das Gemisch in gentleMACS C Tubes (Miltenyi #130-096-334) überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe des gentleMACS Octo Dissociators (Miltenyi #130-096-427). Dafür wurde das Programm zur Mitochondrien Isolation von Mausgewebe verwendet. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml

Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat wurde der Bradford Assay, wie in 2.2.4.8.2 beschrieben, verwendet. Für den Assay wurden je 400 – 500 µg in 50 µl Puffer H in eine 24-well Zellkulturplatte überführt und jeweils 300 µl Puffer A (50 mM HEPES pH 7,5, 30 mM KPi (monobasic) pH 7,5, 0,4 M CoA, 3 mM NAD⁺, 5 % FCS, 2 mM Thiamin Pyrophosphat, 2 mM MgCl₂ in ddH₂O, 1 µl ¹⁴C-KIV ()) dazugegeben. Um das ¹⁴C-markierte CO₂ aufzufangen wurde je ein kleines Stück Chromatin Papier mit 1 M NaOH getränkt und im Deckel über den einzelnen *wells* platziert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C schüttelnd im Wasserbad unter einem Abzug für 30 Minuten. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellkulturschalen auf Eis platziert und je Ansatz 100 µl 70%ige Perchlorsäure hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Chromatin Papierstücke in Szintillationsfläschchen (6,5 ml von ROTH #AYX4.1), welche mit je 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth # 00163) gefüllt waren überführt und die Menge an ¹⁴C mit Hilfe des Szintillationszählers Tri-Carb 2810TR Low Activity Liquid Scintillation Analyzer von Perkin Elmer gemessen.

2.4.19 Metabolomics

Zur Analyse der Konzentrationen diverser Metabolite im knockout-Modell wurden wildtypische und *mito-Inc^{del}* Tiere im Alter von 18-22 Wochen mittels Dekapitation getötet, das Blut gewonnen und die Organe mittels kardialer Perfusion mit 1xPBS gespült. Anschließend wurden die Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Probenaufbearbeitung wurden die gefrorenen Gewebe mit einem Mörser auf Trockeneis zermahlen, die Proben abgewogen und in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt.

Zur Serumgewinnung wurde das gesammelte Blut für 5 Minuten bei Raumtemperatur koaguliert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm für 5 Minuten (RT) zentrifugiert. Die gelbliche, flüssige Phase bildet das Blutserum und wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Probenaufbearbeitung, sowie die Massenspektrometrischen Messungen und Analysen wurden von Sven Zukunft in Frankfurt durchgeführt. Herz und Fettgewebe wurden in 500 µl und die Leberproben in 1 ml 85 % Methanol lysiert und jeweils 200 µl verwendet. Zur Messung wurden 100 µl Plasma verwendet.

2.5 Statistische Auswertungen und Analysen

2.5.1 Transkriptomanalyse mittels GSEA

Zur genaueren Analyse der Transkriptomdaten aus der Affymetrix Analyse (2.2.4.6) wurde die Software GSEA (*Gene set enrichment analysis*) [98] verwendet. Diese ermöglichte eine genauere Betrachtung potentiell veränderter Gensets. Die Veränderten Parameter vor dem Start der Analysesoftware sind im Folgenden abgebildet:

veränderte Parameter GSEA

paramnum100
paramnormmeandiv
paramplot_top_x100
paramnperm1000
paramorderdescending
parammetricSignal2Noise

C57BL/6J Backcross:

paramnormmeandiv
paramplot_top_x100
paramnperm1000
paramorderdescending
parammetricDiff_of_Classes

Die Affymetrix Exon Array Daten wurde zunächst mittels des RMA (*Robust Multi-array Average*) Algorithmus standardisiert. Unter der Annahme, dass die Intensitäten aller Transkripte in einem Gewebe gleich sind, werden die Signale der einzelnen Sonden summiert und dienen so als Referenz zur Normalisierung der einzelnen Gene.

Verglichen wurde je GSEA die Transkriptomdaten von *mito-Inc* knockout und wildtypischen Tieren. Zur Analyse wurden folgende, bereits im Programm integrierte Datenbanken verwendet: Hallmark Datenbank [99], die C2 und die C5 Datenbank [100]. Gene deren Expressionsstärke um mehr als 5 % von der Kontrollgruppe abwichen galten als verändert. [101,102]

2.5.2 Auswertung der histologischen Analysen mittels ImageJ

Die Analyse der Größen der Herzzellen sowie die Größe der Muskelfasern im Skelettmuskel wurde das Programm ImageJ genutzt. Immunhistochemisch oder WGA markierte Gewebeschnitte wurden dafür mikroskopisch dokumentiert, mit einem Maßstabsbalken

versehen und als tiff-Datei exportiert. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Methoden genauer beschrieben.

2.5.2.1 Analyse der Kardiomyozytengröße mittels ImageJ

Zur Analyse der Größen der Kardiomyozyten wurden Herzquerschnitte mit WGA gefärbt und mikroskopisch dokumentiert (Absatz:). Die als tiff-Dateien exportierten Bilder wurden in ImageJ geöffnet und zunächst mit Hilfe des Freihand tools von ImageJ der Maßstabsbalken des importierten Bildes nachgezogen. Über den Befehl „set scale“ wurde die „known distance“ auf die tatsächliche Länge des Maßstabsbalkens gesetzt. Mit dem Freihandtool wurden anschließend die einzelnen Kardiomyozyten per Hand umrandet. Das betätigen der Taste „M“ gibt den Befehl zur Berechnung der Fläche.

2.5.2.2 Analyse der Muskelfasergrößen mittels ImageJ

Zur Bestimmung der Muskelfasergröße im Skelettmuskel wurden Fluoreszenzbilder der Immunhistochemischen Laminin Färbungen verwendet. Die als tiff-Dateien exportierten Bilder wurden in ImageJ geöffnet und zunächst mit Hilfe des Freihand tools von ImageJ der Maßstabsbalken des importierten Bildes nachgezogen. Über den Befehl „set scale“ wurde die „known distance“ auf die tatsächliche Länge des Maßstabsbalkens gesetzt. Die Einstellungen für die Messungen wurden in dem Menü „Set Measurements“ gemacht. Die Unterpunkte „Limit to threshold“, „Add to Overlay“ und „Display Label“ wurden ausgewählt. Mit dem Tool des Zauberstabes (wand tool) wurden die einzelnen Muskelfasern angeklickt und die entsprechende Außengrenze der Faser von ImageJ markiert. Die Markierung konnte bei Bedarf angepasst werden. Das betätigen der Taste „M“ gab den Befehl zur Berechnung der Fläche.

2.5.3 Statistische Auswertungen der Daten

Im Allgemeinen erfolgte die statistische Auswertung der Experimente mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism (Version 6). Die Auswahl des statistischen Tests war abhängig von der Gruppengröße sowie der Normalverteilung innerhalb der Gruppen. Lag eine Gaußverteilung innerhalb der Gruppen vor, wurde ein Students T-Test verwendet. war dies nicht der Fall wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Auswertung der Transkriptomdaten hervorgehend aus den Affymetrix Exon-Arrays erfolgte mittels eines modifizierten tTests. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Ausreißer wurde der ROUT-Ausreißertest verwendet. Zum multiplen Vergleichstest im Zuge einer

Varianzanalyse wurde der Fisher-LSD Test im Zuge einer two-way Anova Multivarianzanalyse verwendet. Statistische Signifikanzen wurden als p-Wert angegeben. Die verwendeten Signifikanzen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 2.4: Verwendete Symbole zur Darstellung der Signifikanzen

p-Wert	Symbol
p >0,05; nicht signifikant	ns
p ≤0,05; signifikant	*
p ≤0,01; signifikant	**
p ≤0,001; signifikant	***
p ≤0,0001; signifikant	****

2.5.4 Standardisierung der Daten mittels z-Transformation

Zur Auswertung der Daten aus den Transkriptom- bzw. Proteom-Analysen wurden die Daten standardisiert. Unter Verwendung der Normalverteilung bei der, der Erwartungswert $\mu = 0$ und die Streuung $\sigma = 1$ ist, kann eine sogenannte z-Transformation durchgeführt und die Daten standardisiert werden. Die Standardisierung erfolgte für jedes detektierte Gen bzw. Protein in dem jeweils der z-Wert über die Gesamtheit der Proben gebildet wurde. „Mit dem z-Wert wird in der Statistik die Differenz eines Rohwertes vom Mittelwerte beschrieben. Dafür wurde der arithmetische Mittelwert (μ) vom entsprechenden Messwert (x) subtrahiert und durch die Standardabweichung (σ) dividiert“. ($z = (x-\mu) / \sigma$) [214, 215]

3. Ergebnisse

3.1 Kandidatenvalidierung

Metabolische Prozesse spielen vor allem im kontraktilen Gewebe im Zusammenhang mit Krankheiten wie Diabetes, Insulin Resistenz (IR), Arteriosklerose, Adipositas oder diversen Herzerkrankungen eine zunehmende Rolle in der Forschung [11-19]. Unser Interesse bestand darin eine lncRNA zu identifizieren und charakterisieren, welche in solch metabolische Stoffwechselprozesse von kontraktilen Gewebe involviert sein könnte. Die erste Klassifizierung erfolgte anhand von Expressionsdaten aus diversen Geweben. Das Hauptaugenmerk bestand dabei auf einer erhöhten Expression der Kandidatengene in kontraktilen, metabolisch aktiven Geweben, wie der Muskulatur, dem Herzen, oder dem braunen Fettgewebe (BAT). Diese Organe sind aktiv bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase des gesamten Organismus involviert und zeigen zugleich deutliche Unterschiede in ihrem organspezifischen Stoffwechsel [4].

Im Zuge der Kandidatenvalidierung sollten für verschiedene lncRNAs, KO-Mäuse generiert und eine präliminäre phänotypische Analyse durchgeführt werden (hmbs-lncRNA (AK086006), bfs-lncRNA (AK080070), HS-lncRNA (AK013431), *mito-lnc* (AK079912)). Der genomische Locus von zwei der lncRNA Kandidaten (bfs-lncRNA, HS-lncRNA) zeigte sich als schwierig manipulierbar. Der Versuch der homologen Rekombination, beziehungsweise genomischen Deletion mittels des CRISPR/CAS9 Systems oder der klassischen, plasmidbasierten homologen Rekombination, zeigte keinen Erfolg. Im Falle der bfs-lncRNA konnte zwar erfolgreich ein Reparaturplasmid zur homologen Rekombination generiert werden, jedoch zeigte sich die Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) als wenig effizient. Es konnte nur ein positiver mES-Zell Klon nachgewiesen werden, welcher für die Generierung der *knockout* (KO)-Mäuse verwendet wurde ([Anhang Abb. 7.2](#)). Die genomische Analyse mittels Southernblot, zur Validierung der Rekombination, zeigte im 3'-Bereich des Ziellokus ein positives Ergebnis. Die Genotypisierung bestätigte die Ergebnisse im 3'-Bereich, zeigte jedoch im 5'-Bereich des Ziellokus der putativ homozygoten Tiere (F1), eine zusätzliche WT-Bande. Zur Validierung des *knockouts* wurde RNA aus dem BAT der bfs-lncRNA mutanten Tiere extrahiert und mittels genspezifischer Primer eine q RT-PCR durchgeführt. Die Verwendung von Exonübergreifenden Primern zeigte nur eine geringfügigere Verringerung der Expression

der bfs-lncRNA, in den putativ homozygoten *knockout* Mäusen, im Vergleich zu wildtypischen oder heterozygoten Kontrolltieren. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die einzelne PCRs, mit spezifischen Primern für jeweils nur ein Exon der bfs-lncRNA.

Die erfolgreich generierten Mausmodelle zur Analyse der Funktion von lncRNAs wurden zunächst basal phänotypisch untersucht. Dazu wurden adulte KO- und WT-Mäuse verwendet. Es wurden diverse histologische sowie molekularbiologische Analysen für diese Kandidaten durchgeführt. Im Verlauf der Validierung konnte mit den verwendeten Methoden kein deutlicher Phänotyp der KO-Linie für die hmb-lncRNA gezeigt werden (Anhang Abb. 7.3, 7.4).

Die Entscheidung fiel schlussendlich auf *mito-lnc*, eine lncRNA mit einer starken Expression im BAT, sowie im Herzen und der Skelettmuskulatur von adulten Mäusen. Im Zuge der Kandidatenvalidierung zeigten die untersuchten KO-Mäuse unter anderem einen kardialen Phänotyp, woraufhin der Fokus für diese Arbeit auf der Analyse der Funktion von *mito-lnc* im Herzen von adulten Mäusen gelegt wurde.

3.2 Charakterisierung von *mito-lnc*

3.2.1 *in-silico* Analyse

Die Charakterisierung der lncRNA *mito-lnc* beinhaltete zunächst eine *in-silico* Analyse des genomischen Locus. Die lncRNA mit der *Accession*-Nummer AK079912 (chr6:86,463,889-86,466,267) wurde anhand des Exonarrays (GeneChip Exon 1.0 ST Array (Affymetrix Inc.) von Gellert et al [104] als nicht-kodierende RNA annotiert. Diese Transkriptomdaten zeigten eine starke Expression der lncRNA im Herzen, im Skelettmuskel und im braunen Fett (BAT) von Mäusen. Auch in der Niere und im weißen Fettgewebe (WAT) konnte die lncRNA geringfügig detektiert werden (Abb. 3.1 A-B). Zur *in-silico* Analyse wurde unter anderem der UCSC Genome Browser [208] verwendet. RNA-seq Daten von 2012 aus der ENCODE/LICR Datenbank [105-107] aus dem UCSC Genome Browser bestätigten die Ergebnisse bezüglich der Expression der lncRNA. Die *mito-lnc* ist 425 bp lang und der genomische Locus umfasst 2379 bp. Kodiert ist sie auf dem (-)-Strang und beinhaltet 2 Exone (Abb. 3.1 C). Sequenzierungsdaten aus Chromatin-Immunoprecipitationen (ChIP) von 2012 aus der ENCODE/LICR Datenbank [108-124] des UCSC Genome Browsers, zeigten im Herzen eine Polymerase 2 Bindestelle, sowie einen H3K4me3 Peak über dem ersten Exon der lncRNA. Beides konnte nicht in der

Leber oder in E14.5 Mausherzen detektiert werden. Etwa 7 kb *upstream* der lncRNA ist *Pcbp1*, neben zwei weiteren annotierten Genen lokalisiert (RefSeq Gene, UCSC Genome Browser [105-107]). Die Analyse der Daten zur Expression von *mito-lnc* anhand eines Exon Array Datensets (Affymetrix Exon Array 1.0: Normal Tissues, UCSC Genome Browser) [125], zeigte eine starke Expression des ersten Exons von *mito-lnc* im Herzen und im Skelettmuskel (Abb. 3.1 D). Zusätzlich konnte *mito-lnc* in der Niere detektiert werden. Für das zweite Exon konnte nur im Herzen eine deutliche Expression gezeigt werden. Die Daten zur Konservierung der lncRNA entstammen ebenfalls der UCSC Genome Browser Datenbank und wurden mit Hilfe einer Multi Alignment Analyse, basierend auf *phastCons* und *phyloP* [126-135], von der Penn State University Center for Comparative Genomics and Bioinformatics erstellt. Die genomische Sequenz des ersten Exons von *mito-lnc* zeigte in der Ratte, eine Konservierung (Abb. 3.1 E). Die Sequenz des ersten Exons von *mito-lnc* war zudem unter anderem im Menschen partiell konserviert.

Die Kodierungswahrscheinlichkeit wurde anhand des CPC2 ermittelt [136]. Für die Analyse wurden Sequenzen von *mito-lnc* und den bereits beschriebenen lncRNAs *Nron* und *Hotair*, den Mikropeptiden *Dwarf* und *Myoregulin* und den proteinkodierenden Genen, *Acta1* und *Gapdh*, verwendet [136-142]. Das Kodierungspotential setzte sich aus der Analyse mehrerer Merkmale zusammen. Eine Rolle spielten dabei die Länge, die Qualität und die Integrität der offenen Leserahmen (ORFs). Als zusätzliches Merkmal für die Bestimmung des Kodierungspotentials, wurden die Treffer mit Protein-kodierenden Genen aus BLASTN Analysen mit eingerechnet. [143] Das Kodierungspotential von *mito-lnc* war vergleichbar mit dem von *Nron*, beide waren geringer im Vergleich zum Kodierungspotential von *Hotair* (Abb. 3.2 A). Die kodierenden Gene *Gapdh* und *Acta1* haben ein Kodierungspotential von 1. Die Mikropeptide *Dwarf* und *Myoregulin* waren mit dem Kodierungspotential der lncRNAs vergleichbar. Weiterhin wurde im Zuge der CPC2 Berechnung [136] der Fickett-Wert berechnet. Dieser basiert auf der Berechnung der Triplett Anordnung und deren Wahrscheinlichkeit eines realen Leserahmens [144]. Je niedriger dieser Wert, desto geringer die Wahrscheinlichkeit eines Kodierungspotentials. Der Fickett-Wert für *Gapdh* und *Acta1* war $>0,4$, während der, der lncRNAs unter $0,35$ lag (Abb. 3.2 B). Der Fickett-Wert für die Mikropeptide *Dwarf* und *Myoregulin* war $>0,4$. Ein weiterer Faktor war die Länge der Offenen Leserahmen (ORF), angegeben in Aminosäuren (AS). Die untersuchten lncRNAs, sowie Mikropeptide, hatten ORF Längen von <100 AS (Abb. 3.2 C). Die

protein-kodierenden Gene hatten ORF's mit Längen von >300 AS. Betrachtete man die Kodierungswahrscheinlichkeit von *mito-lnc* im Blickwinkel des gesamten Transkriptoms auf der Basis von kodierenden und nicht-kodierenden Genen wiesen etwa 8,6 % der nicht-kodierenden RNAs ebenfalls einen ORF von ca 56 AS auf (Abb. 3.2 D). Weniger als 0,005 % der annotierten mRNAs zeigte eine solche Peptidlänge. Betrachtete man den Fickett-Wert von *mito-lnc* (0,35), im Blickwinkel des gesamten Transkriptoms hatten 6,4 % der nicht-kodierenden und 2,4 % der kodierenden RNAs den gleichen Fickett-Wert (Abb. 3.2 E). Weiterhin wurden beide Exone von *mito-lnc* mittels BLASTX [218] auf homologe Proteinsequenzen überprüft, um eine putative Translation auszuschließen. Die Analyse ergab, im Falle des ersten Exons, keine Treffer. Im Falle des zweiten Exons ergaben sich 26 Treffer. Die Längen der positiven Sequenzen betragen zwischen 19 und 44 bp, mit einer prozentualen Identität zwischen 63 % und 85 %. Die prozentuale Identität beschreibt dabei die Ähnlichkeit der untersuchten Sequenz mit der Zielsequenz [216].

AffymetrixExon Array 1.0 (UCSC Genome Browser) Datensets. Das Datenset zeigte eine starke Expression des ersten Exons von *mito-Inc* im Herzen und im Muskel. Zusätzlich konnte *mito-Inc* in der Niere detektiert werden. Für das zweite Exon konnte nur im Herzen eine Expression gezeigt werden. **(E)** Multi Alignment Analyse (UCSC Genome Browser) zur Konservierung von *mito-Inc*. Dargestellt ist der Konservierungswert, basierend auf der multiplen Alignment Analyse, zur evolutionären Konservierung. Dafür wurden die beiden Methoden *phastCons* und *PhyloP* verwendet. Der Graustufendichteplot zeigt die Qualität des Alignments. Je dunkler die Werte, desto höher ist das Level der allgemeinen Konservierung. Die genomische Sequenz des ersten Exons von *mito-Inc* war in der Ratte konserviert. Das zweite Exon zeigte keine Konservierung. (BAT = braunes Fett; m. Sol = *Musculus Soleus*; m. TA = *Musculus Tibialis anterior*; m. Quad = *Musculus Quadrizeps*) [verändert nach 210]

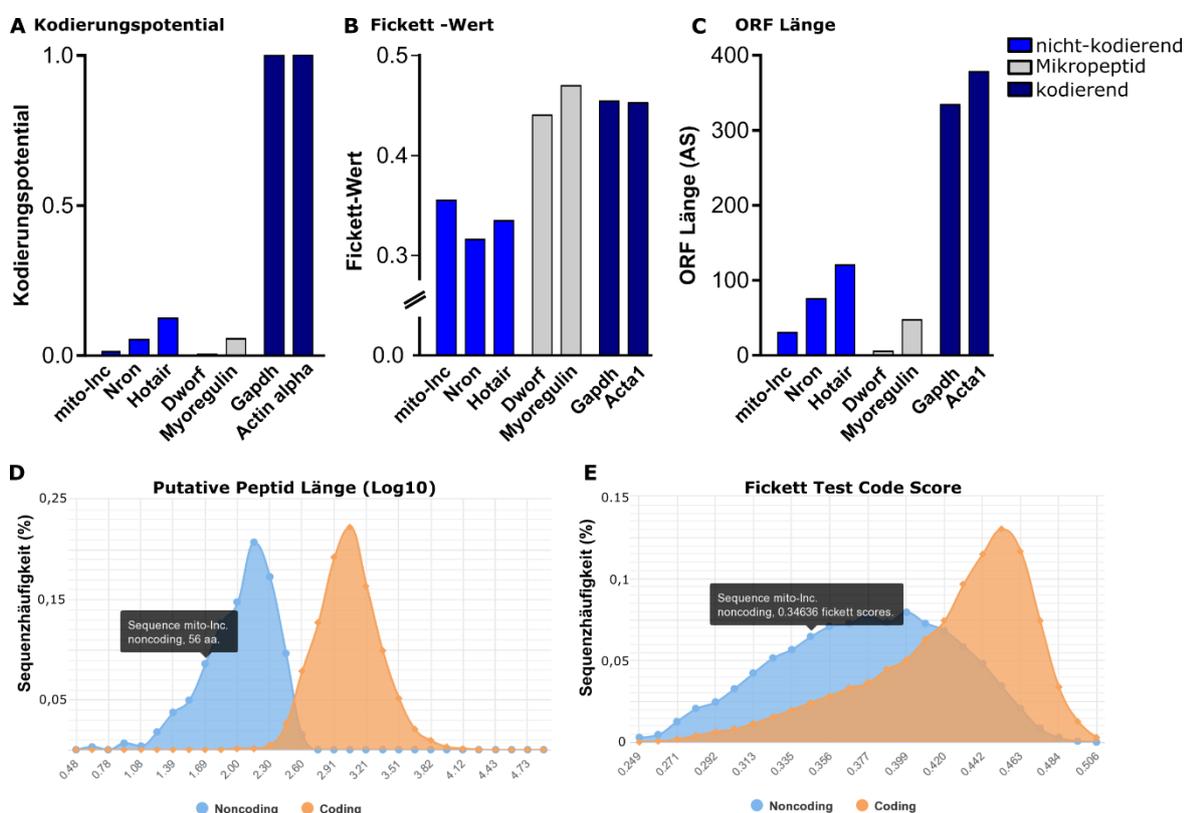


Abb. 3.2: Die *mito-Inc* ist eine nicht-kodierende RNA. (A) CPC2 Analyse zum Kodierungspotential verschiedener Gene. Verglichen wurden die Kodierungspotentiale von *mito-Inc* und den bereits beschriebenen lncRNAs, *Nron* und *Hotair*, den Mikropeptiden *Dworf* und *Myoregulin* und den proteinkodierenden Genen *Acta1* und *Gapdh*. Das Kodierungspotential von *mito-Inc* war vergleichbar mit dem von *Nron*, beide waren geringer als das Kodierungspotential von *Hotair*. Die kodierenden RNAs *Gapdh* und *Acta1* haben ein Kodierungspotential von 1. Die Mikropeptide *Dworf* und *Myoregulin* waren mit dem der lncRNAs vergleichbar. **(B)** CPC2 Analyse zum Fickett-Wert. Der Fickett-Wert für *Gapdh* und *Acta1* war $>0,4$. Der Fickett-Wert der untersuchten lncRNAs lag zwischen 0,3 und 0,35. *Myoregulin* hatte den höchsten Fickett-Wert von allen untersuchten RNAs (0,47). **(C)** CPC2 Analyse zur Länge der Offenen Leserahmen (ORF), angegeben in der Menge an Aminosäuren (AS). Die untersuchten lncRNAs, sowie Mikropeptide zeigten Längen <100 AS. *Nron* hat den längsten ORF, mit 75 AS. Die RNA des Mikropeptids *Dworf* hatte nur eine ORF Länge

von 36 AS. Im Falle von *mito-lnc* betrug die Länge des ORFs 56 AS. Die bekanntlich kodierenden Gene *Acta1* und *Gapdh* zeigten ORF Längen von >300 AS. **(D)** CPC2 Berechnung der Kodierungswahrscheinlichkeit von *mito-lnc*. 8,6 % der nicht-kodierenden RNAs zeigen einen ORF von ca 56 AS auf. Weniger als 0,005 % der annotierten mRNAs zeigten eine solche Peptidlänge. **(E)** CPC2 Berechnung des Fickett-Werts von *mito-lnc*. Der Fickett-Wert von *mito-lnc* lag bei 0,35. 6,4 % der nicht-kodierenden und 2,4 % der kodierenden RNAs zeigen den gleichen Wert. [136]

3.2.2 Lokalisierung von *mito-lnc*

Zur Weiteren Charakterisierung der lncRNA erfolgte eine Analyse zur Lokalisierung der Ziel-RNA auf Transkriptomebene. Die dafür verwendeten Kardiomyozyten wurden fraktioniert und deren RNA gewonnen. Die Analyse erfolgte mittels q RT-PCR unter Verwendung genspezifischer, Exon-übergreifender Primer. Zur qualitativen Kontrolle der einzelnen Fraktionen wurden verschiedene Kontroll-RNAs verwendet. *Neat1* diente als nukleare [32], und *Gapdh* diente als zytoplasmatische Kontrolle [142]. Zur Validierung der Expressionsdaten wurde der $2^{-\Delta CT}$ -Wert berechnet. Dafür wurden die CT-Werte der extranuklearen Fraktion von der entsprechenden nuklearen Fraktion subtrahiert und negativ potenziert ($2^{-(CT_{\text{extra}}-CT_{\text{nuklear}})}$). Die Lokalisierung der nuklearen Kontrolle *Neat1* war auf die nukleare Fraktion limitiert (Abb. 3.3 A). *Neat1* konnte in der extranuklearen Fraktion nur geringfügig amplifiziert werden und war vergleichbar mit der Wasserkontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass *mito-lnc* ein vergleichbares Lokalisierungsmuster aufweist wie *Gapdh*. Der Durchschnitt der Daten beider RNAs lag jeweils über dem Schwellenwert von 1 ($n = 3$). Beide RNAs waren vorwiegend in der extranuklearen Fraktion von isolierten Kardiomyozyten lokalisiert. Für eine detailliertere Analyse der Lokalisierung wurde RNA aus kardialen Mitochondrien isoliert. Zur späteren Normalisierung der Daten wurde vor der eigentlichen Mitochondrienisolierung ein Teil des Herzens entnommen und die RNA beider Fraktionen isoliert. Die Analyse erfolgte mittels q RT-PCR, unter Verwendung Genspezifischer, Exon-übergreifender Primer. Zur qualitativen Kontrolle der Mitochondrien wurden verschiedene Kontroll-RNAs verwendet. *Tfam* diente als kernkodierte und mitochondrial lokalisierte Kontrolle, während β -Aktin als zytoplasmatische Kontrolle verwendet wurde [145,146]. Zur Validierung der Expressionsdaten wurde der $2^{-\Delta CT}$ -Wert berechnet. Dafür wurden die CT-Werte der mitochondrialen Fraktion von der entsprechenden Gesamtfraktion subtrahiert und negativ potenziert ($2^{-(CT_{\text{extra}}-CT_{\text{nuklear}})}$). β -Aktin wurde in den isolierten Mitochondrien nur geringfügig detektiert ($2^{-\Delta CT}$: 0,01) ($n = 4$) (Abb. 3.3 B). *mito-lnc* wurde etwa 8-fach höher in den

Mitochondrien detektiert im Vergleich zu β -Aktin ($2^{-\text{deltaCT}}$: 0,08) ($n = 4$). *Tfam* wurde im Vergleich zu β -Aktin im Durchschnitt etwa 20-fach höher detektiert ($2^{-\text{deltaCT}}$: 0,198) ($n = 3$). Zur Validierung der Daten aus der Lokalisierungsanalyse mittels q RT-PCR, wurde eine RNA Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (RNA-FISH), mit Hilfe von Alina Brandl durchgeführt (Abb. 3.3 D) [155]. Zur Kontrolle der Lokalisierung der Mitochondrien von isolierten Kardiomyozyten wurde eine Sonde gegen *Atp6* verwendet. *ATP6* ist mitochondrial kodiert und lokalisiert [147,148]. *Atp6* konnte klar abgegrenzt, hauptsächlich in dem Bereich rund um den Nukleus detektiert werden. Die *mito-lnc* zeigte im Vergleich zu *ATP6* eine deutlich geringere Abundanz. Die Co-Hybridisierung mit *Atp6* zeigte im Falle von *mito-lnc* ausschließlich Co-Lokalisierungen mit *Atp6*. Nicht alle *Atp6* markierten Bereiche zeigten ein Signal von *mito-lnc*. Zur Analyse der Spezifität der RNA-FISH wurden KO-Kardiomyozyten als negativ Kontrolle verwendet und eine Co-Lokalisierungsanalyse durchgeführt (Abb. 3.3 C). Die Fluoreszenzaufnahmen der wildtypischen Kardiomyozyten zeigten eine Co-Lokalisierung von *mito-lnc* mit *Atp6*. Die KO-Kardiomyozyten zeigten kein spezifisches Signal für *mito-lnc* und somit auch keine Co-Lokalisierung mit *Atp6*. Mittels der Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die Co-Lokalisierung von *mito-lnc* mit *Atp6* genauer untersucht. Analysiert wurde dabei die Häufigkeit mit welcher ein Signal von *mito-lnc* mit einem Signal von *Atp6* co-lokalisiert vorkommt. Dafür wurde der Co-Lokalisierungskoeffizient M1 verwendet. Dieser beschreibt wie viele der detektierten Objekte im Kanal 2 (ROT), mit den detektierten Objekten im Kanal 1 (grün), co-lokalisiert sind. Wobei eine 100 %-ige Überlappung der Signale einen Wert von 1 hat. Für die Analyse wurde das Tool coloc2, aus dem Programm ImageJ verwendet. [149] Eine Co-Lokalisierung lag nur in den *mito-lnc*^{+/+}-Kardiomyozyten vor. Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test verwendet, um die Unterschiede zwischen WT und KO Kardiomyozyten auszuwerten. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von <0,001. (Die statistische Analyse der einzelnen Daten der KO-Kardiomyozyten zeigte, dass 75 % einen Lokalisierungskoeffizienten von 0,001 aufwiesen. Daher wurden im Falle der WT-Gruppe alle Daten <0,001 von der statistischen Analyse ausgeschlossen.)

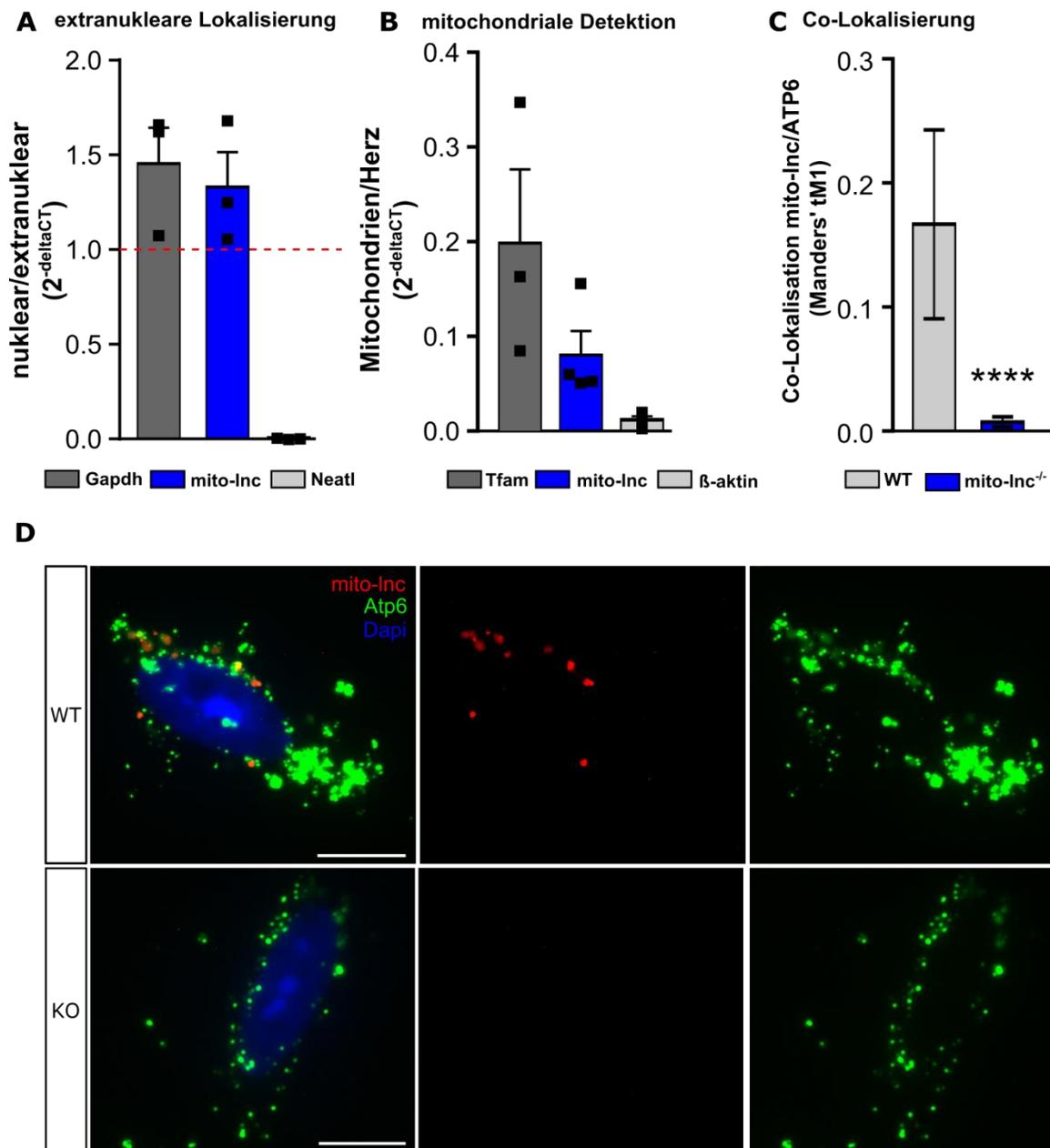


Abb. 3.3: Die *mito-lnc* ist mit Mitochondrien co-lokalisiert. (A) Fraktionierungsanalyse der extranukleären Fraktion im Vergleich zur nukleären Fraktion. Die Analyse erfolgte mittels q RT-PCR aus RNA von isolierten Kardiomyozyten (WT, adult). Dargestellt ist das Verhältnis von extranukleärer zu nukleärer Fraktion ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *Neat1* diene als nukleare und *Gapdh* als zytoplasmatische Kontrolle [32,142]. Der durchschnittliche Wert von *mito-lnc* und *Gapdh* lag jeweils über dem Schwellenwert von 1 ($n = 3$), während der Durchschnittswert von *Neat1* bei 0,005 lag. ($n = 3$) (B) Fraktionierungsanalyse von isolierten, kardialen Mitochondrien (WT), mittels q RT-PCR. Dargestellt ist das Verhältnis von Mitochondrien zum gesamten Herzen ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *Tfam* diene als kernkodierte, mitochondrial lokalisierte RNA und β -Aktin als zytoplasmatische Kontrolle. β -Aktin wurde in den isolierten Mitochondrien nur geringfügig detektiert ($2^{-\Delta\Delta CT}$: 0,01) ($n = 4$). Die *mito-lnc* wurde etwa 8-fach höher in den Mitochondrien detektiert im Vergleich zu β -Aktin ($2^{-\Delta\Delta CT}$: 0,08) ($n = 4$). *Tfam* wurde im Vergleich zu β -Aktin im Durchschnitt etwa 20-fach höher detektiert ($2^{-\Delta\Delta CT}$: 0,198) ($n = 3$). (C) Grafische Darstellung der Auswertung zur Analyse der Co-Lokalisierung von *mito-lnc*

mit *Atp6*. Da keine Normalverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen vorlag wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test verwendet um die Unterschiede zwischen WT- und KO-Kardiomyozyten auszuwerten. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von $<0,001$. **(D)** Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung im Vergleich WT-Kardiomyozyten gegenüber *mito-lnc* KO-Kardiomyozyten. Blau: Färbung mit Dapi (353 nm). Grün (488 nm): Färbung über *Atp6*-Sonden. Rot (594 nm): Färbung über *mito-lnc* Sonden. Dargestellt ist die mikroskopische Aufnahme aller drei Kanäle, sowie die Einzelkanalaufnahme für *mito-lnc* (rot) und *Atp6* (grün) (von links nach rechts). Die Fluoreszenzaufnahmen der *mito-lnc*^{+/+}-Kardiomyozyten zeigten eine Co-Lokalisierung von *mito-lnc* mit *Atp6*. Die Fluoreszenzaufnahmen der KO -Kardiomyozyten zeigten kein spezifisches Signal für *mito-lnc* und somit auch keine Co-Lokalisierung mit *Atp6*. Die Aufnahmen wurden für die Vergleichbarkeit mit gleicher Intensität und Belichtungszeit aufgenommen. Skala = 5 μm . [142,145-149]

3.2.2 Interaktion von *mito-lnc*

Das Interaktom einer lncRNA ist ein bedeutender Faktor in der Analyse ihrer Funktion. Zur Identifikation der, oder des Interaktionspartners von *mito-lnc* wurden verschiedene RNA-Pulldown Experimente durchgeführt. Diverse Vorversuche mit C2C12 Zelllysaten und BAT Zelllysaten ([Anhang Abb. 7.5 A](#)) implizierten eine Interaktion von *mito-lnc* mit BCAA metabolisierenden Enzymen. Für den RNA-Pulldown wurden schließlich Proteinlysate von wildtypischen Herzen verwendet (n = 3). Dabei wurde je ein individuelles Herzlysat für je eines der Triplikate der *in vitro* transkribierten lncRNAs verwendet. Die angereicherten Proteine der einzelnen Proben wurden von Johannes Graumann massenspektrometrisch untersucht und Bioinformatisch ausgewertet. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der einzelnen Replikate des RNA Pulldown Experiments zeigte, dass die einzelnen Versuchsgruppen zu 67,3 % gruppiert und ohne Überlappungen, im Vergleich der drei analysierten lncRNAs vorlagen. Innerhalb der Triplikate der einzelnen Gruppen lag jeweils ein Ausreißer vor. Zur Analyse wurden die Daten unter Verwendung des z-Wertes standardisiert.

Der Vergleich der angereicherten Proteine mit Hilfe des z-Werts zeigte eine Anreicherung der BCAA metabolisierenden Gene mit *mito-lnc* im Vergleich zu beiden Kontroll-RNAs ([Abb. 3.4 C](#)). Für fast alle detektierten BCAA-metabolisierenden Proteine konnte eine Anreicherung mit *mito-lnc* gezeigt werden ([Anhang Abb. 7.5 B](#)). Weiterhin wurde die Anreicherung der Proteine mit *mito-lnc* gegenüber dem Mittelwert beider Kontroll-RNAs verglichen (Mittelwert (CtrlI+CtrlII)). Mit *mito-lnc* konnte eine signifikante Anreicherung der BCKDHA und BCKDK gezeigt werden ([Abb. 3.4 D](#)). Zusätzlich konnte die Anreicherung weiterer BCAAmetabolisierender Gene mit *mito-lnc* bestätigt werden. So konnten alle

Untereinheiten des BCKD Komplexes mit *mito-lnc* angereichert werden. Die Anreicherung der BCKDHA mit *mito-lnc* war signifikant mit einem p-Wert von 0,02 (zweiseitiger t-Test). Für BCKDHB ergab sich ebenfalls eine signifikante Anreicherung mit einem p-Wert von 0,046. DBT und DLD wurden zwar mit *mito-lnc* detektiert, zeigten jedoch keine signifikante Anreicherung im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste Anreicherung konnte jedoch mit *mito-lnc* gezeigt werden. Weiter stromabwärts im Metabolismusweg involvierte Enzyme wurden ebenfalls mit *mito-lnc* angereichert. Darunter ACADM, ACADS, ACADSB und ACAT1 ([Anhang Abb. 7.5 B](#)).

Zur weiteren Analyse der Interaktion von *mito-lnc* mit dem BCKD Komplex wurde ein RNA *in-situ* Hybridisierungs *proximity ligation* Assay (rISH-PLA) auf isolierten Kardiomyozyten durchgeführt ([Abb. 3.4 E](#)). Dieses Experiment wurde von Christian Schutt durchgeführt. Der Assay beruht auf dem Prinzip, dass die räumliche Nähe, beziehungsweise Interaktion zweier Interaktionspartner zueinander ein spezifisches, detektierbares Signal produziert. Dafür wurden spezifische *antisense* Sonden für *mito-lnc* und die entsprechenden Primärantikörper gegen die Untereinheiten des BCKD Komplexes verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Antikörper gegen CYTC verwendet, ein mitochondriales Protein, welches nicht mit *mito-lnc* interagiert [150]. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden WT- sowie KO-Kardiomyozyten ausschließlich mit den sekundären Antikörpern behandelt. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden die mikroskopischen Aufnahmen der rISH-PLA mit der Immunhistochemischen Antikörperfärbung der einzelnen Proteine in wildtypischen Kardiomyozyten verglichen ([Anhang Abb. 7.6](#)). Die mikroskopische Auswertung zeigte für die BCKDHA eine Akkumulation spezifischer Signale außerhalb des Zellkerns. Unter der Verwendung der Kombination der Sonden gegen *mito-lnc* und dem Primärantikörper gegen CYTC, konnten keine positiven Signale detektiert werden. Ebenso verhielt es sich im Falle der Negativkontrolle mittels Sekundärantikörper.

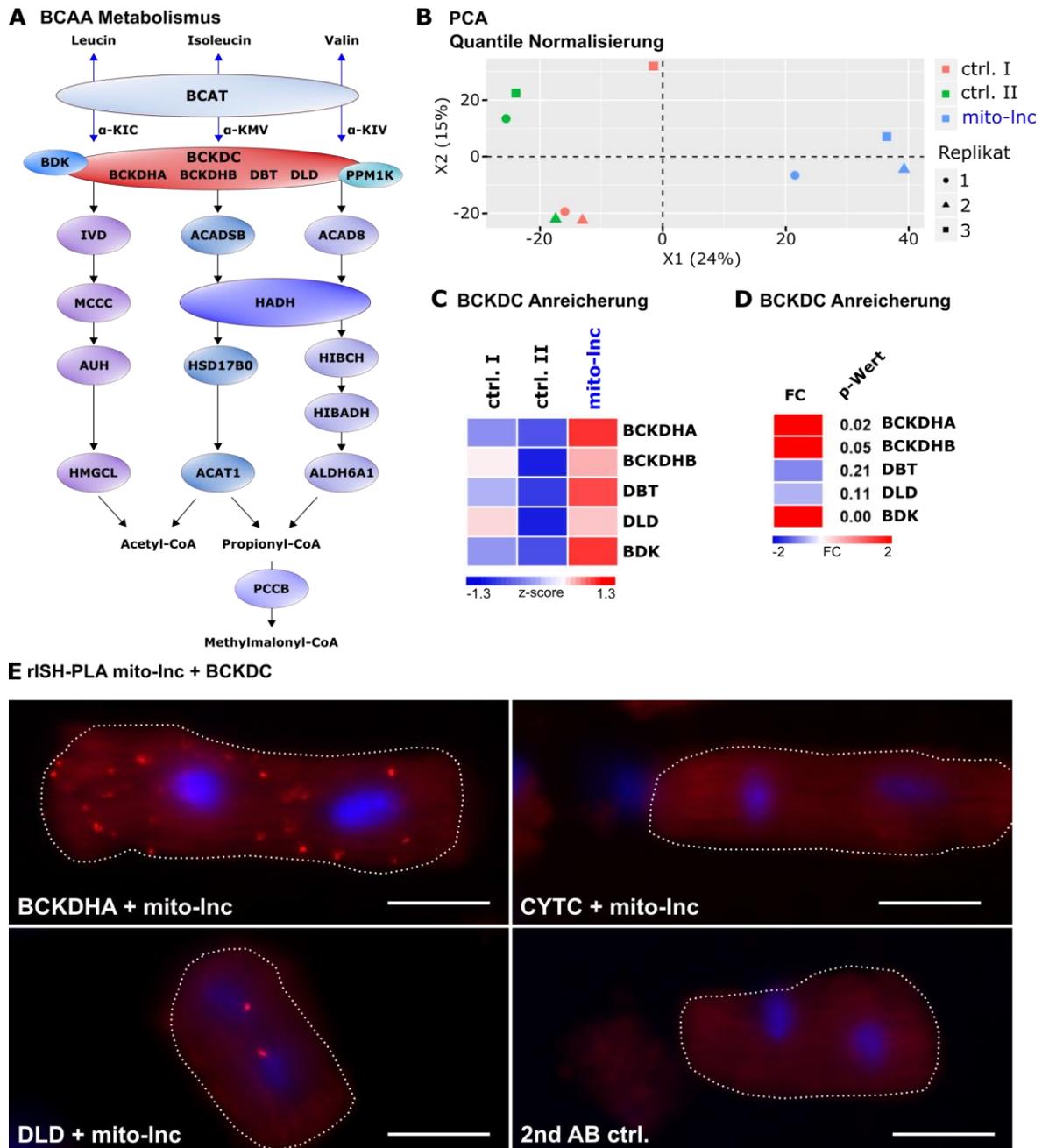


Abb. 3.4: Der BCKD Komplex ist der putative Interaktionspartner von *mito-Inc*. (A) Schematische Darstellung der Enzyme des BCAA Metabolismus [verändert nach 200]. (B) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der einzelnen Replikate des RNA Pulldown Experimentes. Die Streuung innerhalb der Gruppen ist prozentual abgebildet. Die einzelnen Datensets der Proteingruppen, jeweils bestehend aus Triplikaten, lagen in 67,3 % der Fälle gruppiert vor und zeigten keine Überlappungen. Sie waren räumlich getrennt. (C) *Heatmap* der massenspektrometrischen Analyse des RNA-Pulldown Experimentes zur Interaktion von *mito-Inc* im Vergleich zweier Kontroll-IncRNAs. Dargestellt ist der z-Wert der gemittelten Detektionswerte der einzelnen Triplikate der Proteine des BCKD Komplexes und dessen Kinase. Alle Untereinheiten des Komplexes wurden mit *mito-Inc* angereichert. Die E3 Untereinheit (DLD) wurde auch mit einer Kontroll-IncRNAs angereichert (D) Dargestellt ist die *Heatmap* der Anreicherung der Kompartimente des BCKD Komplexes von *mito-Inc* gegenüber des Mittelwerts beider Kontroll-RNAs und dem entsprechenden p-Wert. (E) rISH-PLA auf isol. WT- und KO-KM's unter Verwendung genspezifischer RNA-Sonden für *mito-Inc* in

Kombination mit spezifischen Antikörpern gegen BCKDHA, CYTC und DLD. Zur Kontrolle wurden nur die sekundären Antikörper verwendet (2nd AB ctrl.). Die Verwendung der Sonden gegen *mito-lnc* in Kombination mit spezifischen Primärantikörpern gegen BCKDHA und DLD zeigte spezifische Signale. Im Falle von CYTC konnten keine positiven Signale ausgemacht werden. Dies war auch für die Antikörperkontrolle der Fall (2nd AB ctrl.). Die Zellkerne wurden mittels Dapi Färbung (blau) markiert. Skala = 5 μ m. Blau: Färbung mit Dapi (353 nm). Rot: Färbung Sonden/Antikörper (594 nm)

3.3 Charakterisierung des *in vivo* LOF Modells

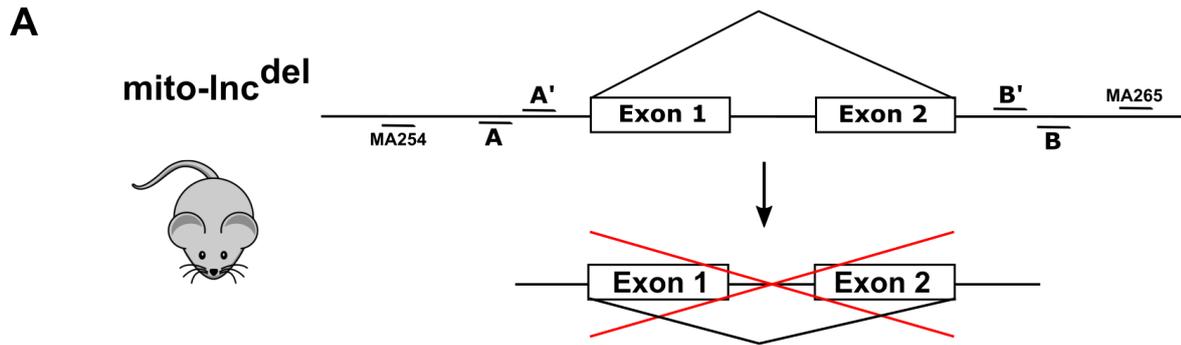
3.3.1 Die Generierung von *mito-lnc* KO-Mäusen mittels CRISPR/CAS9n

Die Generierung und Validierung der Plasmide zur genetischen Detektion von *mito-lnc* in Mäusen wurde mit Unterstützung durch Simone Fister durchgeführt [151]. Dafür wurde das CRISPR/Cas9n System verwendet [91-94]. Die Analyse der transfizierten mES-Zellen erfolgte mittels semiquantitativer PCR und anschließender Sequenzierung der amplifizierten Produkte. Die Sequenzierungsdaten zeigten eine genomische Deletion im gewünschten Bereich ([Anhang Abb. 7.7 A](#)). Die positiven mES-Zellklone wurden anschließend zur Generierung von KO-Mäusen verwendet. Die Überprüfung des genomischen Status der Mäuse wurde eine Genotypisierungs-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer etabliert ([Abb. 3.5 B](#)). Wildtypische Tiere zeigen ein 591 bp langes PCR Produkt während KO-Tiere ein 470 bp langes Produkt zeigen. Die KO-Effizienz im Herzen wurde im Zuge der Transkriptomanalyse (Absatz 3.3.4) überprüft ([Abb. 3.5 C](#)).

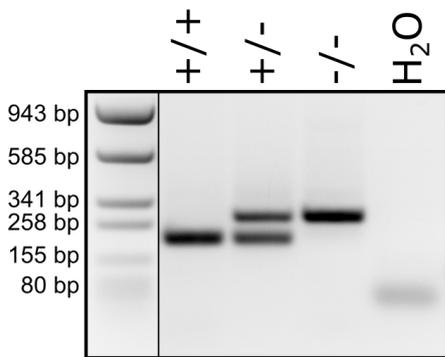
Die KO-Gruppe beinhaltet sowohl *mito-lnc*^{-/-} und *mito-lnc*^{PA}-Tiere. Die Affymetrix Exon Array Daten wurde mittels des RMA (*Robust Multi-array Average*) Algorithmus standardisiert. Die Expression von *mito-lnc* im Herzen war signifikant verringert (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,0083, Wildtyp; n = 7, *mito-lnc* KO; n = 8). Die Expression von *mito-lnc* im BAT war signifikant verringert (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,0143, Wildtyp; n = 4, *mito-lnc*^{del} KO; n = 4).

Als Kontrolle und zur weiteren Analyse der Funktion der lncRNA wurden zusätzlich Mäuse generiert, welche eine polyA-Sequenz im ersten Exon der lncRNA inseriert haben. Dies induziert einen Transkriptionsstop und imitiert somit den KO-Zustand, ohne jedoch eine größere genomische Mutation als Basis zu haben. Wie bereits im Falle der genomischen Deletion, wurden die transfizierten mES-Zellen mittels semiquantitativer PCR, unter Verwendung genspezifischer Primer und anschließender Sequenzierung, überprüft. Die

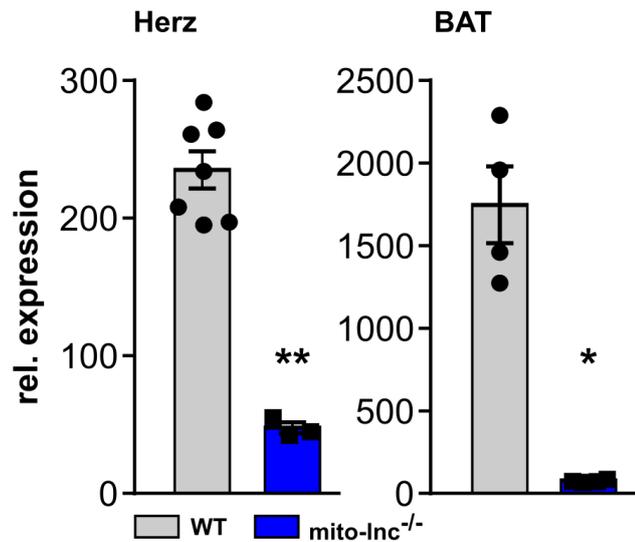
positiven mES-Zellen wurden für die Generierung der mutanten Mäuse verwendet. Die Sequenzierung der spezifischen Produkte zeigte eine fehlerlose polyA-Sequenz, inseriert im ersten Drittel des ersten Exons ([Anhang Abb. 7.7 B](#)). Die Funktionsfähigkeit der Sequenz wurde mittels q RT-PCR überprüft ([Abb. 3.5 F](#)). Die homozygoten polyA-Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der Expression von *mito-Inc*. Der p-Wert unter Verwendung eines einseitigen Mann-Whitney-Tests betrug 0,05. Die Überprüfung des genomischen Status der Mäuse wurde eine Genotypisierungs-PCR unter Verwendung spezifischer Primer etabliert ([Abb. 3.5 E](#)). Wildtypische Tiere zeigen eine 365 bp langes PCR Produkt während homozygot-mutante Tiere ein 412 bp langes Produkt zeigen.



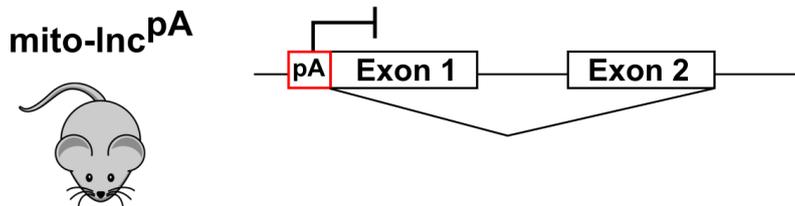
B Genotypisierung - mito-lnc^{del}



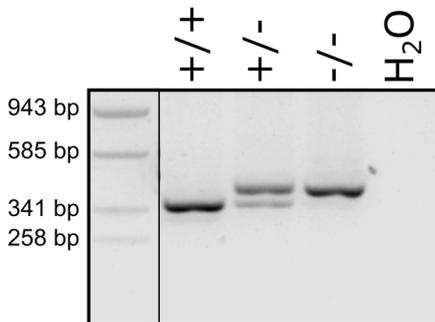
C Expression mito-lnc



D



E Genotypisierung - mito-lnc^{pA}



F Expression mito-lnc

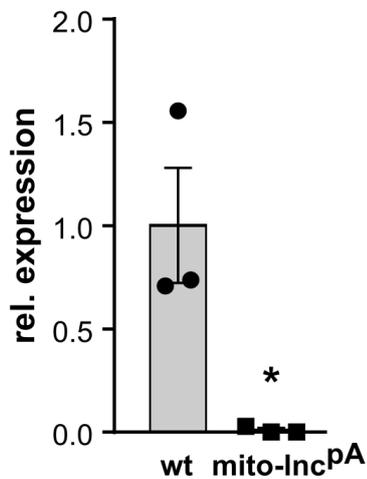


Abb. 3.5: *in vivo* Deletion von *mito-lnc* mittels CRISPR/CAS9 System. (A) Schematische Darstellung der Cas9n medierten genomischen Deletion beider Exone

von *mito-Inc*. Zur Deletion des genomischen Locus von *mito-Inc* wurden vier verschiedene sgRNAs verwendet (A, A', B, B'). Die Verwendung aller vier sgRNAs in Kombination mit der Cas9n führt zur vollständigen Deletion des Ziellokus. Zur Validierung wurden die außenliegenden Primer MA254 und MA265 verwendet. **(B)** Genotypisierungs-PCR der *mito-Inc^{del}* Mäuse. **(C)** Transkriptionelle Analyse der KO-Mäuse im Herzmuskel und dem BAT im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern. Die KO-Gruppe beinhaltet sowohl *mito-Inc^{-/-}* und *mito-Inc^{pA}*-Tiere. Dargestellt ist die relative Expression von *mito-Inc*. Die Affymetrix Exon Array Daten wurde mittels des RMA (*Robust Multi-array Average*) Algorithmus standardisiert. Die Expression von *mito-Inc* im Herzen war signifikant verringert (Mittelwert \pm SEM, einseitiger Mann-Whitney-Test; $p = 0,0083$, Wildtyp; $n = 7$, *mito-Inc* KO; $n = 8$). Die Expression von *mito-Inc* im BAT war signifikant verringert (Mittelwert \pm SEM, einseitiger Mann-Whitney-Test; $p = 0,0143$, Wildtyp; $n = 4$, *mito-Inc^{del}* KO; $n = 4$). **(D)** Schematische Darstellung der Cas9 medierten polyA-Insertion innerhalb des ersten Exons von *mito-Inc*. **(E)** Genotypisierungs-PCR der *mito-Inc^{pA}*-Mäuse. **(F)** q RT-PCR zur Analyse der Expression von *mito-Inc* in den *mito-Inc^{pA}* Herzen. Die Expression von *mito-Inc*, normalisiert auf *Gapdh* ist in den polyA-inserierten Tieren signifikant reduziert (einseitiger Mann-Whitney-Test; p -Wert=0,05; Mittelwert \pm SEM, Wildtyp; $n = 3$, *mito-Inc^{pA}* KO; $n = 3$). (BAT = braunes Fett)

3.3.2 Phänotypische Analyse des LOF-Modells

Die erste phänotypische Untersuchung von acht Wochen alten *mito-Inc* KO-Mäusen zeigte keinerlei signifikante Änderungen im Körpergewicht, Tibialänge oder des Herzgewichtes ([Anhang Abb. 7.8](#)). Im Alter von 15-18 Wochen entwickelten die *mito-Inc^{-/-}*, sowie die *mito-Inc^{pA}*-Tiere einen kardialen Phänotyp ([Abb. 3.6](#)). Zur näheren Untersuchung wurden verschiedene Gewichtsdaten metabolisch aktiver Organe untersucht. Die einzelnen Gewichtsdaten wurden jeweils auf die Länge der Tibia normalisiert, da diese keinen Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen zeigte ([Abb. 3.6 C](#)). Die Kontrollgruppe bestand aus wildtypischen Wurfgeschwistern und umfasste jeweils 38 Tiere im Alter von 15-18 Wochen. Die *mito-Inc^{-/-}*-Gruppe hatte eine Gruppengröße von jeweils 27 im Alter von 15-18 Wochen. Die Gruppengröße der *mito-Inc^{pA}*-Tiere betrug jeweils 20 Tiere im Alter von 15-18 Wochen. Das Körpergewicht der Tiere zeigt keine signifikanten Veränderungen der mutanten Tiere im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe ([Abb. 3.6 B](#)) (*mito-Inc^{-/-}*: zweiseitiger Students t-Test $p = 0,2291$; *mito-Inc^{pA}*: zweiseitiger Students t-Test $p = 0,1560$). Das Herzgewicht der *mito-Inc^{-/-}*-Mäuse war signifikant erhöht (zweiseitiger Students t-Test $p = 0,0164$). Das Herzgewicht der *mito-Inc^{pA}* Tiere war ebenfalls signifikant erhöht ([Abb. 3.6 A](#)) (zweiseitiger Students t-Test $p = 0,0001$).

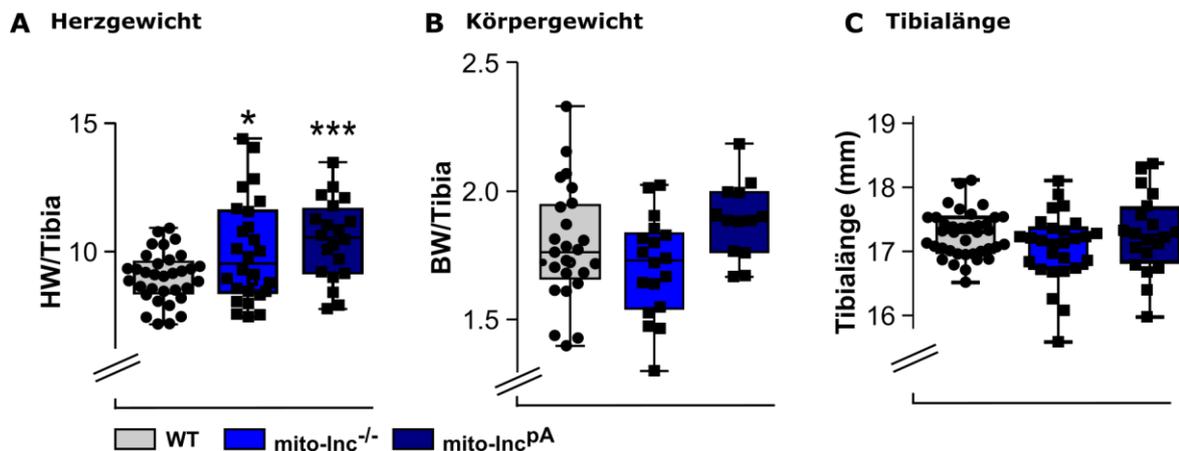


Abb. 3.6: Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einem erhöhten Herzgewicht der KO-Mäuse. Analyse von Körpergewicht und Herzgewicht nach Verlust von *mito-Inc* von 15-18 Wochen alten Mäusen. Die Tibialänge zeigte keine signifikante Veränderung der *mito-Inc^{-/-}*, noch der *mito-Inc^{PA}*-Tiere im Vergleich zur *mito-Inc^{+/+}*-Kontrollgruppe (C). Die einzelnen Gewichtsdaten wurden daher jeweils auf die entsprechende Tibialänge normalisiert. **(A-C)** Analyse der Tiere mit vollständiger genomischer deletion von *mito-Inc* (*mito-Inc^{-/-}*) und der Tiere mit polyA Insertion (*mito-Inc^{PA}*). **(A)** Das Herzgewicht der *mito-Inc^{-/-}*-Mäuse war signifikant erhöht (zweiseitiger Students t-Test $p = 0,0164$). Das Herzgewicht der *mito-Inc^{PA}* Tiere war signifikant erhöht (Mittelwert \pm min.-max. Wildtyp; $n = 38$, *mito-Inc^{del}* KO; $n = 27$, *mito-Inc^{PA}* KO; $n = 20$; zweiseitiger Students t-Test $p = 0,0001$). **(B)** Das Körpergewicht der *mito-Inc^{-/-}* Tiere war nicht signifikant verändert (Mittelwert \pm min.-max. Wildtyp; $n = 38$, *mito-Inc^{del}* KO; $n = 27$, *mito-Inc^{PA}* KO; $n = 20$; zweiseitiger Students t-Test $p = 0,2291$). Das Körpergewicht der *mito-Inc^{PA}* Tiere war nicht signifikant verändert (Mittelwert \pm min.-max. Wildtyp; $n = 38$, *mito-Inc^{PA}* KO; $n = 20$; zweiseitiger Students t-Test $p = 0,1560$). **(C)** Die Tibialänge (mm) war nicht verändert im Vergleich beider KO-Modelle mit der WT-Gruppe (Mittelwert \pm min.-max. Wildtyp; $n = 38$, *mito-Inc^{del}* KO; $n = 27$, *mito-Inc^{PA}* KO; $n = 20$). (HW = Herzgewicht; KG = Körpergewicht)

3.3.3 Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in einer kardialen Hypertrophie

Zur genaueren Untersuchung der kardialen Hypertrophie im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* wurde die Größe der Kardiomyozyten im Herzen von *mito-Inc^{PA}* und *mito-Inc^{-/-}*-Tieren im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren bestimmt. Dafür wurden Querschnitte der Herzen angefertigt und diese mit WGA und Dapi gefärbt (Abb. 3.7 A). WGA markiert die Zellmembranen der Herzzellen und ermöglicht so eine Bestimmung des Umfangs der Zellen. Für die Analyse wurden ausschließlich Zellen von Aufnahmen der äußeren Wand des linken Ventrikels verwendet. Als Kontrollgruppe dienten für die Untersuchung beider bereits beschriebener *in vivo* Maus-Modelle die selben Kontrolltiere mit einer n-Zahl von 10. Die n-Zahl für die *mito-Inc^{-/-}*-Gruppe betrug 8 und für die *mito-Inc^{PA}*-Gruppe 3. Die Histologie der Herzen mittels WGA wurde mit Hilfe von Liv Zimmerman und Alina Brandl durchgeführt [155]. Die histologische Untersuchung der

Kardiomyozyten mittels WGA Färbung zeigte für beide Mauslinien eine Verlagerung der prozentualen Verteilungskurve in den Bereich von Zellen mit einem größeren Umfang (Abb 3.7 B). Die statistische Analyse erfolgte mittels eines Fisher-LSD Tests im Zuge einer *two-way* Anova Multivarianzanalyse. Die Kardiomyozyten der KO-Mäuse hatten signifikant vergrößerte Kardiomyozyten anhand ihres Umfangs. Die Kontrollgruppe zeigte hingegen eine höhere Abundanz an Zellen mit einem Umfang <200 µm. Die Zellen der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere zeigten eine signifikante Verringerung zur Kontrolle der Zellen mit einem Umfang von 100-200 µm ($p_{100-150}=0,0388$; $p_{150-200}=0,0476$). Im Falle der *mito-Inc*^{PA}-Tieren zeigte sich in den Größenbereichen von 100-200 µm ebenfalls eine signifikante Verringerung zur Kontrolle vor ($p_{100-150}=0,026$; $p_{150-200}=0,0099$). Im Bereich der Größeren Zellen (>250 µm) zeigten die mutanten Tiere einen Anstieg in der Anzahl der Zellen. Im Größenbereich von 350-450 µm lag eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Zellen im Vergleich der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere zur Kontrolle vor (p -Wert=0,0263). Bei den *mito-Inc*^{PA}-Tieren wies der Größenbereich 250-450 µm eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf ($p_{250-350}=0,0306$; $p_{350-450}=0,0358$).

Da *mito-Inc* auch eine erhöhte Expression in der Skelettmuskulatur aufweist wurden zur weiteren phänotypischen Untersuchung Fasertypisierungen im Skellettmuskel der Tiere durchgeführt. Diese wurden mit der Hilfe von Liv Zimmermann und Alina Brandl durchgeführt [154]. Dafür wurden Kryoschnitte des *Musculus Tibialis anterior*s angefertigt und mittels spezifischer Antikörperfärbung die Häufigkeit der Fasertypen in den einzelnen Muskeln der Versuchsgruppen bestimmt. Im *Musculus Tibialis anterior* war dabei zwischen dem proximalen und dem distalen Bereich zu unterscheiden, da diese bereits von vornherein eine unterschiedlich Verteilung der Fasertypen zeigten. Im distalen Bereich befinden sich demnach deutlich weniger Typ 2A Fasern als im proximalen Bereich des TA Muskels. [152,153]

Die Gruppengröße für die Fasertypisierung betrug jeweils 6 Tiere in der Kontrollgruppe und entsprechend 7 und 8 in der *mito-Inc* KO-Gruppe für den distalen, sowie den proximalen Bereich. Die Verteilung der Typ 2X und 2B Fasern im proximalen Bereich war in der wildtypischen Kontrollgruppe etwa 40 zu 60, während sie im distalen Bereich bei 20 zu 80 lag (Abb. 3.7 C). Die Daten zeigten in beiden Bereichen des *Musculus Tibialis anterior*s eine Verschiebung in der Häufigkeit von Typ 2B zu Typ 2X Fasern im *mito-Inc* KO-Muskel im Vergleich zur WT-Kontrolle. Im proximalen Bereich des *Musculus Tibialis anterior*s war

dieser Effekt deutlich stärker und ein Fisher-LSD Tests im zuge einer *two-way* Anova Multivarianzanalyse zeigte im Falle der Typ 2X und 2B Fasern einen signifikanten Unterschied zwischen *mito-Inc^{+/+}* und *mito-Inc^{-/-}* Tieren mit einem p-Wert von jeweils <0,0001. Zur weiteren Untersuchung wurden die Fasergrößen im *Musculus Tibialis anterior* der KO-Mäuse mittels immunhistochemischer Lamininfärbung bestimmt. Die histologische Analyse wurde mit Hilfe von Liv Zimmermann und Alina Brandl durchgeführt [154,155]. Die Daten zeigten keine signifikante Veränderung der Muskelfasergrößen in der *mito-Inc* KO-Situation im Vergleich zum WT (Anhang Abb. 7.10).

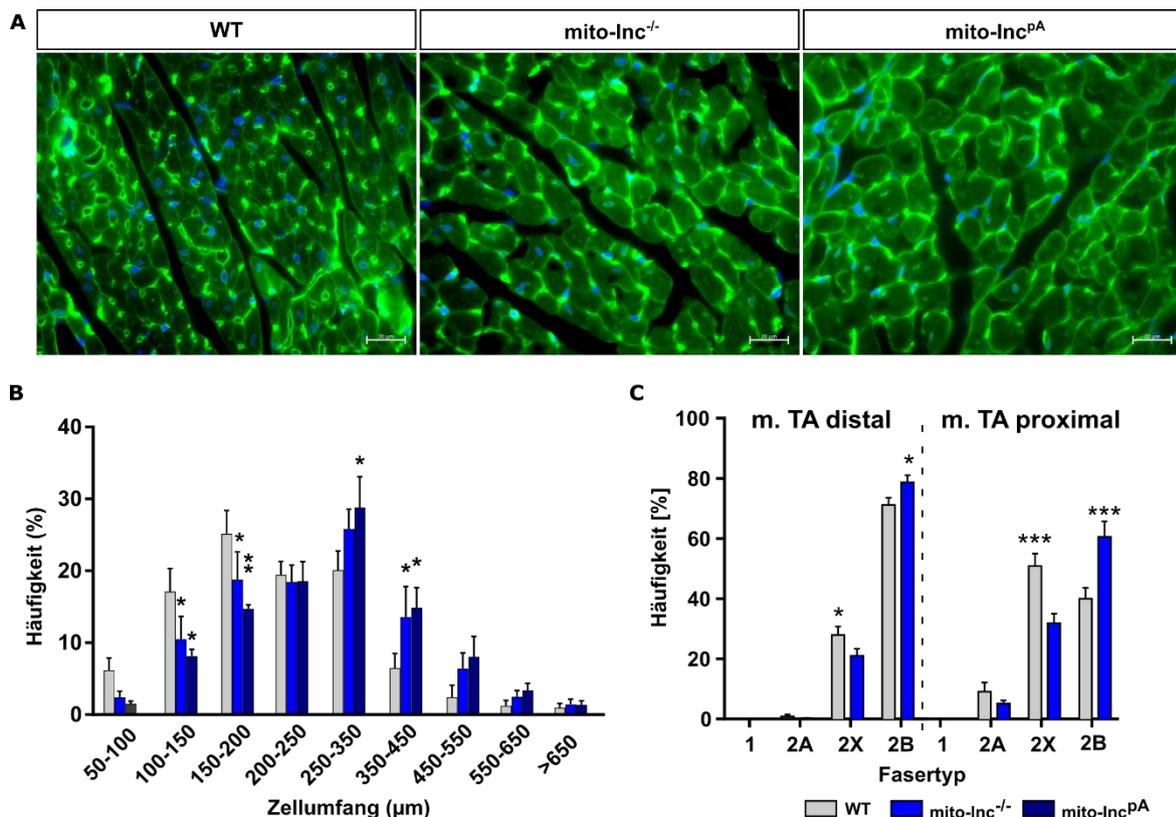


Abb. 3.7: Der Verlust von *mito-Inc* induziert eine kardiale Hypertrophie. (A) Immunhistologische Analyse der Herzzellen von Mäusen nach Verlust von *mito-Inc*. Die WGA Färbung zeigte eine Vergrößerung der Kardiomyozyten in *mito-Inc^{-/-}* und *mito-Inc^{PA}*-Tieren im Vergleich zur WT-Kontrolle. **(B)** Grafische Darstellung der Verteilung der Zellgrößen (%). Die Größen der Zellen wurden über eine WGA Färbung bestimmt. Beide *in vivo* KO-Modelle zeigten eine Verlagerung der prozentualen Verteilungskurve in den Bereich von Zellen mit einem größeren Umfang. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Fisher-LSD Tests. (Mittelwert ± SEM Wildtyp; n = 10, *mito-Inc^{del}* KO; n = 8, *mito-Inc^{PA}* KO; n = 3). **(C)** Grafische Darstellung der Auswertung der immunhistologischen Analyse des *Musculus Tibialis anterior* (m. TA) mittels Fasertypisierung. Dargestellt ist die Häufigkeit mit welcher die einzelnen Fasertypen jeweils im distalen und proximalen Bereich des m. TAs vorkamen. Die Daten zeigten in beiden Bereichen des TAs eine Verschiebung in der Häufigkeit von Typ 2B zu Typ 2X Muskelfasern im *mito-Inc^{-/-}*-Muskel. Im proximalen Bereich war dieser Effekt deutlich stärker. Die statistische erfolgte mittels des Fisher-LSD Tests.

Für die Typ 2X und 2B Fasern konnte ein signifikanter Unterschied zwischen *mito-Inc*^{+/+}- und *mito-Inc*^{-/-}-Tieren mit einem p-Wert von <0,0001 ermittelt werden (Mittelwert ± SEM Wildtyp; n = 6, Distal: *mito-Inc*^{del} KO; n = 8, Proximal: *mito-Inc*^{del} KO; n = 7). Blau: Färbung mit Dapi (353 nm). Grün: Färbung WGA (488 nm).

3.3.4 Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einer transkriptionellen Deregulation von Genen involviert im BCAA Metabolismus

Für eine weiterführende phänotypische Analyse wurde anhand eines Exon Arrays eine Transkriptomanalyse vom Herzen und dem braunen Fettgewebe (BAT) der *in vivo* LOF Maus-Modelle durchgeführt. Für die Transkriptomanalyse des Herzens wurden die Proben von *mito-Inc*^{pA} und *mito-Inc*^{del} Tieren zusammengefügt. Daraus ergab sich eine n-Zahl von jeweils 7 für die KO- und 7 für die WT-Gruppe. Für die Transkriptomanalyse des BAT wurden die Proben von *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen mit einer n-Zahl von 4 für die wildtypen und 4 für die KO-Tiere verwendet. Problematisch bei dieser Analyse war die hohe Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen, welche bereits bei den Kontrolltieren deutlich auftrat. Dadurch waren nur vereinzelt deutliche Veränderungen innerhalb einzelner Gene sichtbar. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer *gene set enrichment* Analyse (GSEA) [98]. Diese Analyse zeigte in beiden Geweben eine signifikante Anreicherung von Genen involviert in verschiedensten metabolischen Prozessen (Abb. 3.8). Ganz oben in den Top 10 der hochregulierten KEGG Gensets im *mito-Inc* KO-Gewebe stand die Degradierung von Valin, Leucin und Isoleucin (BCAA Metabolismus) mit einem FWER (*family-wise error rate*) p-Wert von 0,003 im Herzen und 0,002 im BAT (Abb. 3.8). Im Herzen war dieses Genset um den Faktor 0,58 und im BAT um 0,6 angereichert. Die Phosphatase PPM1K war dabei im Herzen am deutlichsten hochreguliert. Im BAT war dies nur in 2 von 4 KO-Tieren der Fall. Neben dem BCAA Metabolismus waren auch Gensets im Bereich des Fettsäure Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung in beiden Geweben hochreguliert (Abb. 3.8). Die Veränderung der Gene des Fettsäure Metabolismus lag im Herzen bei einem Anreicherungswert von 0,44 und einem FWER p-Wert von 0,24. Im BAT lag der Anreicherungswert bei 0,5, war jedoch nicht-signifikant (FWER p-Wert von 0,2). Im Falle des Gensets der oxidativen Phosphorylierung lag der Anreicherungswert im Herzen bei 0,43 und einem FWER p-Wert von 0,04. Im BAT war dieses Genset um einen Wert von 0,36 mit einem FWER p-Wert von 0,83 angereichert. Hinsichtlich der Veränderungen der Einzelgene der Gensets bestand weiterhin das Problem der hohen Gruppenvarianz. Sodass die einzelnen veränderten Gene der Gensets kaum statistisch signifikante Unterschiede

zeigten. Im BAT waren die Varianzen innerhalb der Gruppen deutlich geringer. Dies führte dazu, dass deutlich mehr Gene der veränderten Gensets eine signifikante und/oder stärkere Anreicherung zeigten als dies im Herzen der Fall war. Eine etwas basale Analyse unter Verwendung der Genset Datenbank der HALLMARKS zeigte ebenfalls deutliche metabolische Veränderungen auf transkriptioneller Ebene (Anhang Abb. 7.11). Das Genset des Fettsäure Metabolismus war im Herzen, sowie im BAT der KO-Mäuse signifikant angereichert. Im Herzen lag der Anreicherungswert bei 0,35 mit einem FWER p-Wert von 0,019. Die Anreicherung im BAT lag bei 0,4 mit einem FWER p-Wert von 0,004.

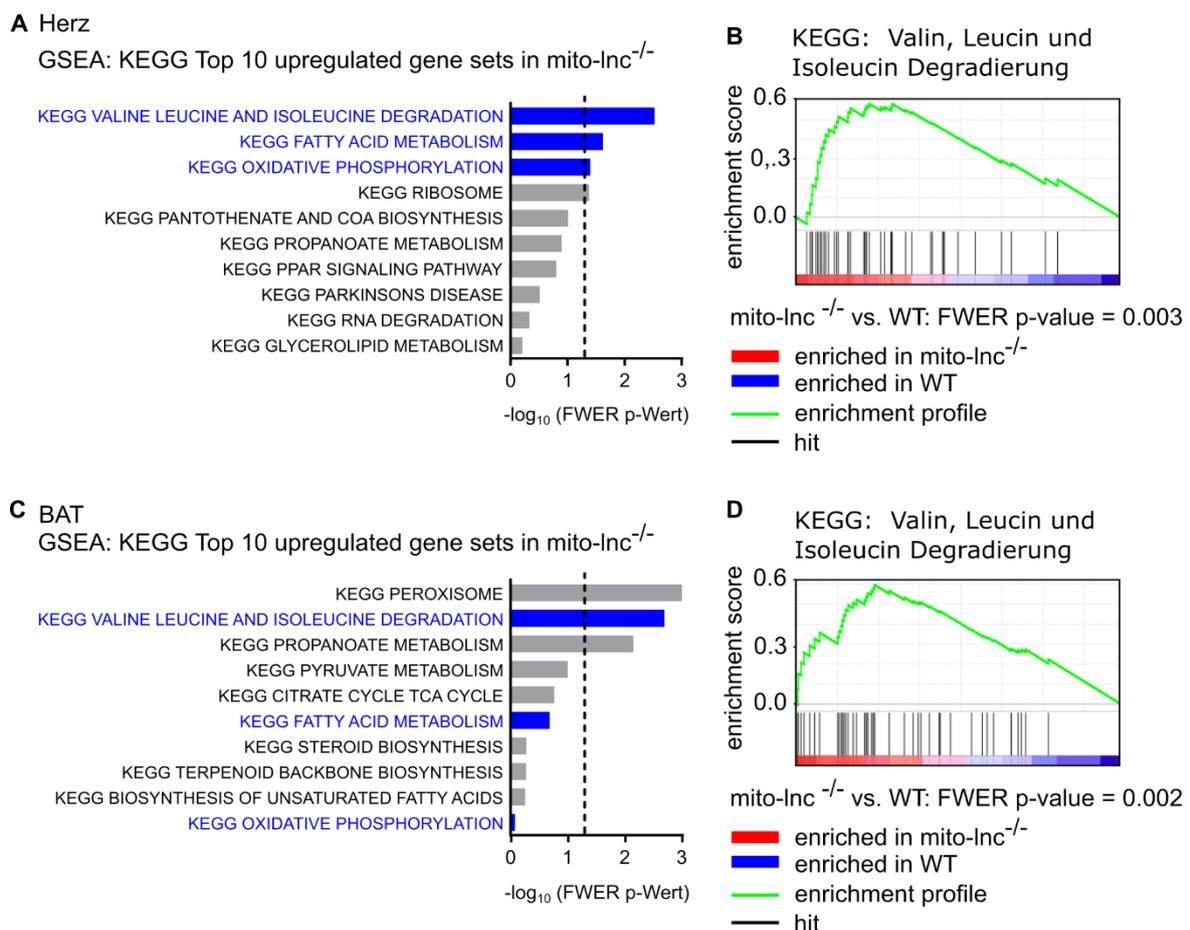


Abb. 3.8: Der Verlust von *mito-lnc* führt zu einer transkriptionellen Deregulation von Genen involviert im BCAA Metabolismus. GSEA der Transkriptomdaten der Affymetrix Analyse vom Herzen (A+B) und dem BAT (C+D) im Vergleich WT- und KO-Mäuse. Die Transkriptomanalyse des *mito-lnc* KO-Gewebes zeigte in beiden Geweben eine signifikante Anreicherung von Genen involviert in metabolischen Prozessen. Die Top 10 der hochregulierten KEGG Gensets im *mito-lnc* KO-Gewebe umfasste unter anderem die Degradierung von Valin, Leucin und Isoleucin (BCAA Metabolismus), den Fettsäure Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung in beiden Geweben. Die drei genannten Gensets sind im Herzen signifikant hochreguliert. Die transkriptionelle Änderung des BCAA Metabolismus ist in beiden Geweben signifikant, mit einem entsprechenden FWER p-Wert von 0,019 und 0,004,

hochreguliert (Herz: Wildtyp; n = 7, *mito-Inc* KO; n = 7, BAT: Wildtyp; n = 4, *mito-Inc* KO; n = 4). (BAT = braunes Fett)

3.3.5 Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einer verringerten Effizienz im BCAA Katabolismus

Um näheren Aufschluss über die Aktivität des BCAA Metabolismus nach Verlust von *mito-Inc* zu erhalten wurde ein BCKDH Aktivitäts Assay durchgeführt (Abb. 3.9 A). Dieser beruht auf der Tatsache, dass bei der Umsetzung der Ketoazide über die BCKDH CO₂ entsteht [61]. Ketoazide werden grundsätzlich nur von dieser Hydrogenase katabolisiert [61]. Unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem KIV kann die Menge an freigesetztem ¹⁴C-markierten CO₂ gemessen werden und so Rückschlüsse auf die Aktivität der Hydrogenase und somit auf die Funktionalität des Stoffwechselprozesses liefern. Für den Assay wurden Gewebelysate aus wildtypischen und *mito-Inc* KO-Herzen hergestellt und diese mit ¹⁴C-KIV versetzt. Das freigesetzte CO₂ wurde mittels NAOH auf einem Filterpapier aufgefangen und die Menge an ¹⁴C gemessen. Die Umsetzung von KIV (nmol/mg/min) wurde über die eingesetzte Proteinkonzentration und die Menge an eingesetztem ¹⁴C, sowie dem schlussendlich gemessenem ¹⁴C über eine Assayzeit von 30 Minuten bestimmt. Die Gruppengröße betrug 18 für die wildtypischen und 18 für die KO-Tiere. Der Assay zeigte eine signifikante Verringerung der Aktivität der BCKDH um 25 % nach Verlust von *mito-Inc* mit einem p-Wert von 0,0162 (t-Test, zweiseitig) (Abb. 3.9 B). Des Weiteren wurde die Aktivität der BCKDH auch im braunen Fettgewebe bestimmt. Der Versuchsablauf und dessen Validierung war identisch zu dem bereits beschriebenen im Herzen. Der Aktivitätsassay zeigte im Falle der *mito-Inc* KO-Tiere keine Verringerung der Aktivität (Abb. 3.9 C). Die Gruppengröße betrug 14 für die wildtypischen und 14 für die KO-Tiere. Die Aktivität der BCKDH wird durch deren Phosphorylierung an der Untereinheit E1 am Serin 293 reguliert. Diese inaktivierende Phosphorylierung wird durch die BDK induziert. Die aktivierende Dephosphorylierung der BCKDHA erfolgt über die Phosphatase PPM1K. [61,62] Zur weiteren Analyse des BCAA Metabolismus nach Verlust von *mito-Inc* wurde die Menge an BCKDHA^{Ser293} mittels Westernblot überprüft. Dafür wurden Proteinlysate aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+}-Herzen verwendet. Zur Analyse der Menge von p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) wurde diese auf die Gesamtmenge von BCKDHA (50 kDa) normalisiert. Die Menge an BCKDHA^{Ser293} ist im *mito-Inc*^{-/-}-Herz signifikant verringert (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,05, WT; n = 3, KO; n = 3) (Abb. 3.10 A). Zusätzlich wurden die Proteinlevel der, an der Regulation beteiligten Enzyme BDK und PPM1K mittels

Westernblot bestimmt. Die Menge an BDK, normalisiert auf RALA war nicht verändert in den *mito-Inc* KO-Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Die Menge an PPM1K, normalisiert auf β -Aktin zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung.

Zusätzlich wurden zur Analyse der BCKDHA Proteinlysate aus dem *Musculus Tibialis anterior* hergestellt und mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.10 B). Die Menge von p-BCKDHA^{Ser293} und BCKDHa wurde entsprechend auf GAPDH normalisiert. Im Verhältnis zur Gesamtmenge von BCKDHA war die Menge von BCKDHA^{Ser293} in den KO-Muskeln signifikant reduziert im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern. Der einseitige Mann-Whitney-Test zeigte einen p-Wert von 0,05 (WT; n = 3, KO; n = 3).

Der Phosphostatus der BCKDHA zeigte auch im braunen Fettgewebe eine tendenzielle Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.10 C). Diese zeigte jedoch keine statistische Signifikanz (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,2, WT; n = 3, KO; n = 3).

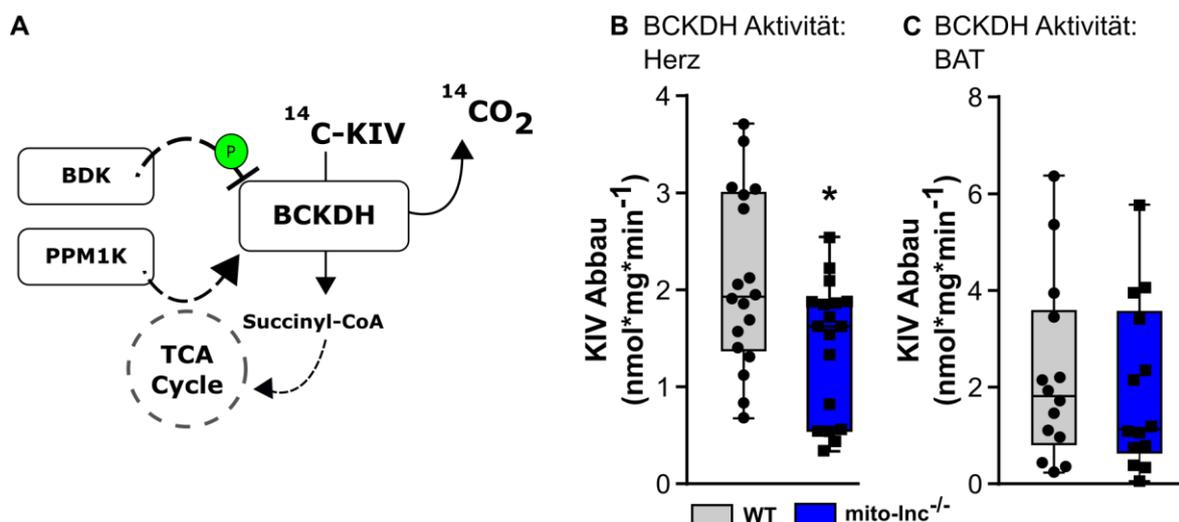


Abb. 3.9: Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einer verringerten Effizienz im BCAA Katabolismus. (A) Schematische Übersicht des Prinzips des BCKDH Aktivitäts Assays. ¹⁴C-markiertes Ketoisovalerat (¹⁴C-KIV) wird unter Abspaltung von ¹⁴C-markierten CO₂ zu Succinyl-CoA umgesetzt. Das freigesetzte ¹⁴CO₂ wird mittels 1 M NaOH aufgefangen, die Intensität gemessen und damit die Umsetzung von α -Ketoisovalerat berechnet. **(B)** Die umgesetzte Menge an ¹⁴C-KIV in nmol/mg/min in Lysaten aus Herzwewebe. Die Aktivität der BCKDH war in *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen signifikant verringert (Mittelwert \pm min.-max, t-Test, zweiseitig p = 0,0162, Wildtyp; n = 18, *mito-Inc* KO; n = 18). **(C)** Die umgesetzte Menge an ¹⁴C-KIV in nmol/mg/min in Lysaten aus BAT. Die Aktivität der BCKDH war im *mito-Inc*^{-/-} nicht verändert (Mittelwert \pm min.-max, t-Test, zweiseitig p = 0,6520, Wildtyp; n = 14, *mito-Inc* KO; n = 14). (BAT = braunes Fett)

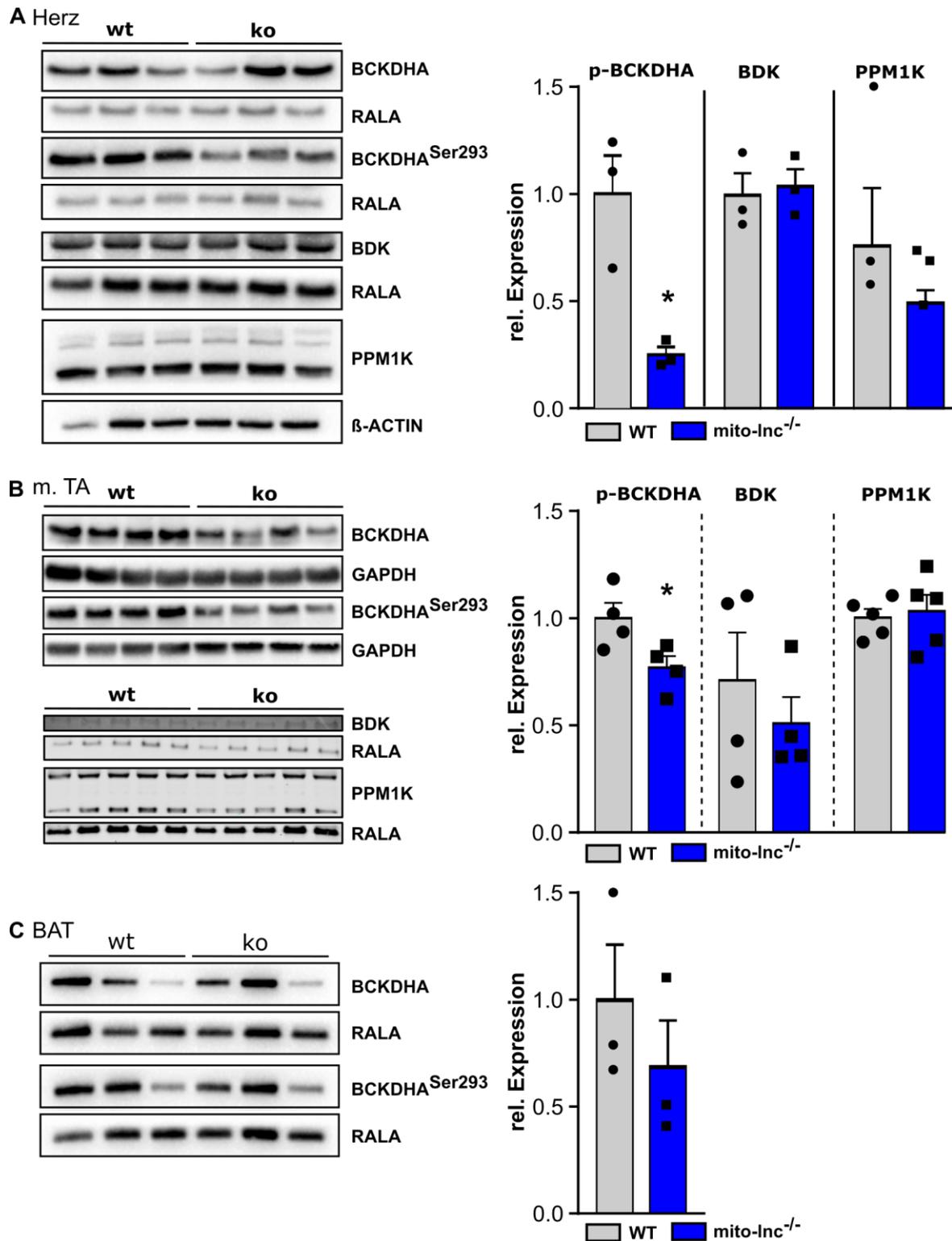


Abb. 3.10: Der Verlust von *mito-Inc* induziert die Erhöhung der Menge an aktiver, unphosphorylierter BCKDHA. (A) Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+} Herzen zur Analyse der Menge von p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) im Verhältnis zur Gesamtmenge der BCKDHA (50 kDa). Die Menge von total BCKDHA und p-BCKDHA^{Ser293} wurde jeweils auf RALA (27 kDa) normalisiert. Die Menge an BCKDHA^{Ser293} war in *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen signifikant verringert (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,05). Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-}- und *mito-Inc*^{+/+}-Herzen zur Analyse der Abundanz von BDK und PPM1K. Die Menge an BDK (46 kDa), normalisiert auf RALA (27 kDa) war nicht verändert im Vergleich WT und

KO. Die Menge an PPM1K (30-40 kDa; Summe aus beiden Banden), normalisiert auf β -Aktin (56 kDa) zeigte ebenfalls. keine Veränderung. (Mittelwert \pm SEM, Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3). **(B)** Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-}- und *mito-Inc*^{+/+}-m. TA zur Analyse der Menge von p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) im Verhältnis zur Gesamtmenge der BCKDHA (50 kDa), normalisiert auf GAPDH (37 kDa). Die Menge an BCKDHA^{Ser293} war in *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen signifikant verringert (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,05, n = 4). Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+} TAs zur Analyse der Abundanz von BDK und PPM1K. Die Menge an BDK (46 kDa), normalisiert auf RALA (27 kDa) war nicht verändert im Vergleich *mito-Inc*^{+/+} gegen *mito-Inc*^{-/-}. Die Menge an PPM1K (30-40 kDa; Summe aus beiden Banden), normalisiert auf β -Aktin (56 kDa) zeigte ebenfalls. keine Veränderung (Mittelwert \pm SEM, Wildtyp; n = 5, *mito-Inc* KO; n = 5). **(C)** Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+} BAT zur Analyse der Menge von p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) im Verhältnis zur Gesamtmenge der BCKDHA (50 kDa), normalisiert auf RALA (27 kDa). Die Menge an BCKDHA^{Ser293} war im *mito-Inc* KO-BAT nicht signifikant verringert (Mittelwert \pm SEM, einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,2, Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3). (BAT = braunes Fett, m. TA = *Musculus Tibialis anterior*)

3.3.6 Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in einer Störung des metabolischen Gleichgewichts

Zur Analyse der metabolischen Veränderungen im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* und der damit einhergehenden Aktivitätsminderung im BCAA Stoffwechsel wurden die Metabolite in Herz, BAT, Leber und im Serum massenspektrometrisch untersucht (Abb. 3.11). Dabei wurden die Metabolite des TCA-Zyklus und des Aminosäurestoffwechsels sowie die CoAs (Abb. 3.11 B) gemessen. Im Falle der Serummetabolite wurden nur die Aminosäuren gemessen. Die n-Zahl betrug 9 für die Kontrollgruppe (WT) und 8 im Falle der KO-Gruppe (*mito-Inc*^{-/-}). Die Aufarbeitung der Proben, sowie die Messungen der Metabolite und deren Normalisierung wurden von Sven Zukunft in Frankfurt durchgeführt. Die Daten wurden normalisiert auf die eingesetzte Menge an Gewebe und das Lyse-Volumen der jeweiligen Proben. Analysiert wurde die Konzentration der Metabolite der KO-Mäuse im Verhältnis zu den der WT-Mäuse (FC). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem Students t-Test. Die Auswertung zeigte nur im Falle des Herzgewebes deutliche Veränderungen, vor allem im Aminosäurehaushalt der Mäuse. Ein Großteil der gemessenen Aminosäuren und Derivate waren in den KO-Tieren hochreguliert (Abb. 3.11 D). Im Besonderen waren dies Valin (Val), Threonin (The), Sarcosin (Sar), Serin (Ser), Citrullin (Cit), Isoleucin (Ile), Glycin (Gly), Hydroxyprolin (Hpro), Thioprolin (Tpr), β -Aminoisobutyrat (bAIBA) und Tryptophan (Tpr) mit jeweils einem FC von $\geq 1,5$. Statistisch signifikant waren dabei Val, The, Sar, Ile, Hpro, bAIBA und Tpr (Abb. 3.11 A, C). Leucin war um einen FC von 1,3 und p-Wert von 0,07 ebenfalls hochreguliert. Dieser Effekt konnte

weder im BAT noch in der Leber beobachtet werden. Nur Tpr, Sar und bAIBA waren ebenfalls deutlich hochreguliert mit einem FC von 2,1 und 3,4 für Tpr entsprechend in BAT und Leber und einem FC von 1,8 für bAIBA in beiden Geweben. Statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,012 war dabei nur die Veränderung von Tpr in der Leber. In der Leber konnte zudem eine statistisch signifikante, 1,6-fache Erhöhung von Orn gemessen werden (p-Wert = 0,04). Im Falle der Serumproben lagen keine Veränderungen vor. Für fast alle AS und deren Derivate lag der FC im Durchschnitt bei 1. Nur im Falle von bAIBA und Hpro konnte eine 1,4- bzw. 1,3-fache Erhöhung der Konzentration im Serum gemessen werden. Diese Veränderungen im Fall von Hpro waren signifikant mit einem p-Wert von 0,03. Die gemessenen Gewebemetabolite des TCA-Zyklus zeigten geringfügigere Veränderungen ([Anhang Abb. 7.12 B](#)). Die Metabolite α -Ketoglutarat und Methylzitat waren jedoch im Zuge des Verlustes von *mito-lnc* im Herzen deutlich angereichert. Im Falle von α -Ketoglutarat war diese Erhöhung der Konzentration signifikant mit einem p-Wert von 0,03. Die Glukoselevel in den KO-Mäusen waren um 50 % reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppengröße für die KO-Tiere betrug nur noch eine n-Zahl von 6, da ein statistisch signifikanter Ausreißer vorlag und für ein weiteres Tier im Falle von Glukose keine Daten vorlagen. Die Reduktion der Glukosekonzentration war trotz dessen statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,033. Zusätzlich zu Glukose konnte eine Reduktion der Konzentration diverser TCA Metabolite in den KO-Tieren detektiert werden. Auffällig waren dabei die Veränderungen mit einem FC um $<0,8$ im Falle von G6-P, Glukonsäure, 2HG, Isozitat, Glucose und Succinat. Statistisch waren diese Veränderungen jedoch nicht signifikant. Die gemessenen CoAs zeigten ebenfalls geringfügigere, statistisch nicht signifikante Veränderungen ([Anhang Abb. 7.12 A](#)). Auffällig waren dabei die Veränderung zwischen langkettigen und kurzkettigen CoAs. Im Herzen ist vor allem C14:0-, C12:0-, und C10:0-CoA mit einem FC von über 1,4 erhöht, während C3:0-, C4:0- und C2:0-dephospho-CoA mit einem FC von $<0,7$ deutlich verringert waren. Die verringerte Konzentration von C2:0-dephospho-CoA war auch in der Leber vorhanden. Zusätzlich konnte eine Verringerung um den Faktor 0,5 für C16:1-CoA detektiert werden. Diese Tendenz konnte auch im BAT und in der Leber gezeigt werden.

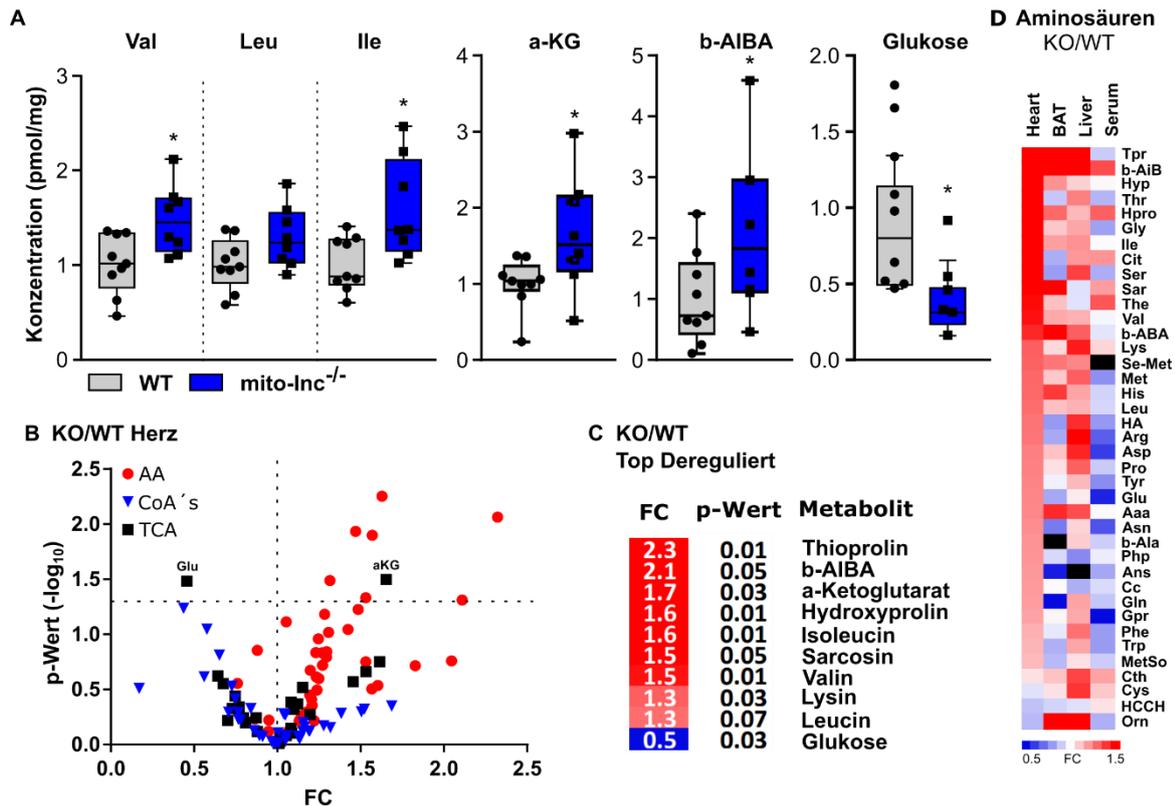


Abb. 3.11: Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in einer Akkumulation von Aminosäuren im Herzgewebe. (A+B) Abgebildet ist die Konzentration in pmol/mg der Top deregulierten Metabolite gemessen im Herzgewebe von WT- und KO-Mäusen (Mittelwert \pm min.-max., Wildtyp; n = 9, *mito-Inc* KO; n = 8, Ausnahme: Glukosekonzentration). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test. Die Kontrollgruppe bestehend aus wildtypischen Geschwistertieren wurde jeweils auf 1 gesetzt. **(A)** Metabolitkonzentrationen im Herzgewebe. Die drei BCAAs Valin (Val), Leucin (Leu) und Isoleucin (Ile) waren etwa um den Faktor 0,5 erhöht in den *mito-Inc* KO-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die statistische Analyse zeigte für Val und Ile einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit entsprechenden p-Werten von 0,011 und 0,01. Der p-Wert im Falle von Leu lag bei 0,066. Der FC von α -KG lag bei 1,6 und war statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,032. Die Konzentration von β -AIBA war im KO doppelt so hoch im Vergleich zum Wildtyp mit einem signifikanten Unterschied bei einem p-Wert von 0,049 (zweiseitiger t-Test). Die Glukoselevel waren in den KO-Tieren signifikant um 50 % reduziert (zweiseitiger t-Test; p = 0.033; Wildtyp; n = 9, *mito-Inc* KO; n = 6). **(B)** Volcanoblot der Metabolitkonzentrationen gemessen im Herzen. Dargestellt ist das Verhältnis (FC) der Metabolitkonzentrationen im Vergleich KO zu WT und der entsprechende p-Wert (-log₁₀). **(C)** Übersicht der primär veränderten Metabolite gemessen im Herzen der *mito-Inc* KO-Tiere im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe. **(D)** Heatmap der Aminosäurekonzentrationen im Vergleich von KO zu WT (pmol/mg) gemessen im Herz, dem BAT, der Leber und dem Blutserum. Hydroxyprolin (Hpro) war im KO um den Faktor 1,6 signifikant erhöht (zweiseitiger t-Test, p-Wert = 0,006). Die Konzentration von Thioprolin (Tpr) war in den KO-Tieren doppelt so hoch im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Wert = 0,009). (BAT = braunes Fett, α -KG = α -Ketoglutarat, AS = Aminosäure, TCA = TCA-Zyklus)

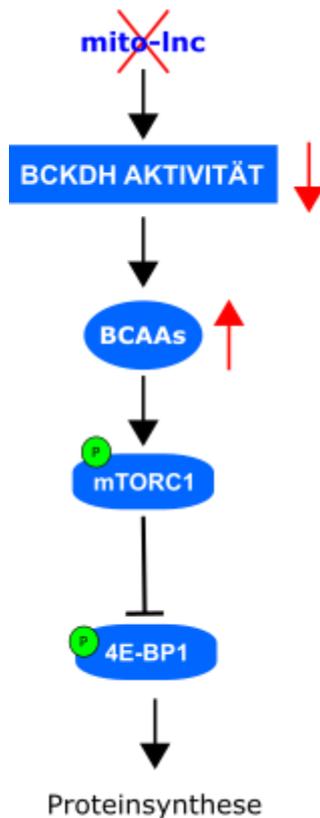


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. Die verringerte Aktivität von BCKDH im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* induziert einen Anstieg an freien BCAAs und resultiert in der Aktivierung von mTOR. [verändert nach 87,88,103]

3.3.6 Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einer Aktivierung von mTOR

Die Tatsache, dass der Verlust von *mito-Inc* in einer verringerten Effizienz des BCAA Metabolismus resultiert, lässt eine Erhöhung der freien BCAAs im Organismus und somit im Blut vermuten (Abb. 3.12). Zur Analyse der BCAA Konzentration im Blutserum wurden die Tiere mittels Dekapitation getötet und das Blut gewonnen. Nach der Gerinnung des Blutes wurde das Serum abzentrifugiert, die Proteinkonzentrationen bestimmt und mittels eines fluormetrischen Tests die Level an freien BCAAs bestimmt. Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von 6 für die KO-Tiere (*mito-Inc*^{-/-}) und 7 für die Kontrollgruppe (*mito-Inc*^{+/+}).

Die Konzentration an freien BCAAs der KO-Tiere war im Durchschnitt ca. um 0,1 nmol/μl erhöht im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern (Abb. 3.13 A). Auf Grund der hohen Standardabweichung innerhalb der Gruppen und der geringen n-Zahl konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die statistische Analyse mittels einseitigem Mann-Whitney-Test ergab keine Signifikanz (p = 0,903). Da eine erhöhte Konzentration freier BCAAs, vor allem aber Leucin, eine Aktivierung von mTOR zur Folge hat [87,88,103] wurde in beiden Versuchsgruppen außerdem die Menge an phosphoryliertem Serin 2448 von mTOR mittels Westernblot überprüft (Abb. 3.13 B). Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von 3. Das Level von p-mTOR^{Ser2448} wurde normalisiert auf die Gesamtmenge von mTOR (289 kDa). Die Menge an mTOR^{Ser2448} der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere war etwa 1,5-fach höher im Vergleich zu Kontrolle. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von p = 0,05. Eines der Zielproteine von mTORC1 ist der Translationsfaktor 4E-BP1. Dieser wird von mTOR phosphoryliert und somit inhibiert. [87,88,103] Daher wurde in beiden Versuchsgruppen der Phosphostatus von 4E-BP1^{Thr37/46} mittels Westernblot überprüft (Abb. 3.13 B). Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von 3. Die Menge an 4E-BP1^{Thr37/46} wurde auf β-Aktin und die Gesamtmenge

von 4E-BP1 normalisiert. Die Menge an p-mTOR^{Ser2448} der *mito-lnc*^{-/-}-Tiere war fast 1,5-fach höher im Vergleich zu Kontrolle. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test verwendet (p = 0,05). Das Level von p-mTOR^{Ser2448} wurde zur weiteren Kontrolle auch im BAT mittels Westernblot überprüft (Anhang Abb. 7.13 A). Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von 3. Das Level von p-mTOR^{Ser2448} wurde normalisiert auf die Gesamtmenge von mTOR (289 kDa). Die Menge an mTOR^{Ser2448} der *mito-lnc*^{-/-}-Tiere war tendenziell höher im Vergleich zu Kontrolle. Die Erhöhung lag jedoch nur bei einem Faktor von 0,5. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von p = 0,2. Zur weiteren Überprüfung des Phänotyps auf Basis der erhöhten BCAA Konzentration im Blutserum und im Herzen der KO-Mäuse wurde das Level von p-mTOR^{Ser2448} auch im *Musculus Tibialis anterior* mittels Westernblot überprüft (Anhang Abb. 7.13 B). Das Level von p-mTOR^{Ser2448} wurde normalisiert auf die Gesamtmenge von mTOR (289 kDa). Die präliminären Daten des *Musculus Tibialis anterior* zeigten keine eindeutige Veränderung in der Phosphorylierung des Ser2448 von mTOR.

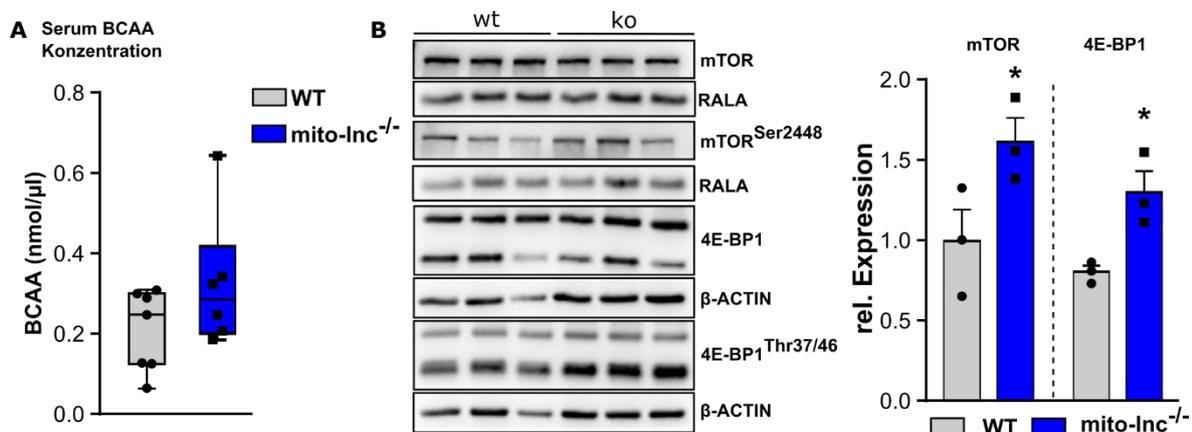


Abb. 3.13: Der Verlust von *mito-lnc* führt zu einer Aktivierung von mTOR. (A) Fluorimetrische Bestimmung der Konzentration freier BCAAs (nmol/μl) im Blutserum. Die Konzentration freier BCAAs im Serum der *mito-lnc*^{-/-} Tiere war tendenziell erhöht im Vergleich zu *mito-lnc*^{+/+}-Mäusen. Die statistische Auswertung mittels eines einseitigen Mann-Whitney-Tests zeigte keine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0903. (Mittelwert ± min.-max, Wildtyp; n = 7, *mito-lnc* KO; n = 6). **(B)** Westernblot von Proteinlysaten aus KO- und WT-Herzen zur Analyse von p-mTOR^{Ser2448} (289 kDa) und p-4E-BP1^{Thr37/46} (20-25 kDa). Die Mengen von mTOR und p-mTOR^{Ser2448} wurden jeweils auf RALA (27 kDa) normalisiert. Dargestellt ist das Verhältnis von mTOR^{Ser2448} zu von mTOR (289 kDa). Die Menge von p-mTOR^{Ser2448} war in *mito-lnc*^{-/-} Herzen signifikant erhöht (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,05). Die Menge von p-4E-BP1^{Thr37/46}, im Verhältnis zur Gesamtmenge von 4E-BP1, war in *mito-lnc*^{-/-} Herzen

signifikant (einseitiger Mann-Whitney-Test; $p = 0,05$) erhöht (Mittelwert \pm SEM, Wildtyp; $n = 3$, *mito-Inc* KO; $n = 3$).

3.3.6.1 Die erhöhte Supplementierung von BCAAs resultiert in einer Aktivierung von mTOR

Die deskriptive Erhöhung der Aktivität von mTOR als Folge pathologisch erhöhter BCAA Konzentrationen sollte *in vivo* überprüft werden. Dazu erhielten wildtypische Tiere für 10 Wochen eine Spezialdiät mit erhöhten Mengen an BCAAs. Anschließend wurden zunächst die Serumproben analysiert. Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von 7 für die Wildtypen und 6 für die BCAA-supplementierte Versuchsgruppe. (*mito-Inc*^{+/+}). Die BCAA-supplementierten Tiere zeigten nahezu eine Verdreifachung der Konzentration an freien BCAAs (Mittelwert (MW) = 0,95) im Vergleich zur Kontrollgruppe (MW=0,21) (Abb. 3.14 A). Die statistische Analyse mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-Tests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von 0,0012. Zusätzlich wurde in beiden Versuchsgruppen die Menge an phosphoryliertem Serin 2448 von mTOR mittels Westernblot überprüft (Abb. 3.14 B). Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von jeweils 3. Das Level von mTOR^{Ser2448} im Verhältnis zur Gesamtmenge von mTOR (289 kDa). wurde normalisiert auf RALA (27 kDa) Die Menge von p-mTOR^{Ser2448} war in den BCAA-supplementierten Tieren etwa 2-fach höher im Vergleich zur Kontrolle. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein einseitiger Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von $p = 0,05$. Um einen Einblick hinsichtlich der Regulation der BCKDC im Zuge der erhöhten BCAA Level zu erhalten wurde auch das Level an p-BCKDHA^{Ser293} mittels Westernblot überprüft (Abb. 3.14 B). Die Gruppengröße betrug eine n-Zahl von jeweils 3. Die Menge von p-BCKDHA^{Ser293}, im Verhältnis zur Gesamtmenge von BCKDHA (50 kDa), wurde auf RALA (27 kDa) normalisiert. Im Vergleich zur Versuchsgruppen war die Menge an p-BCKDHA^{Ser293} nach erhöhter BCAA Supplementierung im WT nicht verändert (einseitiger Mann-Whitney-Test; $p = 0,35$).

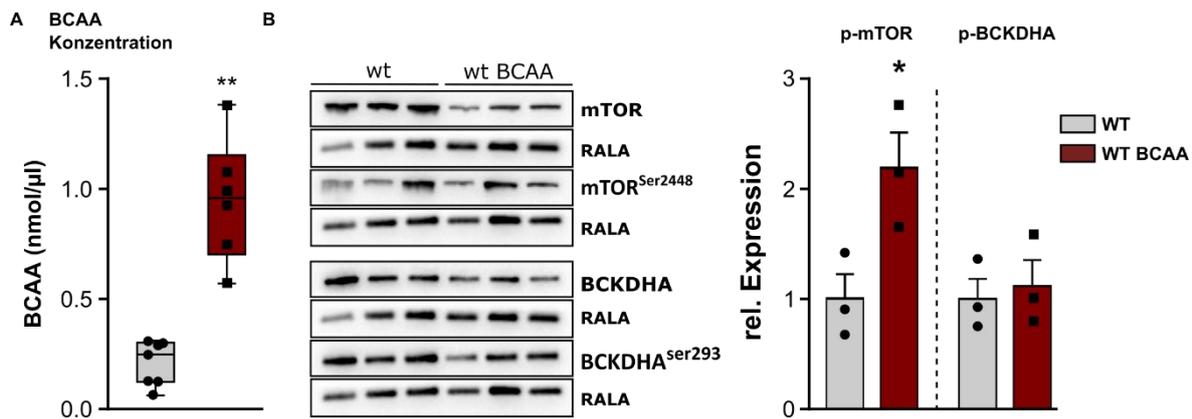


Abb. 3.14: Die erhöhte Supplementierung von BCAAs aktiviert mTOR. (A) Level freier BCAAs (nmol/μl) im Blutserum von normal gefütterten *mito-Inc*^{+/+}-Mäusen und von Tieren, welche eine spezielle hoch-BCAA Diät erhalten haben. Die Konzentration freier BCAAs im Serum der *mito-Inc*^{+/+} BCAA Tiere war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (WT). Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test verwendet. Dieser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von 0,0012 (Mittelwert ± min.-max, Wildtyp; n = 7, *mito-Inc* KO; n = 6). **(B)** Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{+/+} und *mito-Inc*^{+/+} BCAA Herzen zur Analyse von p-mTOR^{Ser2448} (289 kDa) und p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) im Verhältnis zur jeweiligen Gesamtproteinmenge. Das Level von mTOR^{Ser2448} und BCKDHA^{Ser293} wurde jeweils normalisiert auf RALA (27 kDa). Die Menge von p-mTOR^{Ser2448} in der *mito-Inc*^{+/+} BCAA-Gruppe war signifikant höher im Vergleich zur WT-Kontrolle (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,05, n = 3). Die Menge von p-BCKDHA^{Ser293} zeigte keine Veränderung (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,35). (Mittelwert ± SEM, Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3).

3.4 Die Analyse der Funktion von *mito-Inc*

3.4.1 Die erhöhte Supplementierung von BCAAs in *mito-Inc* KO-Mäusen resultiert in einer verstärkten Akkumulation an freien BCAAs im Serum

Um putativ eine Exazerbation des *mito-Inc* KO-Phänotyps zu induzieren erhielten die Tiere für 8 Wochen eine Spezialdiät mit einem hohen Anteil an BCAAs. Zur Kontrolle erhielten wildtypische Wurfgeschwister die gleiche Diät. Für den Versuch wurden *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{ΔA}-Mäuse verwendet. Für die Analyse und die statistische Auswertung wurden diese jedoch nur im Falle des Herzgewichtes zusammengefasst. Im Falle der Serummetabolite und des Körpergewichtes lag bereits unter den wildtypischen Gruppen keine Normalverteilung vor, daher wurden hierfür nur die Daten der *mito-Inc*^{-/-} Tiere und deren Wurfgeschwistern verwendet. Die Gruppengrößen für die BCAA supplementierten Gruppen betrug im Falle der Kontrollgruppe 5 (*mito-Inc*^{+/+}) und 4 für die KO-Tiere (*mito-Inc*^{-/-}). Die Gruppengrößen für die BCAA supplementierten polyA-Mäuse betrug im Falle der Kontrollgruppe 11 (*mito-Inc*^{+/+}) und 9 für die KO-Tiere (*mito-Inc*^{ΔA}). Zur Analyse der Entwicklung des Körpergewichtes im Zuge einer erhöhten BCAA Supplementierung wurden

zusätzlich Daten von normal gefütterten-Tieren mit denen der BCAA-supplementierten Tiere verglichen. Dazu wurden wildtypische und KO-Tiere (*mito-Inc^{-/-pA}*) im Alter von 16-20 Wochen verwendet, welche Normalfutter erhalten hatten. Die Gruppengröße lag bei 10 für die wildtypischen Tiere und 19 für die *mito-Inc^{-/-}*-Tiere. Die behandelten KO-Tiere waren nach Ende des 8-wöchigen Futtersversuches im Durchschnitt etwa 5 g schwerer im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern (Abb. 3.15 A). Die statistische Analyse der Gewichtsunterschiede erfolgte mittels zweiseitigem Mann-Whitney-Test und ergab einen signifikanten Unterschied bei einem p-Wert von 0,0159. Unter Normalfutter-Bedingungen konnte kein signifikanter Gewichtsunterschied festgestellt werden. Zur Analyse der Entwicklung des Herzgewichtes im Zuge einer erhöhten BCAA Supplementierung wurden zusätzlich Daten von normal gefütterten-Tieren mit denen der BCAA-supplementierten Tiere verglichen. Dazu wurden wildtypische und KO-Tiere (*mito-Inc^{-/-pA}*) im Alter von 16-20 Wochen verwendet, welche Normalfutter erhalten haben. Die Gruppengröße lag bei 42 für die wildtypischen Tiere und 40 für die *mito-Inc^{-/-pA}*-Tiere. Das Herzgewicht der *mito-Inc^{-/-pA}*-Tiere unter Normalfutter Bedingung war signifikant erhöht mit einem p-Wert von 0,0025 (zweiseitiger t-Test) (Abb. 3.15 B). Das Herzgewicht der *mito-Inc^{-/-pA}* Tiere nach 10 Wochen BCAA Supplementierung (*mito-Inc^{-/-pA}*– high BCAA) war im Vergleich zur gleichbehandelten *mito-Inc^{+/+}*-Kontrollgruppe (*mito-Inc^{+/+}*– high BCAA) signifikant erhöht (einseitiger t-Test p = 0 0,0286). Der Vergleich beider *mito-Inc^{+/+}*-Gruppen untereinander zeigte keinen signifikanten Unterschied. Das Herzgewicht der *mito-Inc^{-/-}* Tiere nach 10 Wochen Diät zeigte keine Veränderung im Vergleich zu dem unbehandelten *mito-Inc^{-/-}*-Mäuse. Das Herzgewicht der behandelten KO-Mäuse war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (*mito-Inc^{+/+}*) signifikant erhöht (einseitiger t-Test p-Wert=0,0051) Die behandelte Kontrollgruppe (*mito-Inc^{+/+}*-BCAA) zeigte ein signifikant (einseitiger t-Test p-Wert=0,0323) geringeres Herzgewicht im Vergleich zur unbehandelten KO-Gruppe (*mito-Inc^{-/-}*-BCAA). Die Konzentration freier BCAAs (nmol/μl) im Serum der *mito-Inc^{-/-}*-Tiere war nur geringfügig erhöht im Vergleich zu *mito-Inc^{+/+}*-Kontrolltieren (Abb. 3.15 C) (einseitiger t-Test p = 0,0755). Die Menge freier BCAAs im Serum der *mito-Inc^{-/-}* Tiere nach 8 Wochen BCAA Diät (*mito-Inc^{-/-}*-BCAA) war nicht verändert im Vergleich zur gleichbehandelten Kontrollgruppe (*mito-Inc^{+/+}*-BCAA) (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0 0,1429). Der Vergleich beider *mito-Inc^{+/+}*-Gruppen untereinander zeigte eine fast 3-fach erhöhte Menge an freien BCAAs (einseitiger t- Test p<0,0001). Die

Konzentration freier BCAAs im Serum der *mito-Inc*^{-/-} Tiere nach 8 Wochen Diät zeigte etwa 2,5-fach höhere Akkumulation freier BCAAs im Blutserum im Vergleich zur unbehandelten *mito-Inc*^{-/-} Mäusen (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,0048). Die BCAA Diät führte bei den wildtypischen Mäusen (*mito-Inc*^{+/+}-BCAA) zu einer Verdopplung der freien BCAAs im Blutserum im Vergleich zur unbehandelten KO-Gruppe (*mito-Inc*^{-/-}) (einseitiger t-Test p = 0,0005). Zusätzlich wurden die Level an BCKDHA^{Ser293} und mTOR^{Ser2448} der BCAA-supplementierten Tiere bestimmt (Abb. 3.15 D). Dafür wurden Proteinlysate der Herzen der Tiere verwendet. Die Gruppengröße betrug jeweils eine n-Zahl von 4. Die Menge an BCKDHA^{Ser293} wurde normalisiert auf die Gesamtmenge an BCKDHA. Die Menge an BCKDHA^{Ser293} in den KO-Tieren war fast um die Hälfte geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Verringerung war Signifikant mit einem p-Wert von 0,0143 (einseitiger Mann-Whitney-Test). Die Menge an mTOR^{Ser2448} war im *mito-Inc* KO nicht verändert unter der erhöhten Supplementierung von BCAA im Vergleich zum WT.

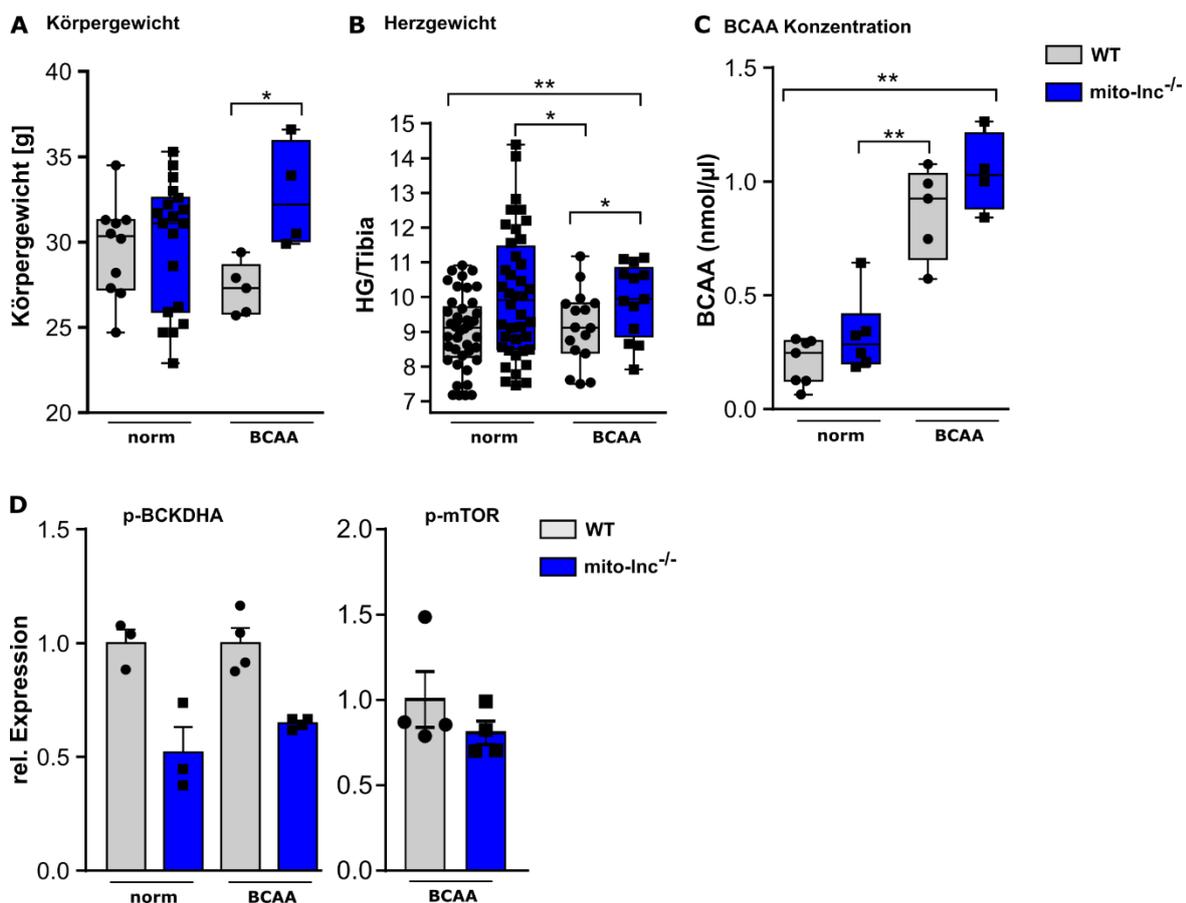


Abb. 3.15: Die erhöhte Supplementierung von BCAAs resultiert in einer verstärkten Akkumulation an freien BCAAs im Serum. (A) Das Körpergewicht der *mito-Inc*^{-/-} Tiere war nach 8 Wochen BCAA Diät signifikant erhöht. (zweiseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,0159). (Mittelwert ± min.-max, Norm: Wildtyp; n = 10, *mito-Inc* KO; n = 19; BCAA: Wildtyp; n = 5, *mito-Inc* KO; n = 4) **(B)** Das Herzgewicht der *mito-Inc*^{-/-} Tiere

nach BCAA Diät (*mito-Inc*^{-/-}-BCAA) war im Vergleich zur gleichbehandelten *mito-Inc*^{+/+}-Kontrollgruppe (*mito-Inc*^{+/+}-BCAA) signifikant erhöht (einseitiger t-Test p = 0,0286). Das Herzgewicht der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere nach Diät zeigte keine Veränderung im Vergleich zu dem unbehandelten *mito-Inc*^{-/-}-Mäuse. Das Herzgewicht der behandelten KO-Mäuse ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (*mito-Inc*^{+/+}) signifikant erhöht (einseitiger t-Test p-Wert=0,0051) Die behandelte Kontrollgruppe (*mito-Inc*^{+/+}-BCAA) zeigte ein signifikant (einseitiger t-Test p-Wert=0,0323) geringeres Herzgewicht im Vergleich zur unbehandelten KO-Gruppe (*mito-Inc*^{-/-}). (Mittelwert ± min.-max, Norm: Wildtyp; n = 42, *mito-Inc* KO; n = 40; BCAA: Wildtyp; n = 16, *mito-Inc* KO; n = 13). **(C)** Das Level freier BCAAs (nmol/μl) im Blutserum. Die Konzentration freier BCAAs im Serum der *mito-Inc*^{-/-} Tiere war nur geringfügig erhöht im Vergleich zu den *mito-Inc*^{+/+}-Kontrolltieren (einseitiger t-Test p = 0,0755). Die Menge freier BCAAs im Serum der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere nach BCAA Diät (*mito-Inc*^{-/-}-BCAA) nicht verändert im Vergleich zur gleichbehandelten Kontrollgruppe (*mito-Inc*^{+/+}-BCAA) (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,1429). Der Vergleich beider *mito-Inc*^{+/+}-Gruppen untereinander zeigte eine fast 3-fach erhöhte Menge an freien BCAAs (einseitiger t-Test p<0,0001). Die Konzentration freier BCAAs im Serum der *mito-Inc*^{-/-}-Tiere nach 10 Wochen Diät zeigte etwa 2,5-fach höhere Akkumulation freier BCAAs im Blutserum im Vergleich zur unbehandelten *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen (einseitiger Mann-Whitney-Test p = 0,0048). Die BCAA Diät führte bei den wildtypischen Mäusen (*mito-Inc*^{+/+}-BCAA) zu einer Verdopplung der freien BCAAs im Blutserum im Vergleich zur unbehandelten KO-Gruppe (*mito-Inc*^{-/-}) (einseitiger t-Test p = 0,0005) (Mittelwert ± min.-max, Norm: Wildtyp; n = 7, *mito-Inc* KO; n = 6; BCAA: Wildtyp; n = 5, *mito-Inc* KO; n = 4). **(D)** Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-}- und *mito-Inc*^{+/+}-Herzen nach 10 Wochen high-BCAA Diät und unter Normalfutterbedingungen zur Analyse von p-BCKDHA^{Ser293} (50 kDa) im Verhältnis zur Gesamtmenge von BCKDHA (50 kDa). Die Menge an p-BCKDHA^{Ser293} war im KO abgereichert (einseitiger Mann-Whitney-Test p-Wert = 0,0143). Die Menge von p-mTOR^{Ser2448} war im *mito-Inc* KO nicht verändert unter der erhöhten Supplementierung von BCAA im Vergleich zum WT (einseitiger Mann-Whitney-Test; p = 0,3429) (Mittelwert ± SEM, Norm: Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3, BCAA: Wildtyp; n = 4, *mito-Inc* KO; n = 4).

3.4.2 Der Verlust von *mito-Inc* führt zu keiner Mislokalisierung von mitochondrialen Proteinen

Eine Hypothese für die Funktion von *mito-Inc* war die Möglichkeit einer regulatorischen Transportfunktion für die mitochondriale Lokalisierung spezifischer BCAA-metabolisierender Proteine. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Mitochondrien aus WT- und KO-Herzen isoliert und deren Proteine gewonnen. Dabei wurde je Tier ein Teil des Gesamtherzens als Kontrolle verwendet. Die Level der spezifischen Proteine in den einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels Westernblot bestimmt (Abb. 3.16). Zur Überprüfung der Isolation und die daraus resultierende Reinheit der einzelnen Mitochondrienisolationen wurden CYTC und GAPDH als Kontrollen verwendet. CYTC ist ein mitochondrial-kodiertes, sowie lokalisiertes Enzym [150]. GAPDH hingegen ist ein zytoplasmatisches Protein [142]. Zur Analyse wurden die Mengen der untersuchten Proteine im Verhältnis auf die entsprechende Gesamtfraktion bezogen. Die Gruppengröße

betrug jeweils 3. Während GAPDH in der Mitochondrienfraktion deutlich abgereichert war, war die Menge an CYTC in den Mitochondrien angereichert. Zur Überprüfung der Hypothese wurden spezifische Antikörper gegen BCKDHA, DBT, PCCA, PPM1K und HADHA verwendet um deren Proteinlevel in den Mitochondrien nach Verlust von *mito-Inc* zu bestimmen. Alle überprüften Proteine sind Bestandteil des BCAA Metabolismus und konnten mit verschiedenen RNA-Pulldown Experimenten (Abschnitt 3.2.2) im Falle von *mito-Inc* als putative Interaktionspartner detektiert werden. Im Vergleich der einzelnen Proteine konnte kein Unterschied im Vergleich von WT- und KO-Tieren bestätigt werden. Keines der analysierten putativen Interaktionsproteine von *mito-Inc* zeigte eine statistisch signifikante Veränderung in ihrer mitochondrialen Lokalisierung auf Proteinebene.

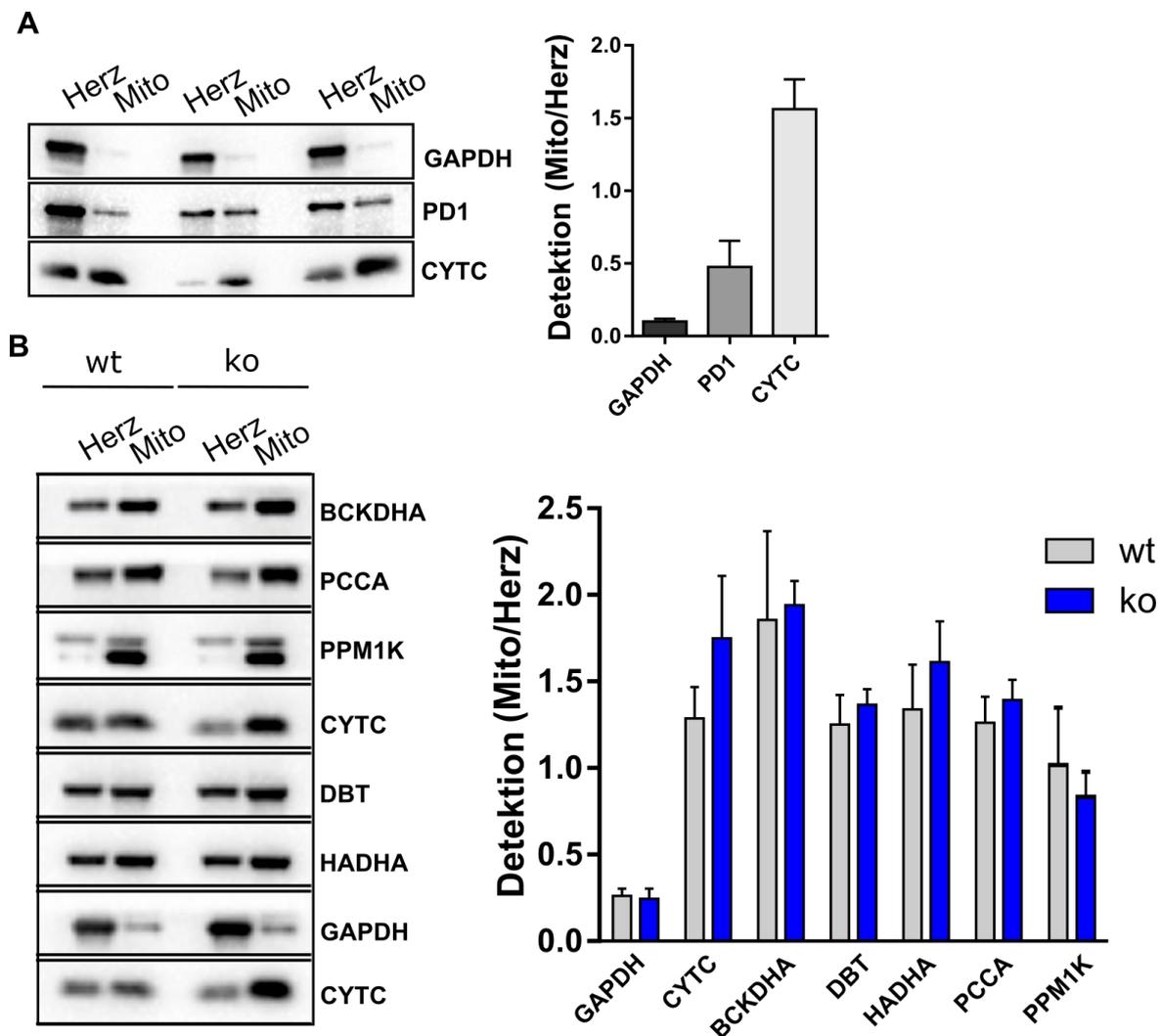


Abb. 3.16: Der Verlust von *mito-Inc* führt zu keiner Mislokalisierung von mitochondrialen BCAA-assoziierten Proteinen. Zur Analyse der Lokalisierung von BCAA Metabolismus-assoziierten Enzymen wurden Mitochondrien aus *mito-Inc*^{+/+} und *mito-Inc*^{-/-} Herzen isoliert und Westernblots angefertigt. Als Kontrolle wurden Proteinlysate des gesamten Herzgewebes verwendet. Zur Kontrolle der

Isolationmethode wurden Antikörper für GAPDH und CYTC verwendet. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis des entsprechenden Proteins zur jeweiligen Gesamtfraktion. **(A)** Westernblot von wildtypischen kardialen Mitochondrien zur Kontrolle der Isolationmethode. Während GAPDH in den Mitochondrien deutlich angereichert war, konnte CYTC in den Mitochondrien angereichert werden. PD1 konnte ebenfalls in den Mitochondrien angereichert detektiert werden. **(B)** Die Analyse zur Proteinverteilung im Vergleich WT gegen KO zeigte keinerlei statistisch signifikante Unterschiede in der Detektionsintensität der untersuchten Enzyme. Als Kontrolle der Mitochondrienfraktion dienten GAPDH und CYTC (Mittelwert \pm SEM, Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3).

3.4.3 Der Verlust von mito-Inc resultiert in keiner Veränderung der Komplexzusammensetzung von BCKDC

Eine weitere Hypothese zur Funktion von *mito-Inc* war die Möglichkeit zur Regulation der Komplexzusammensetzung des BCKD Komplexes (BCDC). Zur Überprüfung wurde eine Immunoprecipitation mit anschließender Massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. Dafür wurden Antikörper gegen DBT und MCCA verwendet. Beide Enzyme sind Teil des BCAA Metabolismus und putative Interaktionspartner von *mito-Inc*. DBT bildet die E2 Untereinheit des BCKDC. MCCA katabolisiert weiter stromabwärts im Metabolismusweg Methylcrotonyl-CoA zu Methylglucanoyl-CoA. [48,50] Verwendet wurden Proteinlysate von WT- und *mito-Inc* KO-Tieren mit jeweils einer n-Zahl von 3. Zur Validierung der Experimente auf ihre Funktionalität wurden Westernblots durchgeführt (Abb. 3.17 D). Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der einzelnen Replikate beider IP-Experimente erfolgte nach Ringnér 2008 [201]. Die einzelnen Datensets der Proteingruppen, jeweils bestehend aus Triplikaten und lagen nach der Normalisierung in 4 Gruppen vor (Abb. 3.17 A). Diese vier Gruppen zeigten eine räumliche Trennung, verteilt in den 4 Quadranten der PCA Skala. Die anti-IgG-Proben bildeten zwei klar abgrenzbare Gruppen in den oberen Quadranten der PCA Skala, in räumlicher Nähe zum 0-Punkt (X1). Die beiden unabhängigen IPs bildeten dabei jeweils eine eigene Gruppe. Die Proben (WT=3; KO=3) der eigentlichen IPs waren ebenfalls in zwei räumlich abgrenzbare Gruppen unterteilt. Beide Experimente sind also deutlich voneinander zu unterscheiden, wobei die Streuung im Falle der IP mit anti-DBT größer war im Vergleich zu der IP mit anti-MCCA. In beiden Fällen lag keine Abgrenzung der wildtypischen von den KO-Proben vor. Die Anreicherung von DBT in der DBT-IP im Vergleich zur IgG Kontrolle war signifikant (p-Wert von $<0,0005$). Die Anreicherung von MCCA in der MCCA-IP im Vergleich zur IgG Kontrolle war ebenfalls signifikant (WT: p-Wert $<0,01$; KO: p-Wert $<0,002$). Die Ergebnisse zeigten keinerlei signifikante Veränderung innerhalb der

individuellen Mengen an detektiertem Protein in den KO-Proben im Vergleich zum WT (Abb. 3.17 B). Die genauere Betrachtung beider IPs der Untereinheiten hinsichtlich des BCKD Komplexes zeigte ebenfalls keine Detektionsunterschiede im Vergleich WT gegen KO (Abb. 3.17 C). Das Verhältnis von WT zu KO lag in einem Bereich von -0,42 und 0,01 im Falle der DBT-IP ohne eine statistische Signifikanz aufzuweisen. Für die MCCA-IP lag der Wert der einzelnen Untereinheiten zwischen 0,04 und 0,06, ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Auch hinsichtlich der restlichen, am BCAA Metabolismus beteiligten Enzyme war kein signifikanter Unterschied im Vergleich WT gegen KO auszumachen (Abb. 3.17 D). Der Vergleich der Ergebnisse beider verwendeter Antikörper untereinander zeigte Unterschiede innerhalb der detektierten Proteine an sich. Mit anti-DBT konnte zum Beispiel die Kinase BDK, welche für die inaktivierende Phosphorylierung des BCKD Komplex verantwortlich ist, detektiert werden. BDK konnte hingegen in der MCCA-IP nicht detektiert werden.

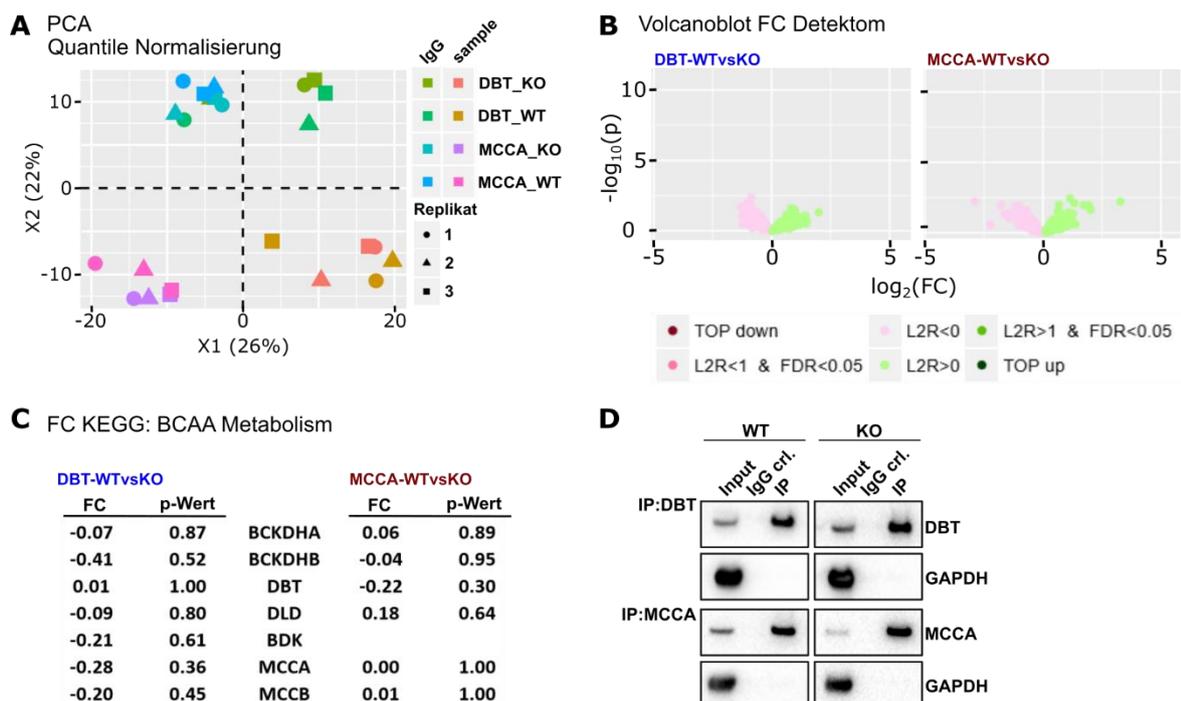


Abb. 3.17 Der Verlust von *mito-Inc* induziert keine Veränderung in der Konstellation des BCKD Komplexes. Immunoprecipitation mit anschließender massenspektrometrischer Analyse zur Untersuchung der einzelnen Komponenten des BCKD Komplexes im Vergleich WT gegen KO. Für die IP wurden Antikörper gegen DBT und MCCA verwendet. **(A)** Hauptkomponentenanalyse (PCA) der einzelnen Replikate beider IP-Experimente. Die Streuung innerhalb der Gruppen ist prozentual abgebildet. **(B)** Volcanoplot der Ergebnisse beider IPs. Aufgetragen wurde das Verhältnis der Detektion aller Protein (FC(log₂)) von WT zu KO gegen den jeweiligen entsprechenden p-Wert (-log₁₀). In beiden Fällen konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression der Proteine von WT- und KO-Proben nachgewiesen

werden. **(C)** Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der IPs für die Komponenten des BCKD und des MCC Komplexes. **(D)** Westernblot zur Validierung der beiden IPs. Beide Proteine konnten mit dem jeweils verwendeten spezifischen Antikörper angereichert werden. Als Kontrolle wurde GAPDH (37 kDa) verwendet. GAPDH konnte nur in der Inputkontrolle detektiert werden. Die IgG-Kontrollen zeigten weder für GAPDH noch für DBT (50 kDa) /MCCA (85 kDa) ein spezifisches Signal. (Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3) (DBT: IP gegen Dbt, MCCA: IP gegen MccA)

3.5 Eine Rückkreuzung in den genetischen C57BL/6J Hintergrund hat eine Regression des kardialen Phänotyps zur Folge

Die Rückkreuzung der *mito-Inc* KO-Mäuse in einen C57BL/6J genetischen Hintergrund führte zu der Reversion der bereits beschriebenen kardialen Hypertrophie im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* (Abb. 3.18 A). Das Körpergewicht der Tiere blieb, ebenso wie die Tibialänge weiterhin unverändert (Abb. 3.18 B, C). Zusätzlich zeigten die Daten der Transkriptomanalyse des Herzens teilweise eine Reversion der, durch den Verlust von *mito-Inc* induzierten Hochregulation BCAA-Metabolismus relevanter Gene (Abb. 3.18 D). Die Gruppengröße für die KO-Mäuse und die wildtypischen Kontrolltiere betrug 2. Zusätzlich konnte eine Hochregulation der Transaminase BCAT2 detektiert werden, welche im gemischten genetischen Hintergrund durch den Verlust von *mito-Inc* unverändert blieb. Die Phosphatase PPM1K war wie bereits im gemischten genetischen Hintergrund in den *mito-Inc* KO-Tieren im C57BL/6J Hintergrund leicht erhöht. Die Hochregulation der BCKDH Kinase (BDK) wurde durch die Rückkreuzung in den genetischen C57BL/6J Hintergrund normalisiert. Die Detektion der beiden Untereinheiten der BCKDH war sehr heterogen innerhalb der Gruppen. Die Darstellung der Detektion mittels z-Wert zeigte jedoch für alle *mito-Inc* KO-Versuchsgruppen eine partielle Hochregulation beider Untereinheiten. Die nähere Betrachtung der Transkriptomdaten auf der Basis der KEGG Gensets für die Glykolyse, den Fettsäure Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung zeigten einige signifikante Unterschiede im Vergleich der zurückgekreuzten *mito-Inc*^{-/-}-Tiere mit den wildtypischen Wurfgeschwistern (Abb. 3.18 C). Der Verlust des Phänotypes stellte die Frage nach dessen Ursache und damit verbunden die Frage danach, ob und warum C57BL/6J Mäuse besser mit dem Verlust von *mito-Inc* zurechtkommen als 129/SvJ Mäuse. Zur Beantwortung der Frage nach Unterschieden in der Expression von *mito-Inc* innerhalb der Mausstränge wurde eine q RT-PCR unter Verwendung Genspezifischer Primer auf verschiedenen Gewebeproben beide Mausstränge durchgeführt Die Gruppengröße betrug jeweils 4 Tiere pro Gruppe. Die Untersuchung zur Expression von *mito-Inc* im Vergleich

C57BL/6J und 129/SvJ Mäuse zeigte nur im TA Muskel eine stärkere Veränderung in der Expression (Abb. 3.18 F). Die *mito-lnc* konnte dort mit einer höheren Abundanz in 129/SvJ Mäusen detektiert werden. Zur weiteren Analyse des Phänomens wurden Transkriptomdaten des *Musculus Tibialis anterior* von Calyjur aus dem Jahr 2016 analysiert [156,209]. Die Transkriptomanalyse der wildtypischen C57BL/6J Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Mäusen mit 129/SvJ Hintergrund zeigte deutliche Unterschiede in der Detektion von BCAA-Metabolismus relevanten Genen (Abb. 3.18 E). C57BL/6J Mäuse zeigten eine geringere Expression der meisten BCAA-relevanten Gene im Vergleich zu 129/SvJ Mäusen. Eine Ausnahme war die Transaminase BCAT2, diese war in C57BL/6J Mäusen stärker exprimiert als in wildtypischen 129/SvJ Mäusen. Die Expression der Phosphatase PPM1K und der Kinase BDK zeigten große Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen. Die Dehydrogenase BCKDH konnte partiell stärker in wildtypischen C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu 129/SvJ Mäusen detektiert werden. Zur weiteren Untersuchung der Unterschiede zwischen C57BL/6J und 129/SvJ Mäusen wurden bereits publizierte Metabolomdaten von Quiao aus dem Jahr 2011 analysiert [158]. Es konnte gezeigt werden, dass 129/SvJ Mäuse unter anderem eine signifikant höhere Konzentration an freien BCAAs im Serum aufweisen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (Abb. 3.18 F) [157]. Auch für weitere Metabolite, wie zum Beispiel die Aminosäuren Serin und Threonin konnte dieser Effekt gezeigt werden [157].

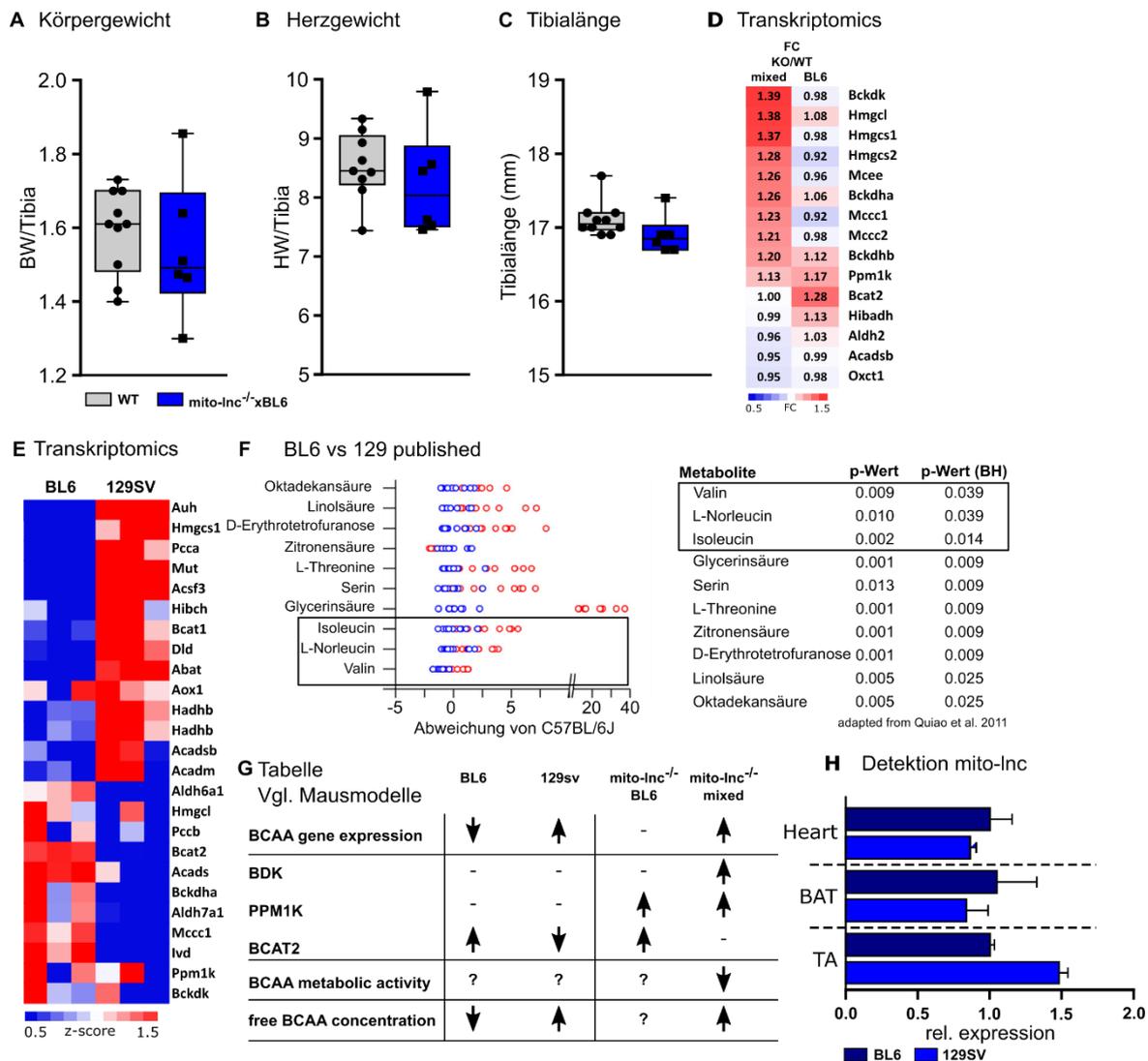


Abb. 3.18 Eine Rückkreuzung in den genetischen C57BL/6J Hintergrund hat eine Regression des kardialen Phänotyps zur Folge. (A-C) Der Verlust von *mito-Inc* im C57BL/6J Hintergrund hatte keine Veränderungen im Herzgewicht, dem Körpergewicht oder der Tibialänge der Tiere zur Folge (Mittelwert \pm min.-max, Wildtyp; n = 10, *mito-Inc* KO; n = 6, Herzgewicht: Wildtyp; n = 9, *mito-Inc* KO; n = 6). (D) Heatmap der Transkriptomanalyse der KO-Tiere im gemischtem (*mixed*) und C57BL/6J Hintergrund. Dargestellt ist das Verhältnis (FC) der Expression einer Auswahl der Gene des KEGG Gensets: BCAA Metabolismus im Vergleich der KO-Tiere zum WT im C57BL/6J oder gemischtem (*mixed*) genetischen Hintergrund (Mixed: Wildtyp; n = 7, *mito-Inc* KO; n = 7, BL6: Wildtyp; n = 2, *mito-Inc* KO; n = 2). (E) Heatmap der Transkriptomanalyse von wildtypischen C57BL/6J und 129/SvJ Mäusen [209]. Dargestellt ist der z-Wert einer Auswahl an Genen des KEGG Gensets: BCAA Metabolismus im Vergleich C57BL/6J WT und WT 129/SvJ im m. TA (BL6; n = 3, 129SV; n = 3). (F) C57BL/6J und 129/SvJ Mäuse zeigten unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Blutserum. Publierte Daten von 2011 zum Vergleich C57BL/6J vs 129/SvJ Mäuse hinsichtlich ihrer Serummetabolite [157]. Die 129/SvJ WT-Mäuse zeigten erhöhte Metabolitkonzentrationen im Vergleich zur wildtypischen C57BL/6J Versuchsgruppe. [verändert nach 157] (G) Tabellarische Übersicht der Unterschiede im BCAA Metabolismus im direkten Vergleich der genetischen Hintergründe im WT-sowie in *mito-Inc*^{-/-}-Mäusen. Die Übersicht ist eine Zusammenfassung der publizierten, sowie der in dieser Arbeit generierten Daten. (H)

Expression von *mito-lnc* im Vergleich von C57BL/6J und 129/SvJ WT-Mäusen. Für die Analyse wurde eine q RT-PCR mit genspezifischen Primern für *mito-lnc* durchgeführt. Die Daten wurden auf *Gapdh* (Herz, TA) oder β -Aktin (BAT) normalisiert. Dargestellt ist das Verhältnis der Detektion der Gene jeweils in C57BL/6J und 129/SvJ WT-Mäusen. (C57BL/6J=1). Die Detektion von *mito-lnc* zeigte nur im *Musculus Tibialis anterior* (m. TA) eine Veränderung im Vergleich beider Versuchsgruppen. Im TA von 129/SvJ Mäusen konnte *mito-lnc* um etwa $\frac{1}{4}$ stärker detektiert werden im Vergleich zur C57BL/6J Kontrolle (Mittelwert \pm SEM Wildtyp; n = 4, *mito-lnc* KO; n = 4,). *(Zur besseren Darstellung wurden die Affymetrix Daten vom BAT verwendet. (m. TA = *Musculus Tibialis anterior*)

4. Diskussion

4.1 Kandidatenvalidierung

Zur Identifikation einer lncRNA, die eine Rolle im Metabolismus kontraktiler Gewebe spielen könnte, wurde eine ausführliche Kandidatenvalidierung durchgeführt. Diese beinhaltete eine detaillierte *in-silico* Analyse und erste molekularbiologische Charakterisierungen der einzelnen lncRNA Kandidaten. Schließlich wurden von drei lncRNA Kandidaten KO-Mäuse generiert und eine basale, phänotypische Analyse durchgeführt. Die Vorauswahl zur Identifikation potentieller lncRNA Kandidaten lieferte schließlich *mito-lnc* als den besten Kandidaten auf der Suche nach einer metabolisch relevanten lncRNA in kontraktilem Gewebe. Die *mito-lnc* wurde von Gellert, 2013 [104] und Sun, 2013 [28] bereits als nicht-kodierend beschrieben. Die Bioinformatischen Daten zum Kodierungspotential von *mito-lnc* waren vergleichbar mit denen, bereits beschriebener lncRNAs wie *Hotair*, oder *Nron* [137,138]. Analysen zur Konservierung der lncRNA und der putativen ORFs mittels BLASTX bestätigten den nicht-kodierenden Charakter der RNA.

Die Entscheidung für diese lncRNA beruhte auf den, zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Daten zur Lokalisierung, sowie der Interaktion von *mito-lnc*, welche später näher diskutiert werden. Zusätzlich führte der Verlust der lncRNA im *in vivo* LOF-Modell zu der Entwicklung eines kardialen Phänotyps der Tiere, was eine funktionelle Rolle von *mito-lnc* per se vermuten ließ.

4.1 *mito-lnc* ist eine mitochondriell-assoziierte lncRNA

Die Lokalisierung einer lncRNA ist ein wichtiger Faktor bei deren Charakterisierung, wie auch bei der Analyse deren Funktion. Viele der anfänglich beschriebenen lncRNAs sind kernlokalisiert und haben einen regulatorischen Einfluss auf die Expression ihrer jeweiligen Zielgene. Beispiele hierfür sind *Neat1*, *Hotair* oder *Xist* [32,138,160]. Die Lokalisierungsanalyse für *mito-lnc* zeigte eine extranukleare, Mitochondrien-assoziierte Lokalisierung von *mito-lnc*. Das Detektionsmuster von *mito-lnc* im Zuge der Zellfraktionierung von Kardiomyozyten zeigte zunächst eine vergleichbare Verteilung wie *Gapdh*. Die kernlokalisierte Kontroll-RNA *Neat1* [32] konnte ausschließlich in der nuklearen Fraktion detektiert werden. Eine nukleare Kontamination der extranuklearen Fraktion wurde damit ausgeschlossen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *mito-lnc* in

isolierten Mitochondrien lokalisiert ist. Der Vergleich mit der kernkodierten, im Mitochondrium lokalisierten Kontroll-RNA *Tfam* [145], zeigte eine Korrelation in der Abundanz beider Transkripte. Die zytoplasmatische Kontroll-RNA β -*Aktin* [146] wurde in den Mitochondrien nicht einmal halb so häufig detektiert wie *mito-lnc* oder *Tfam*. Diese Ergebnisse implizierten eine mitochondrielle Lokalisierung von *mito-lnc*, oder zumindest eine Assoziation der lncRNA mit Mitochondrien. Zur weiteren Überprüfung der Hypothese der mitochondriellen Lokalisierung von *mito-lnc* wurde ein RNA-FISH Experiment auf isolierten Kardiomyozyten durchgeführt. Als mitochondrielle Kontroll-RNA diente *Atp6* [147]. Die mikroskopische Auswertung zeigte eine Co-Lokalisierung von *mito-lnc* mit *Atp6*, wobei nicht jedes *Atp6* Signal ebenfalls eine Überlagerung mit dem Signal von *mito-lnc* zeigte. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Ein wichtiger Faktor war die Limitation der Detektionsmethode [161]. Die *mito-lnc* ist weitaus weniger Abundant in ihrer Gesamtheit im Vergleich zu *Atp6*. Eine höhere Abundanz des Transkriptes resultiert dementsprechend in einer gehäufteten Detektion des amplifizierten Signals. Die geringe Abundanz von *mito-lnc* resultiert daher auch in einer geringeren Detektionsrate des spezifischen Signals für *mito-lnc*. Da nahezu jede mikroskopische Detektion eines spezifischen Signals von *mito-lnc* mit einem spezifischen Signal von *Atp6* einherging, kann davon ausgegangen werden, dass *mito-lnc* eine mitochondrielle Assoziation oder Lokalisierung aufweist. Eine Software-basierte Auswertung der Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von wildtypischen und *mito-lnc* KO-Kardiomyozyten zeigte keine Co-Lokalisierung in der KO-Situation. Diese Tatsache zeigt einerseits die Spezifität der Sonde im Hinblick auf *mito-lnc* und stützt zudem die These deren mitochondriellen Assoziation.

4.2 Der BCKD Komplex ist der Interaktionspartner von *mito-lnc*

Die Interaktionspartner von lncRNAs spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausübung ihrer Funktion. Die Analyse des Interaktoms von *mito-lnc*, im Zuge ihrer Charakterisierung und funktionellen Analyse, war demnach von essentieller Bedeutung. Das Interaktom von *mito-lnc* wurde zunächst mit Hilfe diverser RNA-Pulldown Experimente untersucht. Diese implizierten eine Interaktion von *mito-lnc* mit Enzymen des BCAA Katabolismus [48,50]. Die stärkste Anreicherung mit *mito-lnc* zeigte der BCKD Komplex, das Schlüsselenzym bei der Regulation des BCAA Metabolism. Die postulierte Interaktion von *mito-lnc* und dem BCKD

Komplex wird auch gestützt von der Tatsache der mitochondrialen Lokalisierung bzw. Assoziation der lncRNA. Der Katabolismus von BCAAs ist ein mitochondrialer Stoffwechselweg und kein zytoplasmatischer Prozess [53]. Nur die Transaminierung der BCAAs, welcher über die BCAT katabolisiert wird, kommt im Zytoplasma vor [53]. Diese zytoplasmatische Version der BCAT (BCATc) wurde in den Pulldown Experimenten mit *mito-lnc* weder angereichert, noch detektiert. Daher ist davon auszugehen, dass *mito-lnc* mit den mitochondrialen, BCAA-katabolisierenden Enzymen interagiert. Zur weiteren Charakterisierung und zur Analyse der Funktion von *mito-lnc* sollte möglichst der direkte Interaktionspartner von *mito-lnc* ausgemacht werden. Die stärkste Anreicherung im Zuge des RNA-Pulldown Experimentes fand mit der α -Untereinheit (UE) der BCKDH statt. Diese bildet zusammen mit der β -UE der BCKDH, die E1 UE des BCKD Komplexes (BCKDC) [162]. Der BCKDC, bestehend aus den drei Untereinheiten BCKDH (E1), DBT (E2) und DLD (E3), ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und katalysiert die oxidative Decarboxylierung der Ketoazide zur Produktion von Carbonyl Derivaten, NADH und CO₂ [162,163].

Die Anreicherung der α -BCKDH mit *mito-lnc* konnte mit diesem Experiment statistisch signifikant gezeigt werden. Im direkten Vergleich aller drei verwendeten lncRNAs konnten auch die E2 (DBT) und die E3 (DLD) Untereinheit des BCKDC mit *mito-lnc* runtergezogen werden, jedoch fand keine signifikante Anreicherung im Vergleich von *mito-lnc* mit den Kontroll-RNAs statt. Dies könnte am Aufbau des Komplexes an sich liegen. Die E2 UE (DBT) bildet dabei den Kern des Komplexes [165]. Alternierend um den E2-Kern befinden sich die E1 und die E3 UE des BCKD Komplexes [165]. Wobei die direkte Verbindung zwischen der BCKDHB (E1) und DBT (E2) besteht [165]. Die BCKDHA hingegen, ist nur über die BCKDHB mit dem BCKD Komplex verbunden [165]. Findet nun eine direkte Interaktion zwischen *mito-lnc* und der BCKDHA statt, ist eine Detektion einer Interaktion mit den anderen Komponenten des BCKD Komplexes putativ geringer. Zum Nachweis der Interaktion von *mito-lnc* mit der BCKDHA wurde ein *RNA in-situ* Hybridisierungs *proximity ligation* Assay (rISH-PLA) [165] durchgeführt. Dieser bestätigte die direkte Interaktion von *mito-lnc* und der BCKDHA.

4.3 Der Verlust von *mito-lnc* induziert eine kardiale Hypertrophie

Die Belastungsbewertungen der verwendeten Mauslinien zur Analyse der Funktion von *mito-lnc* zeigten keinerlei Veränderungen im Hinblick auf deren Tierwohl. Der Verlust von

mito-lnc war weder letal noch war die Lebensqualität der Mäuse beeinträchtigt. Die Tierhaltung ist im Allgemeinen nicht von der Expression der lncRNA abhängig. Das Handling der Tiere, sowie die Entwicklung der Neugeborenen und der Jungtiere zeigte keine Verhaltensauffälligkeiten. Tiere mit einem Alter von einem Jahr hatten ebenfalls keinerlei Einschränkungen oder pathologische Veränderungen. Phänotypisch führte der Verlust von *mito-lnc* im Zuge des Alterungsprozesses zu einer kardialen Hypertrophie, sowie zu einer Veränderung in der Verteilung der Muskelfasertypen im Skelettmuskel. Die erste phänotypische Untersuchung von 8 Wochen alten Tieren zeigte zunächst keinerlei Auffälligkeiten im Körpergewicht oder Herzgewicht. Auch äußerlich morphologische Veränderungen der einzelnen metabolisch aktiven Gewebe waren nicht ersichtlich. Der histologische Befund anhand der durchgeführten präliminären Analyse der Skelettmuskulatur von 8 Wochen alten Tieren war ebenfalls negativ. Im Alter von 15-18 Wochen zeigten die KO-Tiere einen kardialen Phänotyp in Form einer sichtbaren Vergrößerung des Herzens. Diese wurde bestätigt mit der signifikanten Erhöhung des Herzgewichtes der Tiere. Die kardiale Hypertrophie konnte auch in den polyA-Tieren festgestellt werden. Ebenso wie die Tiere mit vollständiger genomischer Deletion entwickelten die Mäuse eine signifikante Erhöhung des Herzgewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies bestätigt die Funktion der lncRNA als Molekül, unabhängig von der Transkription desselbigen. Der genomische Locus ist in den polyA-Mäusen noch vorhanden und die Transkriptionsmaschinerie in der Lage die Transkription zu initiieren. Das inserierte polyA-Signal verhindert jedoch ein Fortschreiten der Transkription und induziert somit einen Verlust des *mito-lnc* Transkriptes. Die, bei der phänotypischen Analyse der polyA-Mäuse festgestellte Phänokopie führt somit zu der Schlussfolgerung, dass die Funktion von *mito-lnc* auf dem Vorhandensein des Transkriptes beruht. Dies ist im Zusammenhang mit den charakteristischen Eigenschaften von *mito-lnc* konform. Die Lokalisierung, sowie die Interaktion von *mito-lnc* lassen eine aktive Funktion des Transkriptes bereits vermuten.

Zur Analyse der Ursachen der kardialen Hypertrophie wurden histologische Untersuchungen mittels WGA Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Vergrößerung der Kardiomyozyten Querschnittsebene. Der Verlust von *mito-lnc* führte zu einem gehäuftem Auftreten von Kardiomyozyten in Größenbereichen von über 250 µm, während

kleinere Zellen signifikant seltener vorkamen. Die kardiale Hypertrophie zeigte sich demnach auch auf Zellebene.

Des Weiteren zeigte die Phänotypisierung auf Transkriptomebene eine Deregulation von metabolisch assoziierten Genen. Die Auswertung auf Basis einer GSEA zeigte vor allem für Gene des BCAA Metabolismus eine signifikante Anreicherung. Zusätzlich waren die Gensets des Fettsäure Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung in beiden Geweben hochreguliert. Eine solche Veränderung implementiert wiederum eine pathologische Veränderung der metabolischen Homöostase in den untersuchten Geweben im Zuge des Verlustes von *mito-Inc*. Die beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen vor allem aber eine putative Störung im BCAA Katabolismus durch den Verlust von *mito-Inc*. Zum einen interagiert die lncRNA mit den Untereinheiten des BCKD Komplexes, welcher einen Dreh- und Angelpunkt des BCAA Metabolismus bildet [53]. Zum anderen zeigten die Untersuchungen der *mito-Inc* KO-Mäuse eine erhöhte Expression von Genen involviert im BCAA Metabolismus.

4.4 Die Aktivität des BCKD Komplexes wird reguliert von *mito-Inc*

Zur Analyse des Einflusses von *mito-Inc* auf den BCAA Metabolismus wurde zunächst die Aktivität des BCKD Komplexes anhand dessen Umsetzung des Ketoazides KIV in CO₂ analysiert. Die spezifische Freisetzung von CO₂ während der Decarboxylierung der Ketoazide über die BCKDHA wird dabei genutzt um deren spezifische Aktivität zu messen [61]. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Verringerung in der umgesetzten Menge an ¹⁴C-markiertem KIV in den *mito-Inc* KO-Tieren, was auf eine verringerte Aktivität des BCKD Komplexes schließen lässt. Die Aktivität des BCKD Komplexes wird über die Phosphorylierung der α -UE am Serin 293 der BCKDH reguliert [162,163]. Im phosphorylierten Zustand ist der Komplex inaktiv und es findet keine Katabolisierung der Ketoazide statt [162,163]. Die aktivierende Dephosphorylierung wird über die Phosphatase PPM1K katalysiert und die Kinase BDK katalysiert wiederum die inaktivierende Phosphorylierung [162,163]. Die Untersuchung des Phosphostatus der BCKDHA am Serin 293 im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* zeigte im Herzen eine 50 % verringerte Abundanz von phosphorylierter BCKDHA im Vergleich zu den wildtypischen Wurfgeschwistern. Dieser Effekt konnte auch im Skelettmuskel gezeigt werden. Der Verlust von *mito-Inc* resultiert demnach in einer Akkumulation aktiver BCKDHA und putativ auch des aktiven BCKD

Komplexes, was wiederum im Widerspruch zu der beobachteten verringerten Aktivität des Komplexes steht. Zunächst ergab sich daraus die Frage nach der Ursache für die verringerte Abundanz der phosphorylierten, also der inaktiven Form der BCKDHA. Dafür wurde die Proteinmenge der BDK und PPM1k mittels Westernblot bestimmt. Die Daten zeigten, dass keinerlei Veränderungen in der Abundanz der beiden regulatorischen Enzyme vorlag. Die verringerte Abundanz an phosphorylierter BCKDHA ist somit nicht auf eine Veränderung in der Abundanz der beiden Enzyme zurückzuführen. Allerdings konnte in einigen Tieren eine deutliche Erhöhung der PPM1K auf Transkriptomebene gezeigt werden. Über der selbigen Aktivität kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden. Die Frage nach der Ursache für diese paradoxe Konstellation aus verringerter Aktivität des BCKD Komplexes auf physiologischer Ebene einhergehend mit einer erhöhten Abundanz des aktiven BCKD Komplexes auf molekularer Ebene bleibt weiterhin bestehen. Eine erhöhte Abundanz der drei Ketoazide geht beschriebenermaßen einher mit einer Inhibierung der Transkription von BDK und einer transkriptionellen Aktivierung von PPM1K, was eine indirekte Aktivierung des BCKDC zur Folge haben sollte und somit den katabolischen flux erhöht [85,164]. Der Verlust von *mito-Inc* führt zur verringerten Effizienz der BCKDHA, obwohl gleichzeitig eine Erhöhung der Menge aktiver BCKDHA vorliegt. Ist *mito-Inc* nun direkt bei der Regulation der Aktivität der BCKDHA beteiligt, wäre die Hochregulation aktiver BCKDHA als möglicher kompensatorischer Effekt auf die Verringerung im katabolischen Flux zu deuten.

4.5 Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in Veränderungen im Metabolithaushalt

Das Wissen über den Mechanismus der Regulation der BCKDHA führte zur Hypothese, nach welcher die verringerte Aktivität im BCAA Metabolismus im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* in einer erhöhten Akkumulation freier BCAAs resultiert und damit die erhöhte Dephosphorylierung der α -UE der BCKDH als positiven kompensatorischen Effekt zur Folge hat. Zur Überprüfung der Hypothese wurde eine Analyse des Metaboloms von diversen Geweben und dem Blutserum von *mito-Inc* KO-Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren durchgeführt.

4.5.1 Aminosäuren

Die metabolischen Daten zeigten im Herzgewebe eine deutliche Erhöhung der Aminosäuren und deren Derivaten. Besonders die drei BCAAs Valin, Leucin und Isoleucin waren in den *mito-Inc* KO-Tieren stark angereichert. Dieser Effekt lässt sich auf die verringerte Aktivität des BCKD Komplexes zurückführen. Die BCKDH ist auf Grund des Verlustes von *mito-Inc* weniger aktiv und die Decarboxylierung der Ketoazide damit gestört. Die erhöhte Akkumulation an BCAAs könnte demnach aus der reversiblen Transaminierung der nicht verstoffwechselten BCKAs resultieren. Pathologische Veränderungen der BCKDH Aktivität in Form genetischer Mutationen resultieren in einer Akkumulation von freien BCKAs und BCAAs [69]. Über die Konzentration der Ketoazide kann anhand der vorliegenden Daten zwar keine Aussage getroffen werden, jedoch verdeutlicht die Akkumulation der BCAAs im Herzgewebe die vorliegende Störung des BCAA Metabolismus im Zuge des Verlustes von *mito-Inc*. Bekannte Störungen im BCAA Katabolismus, wie die Ahornsirupkrankheit (*maple syrup urin disease*, MSUD), gehen ebenfalls einher mit erhöhten Konzentrationen freier BCAAs. Im Jahr 1998 verglich Nyhan in einer Studie zur MSUD verschiedene Mausmodelle mit der klassischen humanen Form der Krankheit, welche auf der Mutation im DBT Gen (E1 UE BCKDC) basiert [168]. Diese Mäuse zeigten die gleichen Symptome wie MSUD Patienten, darunter eine dramatische Reduktion der Aktivität des BCKDC, toxisch erhöhte Level freier BCAAs im Blut und Störungen im Aminosäurehaushalt [69,166]. Verglichen mit den Effekten des Verlustes von *mito-Inc*, ist der beschriebene Effekt jedoch um ein vielfaches dramatischer. Zum einen ist MSUD unbehandelt letal und zum anderen zeigen MSUD Patienten, sowie die analysierten Mausmodelle, zusätzlich deutliche neurologische Ausfälle und pathologische Veränderungen [168,169]. Wie bereits erwähnt, ist der Katabolismus der BCAAs vor allem im Gehirn und in der Leber von essentieller Bedeutung [48,170]. Die *mito-Inc* ist jedoch in kontraktilem Gewebe exprimiert und konnte weder in der Leber, noch im Gehirn nachgewiesen werden. Die Funktion von *mito-Inc* könnte demnach eine zusätzliche, Organ-spezifische Regulation der Aktivität des BCKDC darstellen.

Auch ist der reduktive Effekt des Verlustes von *mito-Inc* auf die BCKDH Aktivität um ein vielfaches geringer im Vergleich zu MSUD Patienten oder entsprechenden Mausmodellen, was ohnehin auf eine deutlich mildere pathologische Auswirkung deuten lässt [166]. Während der Verlust von *mito-Inc* eine etwa 25-%ige Reduktion hervorruft, liegt die

Aktivität bei MSUD Patienten oder Mausmodellen meist nur noch bei 0-6 % [166]. Die *mito-Inc* spielt demnach eine vergleichbar eher geringfügigere Rolle in der Regulation des BCAA Metabolismus. Jedoch zeigen unsere Daten, dass selbst solch eine vermeintlich geringfügige und eher lokale Änderung organismisch weitreichende Folgen haben kann. Auch könnte die mechanistische Analyse von *mito-Inc* einen neuen Therapieansatz bei MSUD oder anderen pathologischen Veränderungen im BCAA Metabolismus liefern. In Kontrast zu den Daten der *mito-Inc* KO-Mäuse waren die Level von Alanine, Glutamine und Glutamate in MSUD Mausmodellen drastisch reduziert [166]. In den *mito-Inc* KO-Mäusen war nur Glutamin minimal erhöht. In der Leber konnte allerdings eine tendenzielle Reduktion von Glutamat detektiert werden. Diese Veränderungen waren allerdings weder dramatisch oder signifikant verändert und wurden daher als schwankende Sekundäreffekte im Zuge der entstehenden BCAA/BCKA Azidose interpretiert. Nichts desto trotz konnte in MSUD Patienten wie auch in den Herzen der *mito-Inc* KO-Mäuse eine Störung im Aminosäurehaushalt gezeigt werden [69]. Interessanterweise ist der durch den Verlust von *mito-Inc* beschriebene Effekt auf das Herzgewebe limitiert. Die meisten der vergleichbaren Veränderungen im braunen Fettgewebe, der Leber oder dem Serum sind weder besonders stark, noch signifikant. Interessant wäre jedoch die Analyse des Metaboloms im Skelettmuskel von *mito-Inc* KO-Mäusen. Die Tiere zeigten eine Verschiebung in ihrer Faserzusammensetzung im TA Muskel hin zu einem vermehrten Auftreten glykolytischer Fasern. Die Vermutung liegt daher nahe, nach welcher auch hier eine Störung in der metabolischen Homöostase vorliegt.

4.5.3 α -Ketoglutarat und BAIBA

Die Metabolom Daten zeigten zusätzlich zu der Veränderung im AS Haushalt eine Erhöhung der Konzentration von α -Ketoglutarat (α -KG). Dies könnte auf eine erhöhte Reversion der Transaminierung der BCKAs in ihre entsprechenden BCAAs durch die BCAT verweisen. Diese Reaktion ist deskriptiv mit der Synthese von Glutamat aus α -Ketoglutarat gekoppelt. Die Produktion von α -KG ist jedoch nicht auf die BCAT oder den BCAA Metabolismus limitiert. Da α -KG als Stickstoff-Akzeptor fungiert, ist die Synthese mit jeder AS-Transaminierung verbunden und dieser Prozess dient so gleichzeitig zur Stickstoff-Detoxifikation. α -KG wird aber auch aus Glukose und Pyruvat im TCA-Zyklus gebildet. [48,50,171,172,173]

Im Herzen der *mito-Inc* KO-Tiere wurden nun auch signifikant verringerte Glukosewerte detektiert. Dies könnte seinen Ursprung in der erhöhten α -KG Konzentration haben, welche im Zuge der Detoxifikation des erhöhten Stickstofflevels entsteht. Des Weiteren ist α -KG ein essentielles Substrat für die Oxidierung von Fettsäuren und nicht-essentiellen AS [174]. Daraus ergab sich die Hypothese, ob diese erhöhte Konzentration von α -KG auch eine Antwort auf die verringerte Aktivität im BCAA Metabolismus ist. Und so eine metabolische Veränderung, hin zu einer erhöhten β -Oxidierung darstellt.

Die metabolischen Daten der *mito-Inc* KO-Tiere zeigten des Weiteren eine stark erhöhte Konzentration an β -Aminoisobuttersäure (BAIBA), ein Myokin welches eine erhöhte β -Oxidierung von Fettsäuren, und eine erhöhte Ketonkörper-Synthese induziert [176]. Die Signalwirkung von BAIBA ist jedoch weitreichender. Es konnte gezeigt werden, dass BAIBA das „*browning*“ von weißen Adipozyten über UCP-1 und PGC1- α , PPAR(α)-Abhängig aktiviert [178]. Da *mito-Inc* im Allgemeinen nur geringfügig im weißen Fettgewebe detektiert werden konnte ist ein ausbleibender Effekt auf BAIBA in diesem Fall keine Überraschung. Die transkriptionellen *Ucp1*-Level waren weder im braunen Fettgewebe noch im Herzen der KO-Tiere verändert. Natürlich ist anzumerken, dass die Transkriptomdaten aus 8 Wochen alten Tieren ohne sichtbaren Phänotyp stammen, während die metabolischen Daten von 18-20 Wochen alten Tieren mit kardialem Phänotyp kommen. Die vorliegenden Daten implizieren einen sich entwickelnden Phänotyp beruhend auf der Akkumulation freier BCAAs, resultierend in einer kontinuierlichen Belastung der gesunden metabolischen Homöostase. Dies würde bedeuten, dass zum Zeitpunkt der transkriptionellen Analyse die Veränderungen in den Metaboliten noch gar nicht vorhanden wären und diese somit nicht in den Zusammenhang gebracht werden können. Für genauere Aussagen wären weitere Transkriptom, sowie Proteom Analysen notwendig.

In allen analysierten Geweben (Herz, BAT, Leber, Serum) konnte eine erhöhte Konzentration von BAIBA in den *mito-Inc*-KO-Tieren detektiert werden, doch diese zeigten keine statistische Signifikanz. Außerdem war die Anreicherung im Blutserum von allen Geweben am geringsten, was einen parakrinen Signaleffekt für BAIBA ausschließt. BAIBA ist einerseits ein Produkt der Thymin Degradierung aber auch des Valin Metabolismus. Dort entsteht es als Zwischenprodukt bei der Generierung von Propionyl-CoA [178,179]. Doch, da der BCAA Metabolismus im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* inhibiert wird, ist davon

auszugehen, dass die erhöhte Konzentration von BAIBA uner anderem auf einer erhöhten Transkription von PGC1- α und/oder einer erhöhten Thymin Degradierung beruht [176]. Die Expression von *Pgc1- α* auf transkriptioneller Ebene ist allerdings in den *mito-lnc* KO-Tieren nicht verändert. Natürlich muss hier wieder der Aspekt des Alters der untersuchten Tiere bedacht werden, und ein Effekt auf *Pgc1- α* ist im Verlauf des Voranschreitens des Phänotyps nicht auszuschließen.

4.5.3 Hydroxyprolin, Thioprolin und CoASH's

Weitere metabolische Veränderung konnten im Fall von Hydroxyprolin (Hpro) und Thioprolin (Tpr) ausgemacht werden. Beide Metabolite waren im Herzen von *mito-lnc* KO-Tieren stark angereichert. Die erhöhte Konzentration an Hpro lässt sich mit dem Auftreten der kardialen Hypertrophie der *mito-lnc* KO-Mäuse in Zusammenhang bringen. Hpro ist als Hauptbestandteil von Kollagen ein Marker für Fibrose und wurde im Zusammenhang mit diversen Hypertrophie-Modellen in der Maus in Verbindung gebracht. Studien zeigten eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von Hpro im Blut und dem Herzgewicht. Hypertrophe Herzen zeigten zudem eine signifikant erhöhte Konzentration an Hpro im linken Ventrikel. Eine kardiale Hypertrophie geht demnach einher mit einer putativen Erhöhung im Collagenlevel. [180-183] Histologische Untersuchungen des *in vivo* Verlustes von *mito-lnc* mittels WGA zeigten jedoch bisweilen keinerlei Anzeichen von Fibrose. Zur näheren Untersuchung wären histologische Analysen älterer KO-Tiere notwendig, da die Ergebnisse auf einen sich langsam entwickelnden Phänotyp hindeuten.

Die Erhöhte Konzentration von Tpr könnte auf der erhöhten Akkumulation freier AS im *mito-lnc* KO beruhen. Denn Thioprolin wird eine Rolle bei der Stickstoff-Detoxifikation zugeschrieben und die erhöhte Konzentration von Tpr könnte so ein Resultat der erhöhten Stickstoffkonzentration, im Zuge der Störung des AS Haushalts der *mito-lnc* KO-Mäuse sein [184,185].

4.6 mTORC1-der Mediator bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie?

Die verringerte Aktivität der BCKDC und die damit einhergehende Akkumulation von AS, vor allem aber Leucin legt eine putative Aktivierung des mTOR Komplexes im Zuge des Verlustes von *mito-lnc* nahe. Wie bereits erwähnt wird mTOR auch über Leucin reguliert und in diesem Zusammenhang auch mit der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie

assoziiert [186,187]. Die erhöhten Leucinwerte in der *mito-Inc* KO-Situation und eine daraus folgende Hyperaktivierung von mTOR über die Phosphorylierung am Serin 2448 könnte demnach eine Ursache für den kardialen Phänotyp der KO-Mäuse darstellen. Diese Hypothese wird umso deutlicher auf Grund der Tatsache, dass auch für α -KG eine Funktion als Signalmolekül über AKT für mTOR gezeigt werden konnte [172]. So induziert α -KG, über die Aktivierung von mTOR, eine erhöhte Proteinsynthese in C2C12 Zellen und soll so zur Entwicklung hypertropher Muskelfasern beitragen [172,175].

Die *mito-Inc* KO-Mäuse zeigten in der Tat eine erhöhte Abundanz von p-mTOR^{Ser2448} im Herzen. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass 4E-BP1, ein Zielprotein des mTOR Komplexes [186] eine erhöhte Phosphorylierung am Threonin 37/46 aufweist. Dies wiederum unterstützt die These der Hyperaktivierung von mTOR im Zuge des Verlustes von *mito-Inc*. Diese Inhibierende Phosphorylierung hat eine positive Auswirkung auf die Protein-Synthese und somit auch auf das Zellwachstum [77,78]. Die Regulation von mTOR könnte demnach eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der beobachteten kardialen Hypertrophie der *mito-Inc* KO-Mäuse spielen.

Zunächst stellte sich jedoch die Frage danach, ob eine erhöhte *in vivo* Supplementierung von BCAAs tatsächlich in einer Aktivierung von mTOR resultiert. Eine 10-wöchige hoch BCAA Diät von wildtypischen Mäusen hatte einen starken Anstieg an freien BCAAs im Blutserum der Tiere zur Folge. Daraus resultierend konnte auch eine erhöhte Abundanz von phosphoryliertem mTOR^{Ser2448} festgestellt werden, während die Menge an inaktiver zu aktiver BCKDHA nicht verändert war. Die erhöhte Supplementierung von BCAAs verdeutlicht somit eine positive Korrelation zwischen der Erhöhung an frei zirkulierenden BCAAs und der Aktivierung von mTOR.

Des Weiteren stellte sich die Frage inwieweit die Erhöhung der BCAAs durch den Verlust von *mito-Inc* und die damit einhergehende Aktivierung von mTOR im Zusammenhang mit der beobachteten kardialen Hypertrophie der KO-Mäuse steht. Das Herzgewicht war nach der 10-wöchigen BCAA Diät nicht verändert. In diesem Zusammenhang ist natürlich fraglich ob die kurze Zeitperiode der Behandlung zu einer solch starken phänotypischen Veränderung führen kann. Vor allem hinsichtlich der Tatsache, dass sich der kardiale Phänotyp der KO-Mäuse auch erst im Voranschreiten des Erwachsenenalters entwickelt. Geht man davon aus, dass die erhöhte Konzentration freier BCAAs im Blutserum über die

Hyperaktivierung von mTOR mittels Leucin zu der beobachteten kardialen Hypertrophie führt, sollte eine Langzeit BCAA Diät auch in einer Erhöhung des Herzgewichtes resultieren. Die erhöhten Level an freien BCAAs im Blutserum der WT-Mäuse führten jedoch zu keiner erhöhten Aktivierung der BCKDHA. Der postulierte Effekt des positiven *feedbackloops* freier BCAAs und ihrer Ketoazide auf die Aktivität des BCKDC [61,62] konnte mit diesem Versuch nicht bestätigt werden. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass die Serumlevel womöglich eine geringere Rolle auf deren Regulation im Vergleich zur Gewebe-Konzentration spielen. Die Alleinige Erhöhung an freien BCAAs ist außerdem nicht gleichzusetzen mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Ketoazide. Die Deaminierung der BCAAs katalysiert über die BCAT2 ist ein reversibler Prozess [48,50]. Eine Erhöhung der BCAAs über eine oral verabreichte Diät führt zwar zu einer erhöhten Konzentration an freien BCAAs im Blutserum, doch dies ist nicht gleichzusetzen mit einer gleichzeitig einhergehenden Transaminierung der BCAAs in ihre jeweiligen Ketoazide. Auch ist ungeklärt, ob die erhöhten Serum BCAA Level gleichzeitig zu einer Erhöhung der Gewebekonzentration freier BCAAs führt. Die erhöhte Abundanz aktiver BCKDHA durch den Verlust von *mito-Inc* kann also nicht auf die Erhöhung freier BCAAs im Serum zurückgeführt werden. Es bleibt die Frage, welche Auswirkungen eine erhöhte Supplementierung freier BCAAs auf die *mito-Inc* KO-Mäuse hat.

Die erhöhte Supplementierung von BCAAs in *mito-Inc* KO-Mäusen hatte keine Rekrudescenz des kardialen Phänotyps zur Folge. Nach 10 Wochen erhöhter BCAA Diät zeigten die *mito-Inc* KO-Mäuse zwar eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes, doch das Herzgewicht zeigte keinerlei Veränderung durch die erhöhte Supplementierung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die BCAA Konzentration im Serum hat sich als Folge der BCAA Diät in wildtypen sowie *mito-Inc* KO-Mäusen verdoppelt. Eine erhöhte Konzentration an freien BCAAs in den *mito-Inc*-KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen abermals die unabhängigkeit des Phänotyps der *mito-Inc* KO-Mäuse von den zirkulierenden BCAA Leveln und impliziert eine endokrine Wirkung.

Weitere histologische, sowie molekularbiologische Analysen im Zusammenhang mit dem, im Skelettmuskel beobachteten Phänotyp der *mito-Inc* KO-Tiere, wären äußerst interessant. Als regeneratives Organ wäre eine Reversion des Phänotyps, spätestens im Zusammenhang mit CTX Injektionen, denkbar. Dies wäre ein weiterer Faktor zur

Bestätigung der Hypothese, dass die Entwicklung des Phänotyps in direkter Abhängigkeit mit der BCAA-Konzentration im Gewebe steht.

Dieser Versuch zeigt zudem, dass eine stark erhöhte Supplementierung freier BCAAs über einen längeren Zeitraum potentielle Gesundheitsrisiken birgt. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Serumwerte der freien BCAAs stark angestiegen sind und die Tiere scheinbar nicht effektiv genug BCAAs katabolisieren. Die Aktivität der BCKDH ist scheinbar nicht verändert und der Überschuss an BCAAs kann nicht abgebaut werden. Dies führt zu der beobachteten Aktivierung von mTOR, was deskriptiv mit der Entwicklung metabolischer Krankheiten im Zusammenhang steht. [77,78,186,187]

4.7 Der Verlust von *mito-Inc* induziert eine Akkumulation der glykolytischen Muskelfasern

Die phänotypische Untersuchung der Skelettmuskulatur der *mito-Inc* KO-Mäuse zeigte eine Veränderung in der Zusammensetzung der Muskelfasertypen im *Musculus Tibialis anterior*. Muskelfasern werden in 4 verschiedene Typen und zwei Klassen, den langsamen und den schnellen Muskelfasern, eingeteilt. Zu den langsamen Muskelfasern gehören Muskelfasern vom Typ 1, diese haben einen oxidativen Metabolismus. Sie haben eine hohe Abundanz an Mitochondrien und ermüden deutlich langsamer im Vergleich zu schnellen Muskelfasern. Schnelle Muskelfasern unterscheiden sich noch einmal in ihrem Metabolismus voneinander und werden daher in Typ 2A, Typ 2X und Typ 2B unterteilt. Typ 2A Fasern sind schnelle oxidative Fasern, während Typ 2B Fasern schnelle glykolytische Fasern darstellen. Metabolisch befinden sich die Typ 2X Muskelfasern zwischen Typ 2A und Typ 2B Fasern. Der Mitochondriengehalt nimmt im Verlauf Typ 2A – 2X – 2B ab, ebenso wie die Ausdauer des Muskels. [152,153,188-190]

Der Verlust von *mito-Inc* führt zu einem gehäuften Auftreten von Typ 2B Fasern im distalen, sowie im proximalen Bereich des *Musculus Tibialis anterior*s. Damit einher geht eine signifikante Verringerung von Fasern des Typs 2X und tendenziell auch der Fasern des Typs 2A. Die Verteilung der Muskelfasertypen im WT-Muskel entspricht der bereits beschriebenen Verteilung [153]. Der Verlust von *mito-Inc* führt demnach zu einer erhöhten Akkumulation an glykolytischen Fasern im Skelettmuskel und entsprechend, einer Verringerung an Fasern mit einem eher oxidativen Stoffwechsel. Die histologische Analyse der Succinatdehydrogenase Aktivität zeigte jedoch keine Veränderungen im

mitochondrialen Netzwerk der KO-Mäuse. Die histologische Untersuchung erfolgte jedoch mit Gewebe von 8 Wochen alten Tieren und sollte demnach noch einmal mit älteren Mäusen wiederholt werden, um weitere Aussagen über die physiologischen Veränderungen im Skelettmuskel im Zusammenhang mit dem Verlust von *mito-Inc* treffen zu können.

Interessanterweise ist mTOR auch im Skelettmuskel ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase [153,191]. Untersuchungen hinsichtlich der muskulären mTOR Signalwirkung und die Auswirkungen von Rapamycinbehandlungen auf die Muskulatur zeigten, dass mTOR zwar keine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionalität der Muskulatur spielt, der Verlust jedoch metabolische und physiologische Veränderungen nach sich zieht [153]. Der muskel-spezifische, induzierbare Raptor KO in der Maus resultierte unter anderem in einer Verschiebung der Muskelfasertypen hin zu einer Akkumulation langsamer Muskelfasern [153]. Der Verlust von *mito-Inc* impliziert im Skelettmuskel den gegenteiligen Effekt. Diese Tatsache ist konform mit der Annahme, dass die Leucin-abhängige mTOR Signalwirkung ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des Phänotyps ist und stützt erneut die Wichtigkeit von *mito-Inc* in ihrer Funktion bei der Regulation des BCAA Metabolismus in mkontraktilen Gewebe. Weiterhin steht der Verlust von mTOR im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Muskelatrophie [153] und birgt damit die Hypothese einer Muskelhypertrophie im Zuge des Verlustes von *mito-Inc*. Die Analyse der Skelettmuskulatur im *mito-Inc* KO hinsichtlich einer putativen Skelettmuskelhypertrophie zeigte eine ungleichmäßige Verteilung der Fasergrößen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine deutliche Hypertrophie wurde jedoch nicht detektiert. Doch auch die Untersuchungen von Ham et al. konnten die beschriebene Atrophie im Zuge des Verlustes von Raptor nicht zeigen [153]. Die Rolle von mTOR hinsichtlich einer solchen Phänotypischen Auswirkungen wurde anhand der vorliegenden Daten als entwicklungsbiologisch eingestuft. So ist die Signalwirkung von mTOR im Zuge der Entwicklung und Reifung essentiell [153]. Eine temporäre Veränderung im adulten, maturen Status der Skelettmuskulatur aber weitestgehend unbedenklich [153]. Die aktuell vorliegenden Daten zur Regulation von mTOR im Skelettmuskel der *mito-Inc* KO-Tiere lassen bislang jedoch keine weitere Schlussfolgerung zur Rolle von mTOR zu.

4.8 Die Funktion von *mito-lnc*

Zur genaueren Analyse der Funktion von *mito-lnc* wurden drei Hypothesen experimentell überprüft. Für einige lncRNAs wie zum Beispiel NFAT konnte bereits eine Transportfunktion bestätigt werden [194]. Da *mito-lnc* ist eine zytoplasmatische/mitochondrial-assoziierte lnc-RNA ist und zudem mit dem mitochondrial lokalisiertem BCKD Komplex interagiert, war eine Hypothese, dass *mito-lnc* für den Import der einzelnen Komponenten des BCKD Komplexes verantwortlich ist, oder als Regulator bei dessen Zusammensetzung fungieren könnte.

4.8.1 Die *mito-lnc* hat keine Transportfunktion

Zur Überprüfung der Hypothese einer Transportfunktion von *mito-lnc* wurden Mitochondrien isoliert und die Abundanz der BCAA-assoziierten Proteine in der KO-Situation überprüft. Die Menge der untersuchten Enzyme zeigte keinerlei Unterschiede im Vergleich zwischen WT und KO. Weder deren Gesamtmenge im Herzlysat noch die Abundanz in den Mitochondrien verzeichnete eine Änderung durch den Verlust von *mito-lnc*. Die mitochondriale Lokalisierung der untersuchten Komponenten des BCAA Metabolismus, besonders des BCKD Komplexes ist nicht verändert durch den Verlust von *mito-lnc*. Die Hypothese einer regulatorischen Transportfunktion von *mito-lnc* kann demnach nicht bestätigt werden.

4.8.2 Der Verlust von *mito-lnc* geht nicht einher mit der Änderung der Komplexzusammensetzung

Für *mito-lnc* konnte bisher gezeigt werden, dass sie mit den Untereinheiten des BCKDC interagiert. Der Komplex besteht aus drei UE wobei die E1 UE den direkten Interaktionspartner von *mito-lnc* bildet. Für diverse lncRNAs konnte bereits gezeigt werden, dass diese eine Rolle bei der Komplexbildung und Zusammensetzung spielen [193,196,197]. Die *mito-lnc* könnte also auf Grund ihrer mitochondrien-assoziierten Lokalisierung eine regulatorische Funktion bei der Komplexzusammensetzung des BCKDC spielen.

Zur Überprüfung der Hypothese von *mito-lnc* als Regulator bei der Komplexbildung des BCKDC wurden zwei unabhängige IPs mit verschiedenen Antikörpern gegen Enzyme, involviert im BCAA Metabolismus, durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert. Die IP mit einem Antikörper gegen DBT diente in erster Linie dazu den BCKD Komplex in

seiner Gänze runterzuziehen und zu analysieren. Die zweite IP mit anti-MCCA sollte eine potentielle Rolle von *mito-Inc* im Hinblick auf die Abundanz weiter abwärts im Katabolismus aktiv beteiligter Enzyme ausschließen. Des Weiteren diene sie als Kontrolle für die IP mit anti-DBT. In beiden Experimenten konnte keine Veränderung in der Abundanz der Proteine des BCKD Komplexes durch den Verlust von *mito-Inc* gezeigt werden. Der Vergleich der beiden IPs untereinander zeigte zwar geringfügige Unterschiede in ihrem Detektor, dies war jedoch anhand der unterschiedlichen Funktion der beiden Enzyme innerhalb des Metabolismusweges zu erwarten. Die Proteine wirken an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Katabolismusweges. DBT ist die E2 Untereinheit des BCKD Komplexes und mitverantwortlich für die Katabolisierung der Ketoazide [48,50]. MCCA ist Teil des Leucin Metabolismus und katabolisiert weiter stromabwärts Methylcrotonyl-CoA [48,50]. Zwischen den beiden Prozessen des BCAA Metabolismus finden weitere Zwischenschritte auf dem Weg zur vollständigen Katabolisierung statt [48,50]. Es gibt keine beschriebene direkte Verbindung zwischen den beiden Abläufen. Auch die Möglichkeit der Formation eines Superkomplexes aus den einzelnen Komponenten des BCAA Stoffwechsels konnte bisher weder bestätigt noch verworfen werden. Tatsache bleibt, dass *mito-Inc* keine regulatorische Funktion bei der Komplexbildung des BCKDC zu spielen scheint. Die Ergebnisse dieses Versuches stützen auch die These, dass *mito-Inc* keine regulatorische Transportfunktion aufweist. Denn, wie bereits erwähnt zeigte sich kein Unterschied in der Abundanz der detektierten Proteine innerhalb der individuellen IP's im Vergleich WT und KO.

Weder der Transport noch die Zusammensetzung der im BCAA Metabolismus beteiligten Komplexe sind durch den Verlust von *mito-Inc* verändert. Die *mito-Inc* könnte demnach eine direkte regulatorische Funktion auf den BCKD Komplex haben. Wie bereits beschrieben, wird die Aktivität der BCKDC über die Phosphorylierung der BCKDHA reguliert. Die Vermutung liegt nahe, dass *mito-Inc* durch die Interaktion mit der BDK oder der PPM1K die Phosphorylierung der BCKDHA beeinflussen und so regulatorisch aktiv sein könnte. Eine Interaktion oder Rekrutierung der PPM1k wird aber ausgeschlossen. Denn die Phosphatase konnte weder im RNA-Pulldown Experiment zur Analyse des Interaktoms von *mito-Inc*, noch in der IP zur Analyse der Komplexzusammensetzung detektiert werden.

Eine regulatorische Funktion von *mito-Inc* über die BDK als Mediator ist unwahrscheinlich. Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in einer verringerten Aktivität der BCKDH, was eine

aktivierende Funktion von *mito-lnc* vermuten lässt. Eine Interaktion von *mito-lnc* mit BDK würde dem zu Folge in einer Inhibierung der BDK resultieren und damit einhergehend einer verringerten Menge phosphorylierter BCKDHA. Der Verlust von *mito-lnc* würde folglich in einer Akkumulation inaktiver, Serin 293 phosphorylierter BCKDH resultieren. Doch das Gegenteil ist in den *mito-lnc* KO-Mäusen der Fall. Der Verlust der lncRNA induziert eine Akkumulation freier BCAAs und kompensiert eine gesteigerte Aktivierung des BCKD Komplexes mittels Dephosphorylierung und/oder einer Steigerung der Genexpression. Da der Komplex im dephosphorylierten Zustand aktiv ist, könnte die partiell gesteigerte Expression der BCKDHA zusätzlich kompensatorisch wirksam sein.

4.9 Die Analyse von *mito-lnc* im Vergleich von C57BL/6J- und 129/SvJ-Mäusen

Die Rückkreuzung der Mäuse mit genomischer Deletion von *mito-lnc* in den genetischen C57BL/6J Hintergrund führte zu einer Reversion des kardialen Phänotyps. Zusätzlich zum Herzgewicht zeigte sich dieser Effekt auch auf Transkriptomebene und führte zur Normalisierung der zuvor hochregulierten BCAA-Metabolismus relevanten Gene. Interessanterweise ist die Transaminase BCAT2 jedoch stark hochreguliert in den *mito-lnc* KO-Mäusen mit genetischen C57BL/6J Hintergrund im Vergleich zu den *mito-lnc* KOMäusen im gemischten genetischen Kontext. Die Frage nach der Ursache für diesen Effekt führte zur genaueren Betrachtung der beiden Mausstämme untereinander. Zunächst stellte sich die Frage nach einem Unterschied in der Expression von *mito-lnc* im Vergleich der C57BL/6J WT- und 129/SvJ WT-Mäuse. Die Detektion von *mito-lnc* zeigte jedoch keinerlei Unterschiede im Vergleich der beiden Mausstämme. Der Vergleich zwischen C57BL/6J und 129/SvJ Mäusen zeigte außerdem metabolische, vor allem aber BCAA Metabolismus-relevante Unterschiede. Die C57BL/6J WT-Mäuse zeigen tendenziell eine geringere Expression der meisten BCAA-Metabolismus relevanten Gene im Vergleich zu 129/SvJ WT-Mäusen. Dies galt im Falle des *Musculus Tibialis anterior* auch für *mito-lnc*. Gleichzeitig weisen sie deskriptiv eine geringere Konzentration von freien BCAAs im Blutserum auf [157]. Da der kardiale Phänotyp der *mito-lnc* KO-Tiere auf eine erhöhte Konzentration freier BCAAs zurückzuführen ist und C57BL/6J WT-Mäuse eine generell geringe Abundanz freier BCAAs im Blutserum aufweisen [157], könnte die Reversion der kardialen Hypertrophie auf der besseren Kompensation des Körpers auf den BCAA Anstieg beruhen. Im Verlauf des Alterungsprozesses würde man dann jedoch eine sich

entwickelnde kardiale Hypertrophie erwarten. Natürlich bleibt die Frage bestehen, warum C57BL/6J Mäuse eine solche Verringerung in der Serumkonzentration zeigen. Grundsätzlich würde man von einer erhöhten Aktivität des Metabolismusweges in C57BL/6J Mäusen ausgehen. Dies steht jedoch in Kontrast zur weitgehend niedrigen Expression BCAA-relevanter Gene. Eine Ausnahme ist hierbei jedoch die BCAT2, welche für die Transaminierung der BCAAs zu BCKAs im Mitochondrium verantwortlich ist [48,50]. Dies könnte natürlich die Ursache für die Reduktion der Konzentration freier BCAAs in C57BL/6J Mäusen sein. Es wird vermutet, dass die BCAT2 die Aktivität der BCKDH reguliert, in dem sie mit dieser einen „Supramolekularen Komplex“ bildet und die inhibierende Kinase BDK allosterisch blockiert [50,60]. Eine erhöhte Menge BCAT hätte also eine erhöhte Aktivierung der BCKDH und folglich einen gesteigerten katabolischen BCAA Flux zur Folge [50,60]. Die *mito-Inc* KO-Mäuse im 129/SvJ Hintergrund hatten keine Veränderung in der Expression der BCAT2. Dies, im Zusammenhang mit der Tatsache, dass die BCAT2 nicht als Teil des direkten Interaktoms von *mito-Inc* gezeigt werden konnte, zeigt die Unabhängigkeit der Reversion des Phänotyps von der Expression von *mito-Inc*. Die C57BL/6J Mäuse sind physiologisch scheinbar einfach besser in der Lage den Verlust von *mito-Inc* auszugleichen. Die Erhöhte Expression der BCAT2 könnte die Aktivitätsminderung im Zuge des Verlustes von *mito-Inc* kompensieren und so deren pathologischen Folgen entgegenwirken. Abgesehen von den grundlegenden Unterschieden im Vergleich beider WT-Mausstämme, ist mTOR der putative Hauptmediator des kardialen Phänotyps der *mito-Inc* KO-Mäuse. Die Regulation von mTOR findet in diesem Fall hauptsächlich über Leucin statt [64-67]. Die transkriptionelle Reversion des Phänotyps ist dabei auf die reduzierte Expression der BCAA-relevanten Gene in wildtypischen C57BL/6J Mäusen zurückzuführen.

Die Rückkreuzung der *mito-Inc* KO-Mäuse in den C57BL/6J Hintergrund konnte so zwar keinen näheren Aufschluss über die Funktion von *mito-Inc* geben, sie zeigt jedoch noch einmal deutlich die Abhängigkeit des Phänotyps der KO-Mäuse vom Katabolismus der essentiellen BCAAs.

4.10 Ausblick

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit eine entscheidende Rolle für *mito-lnc* bei der Regulation des kardialen BCAA Metabolismus in der Maus gezeigt werden. Der Verlust von *mito-lnc* resultiert in einer kardialen Hypertrophie, als Folge der verringerten Effizienz des katabolischen BCAA Fluxes. Diese Verringerung führte zu einer Störung im Aminosäure Haushalt der KO-Mäuse und als Folge dessen zu einer Aktivierung des mTOR Signalweges, resultierend in der Entwicklung des kardialen Phänotyps. Die Frage nach der Funktion von *mito-lnc* konnte bislang nur partiell gelöst werden und wirft zudem weiterhin Fragen auf. Schließlich bleibt noch die Möglichkeit einer Funktion von *mito-lnc* im Zusammenhang mit der Regulation der Aktivität des BCKD Komplexes. Die Regulation der BCKDH Aktivität spielt bei der Beantwortung dieser Frage natürlich eine entscheidende Rolle. Die Regulation der Aktivität der BCKDH im Zusammenhang mit der BCAT2 konnte mittels Interaktionsstudien, Komplexanalysen und mittels der Analyse der Daten der C57BL/6J Mäuse ausgeschlossen werden.

Des Weiteren könnte *mito-lnc* die Aktivität abhängig oder unabhängig von der Phosphorylierung der BCKDHA beeinflussen. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Abhängigkeit der Funktion von *mito-lnc* ist eine *in vivo* Inhibierungsstudie mit BT2 (*3,6-dichlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid*) [198,199]. BT2 inhibiert die inaktivierende Kinase BDK [198,199]. Eine Applikation mit diesem Inhibitor sollte also eine verringerte Phosphorylierung vom Ser 293 der BCKDHA zur Folge haben und so indirekt die Aktivität des BCAA Metabolismus steigern. Eine molekularbiologische Analyse der Aktivität der BCKDH im Zuge dieser Studie könnte die Frage nach der Art der regulatorischen Funktion von *mito-lnc* im Hinblick auf die Abhängigkeit von der Phosphorylierung beantworten. Ist die regulatorische Funktion von *mito-lnc* unabhängig von der Phosphorylierung, so wird sich keine Änderung in der verringerten Aktivität der *mito-lnc* KO-Mäuse unter BT2 Applikation zeigen.

Auch eine detaillierte und tiefgreifende Biochemische Analyse des Komplexes mit und ohne die Anwesenheit von *mito-lnc* wäre zur Analyse der genauen Funktion von *mito-lnc* hilfreich. *In vitro* Studien mit verschiedenen Versionen der lncRNA in Kombination mit den Untereinheiten des BCKD Komplexes, könnten die Domänen der lncRNA aufdecken, welche für die Interaktion zuständig und so für die regulatorische Rolle von *mito-lnc* von essentieller Bedeutung sind. Auch im Bezug auf die Abhängigkeit der Komplexbildung im

Zusammenhang mit *mito-1nc* wären solche Studien sicherlich aufschlussreich. Zwar konnte keine Funktion von *mito-1nc* bei der Komplexzusammensetzung auf Basis der Komponenten an sich gezeigt werden, jedoch könnte *mito-1nc* als allosterischer Aktivator für den BCKD Komplex fungieren und so dessen Aktivität regulieren. Unabhängig von der phosphorylierenden Regulation könnte die *mito-1nc* so im Zusammenhang mit einer aktivitätsregulierenden Konformationsänderung innerhalb des Komplexes stehen. Auch eine Konformationsänderung zur Regulation der Interaktion der BCKD Komplexes mit der BDK oder PPM1K wäre als Funktion für *mito-1nc* denkbar.

Weitere phänotypische Untersuchungen könnten bei der Beantwortung der Frage nach der Funktion von *mito-1nc* helfen und würden zudem weitere Einblicke in die Regelkreise des BCAA Stoffwechsels und dessen Rolle bei der Entstehung metabolischer Krankheiten liefern. Bisher wurde der Fokus auf die Analyse der Funktion von *mito-1nc* im Herzen gelegt. Doch der Verlust von *mito-1nc* führt auch im Skelettmuskel zu einer phänotypischen Veränderung mit putativen metabolischen Folgen. Die KO-Mäuse zeigten eine Veränderung in der Zusammensetzung der einzelnen Muskelfasertypen. Es konnte eine erhöhte Anzahl glykolytischer Fasern ausgemacht werden, was ebenfalls das Resultat einer erhöhten mTOR Aktivierung in Folge der Störung im BCAA Metabolismus sein könnte. Leider konnte im Zuge dieser Arbeit die Frage nach der muskulären Aktivität des BCKD Komplexes nicht beantwortet werden und auch ansonsten wurde der Skelettmuskel nur basal untersucht. Histologische, sowie Molekularbiologische Analysen der Skelettmuskulatur sowie Metabolom Analysen könnten weitere interessante Einblicke in die metabolischen Regelkreise bezüglich der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und der Kompensation als Anpassung im Zuge pathologischer veränderter Regelkreise liefern.

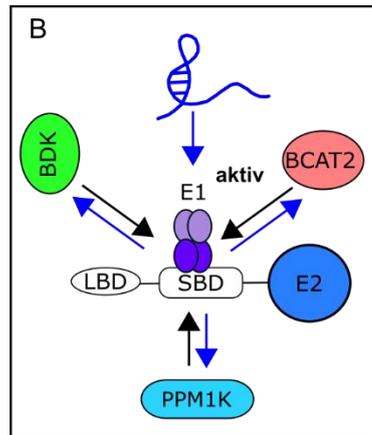
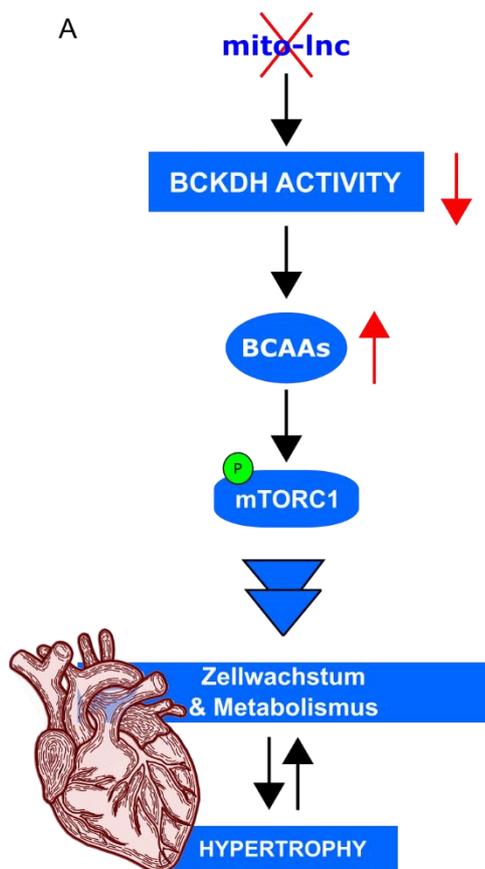


Abb. 4.1: Der kardiale BCAA Metabolismus wird direkt von *mito-lnc* kontrolliert. (A)

Schematische Übersicht der Auswirkungen des Verlustes von *mito-lnc* in der Maus. Der Verlust von *mito-lnc* führt zu einer Verringerung in der Aktivität des BCAA Katabolismus, resultierend in einer Akkumulation freier BCAAs. Die AS Leucin hat eine Aktivierung der mTOR Signalkaskade zur Folge. Der mTOR Komplex wiederum,

gilt als ein Hauptregulator bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase. Die erhöhte Signalwirkung mTORs, im Zusammenhang mit der Störung im BCAA Metabolismus, führte zu einer pathologischen Veränderung im Zellwachstum und dem Metabolismus, resultierend in der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie der Mäuse. **(B) Die *mito-lnc* als allosterischer Aktivator der BCKDHA.** Schematische Darstellung der putativen Funktion von *mito-lnc* bei der, phospho-unabhängigen, Regulation der Aktivität des BCKD Komplexes. Die Interaktion von *mito-lnc* mit der BCKDHA impliziert eine Konformationsänderung und ändert somit deren Bindungsspezifität/affinität für einen der beschriebenen Interaktionspartner des BCKD Komplexes. [verändert nach 62, 87,88,103,211]

5. Literaturverzeichnis

- 1 Oxford languages: <https://languages.oup.com/>
- 2 Halbrook C.J., Lee H.J., Cantley L.C., Lyssiotis C.A. (2018) A Topical Report on the Design Principles of Metabolism.
In: Lewis J., Keshari K. (eds) *Imaging and Metabolism*. Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-61401-4_2
- 3 Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7(3):254-261. doi:10.1016/j.pbi.2004.03.007
- 4 Grüning NM, Lehrach H, Ralser M. Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(4):220-227. doi:10.1016/j.tibs.2009.12.001
- 5 Kummitha CM, Kalhan SC, Saidel GM, Lai N. Relating tissue/organ energy expenditure to metabolic fluxes in mouse and human: experimental data integrated with mathematical modeling. *Physiol Rep*. 2014;2(9):e12159. Published 2014 Sep 28. doi:10.14814/phy2.12159
- 6 Giroud M, Scheideler M. Long Non-Coding RNAs in Metabolic Organs and Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2578. Published 2017 Nov 30. doi:10.3390/ijms18122578
- 7 Liu, J.-S., et al. (1999). The coupling between catabolism and anabolism of *Methano bacterium thermoautotrophicum* in H₂- and iron-limited continuous cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 784 –794.
- 8 Schubert D. Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2005;4(2):240-257. doi:10.1016/j.arr.2005.02.003
- 9 Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, et al. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat Metab*. 2019;1:16-33. doi:10.1038/s42255-018-0014-7
- 10 Keshet R, Szlosarek P, Carracedo A, Erez A. Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(10):634-645. doi:10.1038/s41568-018-0054-z
- 11 Magnusson M, Lewis GD, Ericson U, et al. A diabetes-predictive amino acid Wert and future cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2013;34(26):1982-1989. doi:10.1093/eurheartj/ehs424
- 12 Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005;42(5):987-1000. doi:10.1002/hep.20920
- 13 Karlsson T, Rask-Andersen M, Pan G, et al. Contribution of genetics to visceral adiposity and its relation to cardiovascular and metabolic disease. *Nat Med*. 2019;25(9):1390-1395. doi:10.1038/s41591-019-0563-7
- 14 Kratz M, Baars T, Guyenet S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *Eur J Nutr*. 2013;52(1):1-24. doi:10.1007/s00394-012-0418-1
- 15 Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12. Published 2018 Feb 26. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
- 16 Hanefeld M, Pistrosch F, Bornstein SR, Birkenfeld AL. The metabolic vascular syndrome - guide to an individualized treatment. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(1):5-17. doi:10.1007/s11154-016-9345-4
- 17 Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017;22(4):365-367. doi:10.1177/1074248416686187
- 18 Kouidrat Y, Amad A, De Hert M. Emerging Drugs and Indications for Cardio-Metabolic Disorders in People with Severe Mental Illness. *Curr Pharm Des*. 2015;21(23):3317-3324. doi:10.2174/1381612821666150619093128
- 19 Dedert EA, Calhoun PS, Watkins LL, Sherwood A, Beckham JC. Posttraumatic stress disorder, cardiovascular, and metabolic disease: a review of the evidence. *Ann Behav Med*. 2010;39(1):61-78. doi:10.1007/s12160-010-9165-9
- 20 Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:145-166. doi:10.1146/annurev-biochem-051410-092902
- 21 Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*. 2013;152(6):1298-1307. doi:10.1016/j.cell.2013.02.012
- 22 Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*. 2009;136(4):629-641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- 23 Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. 2009;23(13):1494-1504. doi:10.1101/gad.1800909

- 24 Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. 2013;193(3):651-669. doi:10.1534/genetics.112.146704
- 25 Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. 2012;482(7385):339-346. Published 2012 Feb 15. doi:10.1038/nature10887
- 26 Giroud M, Scheideler M. Long Non-Coding RNAs in Metabolic Organs and Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2578. Published 2017 Nov 30. doi:10.3390/ijms18122578
- 27 Di Gesualdo F, Capaccioli S, Lulli M. A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget*. 2014;5(22):10976-10996. doi:10.18632/oncotarget.2770
- 28 Gomes CPC, Spencer H, Ford KL, et al. The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;8:494-507. doi:10.1016/j.omtn.2017.07.014
- 29 Sun L, Goff LA, Trapnell C, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3387-3392. doi:10.1073/pnas.1222643110
- 30 Xu S, Chen P, Sun L. Regulatory networks of non-coding RNAs in brown/beige adipogenesis. *Biosci Rep*. 2015;35(5):e00262. Published 2015 Aug 17. doi:10.1042/BSR20150155
- 31 Chen G, Yu D, Nian X, et al. LncRNA SRA promotes hepatic steatosis through repressing the expression of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Sci Rep*. 2016;6:35531. Published 2016 Oct 19. doi:10.1038/srep35531
- 32 Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*. 1991;351(6322):153-155. doi:10.1038/351153a0
- 33 Goyal N, Sivasdas A, Shamsudheen KV, et al. RNA sequencing of db/db mice liver identifies lncRNA H19 as a key regulator of gluconeogenesis and hepatic glucose output. *Sci Rep*. 2017;7(1):8312. Published 2017 Aug 16. doi:10.1038/s41598-017-08281-7
- 34 Chen Z. Progress and prospects of long noncoding RNAs in lipid homeostasis. *Mol Metab*. 2015;5(3):164-170. Published 2015 Dec 29. doi:10.1016/j.molmet.2015.12.003
- 35 de Koning TJ. Amino acid synthesis deficiencies. *J Inher Metab Dis*. 2017;40(4):609-620. doi:10.1007/s10545-017-0063-1
- 36 Magnusson M, Lewis GD, Ericson U, et al. A diabetes-predictive amino acid Wert and future cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2013;34(26):1982-1989. doi:10.1093/eurheartj/ehs424
- 37 Lu Y, Wang Y, Liang X, et al. Serum Amino Acids in Association with Prevalent and Incident Type 2 Diabetes in A Chinese Population. *Metabolites*. 2019;9(1):14. Published 2019 Jan 14. doi:10.3390/metabo9010014
- 38 Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J*. 2017;474(12):1935-1963. Published 2017 May 25. doi:10.1042/BCJ20160822
- 39 Wang G, Xu M, Wang W, Galili G. Fortifying Horticultural Crops with Essential Amino Acids: A Review. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1306. Published 2017 Jun 19. doi:10.3390/ijms18061306
- 40 Ropo M, Schneider M, Baldauf C, Blum V. First-principles data set of 45,892 isolated and cation-coordinated conformers of 20 proteinogenic amino acids. *Sci Data*. 2016;3:160009. Published 2016 Feb 16. doi:10.1038/sdata.2016.9
- 41 Cronin JR, Pizzarello S. Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids. *Science*. 1997;275(5302):951-955. doi:10.1126/science.275.5302.951
- 42 Pizzarello S. The chemistry of life's origin: a carbonaceous meteorite perspective. *Acc Chem Res*. 2006;39(4):231-237. doi:10.1021/ar050049f
- 43 Bell EA. Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J Agric Food Chem*. 2003;51(10):2854-2865. doi:10.1021/jf020880w
- 44 Kamei Y, Hatazawa Y, Uchitomi R, Yoshimura R, Miura S. Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids. *Nutrients*. 2020;12(1):261. Published 2020 Jan 19. doi:10.3390/nu12010261
- 45 Levi G, Raiteri M. Exchange of neurotransmitter amino acid at nerve endings can simulate high affinity uptake. *Nature*. 1974;250(5469):735-737. doi:10.1038/250735a0
- 46 Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22(10):1079-1089. doi:10.1038/nm.4185
- 47 Yang T, Li H, Tai Y, et al. Transcriptional regulation of amino acid metabolism in response to nitrogen deficiency and nitrogen forms in tea plant root (*Camellia sinensis* L.). *Sci Rep*. 2020;10(1):6868. Published 2020 Apr 22. doi:10.1038/s41598-020-63835-6
- 48 Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:409-454. doi:10.1146/annurev.nu.04.070184.002205

- 49 Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):954. Published 2018 Mar 23. doi:10.3390/ijms19040954
- 50 Neinast M, Murashige D, Arany Z. Branched Chain Amino Acids. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:139-164. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114455
- 51 Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res.* 2017;42(6):1697-1709. doi:10.1007/s11064-017-2261-5
- 52 Ichihara A. Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase during cellular differentiation and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;259:347-354. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb25431.x
- 53 Cole J.T. (2015) Metabolism of BCAAs. In: Rajendram R., Preedy V., Patel V. (eds) *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition.* Nutrition and Health. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1923-9_2
- 54 Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(1):72-81. doi:10.1093/ajcn/68.1.72
- 55 Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab.* 2017;25(4):838-855.e15. doi:10.1016/j.cmet.2017.03.003
- 56 Harris LLS, Smith GI, Patterson BW, et al. Alterations in 3-Hydroxyisobutyrate and FGF21 Metabolism Are Associated With Protein Ingestion-Induced Insulin Resistance. *Diabetes.* 2017;66(7):1871-1878. doi:10.2337/db16-1475
- 57 Jang C, Oh SF, Wada S, et al. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nat Med.* 2016;22(4):421-426. doi:10.1038/nm.4057
- 58 Wallace M, Green CR, Roberts LS, et al. Enzyme promiscuity drives branched-chain fatty acid synthesis in adipose tissues. *Nat Chem Biol.* 2018;14(11):1021-1031. doi:10.1038/s41589-018-0132-2
- 59 Liebich HM, Först C. Hydroxycarboxylic and oxocarboxylic acids in urine: products from branched-chain amino acid degradation and from ketogenesis. *J Chromatogr.* 1984;309(2):225-242. doi:10.1016/0378-4347(84)80031-6
- 60 Islam mM, Nautiyal M, Wynn RM, Mobley JA, Chuang DT, Hutson SM. Branched-chain amino acid metabolon: interaction of glutamate dehydrogenase with the mitochondrial branched-chain aminotransferase (BCATm). *J Biol Chem.* 2010;285(1):265-276.
- 61 White PJ, McGarrah RW, Grimsrud PA, et al. The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell Metab.* 2018;27(6):1281-1293.e7. doi:10.1016/j.cmet.2018.04.015
- 62 She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1552-E1563. doi:10.1152/ajpendo.00134.2007
- 63 Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007;25(6):903-915. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.003
- 64 Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science.* 2016;351(6268):43-48. doi:10.1126/science.aab2674
- 65 Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, et al. Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science.* 2016;351(6268):53-58. doi:10.1126/science.aad2087
- 66 Han JM, Jeong SJ, Park MC, et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell.* 2012;149(2):410-424. doi:10.1016/j.cell.2012.02.044
- 67 Sener A, Malaisse WJ. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature.* 1980;288(5787):187-189. doi:10.1038/288187a0
- 68 Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.* 2014;19(1):96-108. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.003
- 69 Strauss KA, Puffenberger EG, Carson VJ. Maple Syrup Urine Disease. 2006 Jan 30 [Updated 2020 Apr 23]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1319/>

- 70 Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res.* 2014;114(3):549-564. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302022
- 71 Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994;369(6483):756-758. doi:10.1038/369756a0
- 72 Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell.* 1994;78(1):35-43. doi:10.1016/0092-8674(94)90570-3
- 73 Sabers CJ, Martin mM, Brunn GJ, et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270(2):815-822. doi:10.1074/jbc.270.2.815
- 74 Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
- 75 Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):2043. Published 2018 Jul 13. doi:10.3390/ijms19072043
- 76 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease [published correction appears in *Cell.* 2017 Apr 6;169(2):361-371]. *Cell.* 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
- 77 Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 2010;141(2):290-303. doi:10.1016/j.cell.2010.02.024
- 78 Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23(1):53-62. doi:10.1016/j.gde.2012.12.005
- 79 Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 2010;39(2):171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
- 80 Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152
- 81 Settembre C, Zoncu R, Medina DL, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 2012;31(5):1095-1108. doi:10.1038/emboj.2012.32
- 82 Guo X, Huang C, Lian K, et al. BCKA down-regulates mTORC2-Akt signal and enhances apoptosis susceptibility in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;480(1):106-113. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.162
- 83 Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids.* 2017;49(9):1521-1533. doi:10.1007/s00726-017-2459-5
- 84 Taylor WR. The classification of amino acid conservation. *J Theor Biol.* 1986;119(2):205-218. doi:10.1016/s0022-5193(86)80075-3
- 85 Zhou, M., et al. (2012). "Zhou M, Lu G, Gao C, Wang Y, Sun H. Tissue-specific and nutrient regulation of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase phosphatase, protein phosphatase 2Cm (PP2Cm). *J Biol Chem.* 2012;287(28):23397-23406. doi:10.1074/jbc.M112.351031." *J Biol Chem* 287(28): 23397-23406.
- 86 Kouidrat Y, Amad A, De Hert M. Emerging Drugs and Indications for Cardio-Metabolic Disorders in People with Severe Mental Illness. *Curr Pharm Des.* 2015;21(23):3317-3324. doi:10.2174/1381612821666150619093128
- 87 Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):2043. Published 2018 Jul 13. doi:10.3390/ijms19072043
- 88 Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016;143(17):3050-3060. doi:10.1242/dev.137075
- 89 Mao AP, Shen J, Zuo Z. Expression and regulation of long noncoding RNAs in TLR4 signaling in mouse macrophages. *BMC Genomics.* 2015;16(1):45. Published 2015 Feb 5. doi:10.1186/s12864-015-1270-5
- 90 Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98(3):503-517. doi:10.1016/s0022-2836(75)80083-0
- 91 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- 92 Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143

- 93 Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:475-493. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134123
- 94 Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [published correction appears in *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):479-80]. *Cell*. 2013;154(6):1380-1389. doi:10.1016/j.cell.2013.08.021
- 95 Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci*. 2016;7:703. Published 2016 May 24. doi:10.3389/fpls.2016.00703
- 96 Wang G, Shimada E, Nili M, Koehler CM, Teitell MA. Mitochondria-targeted RNA import. *Methods Mol Biol*. 2015;1264:107-116. doi:10.1007/978-1-4939-2257-4_11
- 97 Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270(5639):725-727. doi:10.1038/270725a0
- 98 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
- 99 Keysar SB, Le PN, Miller B, et al. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *J Natl Cancer Inst*. 2016;109(1):djw189. Published 2016 Sep 15. doi:10.1093/jnci/djw189
- 100 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-29. doi:10.1038/75556
- 101 Eden E, Lipson D, Yogev S, Yakhini Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(3):e39. doi:10.1371/journal.pcbi.0030039
- 102 Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48. Published 2009 Feb 3. doi:10.1186/1471-2105-10-48
- 103 Ananieva EA, Powell JD, Hutson SM. Leucine Metabolism in T Cell Activation: mTOR Signaling and Beyond. *Adv Nutr*. 2016;7(4):798S-805S. Published 2016 Jul 15. doi:10.3945/an.115.011221
- 104 Gellert P, Ponomareva Y, Braun T, Uchida S. Noncoder: a web interface for exon array-based detection of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):e20. doi:10.1093/nar/gks877
- 105 Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank: update. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D23-D26. doi:10.1093/nar/gkh045
- 106 Hsu F, Kent WJ, Clawson H, Kuhn RM, Diekhans M, Haussler D. The UCSC Known Genes. *Bioinformatics*. 2006;22(9):1036-1046. doi:10.1093/bioinformatics/btl048
- 107 Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res*. 2002;12(4):656-664. doi:10.1101/gr.229202
- 108 Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129(4):823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- 109 Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006;125(2):315-326. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041
- 110 Blow MJ, McCulley DJ, Li Z, et al. ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat Genet*. 2010;42(9):806-810. doi:10.1038/ng.650
- 111 Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21931-21936. doi:10.1073/pnas.1016071107
- 112 Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. 2004;306(5701):1574-1577. doi:10.1126/science.1100576
- 113 Hawkins RD, Hon GC, Yang C, et al. Dynamic chromatin states in human ES cells reveal potential regulatory sequences and genes involved in pluripotency. *Cell Res*. 2011;21(10):1393-1409. doi:10.1038/cr.2011.146
- 114 Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, et al. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*. 2009;459(7243):108-112. doi:10.1038/nature07829
- 115 Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, et al. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*. 2007;128(6):1231-1245. doi:10.1016/j.cell.2006.12.048
- 116 Kim TH, Barrera LO, Qu C, et al. Direct isolation and identification of promoters in the human genome. *Genome Res*. 2005;15(6):830-839. doi:10.1101/gr.3430605
- 117 Krogan NJ, Kim M, Tong A, et al. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4207-4218. doi:10.1128/mcb.23.12.4207-4218.2003

- 118 Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- 119 Li J, Moazed D, Gygi SP. Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49383-49388. doi:10.1074/jbc.M209294200
- 120 Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001;107(3):323-337. doi:10.1016/s0092-8674(01)00542-6
- 121 Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* 2011;470(7333):279-283. doi:10.1038/nature09692
- 122 Robertson G, Hirst M, Bainbridge M, et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods.* 2007;4(8):651-657. doi:10.1038/nmeth1068
- 123 Schotta G, Ebert A, Krauss V, et al. Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 2002;21(5):1121-1131. doi:10.1093/emboj/21.5.1121
- 124 Visel A, Blow MJ, Li Z, et al. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature.* 2009;457(7231):854-858. doi:10.1038/nature07730
- 125 Pohl AA, Sugnet CW, Clark TA, Smith K, Fujita PA, Cline MS. Affy exon tissues: exon levels in normal tissues in human, mouse and rat. *Bioinformatics.* 2009;25(18):2442-2443. doi:10.1093/bioinformatics/btp414
- 126 Felsenstein J, Churchill GA. A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol Evol.* 1996;13(1):93-104. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025575
- 127 Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 2005;15(8):1034-1050. doi:10.1101/gr.3715005
- 128 Siepel A, Haussler D. Phylogenetic Hidden Markov Models. In: Nielsen R, editor. *Statistical Methods in Molecular Evolution.* New York: Springer; 2005. pp. 325-351.
- 129 Yang Z. A space-time process model for the evolution of DNA sequences. *Genetics.* 1995;139(2):993-1005.
- 130 Kent WJ, Baertsch R, Hinrichs A, Miller W, Haussler D. Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11484-11489. doi:10.1073/pnas.1932072100
- 131 Blanchette M, Kent WJ, Riemer C, et al. Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res.* 2004;14(4):708-715. doi:10.1101/gr.1933104
- 132 Chiaromonte F, Yap VB, Miller W. Scoring pairwise genomic sequence alignments. *Pac Symp Biocomput.* 2002;115-126. doi:10.1142/9789812799623_0012
- 133 Harris RS. Improved pairwise alignment of genomic DNA. Ph.D. Thesis. Pennsylvania State University, USA. 2007.
- 134 Schwartz S, Kent WJ, Smit A, et al. Human-mouse alignments with BLASTZ [published correction appears in *Genome Res.* 2004 Apr;14(4):786]. *Genome Res.* 2003;13(1):103-107. doi:10.1101/gr.809403
- 135 Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, et al. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science.* 2001;294(5550):2348-2351. doi:10.1126/science.1067179
- 136 Kang YJ, Yang DC, Kong L, et al. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W12-W16. doi:10.1093/nar/gkx428
- 137 Wang Y, Xu P, Zhang C, et al. LncRNA NRON alleviates atrial fibrosis via promoting NFATc3 phosphorylation. *Mol Cell Biochem.* 2019;457(1-2):169-177. doi:10.1007/s11010-019-03521-y
- 138 Pan S, Liu Y, Liu Q, et al. HOTAIR/miR-326/FUT6 axis facilitates colorectal cancer progression through regulating fucosylation of CD44 via PI3K/AKT/mTOR pathway [published correction appears in *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Aug;1866(8):1353]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(5):750-760. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.02.004
- 139 Makarewicz CA, Munir AZ, Schiattarella GG, et al. The DWORF micropeptide enhances contractility and prevents heart failure in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Elife.* 2018;7:e38319. Published 2018 Oct 9. doi:10.7554/eLife.38319
- 140 Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, et al. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell.* 2015;160(4):595-606. doi:10.1016/j.cell.2015.01.009

- 141 Joureau B, de Winter JM, Conijn S, et al. Dysfunctional sarcomere contractility contributes to muscle weakness in ACTA1-related nemaline myopathy (NEM3). *Ann Neurol.* 2018;83(2):269-282. doi:10.1002/ana.25144
- 142 Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(8):674-679. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x
- 143 Chen Y, Ye W, Zhang Y, Xu Y. High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(16):7762-7768. doi:10.1093/nar/gkv784
- 144 Wang L, Park HJ, Dasari S, Wang S, Kocher JP, Li W. CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(6):e74. doi:10.1093/nar/gkt006
- 145 Kozhukhar N, Alexeyev MF. Limited predictive value of TFAM in mitochondrial biogenesis. *Mitochondrion.* 2019;49:156-165. doi:10.1016/j.mito.2019.08.001
- 146 Müller M, Diensthuber RP, Chizhov I, et al. Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins. *PLoS One.* 2013;8(7):e70636. Published 2013 Jul 26. doi:10.1371/journal.pone.0070636
- 147 Dautant A, Meier T, Hahn A, Tribouillard-Tanvier D, di Rago JP, Kucharczyk R. ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Front Physiol.* 2018;9:329. Published 2018 Apr 4. doi:10.3389/fphys.2018.00329
- 148 Richter-Dennerlein R, Oeljeklaus S, Lorenzi I, et al. Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell.* 2016;167(2):471-483.e10. doi:10.1016/j.cell.2016.09.003
- 149 MANDERS, E.M.M., VERBEEK, F.J. and ATEN, J.A. (1993), Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169: 375-382. doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- 150 Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):223-232. doi:10.1038/nchembio727
- 151 Fister, Simone. Die funktionelle Analyse langer nicht-kodierender RNAs in kontraktilem Gewebe. Masterarbeit, 2016 Justus-Liebig-Universität Gießen
- 152 Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1989;10(3):197-205. doi:10.1007/BF01739810
- 153 Ham AS, Chojnowska K, Tintignac LA, et al. mTORC1 signalling is not essential for the maintenance of muscle mass and function in adult sedentary mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11(1):259-273. doi:10.1002/jcsm.12505
- 154 Zimmermann, Liv. Die funktionelle Analyse langer nicht-kodierender RNAs in kontraktilem Gewebe. Bachelorarbeit, 2017 Justus-Liebig-Universität Gießen
- 155 Brandl Alina. Lokalisation einer langen nichtkodierenden RNA im Herzen und Auswirkungen ihres Verlustes. Praxissemeser Bericht, 2020 Brandenburgische Technische Universität Cottbus - Senftenberg
- 156 Calyjur PC, Almeida CdF, Ayub-Guerrieri D, Ribeiro AF Junior, Fernandes SdA, et al. (2016) The mdx Mutation in the 129/Sv Background Results in a Milder Phenotype: Transcriptome Comparative Analysis Searching for the Protective Factors. *PLOS ONE* 11(3): e0150748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150748>
- 157 Qiao Q, Li T, Sun J, Liu X, Ren J, Fei J. Metabolomic analysis of normal (C57BL/6J, 129S1/SvImJ) mice by gas chromatography-mass spectrometry: detection of strain and gender differences. *Talanta.* 2011;85(1):718-724. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.060
- 158 Blanco CE, Sieck GC, Edgerton VR. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochem J.* 1988;20(4):230-243. doi:10.1007/BF01747468
- 159 Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science.* 2016;351(6270):271-275. doi:10.1126/science.aad4076
- 160 Loda A, Heard E. Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS Genet.* 2019;15(9):e1008333. Published 2019 Sep 19. doi:10.1371/journal.pgen.1008333
- 161 Huber, D., Voithenberg, L.V., & Kaigala, G. (2018). Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro and Nano Engineering* 1: 15-24.
- 162 Biswas D, Duffley L, Pulinilkunnil T. Role of branched-chain amino acid-catabolizing enzymes in intertissue signaling, metabolic remodeling, and energy homeostasis. *FASEB J.* 2019;33(8):8711-8731. doi:10.1096/fj.201802842RR

- 163 Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006;136(1 Suppl):207S-11S. doi:10.1093/jn/136.1.207S
- 164 Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T, Harris RA. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001;4(5):419-423. doi:10.1097/00075197-200109000-00013
- 165 Roussis IM, Guille M, Myers FA, Scarlett GP. RNA Whole-Mount In situ Hybridisation Proximity Ligation Assay (rISH-PLA), an Assay for Detecting RNA-Protein Complexes in Intact Cells. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147967. Published 2016 Jan 29. doi:10.1371/journal.pone.0147967
- 166 Skvorak KJ. Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 2009;32(2):229-246. doi:10.1007/s10545-009-1086-z
- 168 Nyhan WL, Rice-Kelts M, Klein J, Barshop BA. Treatment of the acute crisis in maple syrup urine disease. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1998;152(6):593-598. doi:10.1001/archpedi.152.6.593
- 169 Homanics GE, Skvorak K, Ferguson C, Watkins S, Paul HS. Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet.* 2006;7:33. Published 2006 Mar 31. doi:10.1186/1471-2350-7-33
- 170 Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem Res.* 2017;42(6):1697-1709. doi:10.1007/s11064-017-2261-5
- 171 He L, Xu Z, Yao K, et al. The Physiological Basis and Nutritional Function of Alpha-ketoglutarate. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(7):576-581. doi:10.2174/1389203716666150630140157
- 172 Cai X, Zhu C, Xu Y, et al. Alpha-ketoglutarate promotes skeletal muscle hypertrophy and protein synthesis through Akt/mTOR signaling pathways. *Sci Rep.* 2016;6:26802. Published 2016 May 26. doi:10.1038/srep26802
- 173 Yuan Y, Xu P, Jiang Q, et al. Exercise-induced α -ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1-dependent adrenal activation. *EMBO J.* 2020;39(7):e103304. doi:10.15252/embj.2019103304
- 174 Zdzisińska B, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M. Alpha-Ketoglutarate as a Molecule with Pleiotropic Activity: Well-Known and Novel Possibilities of Therapeutic Use. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017;65(1):21-36. doi:10.1007/s00005-016-0406-x
- 175 Yuan Y, Xu P, Jiang Q, et al. Exercise-induced α -ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1-dependent adrenal activation. *EMBO J.* 2020;39(7):e103304. doi:10.15252/embj.2019103304
- 176 Tanianskii DA, Jarzebska N, Birkenfeld AL, O'Sullivan JF, Rodionov RN. Beta-Aminoisobutyric Acid as a Novel Regulator of Carbohydrate and Lipid Metabolism. *Nutrients.* 2019;11(3):524. Published 2019 Feb 28. doi:10.3390/nu11030524
- 178 Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab.* 2014;19(1):96-108. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.003
- 179 Shi CX, Zhao MX, Shu XD, et al. β -aminoisobutyric acid attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress and glucose/lipid metabolic disturbance in mice with type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2016;6:21924. Published 2016 Feb 24. doi:10.1038/srep21924
- 180 Knight J, Holmes RP. Mitochondrial hydroxyproline metabolism: implications for primary hyperoxaluria. *Am J Nephrol.* 2005;25(2):171-175. doi:10.1159/000085409
- 181 Wu Z, Hou Y, Dai Z, Hu CA, Wu G. Metabolism, Nutrition, and Redox Signaling of Hydroxyproline. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(4):674-682. doi:10.1089/ars.2017.7338
- 182 Srivastava AK, Khare P, Nagar HK, Raghuvanshi N, Srivastava R. Hydroxyproline: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2016;17(6):596-602. doi:10.2174/1389203717666151201192247
- 183 Cihák R, Kolár F, Pelouch V, Procházka J, Ostádal B, Widimský J. Functional changes in the right and left ventricle during development of cardiac hypertrophy and after its regression. *Cardiovasc Res.* 1992;26(9):845-850. doi:10.1093/cvr/26.9.845
- 184 Tsuda M, Kurashima Y. Nitrite-trapping capacity of thioproline in the human body. *IARC Sci Publ.* 1991;(105):123-128.
- 185 Tahira T, Ohgaki H, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T. The inhibitory effect of thioproline on carcinogenesis induced by N-benzylmethylamine and nitrite. *Food Chem Toxicol.* 1988;26(6):511-516. doi:10.1016/0278-6915(88)90003-8

- 186 Kammoun HL, Febbraio MA. Come on BAIBA light my fire. *Cell Metab.* 2014;19(1):1-2. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.007
- 187 Martin NRW, Turner MC, Farrington R, Player DJ, Lewis MP. Leucine elicits myotube hypertrophy and enhances maximal contractile force in tissue engineered skeletal muscle in vitro. *J Cell Physiol.* 2017;232(10):2788-2797. doi:10.1002/jcp.25960
- 188 Xu L, Brink M. mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(7 Pt B):1894-1903. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.003
- 189 Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447-1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010
- 190 Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med.* 2016;98:56-67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025
- 191 Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol.* 2004;2(10):e348. doi:10.1371/journal.pbio.0020348
- 192 Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280(17):4294-4314. doi:10.1111/febs.12253
- 193 Noh JH, Kim KM, McClusky WG, Abdelmohsen K, Gorospe M. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(3):e1471. doi:10.1002/wrna.1471
- 194 Willingham AT, Orth AP, Batalov S, et al. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science.* 2005;309(5740):1570-1573. doi:10.1126/science.1115901
- 195 Noh JH, Kim KM, Abdelmohsen K, et al. HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes Dev.* 2016;30(10):1224-1239. doi:10.1101/gad.276022.115
- 196 Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation [published correction appears in *Science.* 2019 Dec 20;366(6472):]. *Science.* 2014;344(6181):310-313. doi:10.1126/science.1251456
- 197 Murakami T, Matsuo M, Shimizu A, Shimomura Y. Dissociation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase (BCKDK) from branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex (BCKDC) by BDK inhibitors. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2005;51(1):48-50. doi:10.3177/jnsv.51.48
- 198 Tso SC, Gui WJ, Wu CY, et al. Benzothioephene carboxylate derivatives as novel allosteric inhibitors of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *J Biol Chem.* 2014;289(30):20583-20593. doi:10.1074/jbc.M114.569251
- 199 Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(12):723-736. doi:10.1038/nrendo.2014.171
- 200 Mika A, Stepnowski P, Chmielewski M, et al. Increased Serum Level of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Patients with Hypertriglyceridemia-Related Disorders. *Lipids.* 2016;51(7):867-873. doi:10.1007/s11745-016-4141-1
- 201 Ringnér M. What is principal component analysis?. *Nat Biotechnol.* 2008;26(3):303-304. doi:10.1038/nbt0308-303
- 202 Weiß, Maria. Die funktionelle Analyse langer nicht-kodierender RNAs im kontraktilem Gewebe. Masterthesis, 2014 Justus-Liebig-Universität Gießen
- 203 Reddy P, Leong J, Jialal I. Amino acid levels in nascent metabolic syndrome: A contributor to the pro-inflammatory burden. *J Diabetes Complications.* 2018;32(5):465-469. doi:10.1016/j.jdiacomp.2018.02.005

Internetquellen:

- 204 <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/21-molecule-s-to-metabolism/anabolism-and-catabolism.html>
- 205 <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/aminosaeuern/523>
- 206 <http://education.med.nyu.edu/mbm/aminoAcids/introduction.shtml>
- 207 https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-whole-body-BCAA-metabolism-Ketoacids-are-formed-by-reversible_fig17_236079012
- 208 <http://www.e-crisp.org/E-CRISP>
- 209 <https://www.biosearchtech.com/support/education/stellaris-rna-fish>

- 210 https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=mm9&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition = &position = chr6%3A86463889 %2D86466267&hgid=240079645_daYhR2ozByjxblIDkxsNn4FJD3pg
- 211 <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-GEOD-77126/>
- 212 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- 213 <http://clipartmag.com/image/human-heart-anatomy-drawing-4.jpg>
- 214 <https://welt-der-bwl.de/z-Transformation>
- 215 <https://support.minitab.com/de-de/minitab/19/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/tests-of-means/what-is-a-z-value/>
- 216 <https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>
- 217 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>
- 218 <https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>
- 219 <https://protocols.scienceexchange.com/protocols/isolation-and-primary-culture-of-brown-fat-preadipocytes>

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	für...
°C	Celsius
µl	Mikroliter
µmol	Mikromolar
129/SvJ	murine Inzuchtlinie 129/Sv (<i>Jackson laboratories</i>)
3-HIB	3-β-Hydroxy-Butyrat
4EB-P1	<i>Eukaryotic Translation initiation Factor 4E Binding Protein 1</i>
A	
A	Ampere
AA	Amino acid
AK	<i>Accession Number</i>
Abb.	Abbildung
Acadm	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain</i>
Acads	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain</i>
Acadsb	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Short/Branched Chain</i>
Acat1	<i>Acyl-CoA Acetyltransferase 1</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AK	Antikörper
AKT	AKT Serin/Threonin Kinase
AMPK	<i>adenosine 5'-monophosphate-activated protein Kinase</i>
AS-RNA	<i>antisense RNA</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Atp6	<i>ATP synthase Membrane Subunit 6</i>
B	
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom
BAIBA	beta-Aminobuttersäure
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
BCAA	<i>Branched Chain Amino Acid</i>
Bcat	<i>Branched chain amino acid transaminase</i>
BCKA	<i>Branched Chain Ketoacid</i>
Bckdc	<i>Branched chain ketoacid dehydrogenase complex</i>

Bckdh	<i>Branched chain ketoacid dehydrogenase</i>
Bckdha	<i>Branched chain ketoacid dehydrogenase alpha</i>
Bckdhb	<i>Branched chain ketoacid dehydrogenase beta</i>
Bdk	<i>Branched chain ketoacid dehydrogenase Kinase</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BT2	<i>3,6-dichlorobenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid</i>
C	
C57BL/6J	C57 black 6, murine Inzuchtlinie (<i>Jackson laboratories</i>)
CAT	Computer animiertes Tierhaus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Chr	Chromosom
Cit	Citrullin
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CoxI	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit I</i>
CPC	<i>Coding Potential Calculator</i>
Crispr	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSF	<i>Codon Substitution Frequencies</i>
CT	threshold cycle, Schwellenwertzyklus
CTX	Cardiotoxin
CVD	Herz-Kreislauf-Erkrankung (<i>cardiovascular disease</i>)
Cytc	<i>Cytochrome C</i>
D	
Dapi	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
Dbt	<i>Dihydrolipoamide Branched Chain Transacylase E2</i>
ddH₂O	demineralisiertes Wasser
del	Deletion
DEPTOR	<i>DEP-domain containing mTOR interacting protein</i>
Dld	<i>Dihydrolipoamide Dehydrogenase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DTA	Diphtherietoxin
DTT	Dithiothreitol
Dwurf	<i>DWARF Open Reading Frame</i>
E, F, G	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
mES-Zellen	Embryonale Stammzellen
et al.	<i>et alterae</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FC	<i>foldchange</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FISH	Fluoreszenz <i>In Situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	<i>forward</i>
FWER	<i>family-wise error rate</i>
g (SI Einheit)	Gram
g (Zentrifuge)	Gravitation
GABA	Gamma Aminobuttersäure
GAP	<i>GTPase-activating Protein</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATOR1/2	<i>GAP activity toward RAGs</i>
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDP	Guanidindiphosphat
Gly	Glycin
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTP	Guanodintriphosphat
H	
h	Stunde
H₂O	Wasser
Hadh	<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme complex</i>
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIF1α	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HMB	β -Hydroxy- β -Methylbutyrat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA
Hnrnp	<i>Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein</i>
Hotair	<i>HOX transcript antisense RNA</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hpro	Hydroxyprolin
HSA	<i>Homo Sapiens</i>
I, J, K, L	
IBMX	<i>3-Isobutyl-methylxanthine</i>
IGF	<i>insulin-like growth factors</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Ile	Isoleucin
IP	Immunopräzipitation
IR	Insulin Resistenz
KATP	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kg	Kilogram
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIV	Ketoisovalerat
KO	<i>Knockout</i>
KPi	Kaliumphosphat
Leu	Leucin
lincRNA	lange, intergenische nicht-kodierende RNA
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA
LOF	<i>loss-of-function</i>
LRS	leucyl-tRNA synthetase
M	
M (SI-Einheit)	Molar
M.	<i>Mus</i>
m.	<i>musculus</i>
Mccc	<i>Methylcrotonyl-CoA Carboxylase</i>

mg	Milligram
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mLST8	<i>mammalian lethal with sec-13 protein 8</i>
mM	Millimol
mm	Millimeter
mol	molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	massenspektrometrisch
mSN1	<i>stress-activated protein kinase-interacting protein 1</i>
MSUD	<i>Maple Syrup Urine disease</i>
MTHFD2	<i>Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Kinase</i>
mTORC1	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Kinase complex 1</i>
mTORC2	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Kinase complex 2</i>
MuSc	Skelettmuskel Stammzelle
mut	Mutante
MW	Mittelwert
N	
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrat
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neat1	<i>nuclear paraspeckle assembly transcript 1</i>
neoR	Neomycinresistenz
ng	Nanogram
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
nm	Nanometer
NP40	Nonyl Phenoxyethoxyethanol
Nr	Nummer
Nron	

O, P	
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	Phosphor
p	phospho
Pax7	Pared Box 7
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pg	picogram
PGC1α	<i>PPARG Coactivator 1-Alpha</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-Kinase</i>
piRNA	<i>piwi protein-associated RNA</i>
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA	<i>Polyadenylic Acid</i>
pos	positive
PPARG	<i>peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PPARα	<i>peroxisome proliferator activated Receptor alpha</i>
Ppm1k	<i>Protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1K</i>
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>
PROTOR1/2	<i>protein observed with rictor 1 and 2</i>
PS	Penicilin/Streptomycin
PSG	Penicilin-Streptomycin-Glutamine
R	
RAG	<i>Recombinating activating</i>
Rala	<i>RAS like Proto-Oncogene A</i>
Raptor	<i>regulatory-associated protein of TOR</i>
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
rel.	relativ
rev	reverse
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycine-insensitive Companion of MTOR</i>

RIPA-Buffer	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Puffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure (Acid)
RNA-PolIII	RNA-Polymerase II
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
S	
S	Sekunde
s.	siehe
S6K1	<i>ribosomal S6 Kinase</i>
SAP	<i>shrimp alkaline Phosphatase</i>
Sar	Sarcosin
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumlaurylsulfat
Seq	Sequenz
Ser	Serin
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SI	Système international d'unités (Internationales Einheitenystem)
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SRA	<i>steroid receptor RNA activator</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription</i>
T	
T7	T7-Phagen
TA	Tibialis anterior
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline – Tween20</i>
TCA	Tricarbonsäure
TE	Trypsin/EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylamin
Tfam	<i>Transcription Factor A, Mitochondrial</i>
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
Thr	Threonin
Tpr	Thioprolin

Tris	Tris-aminomethan
TSC	<i>Tuberous sclerosis</i>
TSS	Transkriptionsstartstelle
TVA	Tierversuchsantrag
U-Z	
U	Unit
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UE	Untereinheit
ULK1	<i>Unc-51 like autophagy activating Kinase</i>
UV	Ultraviolet
V	Volt
Val	Valin
WGA	<i>Wheat germ agglutin</i>
WT	Wildtyp
Xist	X-Chromosom inaktivierendes Transkript
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α-KG	Alpha-Ketoglutarat
α-KIC	Alpha-Ketoisocaproate

6.2 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1.1	Klassifizierung und Funktion von lncRNAs	2
1.2	Übersicht metabolisch relevanter lncRNAs	4
1.3	Übersicht des anabolen und katabolen Metabolismus	5
1.4	Kardiovaskuläre Krankheiten als Resultat metabolischer Störungen	6
1.5	Schematische Darstellung des Aminosäure Metabolismus	9
1.6	Der BCAA Metabolismus	13
1.7	mTORC1 Signalwirkung in Zellwachstum und Metabolismus	18

2.1	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southernblots	22
2.2	Schematische Darstellung der Cas9 medierten genomischen Manipulation zur Generierung der <i>in vivo</i> LOF Mausmodelle	24
2.3	Schematische Darstellung des genomischen Lokus von <i>mito-lnc</i> in den beiden generierten LOF Mausmodellen zur Analyse der Funktion von <i>mito-lnc</i>	25
3.1	<i>mito-lnc</i> wird in metabolisch aktiven Organen exprimiert	51
3.2	<i>mito-lnc</i> ist eine nicht-kodierende RNA	52
3.3	<i>mito-lnc</i> ist co-lokalisiert mit Mitochondrien	55
3.4	Der BCKD Komplex ist der putative Interaktionspartner von <i>mito-lnc</i> .	56
3.5	<i>in vivo</i> Deletion von <i>mito-lnc</i> mittels CRISPR/CAS9 System	61
3.6	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einem erhöhten Herzgewicht der KO-Mäuse	63
3.7	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> induziert eine kardiale Hypertrophie	65
3.8	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer transkriptionellen Deregulation von Genen involviert im BCAA Metabolismus	67
3.9	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer verringerten Effizienz im BCAA Katabolismus	69
3.10	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> induziert die Erhöhung der Menge an aktiver, unphosphorylierter BCKDHA	70
3.11	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in einer Akkumulation von AS und deren Metaboliten im Herzgewebe	73
3.12	Schematische Darstellung der Arbeitshypothese	74
3.13	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu einer Aktivierung von mTOR	75
3.14	Die erhöhte Supplementierung von BCAAs aktiviert mTOR	77
3.15	Die erhöhte Supplementierung von BCAAs resultiert in einer verstärkten Akkumulation an freien BCAAs im Serum.	79
3.16	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt zu keiner Mislokalisierung von mitochondrialen BCAA-assoziierten Proteinen	81
3.17	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> induziert keine Veränderung in der Konstellation des BCKD Komplexes	83
3.18	Die Rückkreuzung in den genetischen C57BL/6J Hintergrund führt zu einer Reversion des, durch den Verlust von <i>mito-lnc</i> induzierten Phänotyps	86
4.1	Der kardiale BCAA Metabolismus wird direkt von <i>mito-lnc</i> kontrolliert	108

7.1	Schematische Übersicht zur Herstellung der Plasmide zur Generierung der <i>LOF in vivo</i> Mausmodelle mittels klassischer homologer Rekombination	141
7.2	Die genomische Deletion von <i>bfs-lncRNA</i> mittels klassischer homologer Rekombination ist unvollständig	142
7.3	<i>hmbs-lncRNA</i> KO-Mäuse haben keine Gewichtsveränderungen	143
7.4	Der Verlust von <i>hmbs-lncRNA</i> führt zu keinem offensichtlichen oder schwerwiegendem Phänotyp	144
7.5	Analyse des Interaktoms von <i>mito-lnc</i> mittels RNA-Pulldown	145
7.6	Immunhistochemie BCKDHA und CYTC auf WT-Kardiomyozyten	145
7.7	<i>in vivo</i> Deletion von <i>mito-lnc</i> mittels CRISPR/CAS9 System	146
7.8	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> führt in 8 Wochen alten Tieren zu keinem erhöhten Herzgewicht der KO-Mäuse	146
7.9	Succinat-Dehydrogenase Färbung der Skelettmuskulatur von <i>mito-lnc</i> KO-Tieren im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren	147
7.10	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> hat keine Hypertrophie der Muskelfasern zur Folge	147
7.11	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in transkriptionellen Veränderungen von metabolisch relevanten Genen	148
7.12	Der Verlust von <i>mito-lnc</i> resultiert in einer Akkumulation von AS und deren Metaboliten im Herzgewebe	148
7.13	Die Aktivierung von mTOR im <i>mito-lnc</i> KO	149

6.3 Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1.1	Übersicht der 20 kanonischen, proteinogenen AS	8
2.1	PCR Reaktionsansatz	28
2.2	PCR Programm zur Genotypisierung	28
2.3	PCR-Fragmente Produktlängen der Genotypisierungen	29
2.4	Verwendete Symbole zur Darstellung der Signifikanzen	46
7.1	Verwendete Mauslinien	134
7.2	Verwendete Software	134 - 135
7.3	Verwendete Zelllinien	135

7.4	Verwendete Plasmide	135
7.5	Verwendete Primärantikörper	136 - 137
7.6	Verwendete Sekundärantikörper	137
7.7	Übersicht Southernblots	137
7.8	Oligonukleotide zur Amplifikation der DNA Sonden für die Southernblots	137
7.9	Verwendete CRISPR/CAS9n Plasmide und Oligonukleotide zur Generierung der <i>mito-Incdel</i> Mäuse	138
7.10	Verwendete CRISPR/CAS9 Plasmide und Oligonukleotide zur Generierung der <i>mito-IncpA</i> Mäuse	138
7.11	Verwendete Primer zur Genotypisierung	138 - 139
7.12	Verwendete Primer q RT-PCRs	139
7.13	rISH-PLA: Oligonukleotide <i>mito-Inc</i>	140
7.14	Verwendet Antikörper rISH-PLA	140

7. Appendix

7.1 Materialien

Tabelle 7.1: Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Erläuterung
895-52	<i>mito-Inc</i> Deletion (BL6 background)
895-52_129	<i>mito-Inc</i> Deletion (129SV background)
895-7_2018	<i>mito-Inc</i> Deletion (129 SV background)
914	polyA-Insertion im ersten Exon von <i>mito-Inc</i>
874	<i>knockout</i> -Modell AK086006
850	<i>knockout</i> -Modell AK080070

Tabelle 7.2: Verwendete Software

Name	Herkunft
Adobe Illustrator, Photoshop, Reader	Adobe Systems Incorporated
CAT (Computer Administriertes Tierhaus)	Mpg
CRISPR Design Tool	
Endnote X8	Endnote
Graphpad Prism 6.0	Graphpad Software
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	Broad Institute
Image Lab 5.2.1	Biorad
Image Studio Ver. 5.2	Li-Cor
Imagej Image Processing And Analysis In Java	Macbiophotonics
Microsoft Powerpoint, Excel, Office, Word	Microsoft Office
Stepone Software V2.3	Applied Biosystems
Seqbuilder 14	Dnastar Lasergene

Seqman Pro 14	DNASTAR Lasergene
Zen 2.1	Zeiss
Inkscape	Inkscape-Projekt

Tabelle 7.3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
C2C12	Immortalisierte Myoblasten aus mus musculus
Braune Preadipozyten	Markus Krüger nach Kahn [219]

Tabelle 7.4: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung
P770	BAC bMQ323-o09 (AK080070)
P860	BAC bMQ407-n21 (AK086006)
P670	pFLCI mit AK086006
P672	modified Bluescript1 mit AK010044
P833	pFLCI Backbone mit cDNA von AK079912
P850	KO-Vektor AK080070
P874	KO-Vektor AK086006
P889	pX335 Abkömmling; Cas9 Nickase (D10A) plus CapGFP und T2APuro; Phillip Grothe
P894	p889 Cas9n mit sgRNA gegen AK079912 5'
P895	p889 Cas9n mit sgRNA gegen AK079912 5'
P898	p889 Cas9n mit sgRNA gegen AK079912 3'
P899	p889 Cas9n mit sgRNA gegen AK079912 3'
P900	px458 addgene pSpCas9(BB)-2A-GFP
P901	px459 addgene pSpCas9(BB)-2A-Puro

P914	px459	addgene	pSpCas9(BB)-2A-Puro SF007x008 in 901xBbsI
-------------	-------	---------	--

Tabelle 7.5: Verwendete Primärantikörper

Name	Bestellnummer	Herkunft	Anwendung	Kda
Bckdha	Abcam #Ab90691	Kaninchen		50
Bckdha^{s293}	Abcam #Ab200577	Kaninchen		50
Mtor	Cell Signaling Technology #2983	Kaninchen	WB	289
Mtor^{s2448}	Cell Signaling Technology #5536	Kaninchen	WB	289
Dbt	Sigma #Hpa026485	Kaninchen	WB; ICH; RISH-PLA	50
Dld	Thermo Scientific #Pa5-27367	Kaninchen	WB; ICH; RISH-PLA	52-62
Mcca	Santa Cruz #Sc-271427	Maus	WB	75
Hadha	Novus Biologicals #Nbp1-83387	Kaninchen	WB	83
Pcca	Novus Biologicals #Nbp2-32215	Kaninchen	WB	70-75
Atp6	Ptg #55313-1-Ap	Kaninchen	WB; ICH; RISH-PLA	30
Bdk	Santa Cruz #Sc374425	Maus	WB	46
Ppm1k	Sigma #	Kaninchen	WB	30; 40
Aco2	Neb #6922	Kaninchen	WB	85
Rala	Bd #610221		WB	24-27
Gapdh	Cell Signaling Technology #2118	Kaninchen	WB	37
4e-Bp1	Cell Signaling Technology #9452	Kaninchen	WB	15-20
4e-Bp1^{thr37/46}	Cell Signaling Technology #9459	Kaninchen	WB	15-20
Tfam		Ziege	WB	25
Cytc	Cell Signaling Technology #4280	Kaninchen	WB; IHC; RISH-PLA	14
Pax7	Sigma #Av32742	Kaninchen	IHC	
Laminin	Abcam #Ab11575	Kaninchen	IHC	
Cox2	Cell Signaling Technology #4842	Kaninchen	WB; IHC	74
Ba-D5	Dshb	Maus	IHC	
Sc-71	Dshb	Maus	IHC	
Bf-F3	Dshb	Maus	IHC	
Anti-Maus Biotin	Dln-006043 Alle, Chem Klon: Btn.4)	Maus	RISH-PLA	
Anti-Kaninchen Biotin	Abcam (Ab53494)		RISH-PLA	
Anti-Maus Igg	Invitrogen 10400c		IP	
Ppm1k	Sigma #Hpa023891	Kaninchen	WB	

Tabelle 7.6: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Firma Und Bestellnummer	Herkunft
Anti-Maus Hrp	Pierce #1858413	Ziege
Anti-Kaninchen Hrp	Pierce #31460	Ziege
Anti-Ziege Hrp	Sigma #A 5420	Kaninchen
Anti-Maus Igg Trueblot Hrp	Ebioscience #18-8877-31	Ratte
Anti-Kaninchen Igg Trueblot Hrp	Ebioscience #18-8816-31	Maus
Anti-Maus Alexa680	Invitrogen A21057	Ziege
Maus Igg Irdye800	Rockland 610-132-121	Ziege
Anti-Kaninchen Alexa680	Invitrogen A21076	Ziege
Kaninchen Igg Irdye800	Rockland 611-132-122	Ziege
Anti-Maus Alexa488	Invitrogen A11001	Ziege
Anti-Maus Alexa594	Invitrogen A11005	Ziege
Anti-Kaninchen Alexa488	Invitrogen A11070	Ziege
Anti-Kaninchen Alexa594	Invitrogen A11012	Ziege
Wheat Germ Agglutinin (Wga) Alexa488	Invitrogen W11261	

Tabelle 7.7: Übersicht Southernblots

Mauslinie	Enzym	Bandengröße in kb	Plasmide und Primer zur Amplifikation
850	<i>HpaI</i>	WT: 11,7 KO: 14,1	P770: MA137XMA138 (222 BP)
874	<i>ECORV</i>	WT: 11,68 KO: 7,5	P860: MA212XMA213 (227 BP)

Tabelle 7.8: Oligonukleotide zur Amplifikation der DNA Sonden für die Southernblots

NAME	SEQUENZ 5'>3'	MAUSLINIE
MA212	actgaaggcttaaacaacattctgc	874
MA213	gcaagtgctggctagagttcacca	874
MA137	accaagattgtgtgccagccaatgc	850
MA138	tagttcagaatctcctaactgatgc	850

Tabelle 7.9: Verwendete CRISPR/CAS9n Plasmide und Oligonukleotide zur Generierung der *mito-Inc^{del}* Mäuse

Primer	Sequenz 5'>3'	Zweck
TB981	caccggatgaaatttactttaagt	p894; <i>sense</i> Oligo
TB982	aaacacttaaagtaaatttcatcc	p894; <i>antisense</i> Oligo
TB983	caccgcatgcaagagaaaactcat	p895; <i>sense</i> Oligo
TB984	aaacatgagtttctcttgcacggc	p895; <i>antisense</i> Oligo
TB989	caccgtgcacaatagttttggtt	p898, <i>sense</i> Oligo
TB990	aaacaaacaaaactattgtgcac	p898, <i>antisense</i> Oligo
TB991	caccgtacctaaagccctgggtga	p899, <i>sense</i> Oligo
TB992	aaactcaccagggtttaggtac	p899; <i>antisense</i> Oligo

Tabelle 7.10: Verwendete CRISPR/CAS9 Plasmide und Oligonukleotide zur Generierung der *mito-Inc^{PA}* Mäuse

Primer	Sequenz 5'>3'	Zweck
SF007	caccgcagagcttgggatccctcat	p914 <i>sense</i> Oligo
SF008	aaacatgaggatccaagctctg	p914 <i>antisense</i> Oligo
TB995	cattgaggatcctggctctgctaaggactctgcactctgcttagaatcctgg ctcaatgaggatcccaaattctggttacaataaagcaatagcatcaca aatttcacaaataaagcattttttcacctggctctgacatctactccagt acctggacaagttgctccttcttagagctcagcttccaa	ssOligonukleotid zur polyA Insertion (HR)

Tabelle 7.11: Verwendete Primer zur Genotypisierung

Name	Sequenz	Bezeichnung
MA254	gaaggctgagaaccacactctatgc	5' Genotyping <i>mito-Inc</i>
MA265	ggatctctctgaattgaggtcagc	3' Genotyping <i>mito-Inc</i>
MA442	agcttgggatccctcattggagcca	Genotyping <i>mito-Inc</i> (895) rev
MA403	ggttacaataaagcaatagcatca	fwd auf polyA insert; Genotyping <i>mito-Inc^{PA}</i>

MA234	tgattgattatccctgggtgagtgc	Galk insertions check p829 fwd mit MA77/78
MA401	cctggtgtcaggaggcagagcagag	rev Primer, auf 1. exon <i>mito-lnc</i> ; 3' der poly A Insertion
MA251	acaggttttgttgactcaaagggc	3' genotyping 874 rev WT-lokus
MA252	atcagctgccagcataggacagggc	3' genotyping 874 fwd WT-lokus
TB497	gaacgagatcagcagcctctgttc	Genotypisierung rev auf 179 3' (IRES-LacZ)
MA239	actctttgatacggtagccggagc	5' genotyping 850 fwd
MA241	gccttgctggtagctacacggctgc	5' genotyping 850 rev WT-lokus
TB495	cgcagaggcacctgtcggcaggtgg	Genotypisierung rev auf 179 5' (IRES-LacZ)
MA242	gcctcctgcccccttactgaaagc	3' genotyping 850 rev
MA245	tgaggaccctgtgattgtctggagc	3' genotyping 850 fwd WT-lokus
TB495	cgcagaggcacctgtcggcaggtgg	Genotypisierung rev auf 179 5' (IRES-LacZ)

Tabelle 7.12: Verwendete Primer q RT-PCRs

Primer	Sequenz 5'>3'	Ziel
MA153	catgaagatcctgaccgagcgtggc	β-Aktin
MA154	tgctcgaagtctagagcaacatagc	
JD106	accacagtccatgccatcac	Gapdh
JD107	catgccagtgagcttcccgt	
MA499	aataggattcccaatcgtttagc	ATP6
MA500	tcgtccttttggtgtgtggattagc	
MA440	acttctgacacacaagccttctgtc	<i>mito-lnc</i>
MA44	agcttgggatccctcattggagcca	
CS069	ctctgtgtggtgcagactagagaca	AK086006
CS070	gagcgagtgtgaacgagccacaggc	
MA018	agtgactgaaggtcaataccttggc	AK080070 Exon 1+2
MA020	agtagaagttatgtctctctgaagc	
MA018	agtgactgaaggtcaataccttggc	AK080070 Exon 1
MA444	gcagttgacagccaaggtatgtgtg	
MA020	agtagaagttatgtctctctgaagc	AK080070 Exon 2
MA445	gcggtacatgcctctggtctttggc	
CS681	aggaggccatcgttgaagtcagctt	Neat1
CS682	ccattcatgcatccgcaaagaatga	

Tabelle 7.13: rISH-PLA: Oligonukleotide *mito-lnc*

NAME	SEQUENZ 5'>3'	ZWECK
MA485	caaaggcagcattatattcaa	<i>mito-lnc</i>
MA486	cagaaggcttgtgtgcagaag	<i>mito-lnc</i>
MA487	gaccctgtttattaagttatt	<i>mito-lnc</i>
MA488	tccttccttagagctcagtc	<i>mito-lnc</i>
MA489	ctctggccctggctctgacatc	<i>mito-lnc</i>

Tabelle 7.14: Verwendet Antikörper rISH-PLA

Antikörper	Verdünnung
Bckdha	1:100
Dld	1:500
Dbt	1:500
Cytc	1:200
Anti-Biotin	1:5000
Anti-Biotin	1:5000

7.2 Anhang: Abbildungen

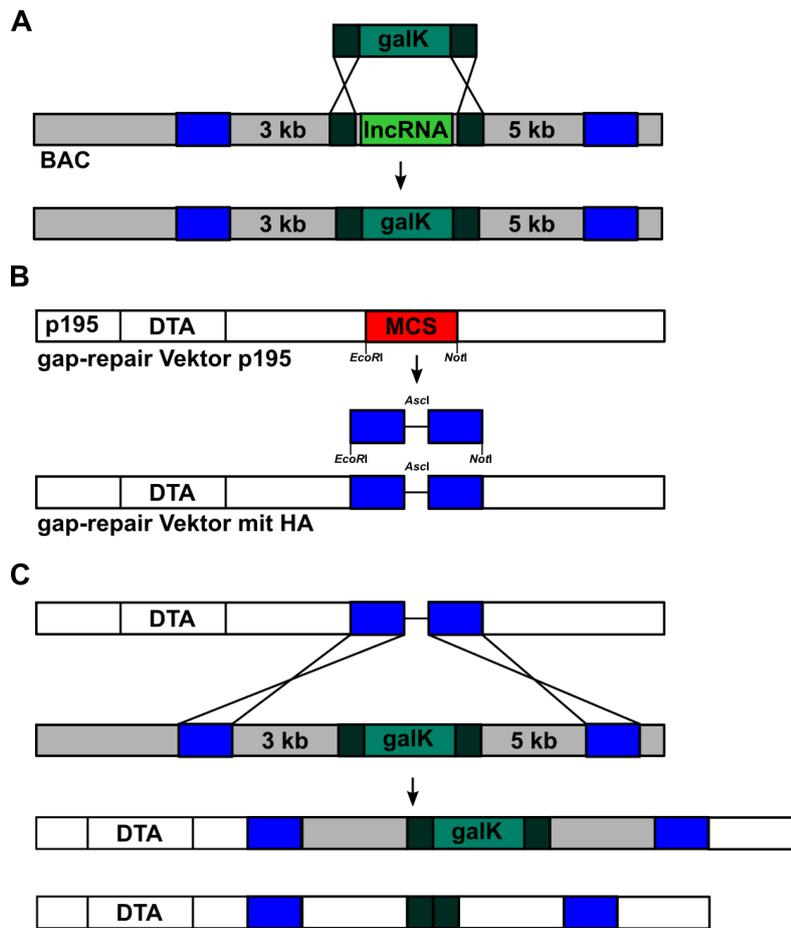


Abb. 7.1: Schematische Übersicht zur Herstellung der Plasmide zur Generierung der LOF in vivo Mausmodelle mittels klassischer homologer

Rekombination. (A) Für die genetische Manipulation an den Zielloki im Zuge der Kandidatenvalidierung, wurde der gewünschte genomische Bereich auf dem BAC gegen eine Galaktosekassette (galK) ausgetauscht. **(B)**

Generierung des gap-repair Plasmids. Für die Herstellung der gap-repair Plasmide wurden die

entsprechenden homologen Arme (HA) (Blau) des Ziellokus über EcoRI und NotI in das Plasmid p195 ligiert und

mittels Ascl linearisiert. Die homologen Arme wurden jeweils etwa 3 kb upstream und 5 kb downstream gewählt. **(C)** Zur Generierung des finalen repair Plasmides, erfolgte eine homologe Rekombination des repair Plasmides, welches die HA enthält und der manipulierten BAC DNA (A). Vor der Verwendung des Plasmides zur Rekombination in mES-Zellen wurde die Galaktosekassette restriktionsenzymatisch entfernt. [verändert nach 202]

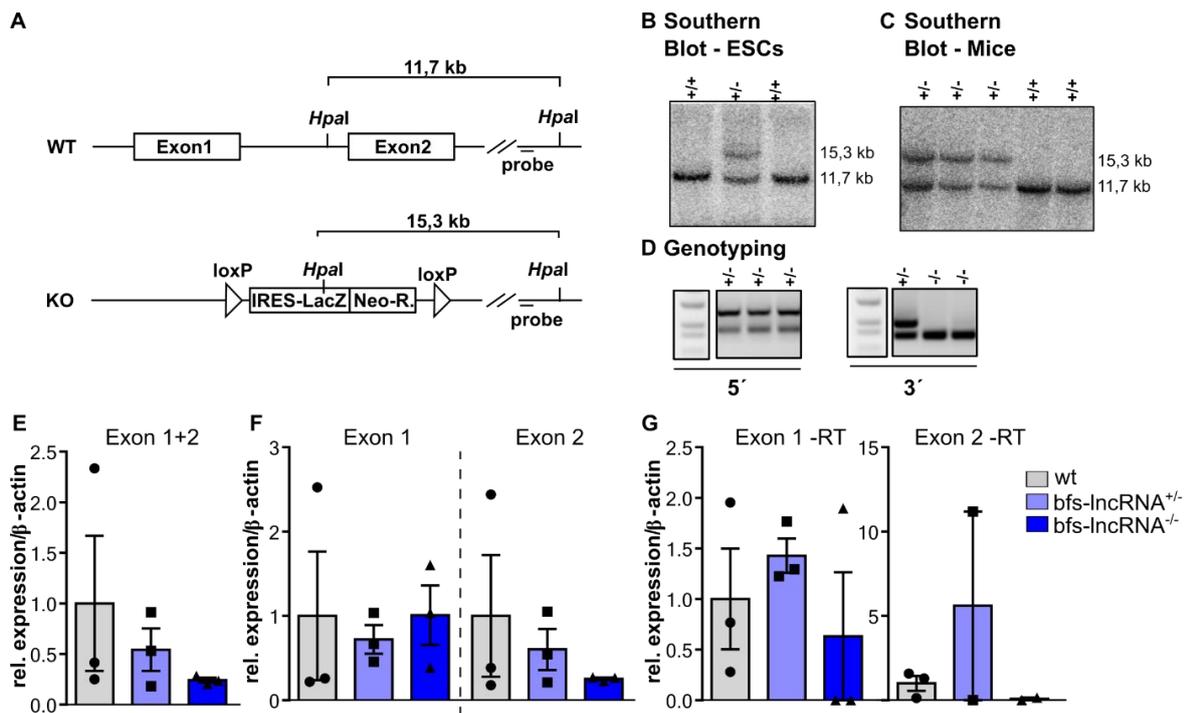


Abb. 7.2: Die genomische Deletion von bfs-lncRNA mittels klassischer homologer Rekombination ist unvollständig. (A) Schematische Darstellung des genomischen WT- und KO-Lokus der bfs-lncRNA. **(B)** Southernblot der mES-Zellen mittels spezifischer Sonden zur Überprüfung der 3'-Region auf erfolgreiche Rekombination. Die DNA der mES-Zellen wurde mittels *HpaI* verdaut und die Fragmentlängen mittels Southernblot überprüft. Wildtypische mES-Zellen, ohne erfolgreiche homologe Rekombination zeigten eine positive Bande einer Größe von 11,7 kb. Positive mES-Zellen hatten zusätzlich eine spezifische Bande bei 15,3 kb. **(C)** Southernblot der F1 Mausgeneration mittels spezifischer Sonden zur Überprüfung der 3'-Region auf erfolgreiche Rekombination **(D)** Genotypisierungs-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer zur Analyse der 3'- und 5'-Region der bfs-lncRNA nach homologer Rekombination. Im 5'-Bereich des Gens betrug die spezifische wt-Bande 419 bp und die KO-Bande 240 bp. Im 3'-Bereich des Gens betrug die spezifische wt-Bande 345 bp und die KO-Bande 228 bp. **(E-G)** q RT-PCR zur Analyse der Expression von bfs-lncRNA von Wildtypen, heterozygoten und homozygoten Tieren (n = 3 pro Gruppe; Ausnahme: KO und heterozygote: Exon 2 -RT; n = 2). Unter Verwendung genspezifischer Primer wurde die Expression von bfs-lncRNA sowohl Exonübergreifend (E), als auch spezifisch für die einzelnen Exonen (F) überprüft. Zur Kontrolle der Einzel-Exon PCRs wurde eine -RT Kontrolle durchgeführt (G). (Mittelwert ±SEM)

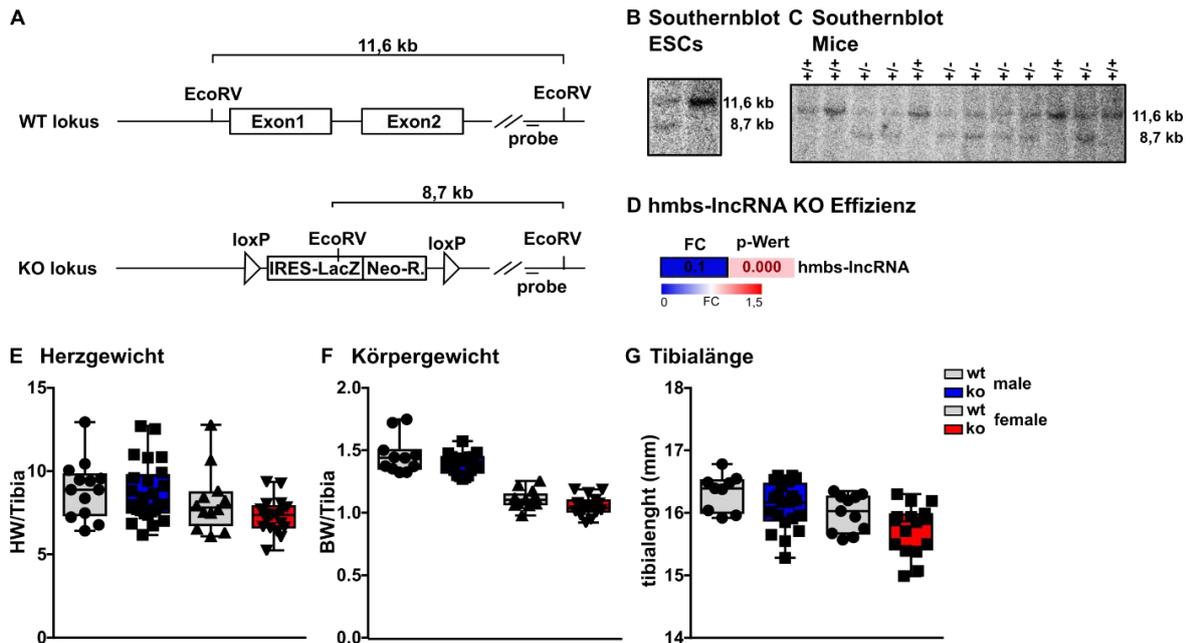


Abb. 7.3: hmbis-lncRNA KO-Mäuse haben keine Gewichtsveränderungen.. (A) Schematische Darstellung des genomischen WT-und KO-Lokus von hmbis-lncRNA. **(B)** Southernblot der mES-Zellen mittels spezifischer Sonden zur Überprüfung der 3'-Region auf erfolgreiche Rekombination. Die DNA der mES-Zellen wurde mittels *EcoRV* verdaut und die Fragmentlängen mittels Southernblot überprüft. Wildtypische mES-Zellen, ohne erfolgreiche homologe Rekombination zeigten eine Bande einer Größe von 11,6 kb. Positiv rekombinierte mES-Zellen haben zusätzlich eine spezifische Bande bei 8,7 kb. **(C)** Southernblot der F1 Mausgeneration mittels spezifischer Sonden zur Überprüfung der 3'-Region auf erfolgreiche Rekombination. **(D)** *Affymetrix* Transkriptom-Daten der *in vivo loss-of-function* Modell Herzen. Die hmbis-lncRNA ist in den KO-Tieren, nicht mehr detektiert im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern. (n = 5 pro Gruppe) **(E-G)** Analyse von Körpergewicht und Herzgewicht nach Verlust von hmbis-lncRNA von 8-10 Wochen alten Mäusen. Die Tibialänge (G) zeigte keine signifikante Veränderung der KO-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe). Die einzelnen Gewichtsdaten wurden daher jeweils auf die entsprechende Tibialänge normalisiert. Das Herzgewicht (E) der KO-Mäuse war nicht verändert, ebenso wie das Körpergewicht (F). (Mittelwert ± min.-max, Männchen: Wildtyp; n = 11 *hmbis-lnc* KO; n 21; Weibchen: Wildtyp; n = 13 *hmbis-lnc* KO; n 16 n = 13/16) (D-G) Für die Analyse wurden männliche sowie weibliche Tiere im Alter von 8 Wochen verwendet.

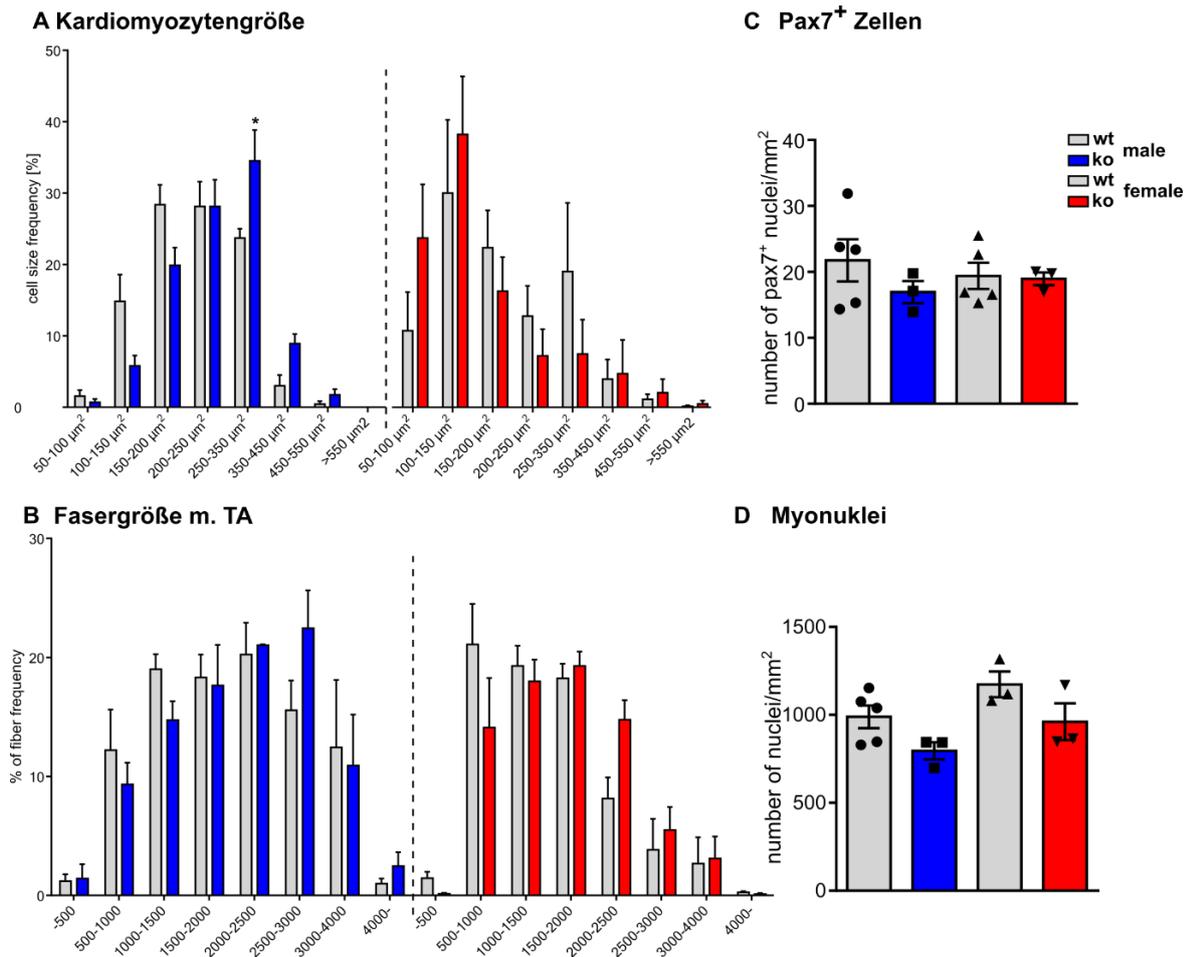


Abb. 7.4: Der Verlust von hmbs-lncRNA führt zu keinem offensichtlichen oder schwerwiegendem Phänotyp. Für die immunhistologische Analyse wurden männliche sowie weibliche Tiere im Alter von 8 Wochen verwendet. **(A)** Grafische Darstellung der Verteilung der Zellgrößen (%). Die Auswertung der immunhistologischen Analyse der Herzzellen von Mäusen nach Verlust der hmbs-lncRNA mittels WGA Färbung zeigte eine tendenzielle Veränderung der Größen der Kardiomyozyten in den KO-Tieren im Vergleich zur WT-Kontrolle (Männchen: n = 3/5; Weibchen: n = 5/7). Diese Verlagerung in die Richtung größerer Zellen war jedoch nur im Falle der Zellen im Bereich 250-350 μm^2 signifikant. **(B)** Grafische Darstellung der Auswertung der immunhistologischen Analyse des *Musculus Tibialis anterior* (m. TA) mittels Lamininfärbung zur Bestimmung der Fasergrößen. Dargestellt ist die Häufigkeit mit welcher die Fasergrößen jeweils im TA vorkommen. Die statistische Auswertung mittels 2-way Anova zeigte keinerlei signifikante Veränderungen (Männchen: n = 3/5; Weibchen: n = 5/7). **(C)** Grafische Darstellung der Auswertung der immunhistologischen Analyse des m. TA mittels Pax7 Färbung zur Bestimmung der Anzahl von Satelliten Zellen (MuSCs). Die Anzahl der Pax7-positiven Zellen per mm^2 ist nicht verändert im Vergleich WT gegen KO (Männchen: n = 5/3; Weibchen: n = 5/3). **(D)** Grafische Darstellung der Auswertung der immunhistologischen Analyse des m. TA mittels Dapi Färbung zur Bestimmung der Anzahl der Myonuklei. Die Anzahl der Myonuklei per mm^2 ist nicht signifikant verändert im Vergleich WT gegen KO (Männchen: n = 5/3; Weibchen: n = 3/3). (Mittelwert \pm SEM)

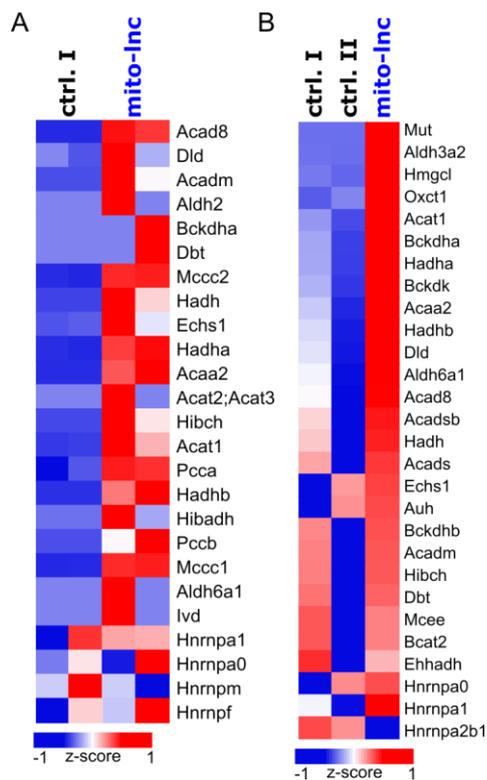


Abb. 7.5: Analyse des Interaktoms von *mito-Inc* mittels RNA-Pulldown. (A) Heatmap der massenspektrometrischen Analyse des RNA-Pulldown Experimentes zur Interaktion von *mito-Inc* im Vergleich mit einer Kontroll-*Inc*RNA. Dargestellt ist der z-Wert der Detektionswerte der einzelnen Triplikate einer Auswahl von Proteinen (n = 2). Die *in vivo* transkribierten-*Inc*RNAs wurden mit BAT Gewebelysate inkubiert und das Interaktom massenspektrometrisch analysiert. Mit *mito-Inc* konnten diverse Enzyme des BCAA Metabolismus angereichert werden. RNA-Bindeproteine, wie HNRNP's konnten mit beiden RNAs angereichert werden. **(B)** Heatmap der massenspektrometrischen Analyse des RNA-Pulldown Experimentes zur Interaktion von *mito-Inc* im Vergleich zweier Kontroll-*Inc*RNAs. Dargestellt ist der z-Wert der gemittelten Detektionswerte der einzelnen Triplikate der detektierten Proteine. Für den RNA-Pulldown wurden Proteinlysate von wildtypischen Herzen

verwendet (n = 3). Dabei wurde je ein individuelles Herzlysate für je eines der Triplikate der *Inc*RNAs verwendet.

WT CM's - Immunhistochemie (rISH-PLA)

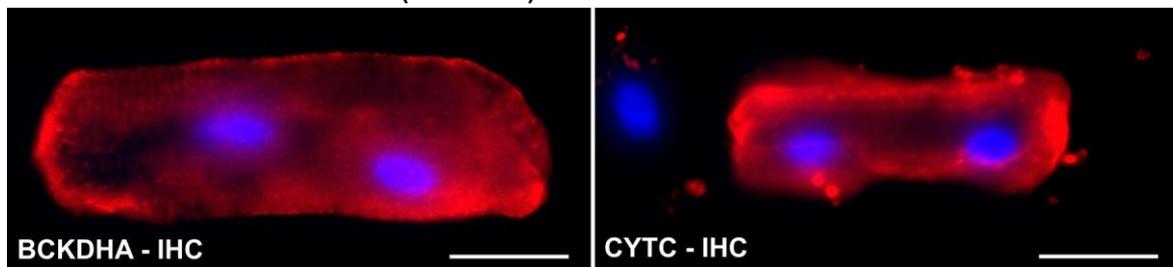


Abb. 7.6: Immunhistochemie BCKDHA und CYTC auf WT-Kardiomyozyten. Die Immunhistochemische Detektion der BCKDHA (rot, li) und von CYTC (rot, re) zeigte eine nahezu homogene Verteilung beider Proteine innerhalb der wildtypischen Kardiomyozyten (WT-KM's). Die Zellkerne wurden mittels Dapi Färbung (blau) markiert. Skala = 5 µm. Blau: Färbung mit Dapi (353nm). Rot: Färbung Sonden/Antikörper (594nm).

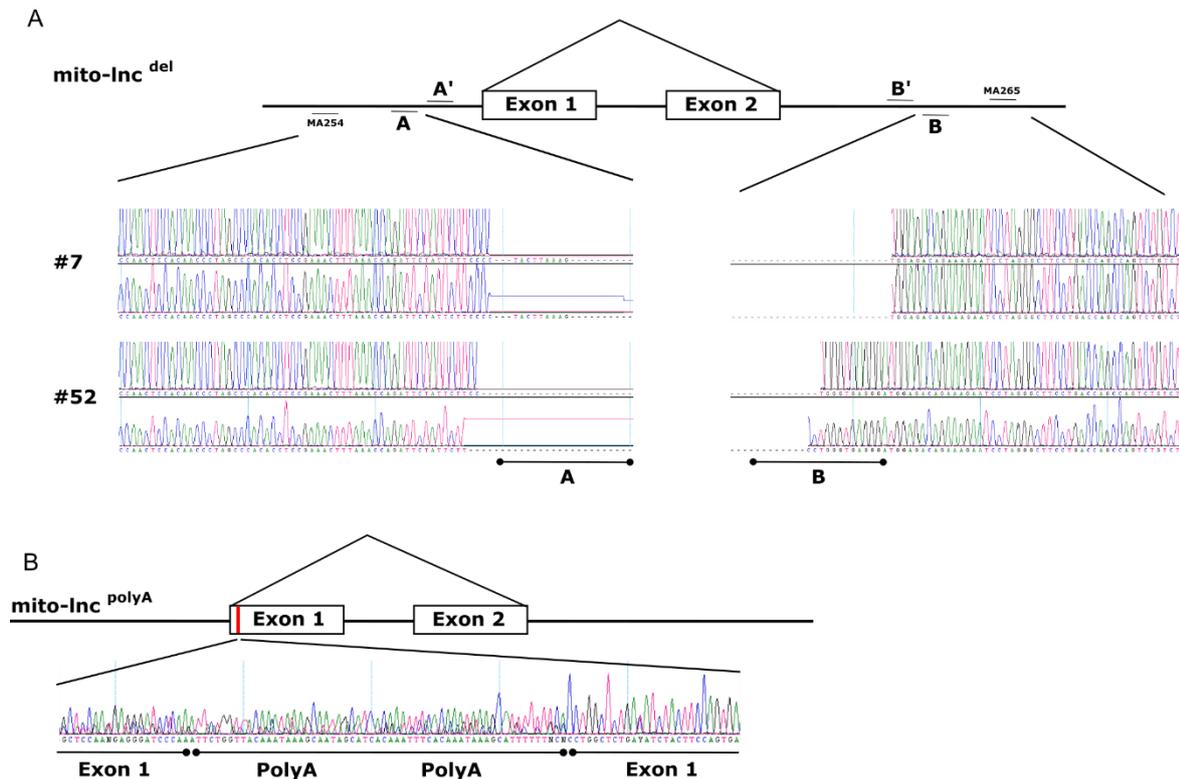


Abb. 7.7: *in vivo* Deletion von *mito-Inc* mittels CRISPR/CAS9 System. (A) Schematische Darstellung der Cas9n medierten genomischen Deletion beider Exone von *mito-Inc* und der entsprechenden Sequenzierung der ES Zellklone #7 und #52. Beide ESC Klone wurden zur Generierung des *in vivo* Mausmodells verwendet. **(B)** Schematische Darstellung der Cas9 medierten polyA Insertion innerhalb des ersten Exons von *mito-Inc* und der entsprechenden Sequenzierung der mES-Zellen.

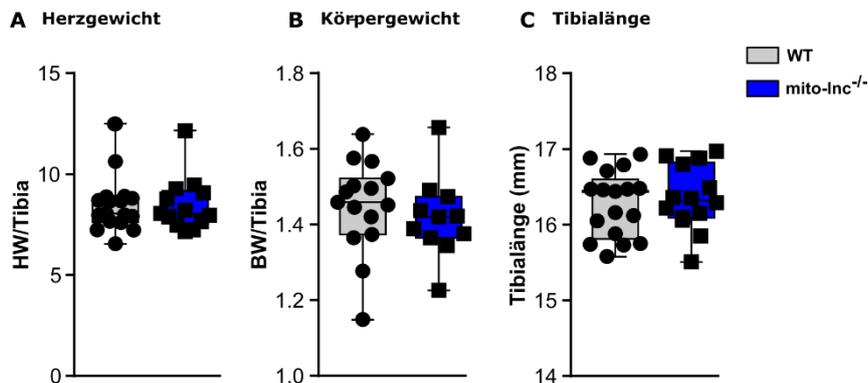


Abb. 7.8: Der Verlust von *mito-Inc* führt in 8 Wochen alten Tieren zu keinem erhöhten Herzgewicht der KO-Mäuse. Analyse von Körpergewicht und Herzgewicht nach Verlust von *mito-Inc* von 8 Wochen alten Mäusen. Die Tibiallänge ziegte keine signifikante Veränderung der *mito-Inc*^{-/-} im Vergleich zur *mito-Inc*^{+/+}-Kontrollgruppe **(C)**. Die einzelnen Gewichtsdaten wurden daher jeweils auf die entsprechende Tibiallänge normalisiert. **(A-C)** Analyse der adulten (8 Wochen) Tiere mit vollständiger genomischer deletion von *mito-Inc* (*mito-Inc*^{-/-}) **(A)** Das Herzgewicht der *mito-Inc*^{-/-}-Mäuse war nicht verändert **(B)** Das Körpergewicht der *mito-Inc*^{-/-} Tiere war nicht verändert. **(C)** Die Tibiallänge der *mito-Inc*^{-/-} Tiere war nicht verändert. (Mittelwert ± min.-max. Wildtyp; n = x, *mito-Inc*^{del} KO; n = x). (HW = Heartweight; BW = Bodyweight)

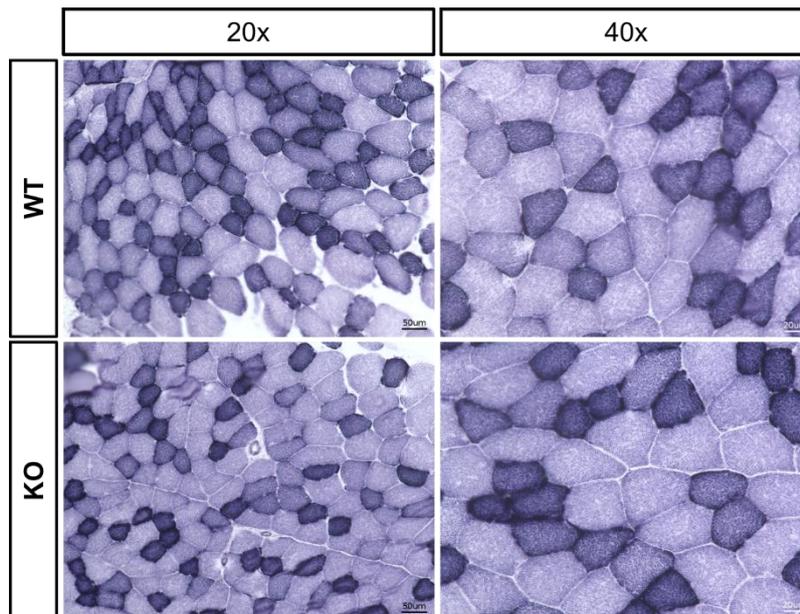


Abb. 7.9: Succinat-Dehydrogenase Färbung der Skelettmuskulatur von *mito-Inc* KO-Tieren im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren. Zur morphologischen Analyse der Mitochondrien Netzwerke im Skelettmuskel von *mito-Inc* knockout Tieren wurde eine Succinat Dehydrogenase Färbung von adulten (8 Wochen) Mäusen durchgeführt. Der, durch die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase gebildete blaue Farbstoff ermöglicht die mikroskopisch sichtbare Detektion der Mitochondrienverteilung innerhalb der Muskelfasern. Es konnte kein wesentlicher Unterschied innerhalb der Mitochondrienverteilung im Vergleich von WT und KO gezeigt werden.

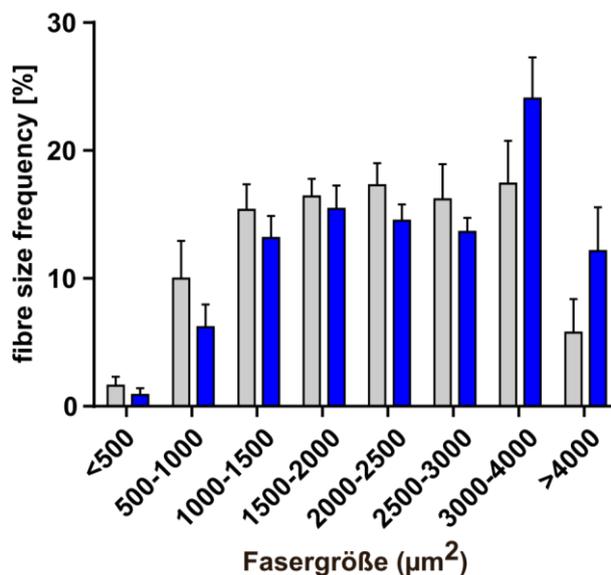
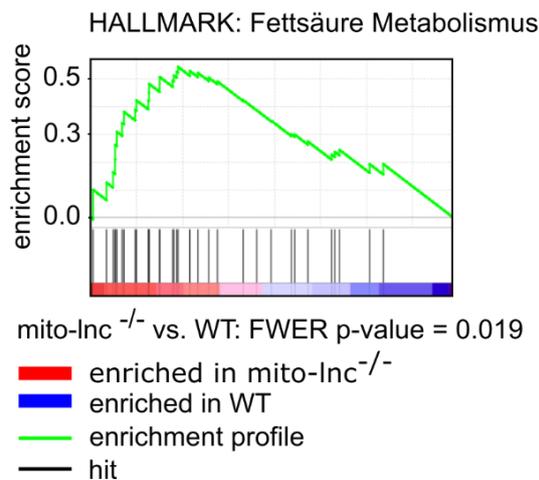


Abb. 7.10: Der Verlust von *mito-Inc* hat keine Hypertrophie der Muskelfasern zur Folge. Auswertung der Analyse der Fasergrößen im *Musculus Tibialis anterior* (m. TA) mittels Lamininfärbung. Dargestellt ist die Verteilung der Fasergrößen (%) im WT- und KO-Muskel. (Mittelwert ± SEM, Wildtyp; n = 8, *mito-Inc* KO; n = 9).

A Heart



B BAT

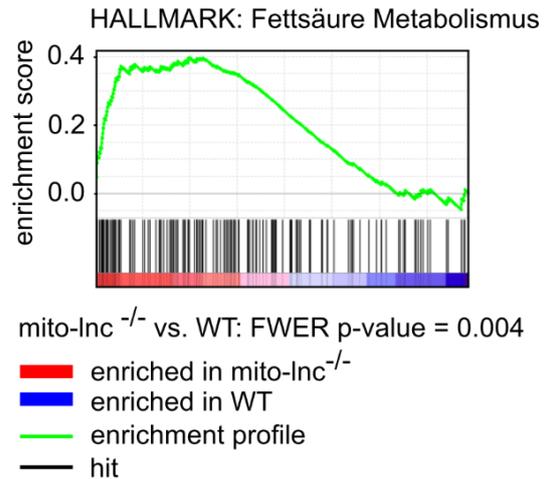
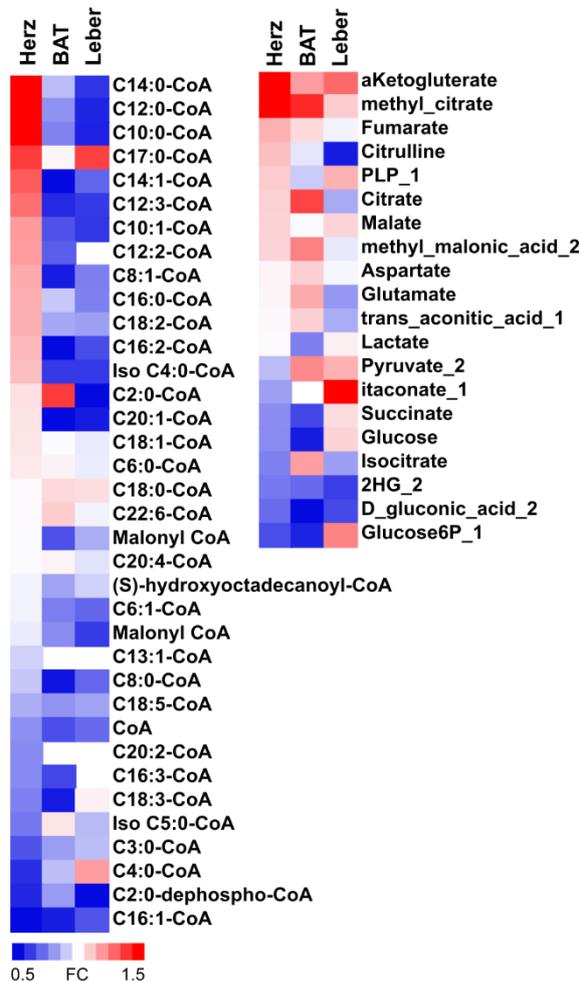


Abb. 7.11: Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in transkriptionellen Veränderungen von metabolisch relevanten Genen. (A+B) Die GSEA der Transkriptomdaten zeigte eine signifikante Anreicherung von Genen aus dem Genset HALLMARK: Fettsäuremetabolismus im Herzen (C) und im BAT (D) mit einem entsprechenden FWER p-Wert von 0,019 und 0,004. (Herz: Wildtyp; n = 7, *mito-Inc* KO; n = 7, BAT: Wildtyp; n = 4, *mito-Inc* KO; n = 4). (BAT = braunes Fett)

A



B

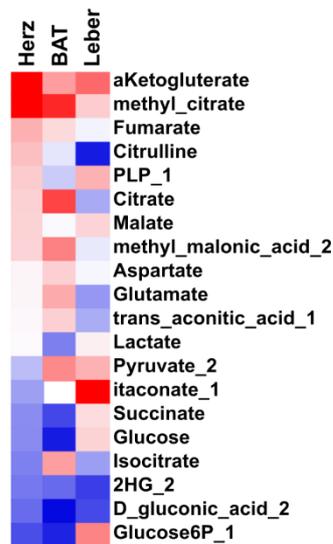


Abb. 7.12: Der Verlust von *mito-Inc* resultiert in einer Akkumulation von Aminosäuren und deren Metaboliten im Herzgewebe. (A) Heatmap der Verhältnisse von KO/WT der CoASH's (pmol/mg) gemessen im Herz, BAT und der Leber. (B) Heatmap der Verhältnisse von KO/WT der TCA-Metabolite (pmol/mg) gemessen im Herz, BAT und der Leber. (Mittelwert \pm min.-max, Wildtyp; n = 9, *mito-Inc* KO; n = 8, Die Kontrollgruppe (WT) bestehend aus wildtypischen Geschwistertieren wurde auf 1 gesetzt) (BAT = braunes Fett)

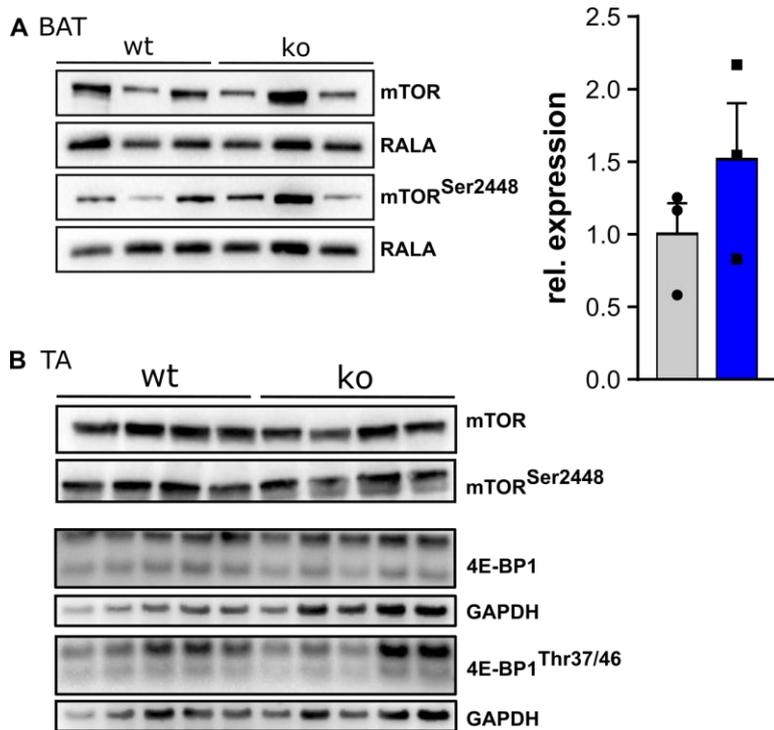


Abb. 7.13: Die Aktivierung von mTOR im *mito-Inc* KO. (A) Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+} BAT zur Analyse von mTOR^{Ser2448} (289 kDa). Das Level von mTOR^{Ser2448} wurde normalisiert auf die Gesamtmenge von mTOR (289 kDa). Die Menge an mTOR^{Ser2448} in *mito-Inc*^{-/-} BAT war tendenziell höher im Vergleich zur Kontrolle, jedoch statistisch nicht signifikant (einseitiger Mann-Whitney-Test;

p = 0,2). (Mittelwert ± SEM, Wildtyp; n = 3, *mito-Inc* KO; n = 3). **(B)** Westernblot von Proteinlysaten aus *mito-Inc*^{-/-} und *mito-Inc*^{+/+} TAs zur Analyse des p-Status von mTOR^{Ser2448} (289 kDa) und 4E-BP1^{Thr37/46} (20-25 kDa) Wildtyp; n = 5, *mito-Inc* KO; n = 5).

Danksagung

Ich danke ganz herzlich...

meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Böttger, für die hervorragende Betreuung die viele Geduld und die zahlreichen sachlichen Diskussionen.

Dr. rer. nat. habil. Thomas Braun, für die Finanzierung dieses Projektes und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen während der Seminare.

Prof. Dr. Adrian Dorresteyn, für die Betreuung meiner Dissertation an der Universität, sowie seiner immerwährenden Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Verlauf meines Studiums.

der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), für die Förderung meines Projektes im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) Transregio 267: Nichtkodierende RNA im kardiovaskulären System.

Sven Zukunft von der Metabolomics Core Facility an der Goethe Universität Frankfurt, für die Kollaboration und den direkten Beitrag zu dieser Arbeit.

meiner Arbeitsgruppe, für die respektvolle Zusammenarbeit, den Zusammenhalt und die Diskussionsbereitschaft. Insbesondere Christian, der mir schon von Beginn an mit Rat und Tat stets zur Seite stand. Besonderer Dank geht an Melissa und Sylvia für die immerwährende Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

allen Mitarbeitern des MPI HLR, welche mir stets geholfen und mich unterstützt haben. Johannes Grauman, Sylvia Jeratsch und den Mitarbeitern der Massenspektrometrie, zum direkt Beitrag dieser Arbeit. Vor allem Ale, Selina, Krishna und Poonam, welche immer ein offenes Ohr hatten und mir stets mit konstruktiver Kritik zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt auch den Tierpflegern für ihre zuverlässige Arbeit.

meinen Freunden, Mitbewohnern und Lieblingsemenschen, für die Unterstützung und ihr Verständnis für meine andauernde Abwesenheit. Besonders für das Ertragen meiner Monologe und das viele in den Arm nehmen.

meiner Familie, für die bedingungslose Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen!