

Moritz Helmut Kern

Untersuchung der Funktion des mTORC1-Inhibitors PRAS40 in kardialen Hypertrophiemechanismen

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Dr. med. Mirko Völkers

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von PRAS40 im Kontext kardialer Hypertrophiemechanismen beleuchtet. Als Inhibitor von mTORC1 ist das Protein bekannt für seine Funktion als Regulator der Translation von Proteinen. Weiterhin erforscht ist die positive Beeinflussung der kardialen Pumpfunktion im Rahmen einer, durch eine pathologische Erhöhung der Nachlast induzierten kardialen Hypertrophie bei einer PRAS40-Überexpression. Die bisherige Einordnung von PRAS40 als Inhibitor von mTORC1 konnte durch *in vitro* KD-Experimente per Western Blot bestätigt werden.

Ein zentrales Thema war die Aufdeckung neuer Netzwerke proteinogener Interaktionen durch die Identifizierung bisher unbekannter Bindungspartner von PRAS40 mittels APEX2. Diese neuartige Methode erlaubt die, in Form einer Biotinylierung stattfindende, Markierung interagierender Proteine in lebenden Zellen *in vitro* unter variablen metabolischen Bedingungen. Dazu wurde erfolgreich ein APEX2-PRAS40-Fusionsprotein kloniert und mit großer methodischer Vielfalt dessen korrekte Expression in HEK-T-Zellen, die Funktionalität bezüglich der Homologie zur Funktion des PRAS40-WT und der APEX2-Biotinylierungsreaktion sowie die spezifische Isolation der durch das Konstrukt biotinylierten Proteine nachgewiesen. Validiert wurden diese Ergebnisse durch parallel durchgeführte Kontrollexperimente mit kommerziell erhältlichen APEX2-Fusionsproteinen. Diese gleichzeitig als „Schablone“ für die APEX2-PRAS40-Auswertung dienenden Kontrollen demonstrierten eine hohe topographische und funktionelle Spezifität. Die Auswertung der aus einer massenspektrometrischen Analyse der gewonnenen Proben resultierenden Listen von Interaktionspartnern erfolgte durch die Einspeisung dieser Daten in die Gene Ontology. Dabei konnte sowohl bei ausreichendem Nährstoffangebot als auch bei Nährstoffdeprivation eine starke Assoziation von PRAS40 mit der Struktur und der Funktion von Mikrotubuli nachgewiesen werden. Zudem legen die detektierten Proteine eine weitere, mTORC1-unabhängige Regulation der Proteintranslation durch PRAS40 nah. Aufgrund der nicht

erfolgten Detektion von mTORC1 und RAPTOR sollte sich an diese Arbeit allerdings eine weitergehende Analyse der generierten Daten anschließen.

Die Vermutung der Beteiligung von PRAS40 an Prozessen des Zellwachstums und der Organisation des Cytoskeletts wurde durch die Messung der Zellgröße isolierter adulter Kardiomyozyten von Sham- und TAC-operierten PRAS40-WT- und KO-Mäusen bestätigt. Dass es in ACM von TAC-operierten PRAS40-KO-Mäusen zu einer geringeren Zunahme der Zellgröße kam als in TAC-operierten WT-Mäusen, demonstriert in Zusammenschau mit den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit, dass PRAS40 in seiner aktiven Form einerseits die Translation von Proteinen hemmt, andererseits gleichzeitig für das Zellwachstum benötigt wird. Die Klonierung von PRAS40-Punkt- und -Deletionsvarianten stellt die Grundlage für die Erforschung determinierter Bereiche des Proteins in Form von Proteinfragmenten und Phosphorylierungsstellen dar. Zur Beurteilung, ob PRAS40 als Ganzes oder in Teilen als therapeutisches Zielprotein genutzt werden kann, ist es notwendig, mit den so erforschbaren Varianten eine Vertiefung des funktionellen Verständnisses von PRAS40 zu erreichen. Perspektivisch sollte *in vitro* und *in vivo* eine Analyse der Varianten bezüglich der Funktion im mTORC1-Signalweg (beispielsweise durch eine Überexpression der Konstrukte) sowie der Auswirkung auf die einzelnen ACM *in vitro* als auch gesamtkardial *in vivo* erfolgen.

Die Messung von Calciumtransienten in ACM von Sham- und TAC-operierten PRAS40-WT- und -KO-Mäusen im Rahmen orientierender Vorversuche lieferte keine signifikanten Unterschiede. Perspektivisch ist daher eine Wiederholung der Versuche mit einer größeren Anzahl inkludierter Tiere angezeigt. Vielversprechend ist, dass in der Tendenz eine funktionelle Einschränkung der TAC-operierten ACM von PRAS40-WT- und -KO-Mäusen an der deutlich verlängerten Latenz bis zum Erreichen der maximalen Anstiegs- und Abnahmegeschwindigkeit der Calciumtransienten zu beobachten ist.

In der Zusammenschau der in dieser Arbeit erzielten Forschungsergebnisse bestätigt PRAS40 seine Position als potenzielles Zielprotein für neue Behandlungsansätze in der Therapie von kardialer Hypertrophie und der damit verbundenen Reduktion der Pumpfunktion des Herzens. Perspektivisch haben die mutierten PRAS40-Konstrukte sowie das APEX2-PRAS40-Konstrukt das Potenzial, eine weitere tiefergehende Analyse der Funktion von PRAS40 sowie der potenziellen Langzeitfolgen einer Einflussnahme auf PRAS40 auf Einzelzell-Ebene und gesamtkardialer Ebene zu ermöglichen.

Langfristig wird die Überführung dieser Ergebnisse der Grundlagenforschung hin zur klinischen Relevanz angestrebt und somit die Translation *From bench to bedside* gelingt. Ziel

ist es, die bisher deutlich limitierten Therapiemöglichkeiten der Kardiomyopathie in Form des konservativen medikamentösen und des herzchirurgischen Ansatzes zu erweitern.