

DISSERTATION

Der Transkriptionsfaktor EB (Tfeb) begünstigt unter chronischem myokardialen Stress die Entstehung einer Herzinsuffizienz

-

The Transcription Factor EB (Tfeb) promotes the development of heart failure under conditions of chronic myocardial stress

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Sebastian Wundersitz

Erstbetreuer: Prof. Dr. Jens Fielitz  
Datum der Promotion: 29.11.2024



# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	6
Abstract	8
1. Einleitung	10
2. Methodik	13
2.1 Klonierung	13
2.2 Produktion der Adeno-assoziierten Viren	15
2.3 Versuchstierkundliche Maßnahmen	15
2.4 Echokardiographie	17
2.5 Muskel- und Organentnahme	17
2.6 Histologie	18
2.7 RNA-Isolation, Reverse Transkription, qRT-PCR	19
2.8 Proteinextraktion, SDS-PAGE und Western Blot	22
2.9 RNA-Sequenzierung	23
2.10 Statistische Auswertung	24
3. Ergebnisse	25
3.1 AAV9-Tfeb induziert unter TAC eine Herzinsuffizienz	25
3.2 AAV9-Tfeb aggraviert Stress-induzierte interstitielle Umbauprozesse	25
3.3 Die TAC-induzierte kardiale Stressreaktion wird verstärkt durch AAV9-Tfeb	26
3.4 AAV9-Tfeb induzierte eine ALP Aktivierung unter TAC	27
4. Diskussion	29
Literaturverzeichnis	32
Eidesstattliche Versicherung	36
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	37
Druckexemplar der Publikation	38
Curriculum Vitae	76
Publikationsliste	77
Danksagung	78

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer-Paar zur Tfeb-Amplifikation	13
Tabelle 2: Reaktionsprotokoll der Polymerase-Kettenreaktion	14
Tabelle 3: Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion	14
Tabelle 4: Protokoll der Picrosirius Red Färbung	18
Tabelle 5: Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	19
Tabelle 6: Reaktionsprotokoll der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	20
Tabelle 7: Primer-Paare zur Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	20

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ALP	Autophagie-Lysosom Signalweg (autophagy lysosome pathway)
EF	Ejektionsfraktion
FS	Verkürzungsfraktion (fractional shortening)
IVStH	interventrikuläre Septumdicke (interventricular septum thickness)
Luc	Luciferase
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
Mm	Mus musculus
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PWth	Hinterwanddicke (posterior wall thickness)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit (Real-Time) Polymerase Kettenreaktion
TAC	Konstriktion der Aorta transversa (transverse aortic constriction)
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
UPS	Ubiquitin-Proteasom System

## Zusammenfassung

### Hintergrund

Hämodynamischer Stress induziert eine kompensatorische myokardiale Hypertrophie, was einen Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz darstellt. Molekulare Mechanismen, die diesen Prozess beeinflussen sind unzureichend charakterisiert. Der Autophagie-Lysosom Signalweg (ALP), welcher eine wesentliche Rolle bei der zellulären Proteinhomöostase und dem Abbau von Proteinen und Zellorganellen einnimmt, zeigt beim Übergang von myokardialer Hypertrophie zur Herzinsuffizienz Aktivitätsunterschiede auf. Der Transkriptionsfaktor EB (TFEB) ist ein wichtiger Regulator der Expression von ALP-Genen und letztlich bei der Steuerung der ALP-Aktivität. Eine Beteiligung bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz wurde bisher nicht überprüft.

### Hypothese

Es wurde die Hypothese geprüft, ob TFEB am Übergang von der kardialen Hypertrophie in die Herzinsuffizienz beteiligt ist.

### Methodik

Durch Adeno-assoziierte virale Vektoren Typ 9 (AAV9) wurde *Tfeb* in den Kardiomyozyten von erwachsenen C57BL/6J Mäusen überexprimiert (AAV9-Tfeb), wobei die Kardiomyozyten-spezifische Expression durch Verwendung eines spezifischen Promoters (Myosin Leichtketten (MLC) 2v Promoter) erfolgte. AAV9-Luciferase (AAV9-Luc) diente als Kontrollvektor. Es erfolgte eine Operation mit Konstriktion der transversen Aorta (transverse aortic constriction, TAC, 27Gauge, AAV9-Luc: n=9, AAV9-Tfeb: n=14) oder eine Scheinoperation (Sham, AAV9-Luc: n=9, AAV9-Tfeb: n=9). Präoperativ sowie 4 Wochen postoperativ wurde die Struktur und Funktion der Herzen der Versuchstiere echokardiographisch untersucht. Durch Sequenzierung der nächsten Generation von RNA (RNA-Seq), die aus dem interventrikulären Septum isoliert wurde, erfolgte die Analyse einer veränderten Genexpression und die Identifizierung von induzierten Signalwegen unter Sham- bzw. TAC-Operation sowie Überexpression von *Tfeb* oder *Luc*. Die weitere Charakterisierung von Veränderungen erfolgte mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, Western Blot und Histologie.

## **Ergebnisse**

Die AAV9-Tfeb behandelten Tiere zeigten eine effektive *Tfeb* Expression im Herzen. Sham-operierte AAV9-Tfeb und AAV9-Luc Tiere zeigten geringfügige Unterschiede in Morphologie und Genexpression. In den AAV9-Luc Tieren induzierte die TAC-Operation eine kompensierte myokardiale Hypertrophie. Im Unterschied dazu führte die TAC-Operation nach *Tfeb*-Überexpression zu einer linksventrikulären Dilatation und eine Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion. In der weiteren Charakterisierung zeigte sich eine Zunahme des Herzgewichts und eine höhere Expression von myokardialen Stressmarkern in der TAC-operierten AAV9-Tfeb Gruppe verglichen mit AAV9-Luc. Durch RNA-Sequenzierung, quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion und Western Blot konnte eine stärkere Aktivierung des ALP nachgewiesen werden.

## **Schlussfolgerung**

In einem Modell von hämodynamischem Stress führte die Überexpression von *Tfeb* zu einer Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion. Dies war begleitet von einer erhöhten Aktivität des Autophagie-Lysosom Signalwegs.

## Abstract

### Background

Hemodynamic stress induces a compensatory myocardial hypertrophy, one of the risk factors leading to heart failure. Molecular mechanism involved in this process are not well understood. The autophagy-lysosome pathway, a protein and organelle degrading system, assures protein homeostasis and is shown to be regulated during this process. The transcription factor EB (TFEB) is a key factor in the regulation of ALP gene expression and activation of autophagy. If TFEB is involved in the progression from myocardial hypertrophy to heart failure still remains uncertain.

### Hypothesis

The hypothesis was tested if TFEB is involved in the progression from cardiac hypertrophy to heart failure.

### Methods

Adeno-associated viral vectors type 9 (AAV9) were used to overexpress *Tfeb* in cardiomyocytes of adult C57Bl/6J mice (AAV9-Tfeb). Cardiomyocyte-specific expression was ensured by using a specific promoter (myosin light chain (MLC) 2v promoter). AAV9-Luciferase (AAV9-Luc) was used as a control. Mice were either exposed to transverse aortic constriction (TAC, 27G, AAV9-Luc: n=9, AAV9-Tfeb: n=14) or Sham operation (Sham, AAV9-Luc: n=9, AAV9-Tfeb: n=9). Echocardiography was performed prior to and 4 weeks after operation to examine heart structure and function. Next-generation sequencing of RNA (RNA-Seq) of tissue isolated from the interventricular septum was used to identify differentially regulated signaling pathways under conditions of sham and TAC operation as well as overexpression of *Tfeb* or *Luc*. Differences were further analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction, Western Blot and histology.

### Results

AAV9-Tfeb treated mice showed effective overexpression of *Tfeb* in heart tissue. Sham operated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb treated animals only showed minor differences in morphology and gene expression. In AAV9-Luc, TAC operation induced a compensated myocardial hypertrophy. In contrast, TAC induced left-ventricular dilatation and strong reduction in left ventricular ejection fraction after *Tfeb* overexpression. AAV9-Tfeb TAC



mice showed an increase in heart weight and higher expression of stress markers compared to AAV9-Luc. RNA-sequencing, quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction and Western Blot identified activation of the ALP.

### **Conclusion**

In a model of hemodynamic stress, *Tfeb* overexpression induced heart failure with reduced ejection fraction. This was associated with increased autophagy-lysosome pathway gene expression.

# 1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, welches durch strukturelle und/oder funktionelle Veränderungen zu erhöhten ventrikulären Füllungsdrücken sowie einem inadäquatem Herzzeitvolumen unter Belastung und/oder in Ruhe führt.(1) Die Prävalenz ist altersabhängig. Im Alter unter 55 Jahren wird sie mit ca. 1% angegeben und steigt auf über 10% ab dem 70. Lebensjahr.(1) Das Lebenszeitrisko ab dem 45 Lebensjahr eine Herzinsuffizienz zu entwickeln beträgt 20-45%.(2) In einer Gesellschaft mit steigendem Durchschnittsalter und steigender Lebenserwartung kommt diesem Syndrom somit eine zunehmende Bedeutung zu. Im Zeitraum von 2005 bis 2014 stiegen die Hospitalisierungsraten aufgrund einer Herzinsuffizienz an und ein weiterer Anstieg in der Zukunft wird prognostiziert.(3) Trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und der Therapie ist die Erkrankung fortschreitend und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Eine 5-Jahres Mortalität von 66% konnte in einer US-amerikanischen Beobachtungsstudie ermittelt werden.(4)

Ätiologisch ist die Herzinsuffizienz auf akute und chronische Schädigungen zurückzuführen. Als wesentliche Risikofaktoren gelten ein hoher Blutdruck, eine koronare Herzerkrankung, ein Diabetes mellitus, Übergewicht und Rauchen.(5, 6)

Eine andauernde Druckbelastung des linken Ventrikels durch beispielsweise eine arterielle Hypertonie führt zu maladaptiven kardialen Umbauprozessen. Auch wenn diese Hypertrophie zunächst ein adaptiver Prozess ist, der die erhöhte Wandspannung kompensieren soll, ist diese ein Risikofaktor für den plötzlichen Herztod und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz.(7)

Einige Mechanismen, die zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beitragen, konnten in vorherigen experimentellen Arbeiten dargestellt werden.(8) Dennoch bleibt der genaue Mechanismus der kardialen Stressreaktion mit Entwicklung einer Hypertrophie und letztlich einer Herzinsuffizienz unklar.

Ein wesentlicher Mechanismus, der diesem Prozess zu Grunde liegen könnte, ist eine Störung der Proteinhomöostase in den Kardiomyozyten. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Proteinsynthese und ein verstärkter Proteinabbau zum Auftreten einer kardialen Hypertrophie beitragen könnte.(8)

In Herzmuskelzellen hat das Ubiquitin-Proteasom System mit seinen E3 Ligasen *Muscle specific RING-finger* (MuRF) Proteinen 1, 2 und 3 eine Schlüsselrolle im Proteinabbau. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fehlregulation in diesem System zu maladaptiver kardialer Hypertrophie und einer hypertrophen Kardiomyopathie führt.(9-12)

Ein weiteres wichtiges System stellt das Autophagie-Lysosom System (autophagy-lysosome pathway, ALP) dar.(13-15) Im Gegensatz zum UPS, welches vor allem langlebige oder fehlgefaltete Proteine abbaut, ist das ALP in der Lage Proteine, unlösliche Proteinaggregate und ganze Zellorganellen bis hin zu Mitochondrien abzubauen.(16) Unter physiologischen Bedingungen ist Autophagie für den Erhalt der normalen zellulären Funktion und zum Erhalt der Proteinhomöostase notwendig. Sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte ALP Aktivität konnten mit kardialen Pathologien in Verbindung gebracht werden.(13, 17-19) Nach Induktion einer Stenose der Aorta thoracica ascendens, mit der die Nachlast des linken Ventrikels erhöht und dadurch eine Hypertrophie des linken Ventrikels ausgelöst wird, zeigt sich nach 48 Stunden eine Induktion von Autophagie, welche auch 3 Wochen und 8 Wochen nach OP weiterhin erhöht ist.(13, 20) Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des ALP eine maladaptive Reaktion der Kardiomyozyten auf hämodynamischen Stress ist und zur Dysfunktion der Kardiomyozyten führt.(13) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors Autophagie induzieren kann.(21, 22)

Dem Transkriptionsfaktor EB (Transcription factor EB, TFEB) kommt eine Schlüsselrolle innerhalb des ALP zu. Durch TFEB werden Gene der frühen und späten lysosomalen Biogenese, der Autophagosom Formation und der Fusion von Lysosomen und Autophagosomen zu Autophagolysosomen sowie von Enzymen für die Proteindegradation induziert.(23, 24) Im Skelettmuskel konnte durch eine Angiotensin-II induzierte TFEB-Aktivierung eine Induktion der MuRF1 Expression und nachfolgend eine Muskelatrophie über das Ubiquitin-Proteasom System induziert werden.(25)

Aufgrund seiner zentralen Funktion bei der Regulation des ALP ist der Einsatz von TFEB in der Behandlung von lysosomalen Stoffwechselerkrankung und Erkrankungen, die durch Proteinakkumulation ausgelöst werden, naheliegend. Beim Morbus Pompe, einer Glycogenspeichererkrankung verursacht durch einen Mangel an lysosomaler alpha-Glucosidase, kommt es zur Akkumulation von Proteinen in Lysosomen und Autophagosomen, da diese dort nicht mehr abgebaut werden können. Diese Glycogenspeichererkrankung

führt letztlich zu einer Kardiomyopathie und pathologischen Veränderungen des Skelettmuskels.(26) In Zellkultur- und Tiermodellen zeigte sich, dass eine *Tfeb*-Überexpression zu einer Clearance des Glykogens führt.(27) Zudem konnte die Vector-basierte Überexpression von *Tfeb* in einem Mausmodell ALP induzieren und so die Muskelfunktion erhalten.(28) Weitere experimentelle Ansätze zur Behandlung des Morbus Gaucher und der amyotrophen Lateralsklerose zeigten ebenfalls vielversprechende Ansätze.(29, 30)

Trotz aller Erkenntnisse ist die Funktion von TFEB und nachgeschalteten Proteinabbauprozesse im Kontext von myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz nicht vollständig geklärt. Zum besseren Verständnis der myokardialen Reaktion auf chronischen Stress und letztlich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer *Tfeb*-Überexpression auf Herzmuskelzellen sowohl im Kontext von hämodynamischem Stress als auch unter physiologischen Bedingungen.(31) Weiterhin soll untersucht werden, ob dies zu einem myokardialen Remodeling beiträgt oder diesem Prozess entgegenwirkt. Ferner soll gezeigt werden, dass Autophagie hierdurch induziert wird und zu diesem Prozess beiträgt.

## 2 Methodik

### 2.1 Klonierung

Für den geplanten Tierversuch mit in vivo Überexpression von Tfeb durch Adeno-assoziierte Viren war es notwendig, Tfeb cDNA in das AAV9-Expressionsplasmid zu klonieren. Basierend auf vorhergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Fielitz lag murine cDNA von *Tfeb* bereits in einem pcDNA3.1(+)/Flag-Plasmid (Invitrogen, USA) vor.(25) Es erfolgte eine Amplifikation mittels PCR mit in Tabelle 1 genannten Primern, die ich selbst generiert habe (Eurofins GmbH, Deutschland). Basierend auf den Herstellerangaben der Advantage® DNA-Polymerase (Clontech, USA) wurde das in Tabelle 1 gezeigte Temperaturprogramm gewählt. Tabelle 2 zeigt den verwendeten PCR-Ansatz. Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung des Produktes und zur Kontrolle der korrekten molekularen Größe. Unter UV-Licht wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und unter Verwendung eines NucleoSpin® Aufreinigungssets (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufbereitet.

Der AAV9-Expressionsvector (AG Müller, Heidelberg) wurden unter Nutzung des Restriktionsenzym XbaI (New England Biolabs, USA) und den entsprechenden Puffern nach Angaben des Herstellers für 10min bei 37°C behandelt. Es erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese mit Ausschneiden der entsprechenden Banden für das AAV9-Expressionsplasmid unter UV-Licht und Nutzung des oben genannten Aufreinigungssets.

**Tabelle 1:** Primer zur Tfeb-Amplifikation (eigene Darstellung)

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
Mm_Tfeb_XbaI_forward	5'-GCT CTA GAA TGG CTC AGC TCG CTC AG-3'
Mm_Tfeb_XbaI_reverse	5'-GCT CTA GAT CAC AGA ACA TCA CCC TCC TC-3'

**Tabelle 2:** Reaktionsprotokoll der Polymerase-Kettenreaktion (eigene Darstellung)

<b>PCR-Schritt</b>	<b>Zeiteinheit</b>	<b>Temperatur in °C</b>
1. Denaturierung	5min	95°C
Start Zyklus (Schritte 2-4)		
2. Denaturierung	45s	95
3. Anlagerung	30s	60
4. Elongation	2min	72
Ende Zyklus (Schritte 2-4), Wiederholung 40mal		
5. Elongation	10min	72°C

**Tabelle 3:** Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion (eigene Darstellung)

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen in µl</b>
Wasser	12
5x HD-Puffer	5
dNTP (10mM)	1
Primer Forward (5µM)	2
Primer Reverse (5µM)	2
cDNA (10ng/µl)	2,5
Advantage® HD-Polymerase	0,5

Mittels einer T4-DNA Ligase (New England Biolabs, USA) und entsprechenden Puffern erfolgte die Ligation von Tfeb cDNA und AAV9-Expressionsplasmid nach Herstellerprotokoll bei 14°C für 14h.

Unter Verwendung von elektrokompenten Escherichia coli XL1-blue (Stratagene, USA) und 100ng Plasmid-DNA erfolgte die Transformation durch Elektroporation. Die Bakterien wurden anschließend in SOC-Medium (10g Trypton; 2,5g Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) resuspendiert und für 1h bei 200rpm in einem Inkubationsschüttler (KS 4000i, IKA-Werke, Deutschland) inkubiert. In

Petrischalen wurde LB-Agar (Carl Roth, Deutschland) nach Erhitzen und Hinzugabe von 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) ausplattiert. Die Platten wurden mit dem bakterienhaltigen SOC-Medium benetzt und bei 37°C im Inkubator für 14h bebrütet. Anschließend wurden Bakterienkolonien einzeln aufgenommen und für weitere 24h in Ampicillin-versetztem LB-Medium (100 µg/ml) bei 37°C im Inkubationsschüttler (200rpm) behandelt.

Die Plasmid-DNA-Aufreinigung aus den Bakterien erfolgte unter Nutzung des Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers. Die so aufgereinigte Plasmid-DNA wurde zum einen probeweise mit oben genanntem Restriktionsenzym behandelt und auf ein Agarosegel aufgetragen, um unter UV-Strahlung die korrekte Größe der Tfeb cDNA zu visualisieren. Zum anderen erfolgte eine Sequenzierung durch einen kommerziellen Dienstleister (Eurofins MWG GmbH, Deutschland) um mögliche Mutationen auszuschließen.

## **2.2 Produktion der Adeno-assoziierten Viren**

Nachdem das AAV9-Tfeb-Plasmid kloniert wurde, erfolgte die Produktion AAV9-Tfeb durch die Arbeitsgruppe von Prof. Oliver Müller, zu diesem Zeitpunkt am Universitätsklinikum Heidelberg. Als Kontroll-AAV wurden AAV9-Luc generiert, die Luciferase als Kontroll-Protein produzieren. Durch Verwendung eines Myosin Leichtketten (myosin light chain, MLC) 2v Promoters als Herzmuskelzell-spezifischen Promoter wird die Gewebespezifität erhöht.<sup>(32)</sup> Hierfür wird auf vorhergehende Publikationen von Prof. O. Müller sowie auf den Methodenteil des Manuskripts (Seite 52) verwiesen.<sup>(32, 33)</sup>

## **2.3 Versuchstierkundliche Maßnahmen**

Alle Experimente wurden nach den aktuellen Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin unter dem Aktenzeichen G 0229/11 genehmigt. Nach den Prinzipien des Max-Delbrück Zentrums für Molekulare Medizin und den Leitlinien zur Pflege und Versorgung von Versuchstieren des National Institutes of Health (NIH publication No. 86-23, revised 1985) wurden die Versuchstiere unter standardisierten Bedingungen in einem keimfreien Bereich gezüchtet und gehalten. Es herrschten konstante Bedingungen für Temperatur (22-24°C)

und Luftfeuchtigkeit (50-60%), der Tag-Nacht-Rhythmus im 12h Takt blieb erhalten und die Tiere erhielten durchgehend Zugang zu Futter und Wasser. Während des Versuchs erfolgte zweimal täglich eine Visite der Versuchstiere.

Für den Versuch wurden 12 Wochen alte, männliche Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J verwendet.

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Kleintiernarkosekammer (Univentor Limited, Malta) angereichert mit einem 2-3%igen Isofluran-Frischlufthgemisch (Forene®, Abbot Laboratories, USA). Nach vollständiger Sedierung wurden die Tiere mit einer Endotrachealkanüle intubiert und auf einer 37°C warmen Wärmeplatte fixiert. Die Narkose wurde durch kontinuierliche Insufflation von 2%igem Isofluran in Frischluft (Rate 50ml/min) mittels eines Rodent MiniVent (Harvard Apparatus, Deutschland) aufrechterhalten und regelmäßig durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes überprüft.

Der Brustkorb wurde rasiert, mit 70%igem Ethanol desinfiziert und über eine mediane Ministernotomie bis zur dritten Rippe eröffnet. Zur Induktion der Aortenkonstriktion erfolgte die Platzierung einer 27G Nadel auf der Aorta zwischen den Abgängen des Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis und anschließend eine Ligatur mittels eines 7-0 Prolene-Fadens (Ethicon, Johnson & Johnson Medtech, USA). Folgend wurde die Nadel entfernt. Es erfolgte der Verschluss von Sternum und Haut mittels Einzelknopfnähten. Die Kontrollgruppe erhielt eine Scheinoperation (englisch Sham Surgery) mit identischer Prozedur ohne die Aorta zu ligieren. Die Narkose der Tiere sowie die Operation erfolgten durch Frau Astrid Schiche und Frau Jutta Meisel, Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin.

Direkt postoperativ wurde der Schwanz der Mäuse zur Venodilatation in Wasser mit einer Temperatur von 37°C gewärmt. Anschließend erfolgte nach Desinfektion mit 70% Ethanol die Punktion der Schwanzvene mit einer 30G Injektionskanüle und die Injektion von  $10^{12}$  Genomen der AAV9-Tfeb bzw. AAV9-Luc. Hierbei erfolgte eine Verblindung und somit Randomisierung bezüglich des injizierten Vektors.

Es erfolgte eine perioperative Schmerztherapie mittels Buprenorphin 0,02mg/kg subkutan alle 12h bis zum dritten postoperativen Tag. Während der postoperativen Phase wurden die Tiere zur Vermeidung einer Narkose-induzierten Hypothermie mit einer Rotlichtlampe (IR808, Efeb, Deutschland) gewärmt und kontinuierlich überwacht.



## 2.4 Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie erfolgte sowohl vor der Operation als auch nach 28 Tagen. Ein Teil der Kohorte erhielt 14 Tage nach Operation eine Verlaufskontrolle.

Durchgeführt wurde die Echokardiographie durch Herrn Martin Taube und Frau Stefanie Schelenz, Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin. Es erfolgte eine Verblindung bezüglich Operation und injiziertem Vector.

Die Tiere wurden mit 2%igem Isofluran in einer Kleintiernarkosekammer narkotisiert und anschließend auf einer Wärmeplatte unter kontinuierlicher Temperatur- und EKG-Ableitung mit einem VisualSonics Vevo 2100 High-Resolution Echokardiographiegerät und einem 38MHz Transducer (Fujifilm VisualSonics Inc., Japan) untersucht. Es erfolgte eine Vermessung der Dicke des interventrikulären Septums (interventricular septum thickness, IVSth) und der posterioren Wand (posterior wall thickness, PWth) in Systole (s) und Diastole (d) sowie des linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Durchmesser (LVESD, LVEDD) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF). Die Verkürzungsfraktion (Fractional shortening, FS) wurde nach folgender Formel errechnet:  $FS = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$ .

## 2.5 Muskel- und Organentnahme

Nach der Echokardiographie und noch unter Isofluran-Narkose erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation. Die Tiere wurden gewogen und es erfolgte die Entnahme von Herz, Lunge und Leber. Die Organe wurden mit einer Präzisionswaage (FA-210-4i, Faust Laborbedarf, Schweiz) gewogen. Das Herz wurde anatomisch in linken und rechten sowie linken und rechten Ventrikel geteilt und separat bei -80°C schockgefroren. Der Apex des linken Ventrikels wurde mit Gum Tragacanth (Synopharm, Deutschland) auf Plättchen fixiert, in stickstoffgekühltem Isopentan geschwenkt und anschließend ebenfalls bei -80°C gelagert.

Zuletzt wurde die Tibia entnommen. Diese wurde in Lysepuffer (100mM Tris pH 8,5; 5mM EDTA; 200mM NaCl; 0,2% SDS; 50mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C behandelt um etwaige Gewebereste entfernen zu können. Anschließend erfolgte eine Vermessung mit einem Messschieber (Tchibo, Deutschland). Die Tibialänge wurde zur Normalisierung der Organgewichte verwendet.

## 2.6 Histologie

Das in Gum Tragacanth gefrorene Gewebe wurde in einem Leica CM 3050 S Kryostaten (Leica Microsystems, Deutschland) weiterverarbeitet. Für die histologischen Untersuchungen des Herzmuskelgewebes wurden 6µm Dicke Schnitte des linken Ventrikels auf SuperFrost® Objektträger (Carl Roth, Deutschland) aufgebracht und anschließend über Nacht bei Raumluft getrocknet. Die Anfertigung der histologischen Schnitte wurde durch Frau Schmidt in der AG Fielitz unterstützt.

Zur Quantifizierung des Kollagengehalts erfolgte die Färbung mit Picrosirius Red (Polysciences, USA). Hierbei werden Kollagenfasern rot gefärbt. Die Färbung erfolgte unter Modifikation des Herstellerprotokolls und ist in Tabelle 3 dargestellt.

Anschließend erfolgte das Eindecken mit Vitro-Clud Eindeckmedium (R. Langenbrick, Deutschland). Unter Nutzung eines Leica Mikroskops (CTR 6500 HS, Leica Microsystems, Deutschland) mit Kamera (DFC 425, Leica Microsystems, Deutschland) wurden unter Verwendung des automatisierten systematischen Abfahrens der Schnitte komplette Aufnahmen des Querschnitts (Tile Scans) angefertigt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit der Software Image J 1.42c. Die artefaktreichen Ränder der Schnitte sowie Färbeartefakte wurden manuell umfahren und entfernt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil roter Fläche, welche den Kollagenfasern entspricht, im Bezug zur Gesamtfläche ermittelt.

**Tabelle 4:** Protokoll der Picrosirius Red Färbung (eigene Darstellung)

<b>Reagenz</b>	<b>Zeiteinheit</b>
eiskaltes Aceton (-20°C)	10min
Ethanol 100%	5min
Ethanol 98%	5min
Picrosirius Red Solution B	30min
Wasser	spülen
Ethanol 96%	2min
Ethanol 100%	2min
Xylol	10min

## 2.7 RNA-Isolation, Reverse Transkription, qRT-PCR

Die Isolation von RNA aus Gewebe des linken Ventrikels erfolgte unter Nutzung der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit Trizol® Reagenz (Life Technologies, USA). Das Gewebe wurde in Trizol® aufgenommen und mittels des Homogenisator FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) und Keramikugeln (Precellys 2,8mm, Peqlab, Biototechnology, Deutschland) homogenisiert. Zur Abtrennung von überschüssigen Geweberesten wurden die Proben bei 15.000g und 4°C für 15min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß dem Herstellerprotokoll. Die RNA wurde in RNase-freiem, sterilen Wasser aufgenommen.

Die RNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, USA) bestimmt und 1,5µg RNA wurde nach Herstellerangaben des First-Strand cDNA Synthesis Kits (Life Technologies, USA) unter Verwendung der SuperScript™ II Reversen Transkriptase (Life Technologies, USA) in cDNA transkribiert.

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet um die Genexpression in den einzelnen Proben zu bestimmen. Der FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche Diagnostics, Deutschland) diente als Fluoreszenzfarbstoff. Die Reaktion erfolgte in einem Step-One™ Plus Thermocycler (Life Technologies, USA) mit in Tabelle 4 dargestelltem Reaktionsprotokoll und in Tabelle 5 gezeigtem Reaktionsansatz.

**Tabelle 5:** Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (eigene Darstellung)

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen in µl</b>
RNAse-freies Wasser	6
SYBR® Green Master	10
Primer Forward (5µM)	1
Primer Reverse (5µM)	1
cDNA (5ng/µl)	2

**Tabelle 6:** Reaktionsprotokoll der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (eigene Darstellung)

PCR-Schritt	Zeiteinheit	Temperatur in °C
1. Denaturierung	10min	95°C
Start Zyklus (Schritte 2-3)		
2. Denaturierung	15s	95
3. Anlagerung, Elongation	1min	60
Ende Zyklus (Schritte 2-3), Wiederholung 40mal		
4. Schmelzkurve	0,3°C/s bis 95°C	

Die Quantifizierung erfolgte unter Nutzung der Standardkurvenmethode, wobei 2µl aller zu untersuchenden Proben vereinigt und anschließend als Verdünnungsreihe aufgetragen wurden. Die Quantifizierung der Genexpression der Einzelproben erfolgte relativ zu dieser Standardkurve. Zur Normalisierung diente der geometrische Mittelwert der stabil exprimierten Gene *Mitochondrial ribosomal protein L13 (Mrpl13)*, *Importin 8 (Ipo8)* und *Phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1)*. Alle Proben wurden als biologische Duplikate aufgetragen und der Mittelwert beider Werte zur Analyse verwendet. Verwendet wurden die in Table 7 dargestellten, selbst designten Primer (Eurofins GmbH, Deutschland).

**Tabelle 7:** Primer-Paare zur Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (eigene Darstellung)

Primer	Sequenz
Mm_Atg101_forward	5'-CCG GTC AGA ATT CTC GGT-3'
Mm_Atg101_reverse	5'-GCA AGA CAC AGG ATA CTT CAC C-3'
Mm_Atp6v1h_forward	5-GCT CAC GAT GTT GGA GAA TAT GT-3'
Mm_Atp6v1h_reverse	5'-GCA TGT GGT TCA TCA CCA ACT-3'
Mm_Becn1_forward	5'-AGG ATG GTG TCT CTC GAA GATT -3'
Mm_Becn1_reverse	5'-GAT CAG AGT GAA GCT ATT AGC ACT TTC-3'
Mm_Col1a1_forward	5'-TGT AAA CAC CCC AGC GAA GAA-3'

Mm_Col1a1_reverse	5'-CTG AGT TGC CAT TTC CTT GGA-3'
Mm_Col3a1_forward	5'-CTC ACC CTT CTT CAT CCC ACT CTT A-3'
Mm_Col3a1_reverse	5'-ACA TGG TTC TGG CTT CCA GAC AT-3'
Mm_Ctgf_forward	5'-TTC CCG AGA AGG GTC AAG CT-3'
Mm_Ctgf_reverse	5'-TTG GGT CTG GGC CAA ATG T-3'
Mm_Ctsd_forward	5'-CAT TGC AAG ATA CTT GAC ATA GCC-3'
Mm_Ctsd_reverse	5'-CGT TCT TCA CAT AGG TGC TGG-3'
Mm_Ctsl_forward	5'-CAA ATA AGA ATA AAT ATT GGC TTG TCA-3'
Mm_Ctsl_reverse	5'-TTT GAT GTA GCC TTC CAT ACC C-3'
Mm_Gabarapl2_forward	5'-AGT CCC GCC TGT GGA GTA G-3'
Mm_Gabarapl2_reverse	5'-AGC GAC CAC AAC AAC AAC G-3'
Mm_lpo8_forward	5'-GAG AAG ATG CCG AGT GCT ATG-3'
Mm_lpo8_reverse	5'-GAC TTG CTC CAG TGT ATG GAA C-3'
Mm_Map1lc3b_forward	5'-GAC CAG CAC CCC AGT AAG AT-3'
Mm_Map1lc3b_reverse	5'-TGG GAC CAG AAA CTT GGT CT-3'
Mm_Mrpl13_forward	5'-ACA ATG ATG CAA AGG CTG C-3'
Mm_Mrpl13_reverse	5'-CGT GGC TGA GGA AGC TCT T-3'
Mm_Myh6_forward	5'-GCC AAG ACT GTC CGG AAT GA-3'
Mm_Myh6_reverse	5'-TGG AAG ATC ACC CGG GAC TT-3'
Mm_Myh7_forward	5'-CAA AGG CAA GGC AAA GAA AG-3'
Mm_Myh7_reverse	5'-TCA CCC CTG GAG ACT TTG TC-3'
Mm_Nppa_forward	5'-GGG GGT AGG ATT GAC AGG AT-3'
Mm_Nppa_reverse	5'-ACA CAC CAC AAG GGC TTA GG-3'
Mm_Nppb_forward	5'-GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG-3'
Mm_Nppb_reverse	5'-CTT CAA AGG TGG TCC CAG AG-3'
Mm_Pgk1_forward	5'-CAG ACA AGA TCC AGC TGA TCA-3'
Mm_Pgk1_reverse	5'-CTT CTT CAT CAT ACA GAG ATG TGC-3'
Mm_Sqstm1_forward	5'-AGA CCC CTC ACA GGA AGG AC-3'
Mm_Sqstm1_reverse	5'-CAT CTG GGA GAG GGA CTC AA-3'
Mm_Tecpr1_forward	5'-TAT GTG TGC TCC AGT GAT GTA CC-3'
Mm_Tecpr1_reverse	5'-CTC GGC AGG AGC TTC TCA-3'
Mm_Tfeb_forward	5'-GAG CTG GGA ATG CTG ATC C-3'
Mm_Tfeb_reverse	5'-CTT GAG GAT GGT GCC TTT GT-3'

Mm\_Wipi1\_forward            5'-CCT ATC CTG GAA GCC AGA GTA C-3'  
Mm\_Wipi1\_reverse            5'-CGA GGA GTT GAA GGT GAT AGC-3'

## **2.8 Proteinextraktion, SDS-PAGE und Western Blot**

30 mg Gewebe des linken Ventrikels wurde in Proteinlysepuffer (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM Natriumchlorid; 1mM Natriummethyldiamintetraacetat; 1% Nonidet P-40; 0,1% Natriumdodecylsulfat) versetzt mit cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Deutschland) sowie PhosphoStop Phosphatase Inhibitor (Roche Diagnostics, Deutschland). Anschließend wurde dieser Ansatz mit einem Homogenisator (FastPrep® 24, MP Biomedicals, USA) unter Verwendung von Keramikugeln (Precellys 2,8mm, Peqlab, Biotechnology, Deutschland) homogenisiert. Unlösliche Gewebestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15.000g für 15min bei 4°C abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, USA) dem Herstellerprotokoll folgend.

Nach Angleichung der Gesamt-Proteinkonzentration in den einzelnen Proben erfolgte die Denaturierung durch Laemmli-Puffer (finale Konzentration: 300mM Tris-HCl pH 6,8; 12% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 50% Glycerol; 1/6 β-Mercaptoethanol) und Erhitzung bei 95°C für 5min.

Es erfolgte die Auftrennung der Probe nach Proteingröße unter Verwendung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese erfolgte in 5%igen Sammelgelen sowie 10-15%igen Trenngelen bei initial 80V und nach Erreichen der Trennphase bei 120V in Laufpuffer (25mM TRIS, 192mM Glycin, 0,1% Natriumdodecylsulfat).

Während des Western Blot, durchgeführt als Tank-Blot, wurden die aufgetrennten Proteinfractionen auf Nitrocellulose- bzw. Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membranen (GE Healthcare, Deutschland) transferiert. Dies erfolgte mit 100V für 1h unter kontinuierlicher Kühlung in Transferpuffer (25mM Tris pH 8,8; 192mM Glycin; 10% Methanol). Anschließend wurden die Membranen je nach Antikörper mit 5% Magermilchpulver in TBST oder 5% BSA in TBST (Hefeextrakt 2mM Tris pH 8,8; 150mM NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,6) für 1h bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht wurden die Membranen anschließend bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Es wurden die Antikörper anti-β/slow myosin heavy chain (MyHC) (NOQ7.5.4D, Maus, 1:1000, Sigma-Aldrich, Deutschland), anti-

p62 (Meerschweinchen, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B (anti-LC3B; Hase, 1:750, Cell Signaling Technology, USA), anti-TFEB (Hase, 1:1000, Bethyl Laboratories, USA) and anti-Beclin-1 (Hase, 1:1000, Cell Signalling Technology, USA) verwendet. Als Ladekontrolle diente anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, clone 6C5, mouse, 1:10,000, Merck Millipore, USA).

Nach drei Waschzyklen mit TBST erfolgte die Inkubation mit einem sekundären IgG-Antikörper, welcher mit dem Horseradish-Peroxydase (HRP)-Enzym zum Chemilumineszenznachweis markiert ist. Verwendet wurden Ziege anti-Maus, Ziege anti-Hase (beide 1:3000, Cell Signalling Technology, USA) oder Ziege anti-Meerschweinchen (1:3000, Abcam, Großbritannien).

Nach erneuten drei Waschzyklen mit TBST wurden die Membranen mit dem SuperSignal® West Pico Chemilumineszenz-Substrat (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers behandelt und das Signal auf Chemilumineszenzfilmen (Amersham Hyperfilm ECL™, GE Healthcare, Großbritannien) in einer Curix60 Entwicklermaschine (Agfa-Geavert, Belgien) dargestellt.

## **2.9 RNA-Sequenzierung**

Für die RNA-Sequenzierung wurden 500ng RNA aus Gewebe des linken Ventrikels verwendet. Eine Qualitätskontrolle der Probe wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalysator (Agilent Technologies, USA) durchgeführt. Eine Sequenzierbibliothek wurde mit dem Illumina TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina, USA) erstellt. Die so gewonnene DNA wurde erneut mittels Bioanalysator auf Intaktheit überprüft. Die sequenzierten Fragmente wurden mit der Software STAR Aligner (Version 2.5.3a) mit dem gesamten Mausgenom (mm10) abgeglichen.<sup>(34)</sup> Die für jedes Gen detektierte Häufigkeit wurde aus der Binary Alignment Map (BAM) mit der featureCounts Software (Version 1.5.1) ausgewertet, wobei eine Häufigkeit von weniger als 10 über alle Proben als unspezifische Treffer interpretiert und entfernt wurden.<sup>(35)</sup> Die Expressionsanalyse mit Vergleichen der Expression zwischen den Gruppen wurden mit dem DESeq 2 R Statistikpaket durchgeführt, wobei ein p-Wert (Benjamini-Hochberg-Korrektur) von kleiner als 0,05 als ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied betrachtet wurde.<sup>(36)</sup>

Die Analysen im Bioanalysator sowie die Sequenzierung der RNA wurden von Frau Claudia Langnick, AG Sauer, Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin durchgeführt. Die Aufbereitung und Erstellung des primären Datensatzes erfolgten durch Herrn Dr. Ramon Vidal, AG Sauer, Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin.

Unter Verwendung der DAVID-Software (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, Version 6.8, <https://david.ncifcrf.gov>, letzter Zugriff 29. April 2022) wurde der primäre Datensatz bezüglich Anreicherungen von bestimmten Signalwegen und Zellprozessen verglichen. Das Transcriptome des Primärdatensatzes wurden auf EBI Annotare v.2.0 (Project-ID: E-MTAB-9585) veröffentlicht.

## **2.10 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Analysen und die Erstellung der Grafiken wurden mit GraphPad Prism® 8 (GraphPad Software, USA; version 8.03) und Adobe Illustrator CS6 (Adobe Inc., USA) durchgeführt. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte unter Nutzung eines ungepaarten zweiseitigen Student t-test. Für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen wurde eine einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Turkey Post-hoc Test verwendet. Die Gewichtsanalysen und echokardiographischen Daten wurden als Box-Plot dargestellt. Die Boxen stellen den Interquartalsabstand sowie den Median dar, die Antennen zeigen die minimalen und maximalen Werte. Die Daten der Genexpression wurden als Balkendiagramme mit Median und Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 AAV9-Tfeb induziert unter TAC eine Herzinsuffizienz**

Im Vergleich zu den AAV9-Luc Tieren bewirkt die Überexpression von Tfeb keine Veränderungen in der Morphologie oder den Organgewichten in den Sham operierten Tieren. Durch die TAC-Operation kam es in der AAV9-Luc Gruppe zu einer Zunahme der Herzgröße mit Erhöhung des Herzgewichts. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung mit dem AAV9-Tfeb Vector aggraviert, was sich in einer stärkeren Zunahme der Herzgröße und einer signifikanten Erhöhung des Herzgewichts, sowohl verglichen mit den Sham-Gruppen als auch im Vergleich zur TAC-operierten AAV9-Luc Gruppe widerspiegelte. Zusätzlich zeigte sich eine Zunahme des auf die Tibialänge normalisierten Lungengewichts als Zeichen eines Rückwärtsversagens mit pulmonaler Stauung.

Echokardiographisch hingegen zeigten sich zwischen den Sham-operierten Tieren nach Tfeb-Überexpression eine gering signifikante Zunahme der ventrikulären Diameter (LVESD, LVEDD) sowie eine Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) von 64,6% auf 56,3% ( $p=0,1$ ). In der AAV9-Luc Gruppe führte die TAC-Operation zu einer kompensierten myokardialen Hypertrophie, welche sich durch Zunahme der Wanddicken (IVSth, PWth) ausdrückte. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte sich mit 52,3% erniedrigt, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant. Die Kombination aus Nachlast-induziertem Stress und Tfeb-Überexpression hingegen führte zu einer deutlichen Dilatation der Herzhöhlen (LVESD, LVEDD) bei gleichzeitiger Abnahme der Wanddicken (IVSth, PWth). Die Ejektionsfraktion zeigte sich mit 22,4% hochgradig eingeschränkt. In Zusammenschau mit der Zunahme des Lungengewichts zeigt sich somit in den AAV9-Tfeb TAC-operierten Tieren das Bild einer dekompensierten Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion.

#### **3.2 AAV9-Tfeb aggraviert Stress-induzierte interstitielle Umbauprozesse**

Die Picrosirius Red Färbung von histologischen Schnitten der Herzen diente zur Darstellung einer interstitiellen und perivaskulären Fibrose, die häufig pathologische myokardiale Umbauprozesse begleitet.(37, 38) Hierbei zeigte sich in den Herzen der AAV9-Luc Tiere eine leichte, nicht signifikante Zunahme der Picrosirius Red Färbung nach TAC-Operation. Dieser Effekt war deutlich stärker in den TAC operierten AAV9-Tfeb Tieren.

Zur weiteren Analyse dieses Befundes wurde mittels qRT-PCR die Expression von *connective tissue growth factor (Ctgf)*, dass die Expression von Genen reguliert, die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren, sowie von Kollagen Typ 1, alpha 1, und Kollagen Typ 1, alpha 3. Für *Ctgf* zeigte sich eine signifikante Zunahme nach TAC-Operation und Tfeb-Überexpression. Die Expression von *Col1a3* war nach TAC-Operation in beiden Gruppen erhöht. Für *Col1a1* wiederum zeigte sich eine signifikante Zunahme durch Tfeb-Überexpression. Somit zeigt sich durch TAC-Operation eine zu erwartende Induktion von myokardialer Fibrose, welche nach Tfeb-Überexpression verstärkt nachweisbar war.

### **3.3 Die TAC-induzierte kardiale Stressreaktion wird verstärkt durch AAV9-Tfeb**

Als Marker einer myokardialen Stressreaktion wurde die Expression der Gene *Nppa* (kodierend für das Protein atrial natriuretic peptide, ANP) und *Nppb* (kodierend für das Protein B-type natriuretic peptide, BNP) mittels qRT-PCR untersucht. Im Vergleich zur AAV9-Luc Gruppe führte die Tfeb-Überexpression zu keiner Änderung der *Nppa* und *Nppb* Expression der jeweils Sham operierten Tiere. In der AAV9-Luc-Gruppe führte die TAC-Operation zu einer signifikanten *Nppb*-Induktion. Die Überexpression von Tfeb induzierte eine signifikant verstärkte Expression von *Nppa* und *Nppb* im Vergleich zu den AAV9-Luc Tieren.

Weiterhin wurde untersucht, ob es zu einer Änderung der Zusammensetzung der Myosin-Schwerketten kam, da eine pathologische Hypertrophie häufig mit einer Abnahme der *Myh6* (kodierend für alpha myosin heavy chain,  $\alpha$ -MyHC) und einer Zunahme der *Myh7* (kodierend für die beta myosin heavy chain,  $\beta$ -MyHC) Expression einhergeht.(39, 40) In beiden TAC-Gruppen konnte eine verminderte *MyH6* und eine gesteigerte *Myh7* Expression im Vergleich zur jeweiligen Sham Gruppe nachgewiesen werden. Die *Myh7* Expression war in den AAV9-Tfeb TAC Tieren signifikant höher als in den AAV9-Luc TAC Tieren, was auch auf Protein-Ebene im Western Blot zu beobachten war.

In Zusammenschau induziert die TAC-Operation eine myokardiale Stressreaktion, welche durch Tfeb-Überexpression aggraviert wurde.

### 3.4 AAV9-Tfeb induziert eine ALP Aktivierung unter TAC

Die Analyse von Veränderungen der Genexpression in den Herzen erfolgte durch die Sequenzierung der nächsten Generation („next generation sequencing“) der GesamtrNA (RNA Seq), die aus dem interventrikulären Septum der AAV9-Luc Kontrollgruppe (Sham: n=3, TAC: n=4) und der AAV9-Tfeb Gruppe (Sham: n=3, TAC: n=3) isoliert wurde. Tfeb Überexpression induzierte in Sham-operierten Tieren eine veränderte Expression von 79 Genen. Hierbei wurden 20 Gene vermehrt und 59 Gene vermindert exprimiert. In der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Signalweg Analyse zeigten sich die Signalwege für das Aktinzytoskelett (actine cytoskeleton (mmu04810) und Phagosom (mmu04145) angereichert.

Durch die TAC-Operation wurden in der AAV9-Luc Gruppe 1392 und in der AAV9-Tfeb Gruppe 2405 Gene vermehrt exprimiert, wobei beide Gruppen eine gemeinsame Schnittmenge von 990 Genen aufweisen. Durch Tfeb-Überexpression zeigte die KEGG-Analyse in der TAC-operierten Gruppe im Gegensatz zur AAV9-Luc Gruppe eine Anreicherung der Signalwege „phagosome“, „endocytosis“, „autophagy“ und „lysosome“.

Zur weiteren Untersuchung des ALP führten wir ein hierarchisches Clustering der beiden GO-Begriffe Autophagie und Lysosom durch. Es zeigt sich, dass beide Signalwege in beiden TAC-Gruppen hochreguliert sind, wobei dies verstärkt nach Tfeb-Überexpression zu beobachten war.

Zur Bestätigung erfolgte eine qRT-PCR von exemplarischen Genen. Für die zum GO-Term zugeordneten Gene *Atg101* und *Becn1* (kodierend für Beclin-1) zeigte sich in beiden TAC-Gruppen unabhängig von der Tfeb-Behandlung eine vermehrte Expression. *Tecpr1* wurde in beiden Gruppen induziert, jedoch signifikant stärker nach Tfeb-Überexpression. *Gabarapl2* und *Sqstm1* (kodiert für p62) zeigten sich nur nach Tfeb-Überexpression verstärkt exprimiert. Auf Proteinebene zeigte p62 im Western Blot einen inkonsistenten Proteingehalt sowohl innerhalb einer Behandlungsgruppe als auch zwischen den Gruppen. *Map1lc3b* (kodierend für LC3B) zeigte sich auf RNA-Ebene nicht reguliert. Im Western Blot konnte jedoch ein Anstieg von LC3B-I und LC3B-II nach Tfeb-Überexpression und TAC-Operation nachgewiesen werden. Während LC3B-I vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist, entsteht LC3B-II während Autophagie durch Lipidierung und anschließendem Einbau in Autophagosomen und Autolysosomen und spiegelt so eine erhöhte Aktivität wider.(41)

Für die zum GO-Term Lysosom zugeordneten Gene *Atp6v1h*, *Ctsd* und *Ctsl* konnte nach TAC-Operation eine Induktion nachgewiesen werden, wobei dies für *Ctsd* und *Ctsl* signifikant stärker nach Tfeb-Überexpression sichtbar war. *Wipi1* wurde lediglich durch die Kombination von TAC-Operation und Tfeb-Überexpression induziert.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung der Auswirkungen einer *Tfeb*-Überexpression auf das Herz im Kontext von chronischem myokardialen Stress. Die hierbei genutzte TAC-Operation ist ein etabliertes Modell zur Induktion einer chronischen Nachlasterrhöhung, vergleichbar mit einer Aortenklappenstenose oder arterieller Hypertension.(42) Diese führt sowohl im klinischen als auch im tierexperimentellen Kontext zu einer myokardialen Hypertrophie.(43) In unserem Experiment konnten wir dies sowohl phänotypisch durch ein erhöhtes Gesamtgewicht des Herzens, echokardiographisch durch eine Zunahme der Wanddicken des linken Ventrikels als auch auf molekularer Ebene durch Nachweis einer erhöhten Expression myokardialer Stressfaktoren nachweisen. Der gewählte Untersuchungszeitraum von vier Wochen verursachte in den Kontrolltieren keine Herzinsuffizienz, was sich in einer normwertigen linksventrikulären Ejektionsfraktion und einem normalen Lungengewicht als indirekter Marker für eine pulmonale Stauung nachweisbar war.

Durch einen Adeno-assoziierten viralen Vektor erfolgte die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von *Tfeb*. In Abwesenheit von hämodynamischem Stress führte die *Tfeb*-Überexpression lediglich zu marginalen Veränderungen der phänotypischen und echokardiographischen Parameter. Durch hämodynamischen Stress verursacht durch die TAC-Operation zeigte sich eine deutliche und signifikante Zunahme des Herzgewichts. Echokardiographisch zeigte sich eine Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion, eine Verminderung der Wanddicken sowie eine Zunahme der ventrikulären Diameter, welche eine Zunahme der Füllungsdrücke suggerieren. Das Lungengewicht war signifikant erhöht, was auf eine pulmonale Stauung schließen lässt. Marker der myokardialen Stressreaktion zeigten sich auch im Vergleich zur TAC-operierten AAV9-Luc Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zudem zeigte sich eine vermehrte interstitielle Fibrose, was auf einen pathologischen Umbau der extrazellulären Matrix schließen lässt. Unter Nutzung von RNA-Sequenzierung, qRT-PCR und Western Blot konnte eine vermehrte Aktivität des Protein- und Organellen abbauenden ALP nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsfaktor EB (TFEB) hat eine Schlüsselrolle in der Regulation des ALP. Aufgrund dieser zentralen Funktion innerhalb der zellulären Proteinhomöostase unterliegt er einer fein abgestimmten Regulation, was vor allem durch seinen Phosphorylierungsstatus reguliert wird.(44) Wichtige Regulatoren sind der TFEB Aktivität sind mammilian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1), die Akt/Proteinkinase B, die extracellulär-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1, ERK2) sowie die Proteinkinase D1 (PKD1). Aktivierte TFEB transloziert in den Zellkern, bindet dort an spezifische E-Box Elemente (Konsensus-Sequenz: CANNTG) in der Promoter-Region seiner Zielgene (z.B. *Trim63*, *p62*, *Ppargc1a*) und steigert deren Expression.(25, 44-48) In unserem Experiment führte eine *Tfeb*-Überexpression in der Abwesenheit von myokardialen Stress lediglich zu marginalen Veränderungen der Genexpression, was die Befunde, dass TFEB zunächst aktiviert werden muss, bevor es seine volle Wirkung hinsichtlich einer veränderten Genexpression ausüben kann, unterstützt. Zudem wurde beschrieben, dass die Überexpression von *Tfeb* während eines Beobachtungszeitraums von drei Monaten keine myokardialen Veränderungen auslöste, sodass von einer fein abgestimmten Regulation der *Tfeb* und letztlich der ALP-Aktivität auszugehen ist.(28) Eine konstitutiv-aktive *Tfeb*-Variante könnte dies in weiteren Experimenten nachweisen.

Der mammilliar Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) verursacht durch Phosphorylierung von TFEB an den Serin-Resten Ser122, Ser142 und Ser211 eine Bindung des 14-3-3 Chaperon-Proteins und verhindert hierdurch eine nukleäre Translokation bzw. bewirkt den nukleären Export von TFEB und reduziert dadurch letztlich seine transkriptionelle Aktivität.(45, 46) In einem Mausmodell mit mTORC1-Defizienz konnte unter Nutzung des TAC-Modells eine vermehrte Aktivität des ALP nachgewiesen werden.(49) Dies führte zu einer Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion und einer Zunahme der linksventrikulären Diameter.(49) Da eine mTORC1-Defizienz zu einer verstärkten TFEB-Aktivität führt, sind diese Beobachtungen konsistent zu unseren Daten. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass bei hämodynamischem Stress eine Dysregulation des ALP stattfindet.(13, 19) Weiterhin scheint es eine zeitliche Dynamik in der Aktivität zu geben. Für mTORC1 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität in frühen Phasen nach TAC-Operation ansteigt und in späteren Zeitpunkten mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz wieder abfällt.(50, 51) Dies ist konsistent mit weiteren Untersuchungen, die eine Abnahme der ALP-Aktivität in frühen Zeitpunkten nach TAC-Operation nachwei-

sen konnten, wohingegen es während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine deutliche Zunahme der Aktivität gibt.(19) Dies würde auch eine zeitliche Dynamik in der TFEB-Aktivität nahelegen.

Da TFEB ein potenter Induktor des ALP ist, gibt es verschiedene Versuche einer therapeutischen Nutzung bei lysosomalen Speichererkrankungen, beispielsweise beim Morbus Pompe oder Morbus Gaucher sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose und des Morbus Alzheimer mit ersten positiven Ergebnissen.(27-30) Aufgrund unserer Daten könnte der Einsatz dieser therapeutischen Ansätze bei bestehendem oder akut auftretendem myokardialen Stress wie beispielsweise einer nicht bekannten Aortenklappenstenose problematisch sein. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich, dass bei therapeutischen Interventionen unter Nutzung von TFEB eine Gewebespezifität dringend notwendig ist, wobei beispielsweise beim Morbus Pompe in jedem Fall eine kardiale Expression anzustreben ist. Weiterhin sind die Auswirkungen von andauendem muskulären Stress bei gleichzeitiger *Tfeb*-Überexpression unklar und benötigen weitere Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von *Tfeb* in einem Modell von chronischem hämodynamischen Stress zu einer Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter Ejektionsfraktion führt. Korrelierend dazu zeigen sich Anzeichen für eine Aktivierung des ALP. Einschränkend zu erwähnen ist, dass dies lediglich eine Korrelation darstellt, welche aufgrund der bekannten transkriptionellen Aktivität von TFEB in anderen Zelltypen basiert. Eine weitere Charakterisierung des Signalweges ist notwendig. Zudem konnte lediglich der Effekt einer *Tfeb*-Überexpression dargestellt werden. Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse für etwaige therapeutische Ansätze sind Versuche mit Inhibition der TFEB-Aktivität im Kontext von hämodynamischem Stress notwendig. Zudem fehlen Daten über TFEB-Aktivitätsunterschiede im zeitlichen Verlauf.

Trotz dieser Einschränkungen konnte in dieser Arbeit ein robuster Phänotyp mit deutlichen Veränderungen nach *Tfeb*-Überexpression dargestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen weiteren Beitrag im Verständnis der molekularen Entstehung einer Herzinsuffizienz dar, wobei viele weitere Schritte notwendig sind um neue und effektive Behandlungsmethoden zu entdecken.

## Literaturverzeichnis

1. Authors/Task Force M, McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, Burri H, Butler J, Celutkiene J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, Group ESCSD. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2022;24(1):4-131.
2. Huffman MD, Berry JD, Ning H, Dyer AR, Garside DB, Cai X, Daviglius ML, Lloyd-Jones DM. Lifetime risk for heart failure among white and black Americans: cardiovascular lifetime risk pooling project. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(14):1510-7.
3. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, Rossi JS, Loehr LR, Russell SD, Agarwal SK, Konety SH, Rodriguez CJ, Rosamond WD. Trends in Hospitalizations and Survival of Acute Decompensated Heart Failure in Four US Communities (2005-2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation.* 2018;138(1):12-24.
4. Tsao CW, Lyass A, Enserro D, Larson MG, Ho JE, Kizer JR, Gottdiener JS, Psaty BM, Vasan RS. Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* 2018;6(8):678-85.
5. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(10):e146-e603.
6. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(1):30-41.
7. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322(22):1561-6.
8. Willis MS, Ike C, Li L, Wang DZ, Glass DJ, Patterson C. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res.* 2007;100(4):456-9.
9. Willis MS, Schisler JC, Li L, Rodriguez JE, Hilliard EG, Charles PC, Patterson C. Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. *Circ Res.* 2009;105(1):80-8.
10. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2486-95.
11. Fielitz J, van Rooij E, Spencer JA, Shelton JM, Latif S, van der Nagel R, Bezprozvannaya S, de Windt L, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Loss of



muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4377-82.

12. Lodka D, Pahuja A, Geers-Knorr C, Scheibe RJ, Nowak M, Hamati J, Kohncke C, Purfurst B, Kanashova T, Schmidt S, Glass DJ, Morano I, Heuser A, Kraft T, Bassel-Duby R, Olson EN, Dittmar G, Sommer T, Fielitz J. Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(2):165-80.

13. Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, Le V, Levine B, Rothermel BA, Hill JA. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1782-93.

14. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007;13(5):619-24.

15. Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, Berry JM, Johnstone JL, Shelton JM, Miller FJ, Jr., Rothermel BA, Hill JA. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation*. 2008;117(24):3070-8.

16. Wang X, Robbins J. Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;71:16-24.

17. Dong Y, Undyala VV, Gottlieb RA, Mentzer RM, Jr., Przyklenk K. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;15(3):220-30.

18. Dammrich J, Pfeifer U. Cardiac hypertrophy in rats after supra-avalvular aortic constriction. I. Size and number of cardiomyocytes, endothelial and interstitial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1983;43(3):265-86.

19. Li B, Chi RF, Qin FZ, Guo XF. Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: association with oxidative stress. *Exp Physiol*. 2016;101(8):1050-63.

20. Givvimani S, Munjal C, Tyagi N, Sen U, Metreveli N, Tyagi SC. Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (Mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure. *PLoS One*. 2012;7(3):e32388.

21. Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, Allen AM, Harrap SB, Thomas WG, Delbridge LM. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. *Hypertension*. 2009;53(6):1032-40.

22. Lin L, Tang C, Xu J, Ye Y, Weng L, Wei W, Ge J, Liu X, Zou Y. Mechanical stress triggers cardiomyocyte autophagy through angiotensin II type 1 receptor-mediated p38MAP kinase independently of angiotensin II. *PLoS One*. 2014;9(2):e89629.

23. Kuiper RP, Schepens M, Thijssen J, Schoenmakers EF, van Kessel AG. Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic acids research*. 2004;32(8):2315-22.

24. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 2011;332(6036):1429-33.

25. Du Bois P, Pablo Tortola C, Lodka D, Kny M, Schmidt F, Song K, Schmidt S, Bassel-Duby R, Olson EN, Fielitz J. Angiotensin II Induces Skeletal Muscle Atrophy by Activating TFEB-Mediated MuRF1 Expression. *Circ Res*. 2015;117(5):424-36.

26. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008;372(9646):1342-53.

27. Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Ida H, Ohashi T. TFEB overexpression promotes glycogen clearance of Pompe disease iPSC-derived skeletal muscle. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16054.
28. Gatto F, Rossi B, Tarallo A, Polishchuk E, Polishchuk R, Carrella A, Nusco E, Alvino FG, Iacobellis F, De Leonibus E, Auricchio A, Diez-Roux G, Ballabio A, Parenti G. AAV-mediated transcription factor EB (TFEB) gene delivery ameliorates muscle pathology and function in the murine model of Pompe Disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):15089.
29. Awad O, Sarkar C, Panicker LM, Miller D, Zeng X, Sgambato JA, Lipinski MM, Feldman RA. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum Mol Genet.* 2015;24(20):5775-88.
30. Chen Y, Liu H, Guan Y, Wang Q, Zhou F, Jie L, Ju J, Pu L, Du H, Wang X. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Transl Res.* 2015;7(9):1574-87.
31. Wundersitz S, Pablo Tortola C, Schmidt S, Oliveira Vidal R, Kny M, Hahn A, Zanders L, Katus HA, Sauer S, Butter C, Luft FC, Muller OJ, Fielitz J. The Transcription Factor EB (TFEB) Sensitizes the Heart to Chronic Pressure Overload. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11).
32. Muller OJ, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus HA, Kleinschmidt JA. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res.* 2006;70(1):70-8.
33. Goehringer C, Rutschow D, Bauer R, Schinkel S, Weichenhan D, Bekeredjian R, Straub V, Kleinschmidt JA, Katus HA, Muller OJ. Prevention of cardiomyopathy in delta-sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):404-10.
34. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
35. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-30.
36. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
37. McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation.* 1998;98(24):2765-73.
38. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.* 2009;131(4):471-81.
39. Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2362-70.
40. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2315-24.
41. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8.
42. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial

- natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(18):8277-81.
43. Bosch L, de Haan JJ, Bastemeijer M, van der Burg J, van der Worp E, Wesseling M, Viola M, Odille C, El Azzouzi H, Pasterkamp G, Sluijter JPG, Wever KE, de Jager SCA. The transverse aortic constriction heart failure animal model: a systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev*. 2021;26(6):1515-24.
44. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, Facchinetti V, Sabatini DM, Ballabio A. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*. 2012;31(5):1095-108.
45. Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC, Ferguson SM. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling*. 2012;5(228):ra42.
46. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*. 2012;8(6):903-14.
47. Vega-Rubin-de-Celis S, Pena-Llopis S, Konda M, Brugarolas J. Multistep regulation of TFEB by mTORC1. *Autophagy*. 2017;13(3):464-72.
48. Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, Lotfi P, Stinnett GR, Seymour ML, Chaudhury A, Bajaj L, Bondar VV, Bremner L, Saleem U, Tse DY, Sanagasetti D, Wu SM, Neilson JR, Pereira FA, Pautler RG, Rodney GG, Cooper JD, Sardiello M. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat Commun*. 2017;8:14338.
49. Shende P, Plaisance I, Morandi C, Pellieux C, Berthonneche C, Zorzato F, Krishnan J, Lerch R, Hall MN, Ruegg MA, Pedrazzini T, Brink M. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation*. 2011;123(10):1073-82.
50. Drolet MC, Desbiens-Brassard V, Roussel E, Tu V, Couet J, Arsenault M. Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation. *Springerplus*. 2015;4:435.
51. Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan KL, Brown JH, Chen J, Sonenberg N, Condorelli G. mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2805-16.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Wundersitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Transkriptionsfaktor EB (Tfeb) begünstigt unter chronischem myokardialen Stress die Entstehung einer Herzinsuffizienz“ („The Transcription Factor EB (Tfeb) promotes the development of heart failure under conditions of chronic myocardial stress“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.**

### **Publikation**

Wundersitz, Sebastian, Cristina Pablo Tortola, Sibylle Schmidt, Ramon Oliveira Vidal, Melanie Kny, Alexander Hahn, Lukas Zanders, Hugo A. Katus, Sascha Sauer, Christian Butter, Friedrich C. Luft, Oliver J. Müller, and Jens Fielitz. "The Transcription Factor EB (TFEB) Sensitizes the Heart to Chronic Pressure Overload" *International Journal of Molecular Sciences*, 2022.

### **Beitrag im Einzelnen**

Alle nicht durch mich erfolgten Arbeitsschritte dieser Arbeit wurden von mir im Methodenteil kenntlich gemacht und die jeweilige Person entsprechend benannt. Meine Beiträge zur Publikation im Einzelnen:

Durchführung der Experimente, Sammlung, statistische Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten für Figure 1, 3 und 5 sowie Supplemental Table S1,

Statistische Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten für Figure 2 sowie Supplemental Table S2.

Aufnahme der Fotos für Figure 1C.

Durchführung der Mikroskopie und Aufnahme der exemplarischen Bilder für Figure 3F.

Graphische Aufbereitung der Daten für Supplemental Figure 2D und 3.

Erstellung einer vollständigen ersten Version des Manuskripts und stetige Bearbeitung unter Beteiligung von Prof. Fielitz und den beteiligten Ko-Autoren.

Beteiligung bei der Revision.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



Article

# The Transcription Factor EB (TFEB) Sensitizes the Heart to Chronic Pressure Overload

Sebastian Wundersitz <sup>1,2</sup>, Cristina Pablo Tortola <sup>1</sup>, Sibylle Schmidt <sup>1</sup>, Ramon Oliveira Vidal <sup>3,4</sup>, Melanie Kny <sup>1</sup>, Alexander Hahn <sup>1</sup>, Lukas Zanders <sup>1</sup>, Hugo A. Katus <sup>5,6</sup>, Sascha Sauer <sup>3,4</sup>, Christian Butter <sup>7</sup>, Friedrich C. Luft <sup>1</sup>, Oliver J. Müller <sup>8,9</sup> and Jens Fielitz <sup>1,10,11,\*</sup>

- <sup>1</sup> Experimental and Clinical Research Center (ECRC), Max Delbrück Center (MDC) for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13125 Berlin, Germany; sebastian.wundersitz@charite.de (S.W.); cristinapablotortola@gmail.com (C.P.T.); sibylle.schmidt@charite.de (S.S.); melaniekny@web.de (M.K.); alexanderhahn85@gmx.de (A.H.); lukas.zanders@charite.de (L.Z.); luft@charite.de (F.C.L.)
- <sup>2</sup> DZHK (German Center for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, 10785 Berlin, Germany
- <sup>3</sup> Laboratory of Functional Genomics, Nutrigenomics and Systems Biology, Max Delbrück Center (MDC) for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Berlin Institute for Medical Systems Biology, 10115 Berlin, Germany; ramon.vidal@gmail.com (R.O.V.); sascha.sauer@mdc-berlin.de (S.S.)
- <sup>4</sup> Berlin Institute of Health (BIH), 10178 Berlin, Germany
- <sup>5</sup> Department of Internal Medicine III, University Hospital Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany; hugo.katus@med.uni-heidelberg.de
- <sup>6</sup> DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Heidelberg/Mannheim, 69120 Heidelberg, Germany
- <sup>7</sup> Heart Center Brandenburg, Department of Cardiology, Medical University Brandenburg (MHB), 16321 Bernau, Germany; c.butter@immanuel.de
- <sup>8</sup> Department of Cardiology and Angiology, University Medical Center Schleswig-Holstein, 14105 Kiel, Germany; oliver.mueller@uksh.de
- <sup>9</sup> DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Hamburg/Kiel/Lübeck, 20251 Hamburg, Germany
- <sup>10</sup> DZHK (German Center for Cardiovascular Research), Partner Site Greifswald, 17475 Greifswald, Germany
- <sup>11</sup> Department of Internal Medicine B, Cardiology, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany
- \* Correspondence: jens.fielitz@med.uni-greifswald.de; Tel.: +49-3834-86-80519



**Citation:** Wundersitz, S.; Pablo Tortola, C.; Schmidt, S.; Oliveira Vidal, R.; Kny, M.; Hahn, A.; Zanders, L.; Katus, H.A.; Sauer, S.; Butter, C.; et al. The Transcription Factor EB (TFEB) Sensitizes the Heart to Chronic Pressure Overload. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5943. <https://doi.org/10.3390/ijms23115943>

Academic Editor: Daiqing Liao

Received: 30 April 2022  
Accepted: 23 May 2022  
Published: 25 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The transcription factor EB (TFEB) promotes protein degradation by the autophagy and lysosomal pathway (ALP) and overexpression of TFEB was suggested for the treatment of ALP-related diseases that often affect the heart. However, TFEB-mediated ALP induction may perturb cardiac stress response. We used adeno-associated viral vectors type 9 (AAV9) to overexpress TFEB (AAV9-Tfeb) or Luciferase-control (AAV9-Luc) in cardiomyocytes of 12-week-old male mice. Mice were subjected to transverse aortic constriction (TAC, 27G; AAV9-Luc:  $n = 9$ ; AAV9-Tfeb:  $n = 14$ ) or sham (AAV9-Luc:  $n = 9$ ; AAV9-Tfeb:  $n = 9$ ) surgery for 28 days. Heart morphology, echocardiography, gene expression, and protein levels were monitored. AAV9-Tfeb had no effect on cardiac structure and function in sham animals. TAC resulted in compensated left ventricular hypertrophy in AAV9-Luc mice. AAV9-Tfeb TAC mice showed a reduced LV ejection fraction and increased left ventricular diameters. Morphological, histological, and real-time PCR analyses showed increased heart weights, exaggerated fibrosis, and higher expression of stress markers and remodeling genes in AAV9-Tfeb TAC compared to AAV9-Luc TAC. RNA-sequencing, real-time PCR and Western Blot revealed a stronger ALP activation in the hearts of AAV9-Tfeb TAC mice. Cardiomyocyte-specific TFEB-overexpression promoted ALP gene expression during TAC, which was associated with heart failure. Treatment of ALP-related diseases by overexpression of TFEB warrants careful consideration.

**Keywords:** heart failure; left ventricular hypertrophy; transcription factor EB

## 1. Introduction

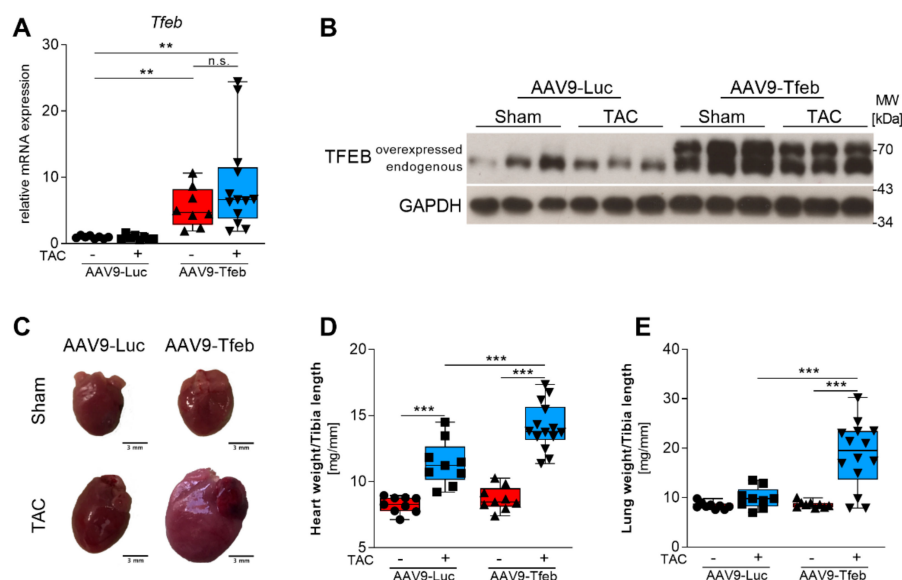
Heart failure with reduced ejection fraction is a common cause of death worldwide and is commonly preceded by pathological cardiac hypertrophy and left ventricular remodeling [1,2]. Pathological hypertrophy is a maladaptive response related to hemodynamic stress stimuli, such as pressure-overload, due to arterial hypertension or aortic stenosis [3]. Although several mechanisms underlying cardiac hypertrophy are well described [4], pathways involved in cardiomyocyte stress response are not well understood. However, disturbed protein homeostasis in cardiomyocytes caused by decreased protein synthesis and increased protein degradation has been implicated [4]. In cardiomyocytes, protein degradation is predominantly mediated by the ubiquitin-proteasome system (UPS) [5–8] and the autophagy-lysosomal pathway (ALP) [9–11]. In contrast to the UPS which degrades single long-lived and misfolded proteins [12], the ALP degrades entire cell contents such as proteins, insoluble protein aggregates, and even whole organelles such as mitochondria [12]. Because the cardiac proteome changes during hypertrophy, activation of protein degradation is important to efficiently remodel the contractile apparatus and assure adaptation of the heart to stress. A malfunction of protein degradation may in turn lead to the accumulation of proteins and pathological stress response. For example, a malfunction of the UPS is associated with hypertrophic cardiomyopathy [13], maladaptive cardiac hypertrophy [5,7] and protein-surplus myopathy [6,8,14]. The ALP is equally important for the maintenance of normal cardiac structure and function and its inhibition in ALP-related diseases often leads to cardiomyopathy [9,15]. For example, in Pompe's disease, lysosomal acid alpha-glucosidase deficiency compromised the breakdown of glycogen and causes the accumulation of autophagic vesicles and autophagic debris in heart and skeletal muscle leading to heart and skeletal muscle failure [16]. The transcription factor EB (TFEB) is a critical regulator of ALP and is a master regulator of lysosomal biogenesis and autophagy. TFEB activation results in an increased expression of genes involved in autophagy and autophagic flux, biogenesis of autophagosomes, and the fusion of autophagosomes with lysosomes in non-myocytes [17]. TFEB also promotes the expression of genes involved in early and late lysosomal biogenesis as well as UPS-dependent protein degradation [18–21].

The nodal function of TFEB in ALP promoted the development of TFEB-based gene therapy predominantly by its overexpression to treat lysosomal storage disorders, which was successfully tested in cell and mouse models of Pompe's disease [22,23], Gaucher's disease [24], and amyotrophic lateral sclerosis [25]. However, because cardiomyocyte ALP is important for load-induced cardiac stress response [9–12], its activation by TFEB overexpression may elicit cardiac side effects, especially during hemodynamic stress such as pressure-overload. We therefore tested the hypothesis that TFEB overexpression in cardiomyocytes sensitizes the heart to a pressure-overload-induced cardiac stress response.

## 2. Results

### 2.1. TFEB Overexpression Leads to Heart Failure in Response to Pressure Overload

AAV9-mediated systemic delivery of the murine *Tfeb* cDNA under the control of the cardiomyocyte-specific MLC v2.1 promoter led to an increased cardiac TFEB mRNA expression (Figure 1A) and protein content (Figure 1B). The hearts of sham-treated AAV9-Tfeb and AAV9-Luc mice were similar in size (Figure 1C,D, Table S1). In transthoracic echocardiography (Figure 2A), AAV9-Tfeb mice showed a slight increase in the left ventricular enddiastolic diameter (LVEDD;  $p < 0.05$ ) and the left ventricular endsystolic diameter (LVESD;  $p < 0.05$ ), and a small decrease in left ventricular ejection fraction (LVEF;  $p < 0.05$ ) (Figure 2B–D, Tables S1 and S2) when compared to AAV9-Luc.

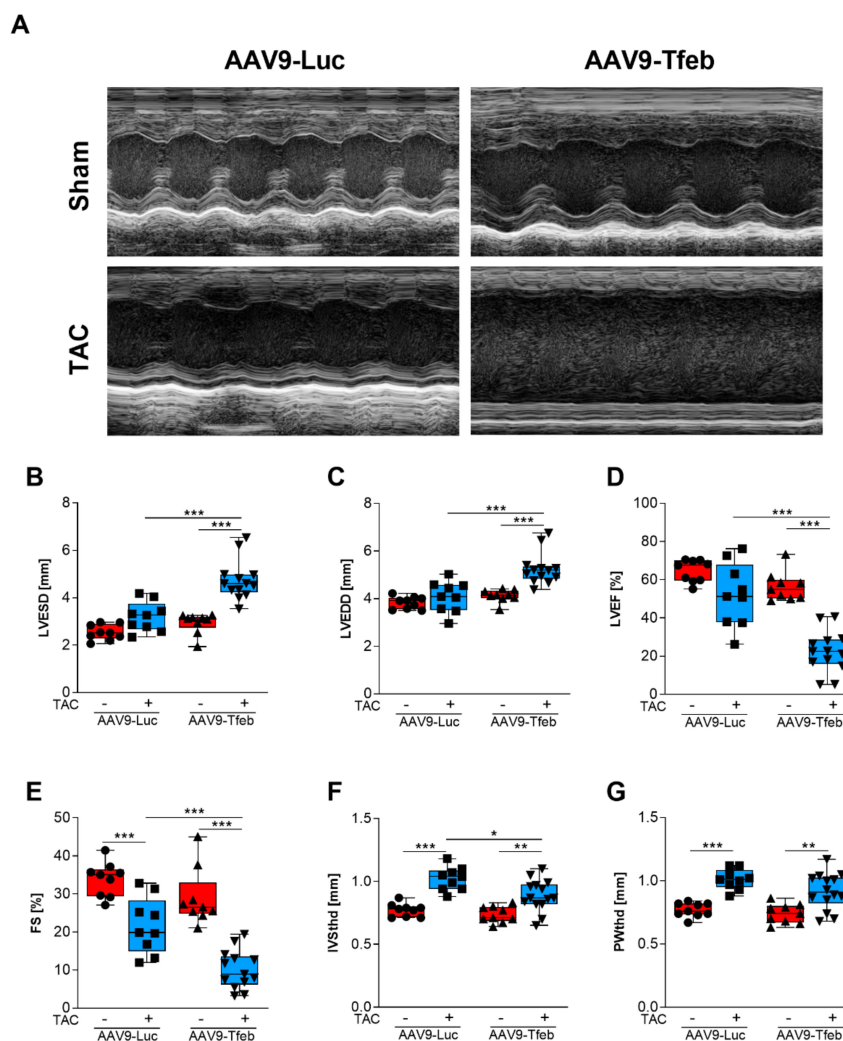


**Figure 1.** Cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB leads to heart failure in response to 28 days of pressure overload. (A) qRT-PCR results of *Tfeb* mRNA expression normalized to geometric mean of *Ipo8*, *Mrpl13* and *Pgk1* and shown as mean  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$ ; n.s. not significant. (B) Western blot analysis of protein lysates from hearts to analyse TFEB protein levels. Overexpressed and endogenous TFEB are indicated. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein content was used as loading control. (C) Gross morphology of representative hearts of sham and TAC treated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice are shown. (D) Heart weight/tibia length (HW/TL) and (E) Lung weight/tibia length (LW/TL) ratios of AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice 28 days after sham and TAC surgery are shown. Box plots show median and interquartile range (IQR)  $\pm$  minimum to maximum values. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Following TAC, AAV9-Luc mice showed an increased heart weight-to-tibia length ratio (HW/TL) to 138% ( $p < 0.001$ ; Figure 1D), a thickening of the interventricular septal wall thickness at systole (IVS<sub>ths</sub>,  $p < 0.05$ ; Table S2) and diastole (IVS<sub>thd</sub>,  $p < 0.001$ ; Figure 2F), and an increased thickness of the left ventricular posterior wall at diastole (PW<sub>thd</sub>,  $p < 0.005$ ; Figure 2G) when compared to AAV9-Luc sham mice. LVESD ( $p < 0.05$ ) was increased whereas the LVEDD remained unchanged in TAC-operated AAV9-Luc mice when compared to sham animals (Figure 2B,C). Although the fractional shortening (FS) was reduced ( $p < 0.01$ ), LVEF and stroke volume (SV) remained unchanged in AAV9-Luc during pressure-overload (Figure 2D,E, Table S2). Moreover, the lung weight-to-tibia length ratio remained unchanged in AAV9-Luc TAC compared to sham mice (Figure 1E). These data indicate that TAC surgery resulted in compensated left ventricular hypertrophy in AAV9-Luc mice. In contrast, TAC-operated AAV9-Tfeb mice showed a significantly stronger increase in HW/TL ratio when compared to AAV9-Luc mice (AAV9-Tfeb Sham:  $100 \pm 9\%$ , AAV9-Tfeb TAC:  $162.3 \pm 19.6\%$ ;  $p < 0.001$ ;  $p = 0.014$  AAV9-Luc TAC vs. AAV9-Tfeb TAC) (Figure 1D, Table S2). AAV9-Tfeb TAC mice showed only a mild increase in IVS<sub>thd</sub> ( $p < 0.01$ ) and PW<sub>thd</sub> ( $p < 0.01$ ), whereas IVS<sub>ths</sub>, PW<sub>ths</sub> remained unchanged when compared to AAV9-Tfeb sham mice (Figure 2F,G). TAC caused a pronounced increase in LVEDD ( $p < 0.005$  vs. AAV9-Tfeb sham) and LVESD ( $p < 0.005$  vs. AAV9-Tfeb sham) and a decrease in LVEF ( $p < 0.005$  vs. AAV9-Tfeb sham) and FS ( $p < 0.005$  vs. AAV9-Tfeb sham) in AAV9-Tfeb compared to sham mice (Figure 2B–E). Importantly, the increase in LVEDD ( $p < 0.001$  vs. AAV9-Luc TAC) and LVESD ( $p < 0.001$  vs. AAV9-Luc TAC) was substantially stronger and the decrease in LVEF ( $p < 0.001$  vs. AAV9-Luc TAC) and FS ( $p < 0.001$  vs. AAV9-Luc TAC) was significantly higher in AAV9-Tfeb TAC compared to



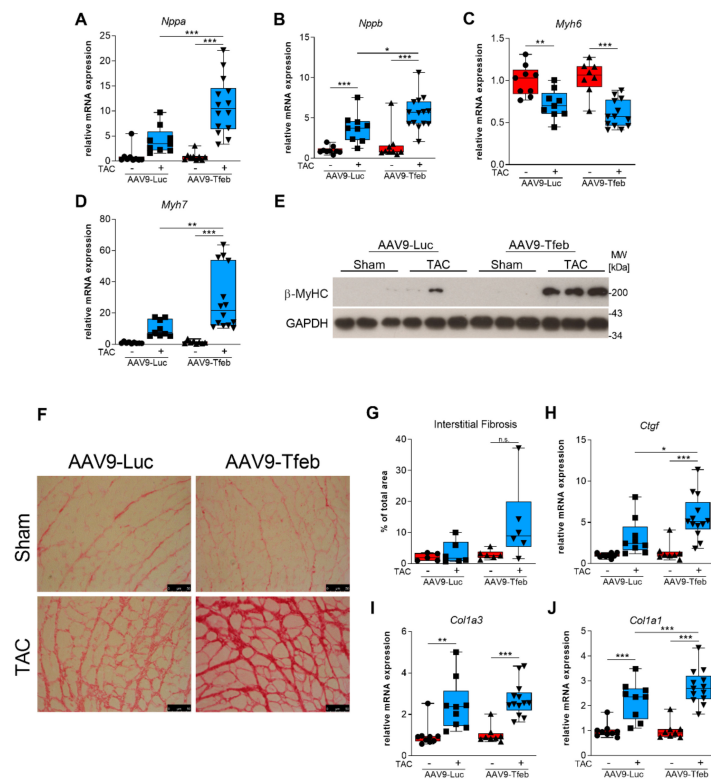
AAV9-Luc TAC (Figure 2B–E). TAC also caused an increase in E/A-ratio in AAV9-Luc and AAV9-Tfeb; this increase was significantly higher in AAV9-Tfeb mice. The mitral A velocity was significantly lower in TAC-operated AAV9-Tfeb compared to AAV9-Luc mice (Table S2). Moreover, lung weight-to-tibia length ratio increased in AAV9-Tfeb TAC mice (+222%;  $p < 0.01$  vs AAV9-Tfeb sham,  $p < 0.01$  vs. AAV9-Luc TAC; Figure 1E) indicative for pulmonary congestion due to heart failure. In summary, in a mouse model of compensated left ventricular hypertrophy cardiomyocyte-specific TFEB overexpression sensitized the heart to chronic pressure-overload resulting in left ventricular dilatation, reduced left ventricular function, and diminished hypertrophic response and diastolic dysfunction with a restrictive filling pattern.



**Figure 2.** Cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB leads to heart failure in response to 28 days of TAC. (A) Representative echocardiographic M-mode tracings of sham and TAC treated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice. Echocardiographic assessment of left ventricular endsystolic (LVESD, (B)) and enddiastolic diameter (LVEDD, (C)), left ventricular ejection fraction (LVEF, (D)), fractional shortening (FS, (E)), thickness of the interventricular septum in diastole (IVSthd, (F)) and posterior wall thickness in diastole (PWthd, (G)) of sham and TAC treated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice after 28 days. Boxes show IQR  $\pm$  minimum to maximum values. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 2.2. TFEB Overexpression Aggravates Pressure-Overload Induced Cardiac Stress Response

qRT-PCR was used to investigate if the heart failure phenotype in AAV9-Tfeb TAC mice was accompanied by a stronger activation of cardiac stress markers. No differences in *Nppa* (encoding atrial natriuretic factor), *Nppb* (B-type natriuretic peptide), *Myh7* (beta myosin heavy chain;  $\beta$ -MyHC), and *Myh6* (alpha myosin heavy chain,  $\alpha$ -MyHC) expression were found between AAV9-Tfeb sham and AAV9-Luc sham mice (Figure 3A–D). When compared to the respective sham group, a significant increase in *Nppa*, *Nppb*, and *Myh7* expression and a significant decrease in *Myh6* expression were found in AAV9-Luc TAC and AAV9-Tfeb TAC mice. Importantly, a significantly higher increase in *Nppa* ( $p < 0.01$ ), *Nppb* ( $p < 0.05$ ) and *Myh7* ( $p < 0.01$ ) expression was found in AAV9-Tfeb TAC compared to AAV9-Luc TAC mice. For *Myh7*, this result was confirmed on the protein level ( $\beta$ -MyHC; Figure 3E). These data show that cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB leads to an aggravated cardiac stress response during pressure-overload.



**Figure 3.** Overexpression of TFEB aggravates pressure-overload-induced cardiac stress response and interstitial fibrosis. qRT-PCR of RNAs isolated from hearts of AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice 28 days after sham and TAC surgery. Gene expression of *Nppa* ((A), atrial natriuretic factor), *Nppb* ((B), B-type natriuretic peptide), *Myh6* ((C),  $\alpha$ -myosin heavy chain), and *Myh7* ((D),  $\beta$ -myosin heavy chain), is shown. Data were normalized to geometric mean of *Mrpl13*, *Ipo8* and *Pgk1* and presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (E) Western Blot analysis of  $\beta$ -MyHC ( $\beta$ -myosin heavy chain). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein content was used as loading control. (F) Representative Picrosirius Red staining of histological sections from hearts of sham and TAC operated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb mice to identify interstitial fibrosis. Scale bars: 50  $\mu$ m. (G) Interstitial fibrosis is presented as percentage of total area of the histological cross section ( $n = 5$ –6 per group). (H–J) Quantification of connective tissue growth factor ((H), *Ctgf*), collagen alpha-1 type III ((I), *Col1a3*), and collagen alpha-1 type I ((J), *Col1a1*) expression by qRT-PCR normalized to geometric mean of *Ipo8*, *Mrpl13* and *Pgk1*. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 2.3. TAC-Induced Interstitial Fibrosis Is Augmented by TFEB Overexpression

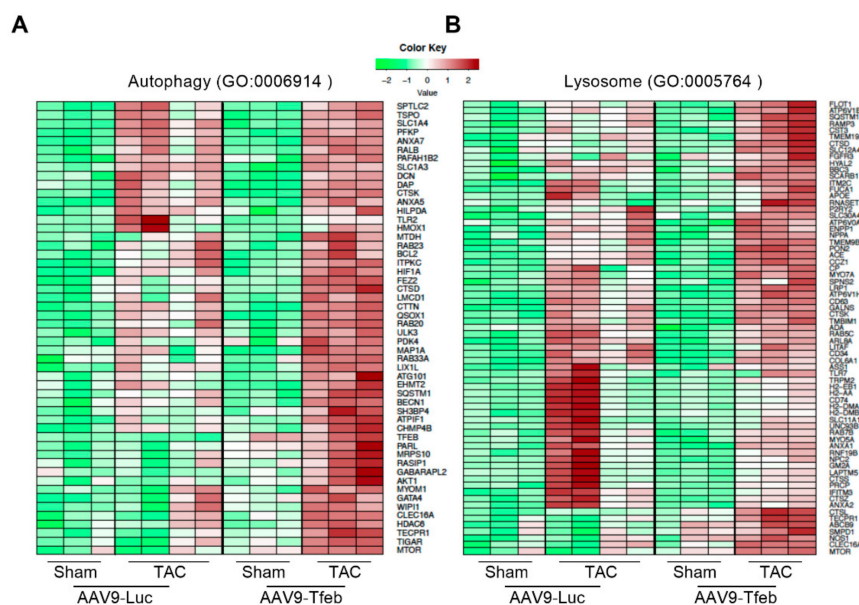
Pathological cardiac remodeling is often accompanied by interstitial fibrosis [26,27]. To investigate if the heart failure phenotype resulting from TFEB overexpression was associated with increased interstitial myocardial fibrosis, we performed Picosirius Red staining of histological cross-sections from our experimental groups. As expected, AAV9-Luc mice developed interstitial fibrosis (Figure 3F,G). However, this phenotype was much stronger in AAV9-Tfeb mice in response to TAC (Figure 3F,G). Although, the gene expression of *connective tissue growth factor (Ctgf)*, a marker for extracellular matrix synthesis, was higher in the AAV9-Tfeb TAC compared to AAV9-Luc TAC mice, the expression of *collagen I* and *collagen III* remained unchanged (Figure 3H–J). In summary, these data indicate that the heart failure phenotype in AAV9-Tfeb mice is accompanied by pronounced interstitial cardiac fibrosis.

### 2.4. TFEB Increases ALP Gene Expression during Chronic Pressure Overload

The role of TFEB for ALP-mediated protein degradation is well described in non-muscle tissue [17,18,28] but the regulation of ALP-related genes in the heart in response to stress is not well understood. We used next-generation sequencing of total RNA isolated from the interventricular septum of sham- and TAC-operated AAV9-Luc (sham:  $n = 3$ ; TAC:  $n = 4$ ) and AAV9-Tfeb (sham:  $n = 3$ ; TAC:  $n = 3$ ) mice to quantitate TFEB-dependent gene expression. As a result, our data set included 413,676,271 reads sequenced across the four experimental groups in total, where 326,734,645 reads could be uniquely mapped (78.98%) (Table S3). Principal component analysis (PCA) disclosed pressure-overload as the main source of the variance observed in our dataset (PC1). Furthermore, PC2 separated AAV9-Luc TAC from AAV9-Tfeb TAC mice (Figure S1).

A comparison of the transcriptional profiles revealed that TFEB overexpression caused a differential regulation of only 79 genes (20 up- and 59 downregulated) in the heart (Table S4). Gene ontology (GO) term analysis (biological process, BP) of these differentially expressed genes (DEG) revealed an enrichment of genes contained in cell activation (GO:0001775; e.g., *Itga2b*, *Itgb2*, *Irs2*, *Ctsl*) and response to stress (GO:0006950; e.g., *Tmsb4x*, *Ppargc1a*, *Gadd45a*). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-pathway analysis showed that the regulation of actin cytoskeleton (mmu04810; e.g., *Tmsb4x*, *Itgb2*, *Itga2b*) and phagosome (mmu04145; e.g., *Ctsl*, *Tubb1*, *Itgb2*) was increased in AAV9-Tfeb sham-treated hearts. TAC resulted in an up-regulation of 2405 genes in AAV9-Tfeb but only 1392 genes in AAV9-Luc hearts (Table S4, Figure S2). From the upregulated genes, 990 genes were increased in both TAC groups. TAC resulted in a downregulation of 2002 genes in AAV9-Tfeb but only 969 genes in AAV9-Luc hearts (Table S4). From the down-regulated genes, 783 genes were decreased in both TAC groups. These data indicate that the overexpression of TFEB results in an augmented transcriptional regulation in the heart in response to TAC. Upregulated as well as downregulated genes were annotated using the KEGG database to identify enriched categories. Pathways that are likely influenced by DEG are shown in Tables S5–S13. In general, the genes that were increased in both TAC-treated AAV9-Luc and AAV9-Tfeb hearts reflected the general stress response with enrichment of extracellular matrix-receptor interaction (e.g., *Itgb5*, *, *, *, *, *), focal adhesion (e.g., *Lamc2*, *Rap1b*, *Flnc*, *Cav3*), regulation of actin cytoskeleton (e.g., *Actb*, *Actg1*, *Actr3*, *Actn1*, *Actn4*) and PI3K-Akt signaling pathway (e.g., *Fgf6*, *Myc*, *Pdgfc*, *Spp1*, *Eif4ebp1*, *Creb3*, *Il6*, *Tlr4*, *Atf4*). The genes that were downregulated in both groups were contained in the KEGG pathways fatty acid degradation (e.g., *Acaa2*, *Cpt2*, *Aldh2*, *Hadh*), calcium signaling pathway (e.g., *Camk2a*, *Adrb1*, *Cacna1h*, *Mylk*, *Casq1*), and cardiac muscle contraction (e.g., *Atp2a2*, *Tnni3*, *Myh6*). We next performed a KEGG pathway analysis with the genes that were either upregulated only in the hearts of TAC-treated AAV9-Luc but not AAV9-Tfeb mice and vice versa, which uncovered pronounced differences between both groups. When considering genes that were only upregulated in TAC AAV9-Luc but not TAC AAV9-Tfeb hearts, the NOD-like receptor signaling pathway (e.g., *Casp1*, *Nlrp3*, *Myd88*, *Gsdmd*, *Il1b*), the NF- $\kappa$ B signaling pathway (e.g., *Cd40*, *Prkcb*, *Tnfaip3*) and*****

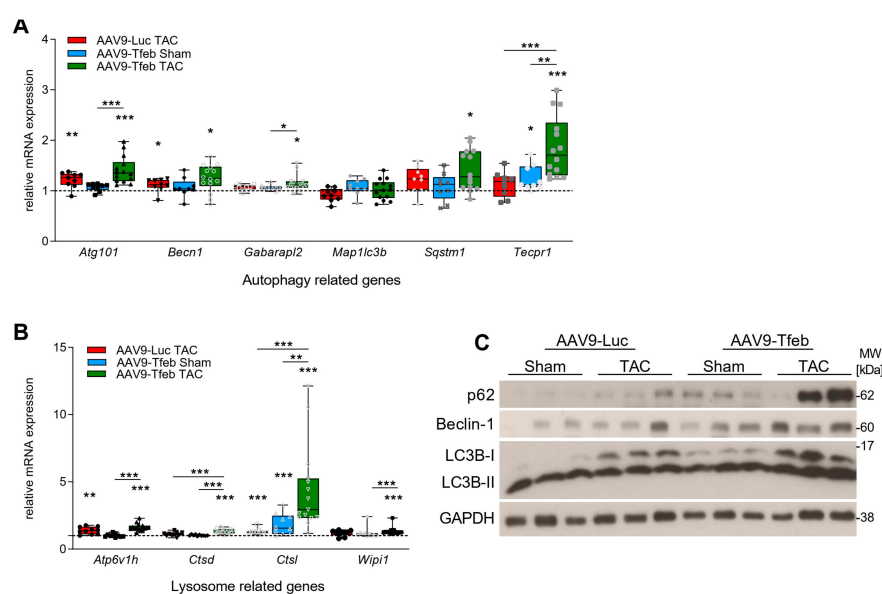
cytokine–cytokine receptor interaction (e.g., *Ccl12*, *Osm*, *Lif*, *Inhba*, *Il1rl2*, *Ccl2*, *Il7r*) were predominantly enriched. In TAC AAV9-Tfeb hearts, the upregulated genes were contained in the KEGG pathways ribosome (e.g., *Rpl4*, *Rpl10*, *Rplp1*), phagosome (e.g., *Ctss*, *Lamp1*, *Ctstl*, *Atp6v1f*, *Atp6ap1*, *Atp6v0e*), endocytosis (e.g., *Snx4*, *Ldlrap1*, *Snx5*, *Vps37b*, *Chmp4c*, *Chmp3*, *Chmp4b*), autophagy (e.g., *Becn1*, *Gabrarpl1*, *Wipi1*, *Mtor*, *Camkk2*, *Atg101*, *Akt1*, *Sqstm1*, *Ctstb*), insulin signaling (e.g., *Ptpn1*, *Irs2*, *Socs2*, *Rapgef1*) and lysosome (e.g., *Atp6ap1*, *Cltb*, *Ctss*, *Lamp1*, *Ctstl*, *Cttd*, *Ctstb*). Downregulated genes in AAV9-Luc but not AAV9-Tfeb TAC hearts were contained in metabolic pathways (e.g., *Eno3*, *Ldhd*, *Car4*, *Got1*), pyruvate metabolism (e.g., *Adh1*, *Mdh1*, *Acacb*) and oxidative phosphorylation (e.g., *Atp5a1*, *Ndufs2*, *Sdhc*, *Cox6c*). In contrast, downregulated genes in the hearts of TAC-treated AAV9-Tfeb but not AAV9-Luc mice showed enrichment in the cGMP-PKG signaling pathway (e.g., *Pde2a*, *Nfatc3*, *Creb1*, *Pde3a*), growth hormone synthesis, secretion and action (e.g., *Stat5a*, *Stat5b*, *Irs1*, *Mapk14*, *Mapk9*), and adrenergic signaling in cardiomyocytes (e.g., *Camk2b*, *Ryr2*, *Myl2*, *Cacna1s*, *Scn4b*) (Tables S5–S13). GO-term analyses are depicted in Figure S2. To further investigate if genes contained in ALP were increased in TAC treated AAV9-Tfeb hearts when compared to AAV9-Luc, we performed hierarchical clustering of all genes contained in autophagy (Figure 4A) and lysosomes (Figure 4B), respectively. We found that ALP-related genes were increased in both groups in response to TAC. However, this increase was much stronger in TAC-treated AAV9-Tfeb mice (Figure 4).



**Figure 4.** RNA sequencing reveals that TFEB increases the expression of ALP genes during TAC. Heat maps showing the expression of genes that are enriched GO-terms (A) autophagy (GO:0006014) and (B) lysosome (GO:0005764).

To confirm that TFEB overexpression increases ALP gene expression in response to chronic pressure-overload, we performed a qRT-PCR analysis of RNAs isolated from the interventricular septum of all experimental groups. In the absence of pressure-overload, AAV9-Tfeb increased the expression of *cathepsin L* (*Ctstl*;  $p < 0.001$ ) and *tectonin beta-propeller repeat containing 1* (*Tecpr1*;  $p < 0.05$ ) (Figure 5). TAC treated AAV9-Luc animals showed increased levels of the ALP-genes *autophagy-related 101* (*Atg101*,  $p < 0.01$ ), *Beclin-1* (*Becn1*,  $p < 0.05$ ), *ATPase H + transporting v1 subunit h* (*Atp6v1h*;  $p < 0.01$ ) and *cathepsin L* (*Ctstl*;  $p < 0.001$ ) (Figure 5A). The induction of *Tecpr1*, *cathepsin D* (*Cttd*) and *Ctstl* expression was significantly stronger in AAV9-Tfeb TAC when compared to AAV9-Luc TAC mice. In addition, the ALP-genes *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like* (*Gabrarpl2*;

$p < 0.05$ ), sequestosome 1 (*Sqstm1*;  $p < 0.05$ ) and WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 (*Wipi1*, *Atg18*;  $p < 0.001$ ), were significantly induced in AAV9-Tfeb TAC mice compared to sham. However, microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B (*Map1lc3b*), encoding for LC3B, expression remained unchanged, whereas both isoforms LC3-I and LC3-II increased at the protein level in the two TAC groups, with a stronger increase in AAV9-Tfeb mice (Figure 5B,C). For p62 and Beclin-1 protein contents, we observed an increase in both TAC groups, which was more pronounced in AAV9-Tfeb mice. However, the degree of p62 induction was not consistent for all AAV9-Tfeb TAC animals. In summary, our data show that cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB promotes the expression of ALP genes during TAC, which was associated with the occurrence of heart failure in response to pressure-overload.



**Figure 5.** Validation of selected genes enriched in the GO-term analysis by qRT-PCR and Western blot analysis. (A,B) qRT-PCR to quantify gene expression of autophagy related genes (A) of *autophagy-related 101* (*Atg101*), *Beclin-1* (*Becn1*), *gamma-aminobutyric acid A receptor-associated protein-like 2* (*Gabarapl2*), *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (*Map1lc3b*), *sequestosome 1* (*Sqstm1*/p62), *tectonin beta-propeller repeat containing 1* (*Tecpr1*), and lysosome related genes (B) *ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit H* (*Atp6v1h*), *cathepsin D* (*Ctsd*), *cathepsin L* (*Ctsl*) and *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1* (*Wipi1*) in the interventricular septum from sham (AAV9-Luc, AAV9-Tfeb;  $n = 9$ ) and TAC (AAV9-Luc;  $n = 9$ , AAV9-Tfeb;  $n = 14$ ) operated mice. Genes involved in autophagy (GO:0006014) and lysosome (GO:0005764) are separately shown. Data were normalized to geometric mean of *Mrpl13*, *Ipo8* and *Pgk1* and presented as mean  $\pm$  SEM. Values indicate relative expression levels related to the AAV9-Luc sham group, which group mean was set to 1 ( $\pm$ SEM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (C) Western blot of proteins from left ventricular tissue lysates of sham (AAV9-Luc and AAV9-Tfeb) and TAC (AAV9-Luc and AAV9-Tfeb) treated mice ( $n = 3$  each) using anti-p62, anti-beclin-1 and anti-LC3 antibody, as indicated. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein content was used as the loading control.

### 3. Discussion

The function of TFEB in non-muscle cells and tissue is well defined [17,18,28]; however, whether TFEB plays a role in cardiac stress response was unknown. In our study, we used systemic administration of AAV9 to effectively overexpress TFEB in murine cardiomyocytes and exposed the mice to chronic pressure-overload by TAC surgery. Our mouse model caused a compensated left ventricular hypertrophy, as indicated by an increased heart

weight, an increased left ventricular wall thickness, a preserved LVEF, and an absence of pulmonary congestion. We found that cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB resulted in heart failure as indicated by left ventricular dilatation, reduced systolic function, increased the expression of stress response genes, augmented interstitial fibrosis and pulmonary congestion. Using RNA sequencing, qRT-PCR and Western Blot analysis we show that the overexpression of TFEB was accompanied by increased ALP gene expression in the heart when hemodynamic stress was applied. Our data suggest that TFEB sensitizes the heart to hemodynamic stress and facilitates heart failure possibly due to the activation of ALP-mediated protein degradation. This hypothesis is supported by the notion that TFEB regulates the expression of genes involved in lysosomal biogenesis and phagosome formation, two major parts of the ALP [17–19,29–31]. Moreover, we observed an increase in ALP gene expression in the heart by cardiomyocyte-specific overexpression of TFEB. Previous studies showed that ALP is important for protein turnover during cardiac stress response, especially in pressure-overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure [9–11,32,33]. Because cardiomyocytes remodel during pathological hypertrophy with an increased synthesis of sarcomeric and non-sarcomeric proteins, such as  $\beta$ -MyHC or calcium handling proteins, a well-controlled protein degradation must accompany this process to maintain cardiac function. Indeed, hemodynamic stress was shown to activate ALP in cardiomyocytes as early as 24 h after the induction of pressure-overload, which remained elevated for 3 weeks [9] to 8 weeks [34]. Both an increased as well as a decreased ALP activity are associated with cardiac hypertrophy and heart failure [35,36]. For example, chronic pressure-overload-induced heart failure was paralleled by increased autophagy in rodent hearts [9,36]. Likewise, the overexpression of Beclin-1, a key element of autophagy, increased autophagy in response to stress and augmented pathological remodeling in the heart, whereas Beclin-1 haploinsufficiency showed the opposite effect. Moreover, prolonged activation of autophagy by the activation of phosphoinositide 3-kinase accelerated the transition from hypertrophy to heart failure [37]. In contrast, inhibiting autophagy by cardiomyocyte-specific deletion of autophagy-related 5 (Atg5) leads to cardiomyopathy in adult mice [9,15]. Our data support the hypothesis that prolonged ALP activation sensitizes the heart to hemodynamic stress resulting in heart failure. We hypothesize that fine-tuning of the ALP throughout the disease course is important for cardiac stress response.

The transcriptional activity of TFEB is tightly controlled by its phosphorylation, which regulates its subcellular localization [38]. In non-myocytes, TFEB is predominantly localized in the cytoplasm and kinases such as the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt/Protein Kinase B [29,30,39–41] phosphorylate TFEB on specific serine residues, which hampers its translocation into the nucleus and its transcriptional activity [17,29,30,39]. For example, activated mTORC1 phosphorylates TFEB at the lysosomal membrane promoting its interaction with 14-3-3 chaperon proteins and therefore its cytosolic retention [30,39]. Conversely, reduced mTORC1 activity enhances TFEB shuttling into the nucleus and increases the expression of ALP genes [29,30,39]. Accordingly, mTORC1 deficiency should increase and its overexpression should decrease TFEB activity. When exposed to TAC *mTorc1* deficient mice showed an increased ALP activity, which was accompanied by left ventricular dilatation and heart failure [42,43]. These data are reminiscent of our findings showing that TFEB overexpression increased ALP gene expression in a mouse model of chronic pressure-overload which was accompanied by heart failure as well. However, whether TFEB activity is increased in the hearts of *mTorc1* deficient mice undergoing TAC and whether this response is accountable for the phenotype observed needs to be proven. In addition, since mTORC1 activity increases during the early [39,40,42,44] and decreases during later time points of TAC when the hearts go into failure [42], we hypothesize that TFEB activity is dynamically regulated throughout the disease course, an idea that warrants further investigations.

Earlier, we showed that the stress-responsive kinase protein kinase D1 (PKD1) via phosphorylation and inactivation of the transcriptional inhibitor histone deacetylase 5 (HDAC5) can also increase TFEB activity [20]. PKD1 activation would therefore be

expected to cause a similar response as we observed here. Indeed, cardiomyocyte specific PKD1 overexpression was shown to result in left ventricular dilation, thinning of the ventricular wall, deterioration of cardiac function, and increased expression of cardiac stress markers [45]. This observation is like the heart failure phenotype reported here. Likewise, we have shown that mice with a cardiomyocyte-specific deletion of *Prkd1* (encoding PKD1) are protected from pathological cardiac remodeling and dysfunction induced by stress, such as TAC and isoproterenol-treatment [26]. However, whether the phenotype of PKD1 transgenic mice or *Prkd1* knockout mice is related to a concomitant TFEB activation and inhibition, respectively, needs further investigation. Further work revealed that TFEB and TFE3 activity is also controlled by other PKD family members such as PKD2 and PKD3 and class IIa HDACs including HDAC4 and HDAC7 [21]. If this regulatory network affects TFEB and TFE3-mediated ALP genes in cardiomyocytes warrants further studies.

Without hemodynamic stress, TFEB overexpression caused only minor changes in ALP gene expression. Given the body of evidence showing that TFEB is tightly controlled by stress-responsive kinases [38], we assume that TFEB is less active in the unstressed heart. We hypothesize that in response to pressure-overload, TFEB is then activated, translocates to the nucleus, and increases ALP gene expression. This hypothesis is supported by our RNA sequencing data showing that significantly more ALP genes were increased in AAV9-Tfeb TAC mice, compared to controls. By using qRT-PCR, we confirmed that the expression of some ALP genes was increased in the hearts of TAC-treated AAV9-Tfeb mice. However, the content of ALP proteins, such as *Sqstm1*/p62, was not increased to the same degree in all of the TAC-treated mice. Indeed, p62 itself is a target for ALP-mediated degradation, which would lead to a decrease in its protein content. This balance between gene expression and protein degradation was not equal in all animals, at least not for the 28-day time point at which the analyses were performed. Further studies, especially autophagic flux assays, are needed to investigate the effects of TFEB on ALP activity in cardiomyocytes in response to TAC. Since we have also only investigated male mice, further studies are needed to address sex-based differences in the effects of TFEB-induced ALP activity in heart failure. We will pursue this issue further.

The central role of TFEB in the regulation of ALP activity made the transcription factor an attractive tool to treat lysosomal storage diseases, such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Gaucher disease, and Pompe's disease [22,24,25,46–48]. Because Pompe's disease is a prototypic lysosomal storage disease, it received particular attention [16]. Pompe's disease is caused by mutations of the *GAA* gene with resultant acid alpha-glucosidase (GAA, acid maltase) deficiency, a lysosomal hydrolase involved in the breakdown of glycogen. A lack of functional GAA results in extensive intra-lysosomal glycogen storage and accumulation of autophagic vesicles and autophagic debris in muscles [23]. These accumulations result in functional cardiac impairment and skeletal muscle weakness. Gatto et al. [23] elegantly showed that TFEB overexpression for 3 months attenuated the phenotype of Pompe's disease. As in our study, they also used systemic AAV9 mediated delivery of the human TFEB gene with the difference that they applied the muscle creatine kinase promoter to overexpress TFEB (AAV2.9-MCK-TFEB) in myocytes of the skeletal muscle and the heart. This approach attenuated muscle pathologies in a mouse model of Pompe's disease and resulted in an improved heart and skeletal muscle structure and function [23]. Together with our data, their results indicate that the overexpression of TFEB per se from 28 days to 3 months does not cause cardiac pathology. However, if the overexpression of TFEB over a longer period could lead to cardiac side effects, especially in mice that do not have a lysosomal storage disease, has not been investigated. There are also some technical differences between the study of Gatto et al. and our work. Gatto et al. overexpressed the human whereas we used the mouse *TFEB* gene. Furthermore, in contrast to the MCK-promoter used by Gatto et al., we used a CMV-enhanced myosin light chain (MLC) v2.1 promoter to favor cardiomyocyte-specific expression and to avoid expression in other cells. These experimental approaches of our respective groups were chosen according to the scientific questions asked. Gatto et al. investigated whether TFEB

overexpression would correct Pompe's disease in skeletal muscle, whereas we investigated the effects of TFEB in cardiomyocytes in response to pressure overload. Although the overexpression of TFEB seems to be safe under physiological conditions, it might be harmful in response to stress. Our data suggest that TFEB gene transfer needs to be specifically targeted, excluding cardiomyocytes. However, if cardiomyocyte-specific targeting and overexpression of TFEB in cardiomyocytes are needed, for example, to reverse cardiac hypertrophy associated with Pompe's disease, it may be important to further increase tissue-specific delivery. In this regard, a careful selection of the cell type to be targeted and the use of cell type-specific promoters are necessary. It may also be important to use constructs that can be switched on and off or can be regulated to adjust gene expression and therefore protein amounts if needed. Cell type-specific delivery may also help to improve the efficacy of gene therapy and several delivery methods were shown to be successful. For example, direct intramyocardial injection of AAV was used to deliver the *vascular endothelial growth factor* gene that induced angiogenesis locally in ischemic mouse myocardium [49]. This method is independent of coronary blood flow and is associated with less systemic vector exposure. Another approach is the antegrade infusion of AAV into coronary arteries, which was already practiced in clinical trials of human heart failure patients to restore sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity [50,51]. However, these trials were not effective in terms of clinical endpoints [51]. Finally, we have previously shown that retrograde infusion of AAV-luciferase vectors loaded to lipid microbubbles into the anterior interventricular coronary vein increased transgene expression in pig hearts. The targeting of cardiomyocytes and gene expression in the heart was further increased when ultrasound-targeted microbubble destruction was used [52].

Based on our data we conclude that if *Tfeb* gene transfer is developed further for the treatment of lysosomal storage diseases, caution is needed for accompanying cardiovascular risk factors, such as arterial hypertension, valvular disorders, and coronary heart disease, and perhaps even in acute stress situations.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Construction of Adeno-Associated Vectors

The generation and administration of adeno-associated vectors (AAV) were performed as recently described [53,54]. Briefly, the AAV9 serotype was used because it shows the highest tropism for rodent hearts when delivered through the tail vein [55,56]. *Tfeb*-cDNA was PCR amplified using the primers shown in Table S14 and cloned into the AAV9-vector genome cassette under the control of the 1.5kb myosin light chain (MLC) 2v promoter and CMV enhancer to increase tissue specificity of AAV-mediated gene transfer (AAV9-Tfeb) [53]. Vectors containing a Luciferase gene served as a control (AAV9-Luc). Viral vector stock production using respective helper plasmids, as well as purification by filtration and iodixanol step gradient centrifugation, dialysis and titration were performed as previously reported [53,54,57].

##### 4.2. Animal Model

Animal procedures performed in accordance with the Max-Delbrück Center for Molecular Medicine guidelines were approved by the Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Germany (G 0229/11), and followed the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and the current version of German Law on the Protection of Animals. Mice were kept on a 12/12-h dark-light cycle (lights on at 7 am) in a temperature (22–24 °C) and humidity controlled (50–60%) environment and provided ad libitum standard chow and water. To induce chronic pressure-overload, 12-week-old male C57BL/6J wild type mice were subjected to transverse aorta constriction (TAC) surgery, introducing a 27G stenosis as previously described [26,58]. Briefly, mice were anesthetized, intubated and ventilated (2% isoflurane in air, 50 mL/min; rodent MiniVent, Harvard Apparatus, Germany) on a heated operation table. The thoracic cavity was opened by a median sternotomy until the 3rd rib and a blunted needle (27G) was placed on the aortic



arch between the innominate artery and left common carotid. A 7-0 suture was tied onto the needle. Immediately afterwards the needle was removed, and the thoracic cavity was closed. Sham mice were treated identically except for the ligation of the thoracic aorta. Before and over a period of 3 d (every 12 h) after surgery, the animals were treated with analgesic medication (Buprenorphine 0.02 mg/kg s.c.) and monitored daily until the end of the study. Directly after surgery mice were randomized to receive either AAV9-Luc or AAV9-Tfeb by an investigator blinded to treatment and analyses.  $10^{12}$  vector genomes of AAV9 were injected into the tail vein using a 30G needle to overexpress TFEB in cardiomyocytes (AAV9-Tfeb) of Sham ( $n = 9$ ) and TAC ( $n = 14$ ) mice. AAV9-Luc was used as a control in Sham ( $n = 9$ ) and TAC ( $n = 9$ ) mice. The effectiveness of TAC was confirmed by performing transthoracic echocardiography at baseline and after 4 weeks. Potential confounders such as the order of treatments and measurements, as well as animal/cage location, were minimized by prespecified and consecutive handling of the animals. Mice were sacrificed by cervical dislocation and removal of the heart after 4 weeks of surgery and directly after transthoracic echocardiography while still being in isoflurane anesthesia. At this time point, the integrity of aortic banding was confirmed by inspection of the surgical constriction. Hearts, lungs, and livers were harvested; body weight and organ weights were measured and normalized to tibia length.

#### 4.3. Transthoracic Echocardiography

Two-dimensional transthoracic echocardiography was performed as previously described [6–8,26,59]. Mice were anesthetized with 2% isoflurane and kept warm on a heated platform. Temperature and electrocardiography were continuously monitored. Systolic cardiac function and morphology were assessed with a VisualSonics Vevo 2100 High-Resolution Imaging System with the use of a high-resolution (38 MHz) transducer. The examiner was blinded for the treatment groups. The following parameters were measured: thickness of the left ventricular posterior wall (PWth, PWthd); septum (IVSth, IVSthd) at systole (s); diastole (d); left ventricular ejection fraction (LVEF); stroke volume (SV); left ventricular enddiastolic (LVEDD) and endsystolic (LVESD) dimensions. The left ventricular fractional shortening (FS) was calculated as following  $FS = [(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100$ . Diastolic parameters were evaluated as follows: Doppler flow profiles were acquired using pulsed-wave Doppler in the apical 4-chamber view. The sample volume was placed close to the tip of the mitral leaflets in the mitral orifice parallel to the blood flow to record maximal transmitral flow velocities. A simultaneous mitral inflow and aortic outflow profile was recorded, which allows the measurement of the isovolumetric relaxation time (IVRT, time interval between aortic valve closure and mitral valve opening).

#### 4.4. Histological Analyses

The apex of the harvested hearts was embedded in gum tragacanth (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) and then stepwise frozen in isopentane and liquid nitrogen. Embedded tissue was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further usage. A cryotome (Leica CM 3050 S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) was used for sections that were stained with haematoxylin and eosin, and Picosirius Red as previously described [6,8,26,59]. For Picosirius Red stain,  $6\mu\text{m}$  thick myocardial sections were fixed in ice-cold acetone for 10 min and afterwards washed twice with 98% ethanol for 5 min. Slides were then stained for 30 min in Picosirius Red F3BA (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA). After rinsing with distilled water, slides were washed with 98% and absolute ethanol, dehydrated with xylol and mounted with Vitro-Clud (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany). Images were acquired using a Leica CTR 6500 HS microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Fibrosis was quantified using ImageJ software 1.42c (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, last access 29 April 2022). In tile scan images, the borders of the myocardium were selected manually, and staining artefacts were removed. Using a predefined threshold, the red area representing fibrosis was measured and the results are presented as a percent of the total area.

#### 4.5. RNA Isolation, cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was isolated from the interventricular septum using TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and the FastPrep-24<sup>™</sup> instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's protocol and as recently reported [8,20,59,60]. The SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) was used to synthesize 1.5 µg RNA per sample in accordance with the manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and self-designed primers (for primer sequences see Table S15) on a Step-One<sup>™</sup> Plus thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) using the standard curve method as described recently [8,58,61,62]. The expression of individual genes was normalized to the geometric mean of the three stably expressed internal control genes *mitochondrial ribosomal protein L13 (Mrpl13)*, *importin 8 (Ipo8)*, and *phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1)* selected from obtained RNA sequencing data and according to previously published work [63].

#### 4.6. RNA-Sequencing

Total RNA analyses were evaluated by an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Library preparation of 500 ng RNA was performed using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Kit. To check integrity, DNA was evaluated again using an Agilent 2100 Bioanalyzer. The initial quality check of RNA-sequencing results was done by FASTQC software (v0.11.5; Babraham Bioinformatics, Babraham, UK; available online at [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc), last access 29 April 2022) [64]. Sequencing reads were mapped to the mouse whole genome (mm10) using STAR aligner (v 2.5.3a; default parameters) [65]. Read counts for each gene (Gencode vM12) were extracted from the BAM file using featureCounts software (v1.5.1) [66]. In order to avoid background signal noise, genes with less than 10 reads over all samples were excluded. Read counts from different biological groups were subjected to differential expression analysis using the DESeq2 R statistical package (v1.16.1) [67]. Genes with adjusted *p*-value (Benjamini–Hochberg procedure) lower than 0.05 were considered significantly differentially expressed in the respective comparison. Pathway enrichment analysis was performed using DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>, last access 29 April 2022) using the outputs BP\_ALL (all biological process terms) and MF\_ALL (all molecular function terms). The transcriptome data can be found under EBI Annotare v.2.0 (Project-ID: E-MTAB-9585).

#### 4.7. Protein Extraction

The FastPrep-24<sup>™</sup> instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) was used to homogenize tissue in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% (w/v) sodium deoxycholate) adjusted to pH 8.0 and supplemented with protease inhibitors (cOmplete, Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Switzerland) and phosphatase inhibitors (PhosphoStop, Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Switzerland). Micro Packaging Vials with 2.8 mm Precellys ceramic beads (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany) were used for homogenization. Lysates were cleared by centrifugation at 15,000 × *g* for 15 min at 4 °C and protein content was quantified using Pierce<sup>®</sup> BCA reagent (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA). After adding 6 × Laemmli buffer (300 mM Tris-HCl, pH 6.8; 12% (w/v) SDS; 0.1% (w/v) bromophenol blue, 50% (v/v) glycerol and 1/6 β-mercaptoethanol added before usage), samples were heated for 5 min at 95 °C and afterwards resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE healthcare, Chicago, IL, USA). Membranes were blocked with 5% skim milk powder or 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6) for 1 h. For immunoblotting following antibodies were used for overnight incubation at 4 °C: monoclonal anti-β/slow

myosin heavy chain (MyHC) (NOQ7.54D, mouse, 1:1000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Germany), anti-p62 (guinea pig, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), anti-microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B (anti-LC3B; detecting LC3B-I and LC3B-II, rabbit, 1:750, Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-TFEB (rabbit, 1:1000, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) and anti-Beclin-1 (rabbit, 1:1000, Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA). Loading was controlled with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (clone 6C5, mouse, 1:10,000, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Horseradish Peroxidase (HRP)-linked IgG goat anti-mouse, goat anti-rabbit (both 1:3000, Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) or goat anti-guinea pig (1:3000, Abcam, Cambridge, UK) were used as secondary antibodies. Proteins were visualized with a chemiluminescence system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol.

#### 4.8. Statistical Tests

Differences between the two groups were evaluated with an unpaired two-tailed Student's *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test was used for comparison of more than two independent groups. Weight analysis and echocardiography data are presented as box-and-whisker plots with boxes showing the mean and interquartile range (IQR) and whiskers indicating the minimum and maximum values. All qRT-PCR gene expression data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) in bar plots. Plots and statistics were performed by using GraphPad Prism® 8 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; version 8.03) and Adobe Illustrator CS6 (Adobe Inc. Mountain View, CA, USA), version 16.0.0.

## 5. Conclusions

Cardiomyocyte-specific TFEB overexpression sensitizes the heart to pressure-overload-induced cardiac stress resulting in heart failure. This phenotype can be attributed to TFEB-induced ALP activation. The treatment of ALP-related diseases such as Pompe's disease by TFEB gene therapy warrants careful consideration and specific tissue-targeting that excludes the heart.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23115943/s1>

**Author Contributions:** S.W., C.P.T., S.S. (Sibylle Schmidt), M.K., A.H., L.Z., F.C.L., O.J.M. and J.F. designed and performed experiments, discussed data, and prepared the manuscript. H.A.K., F.C.L., C.B. designed experiments and discussed data. R.O.V. and S.S. (Sascha Sauer) performed RNA sequencing, bioinformatics analysis and discussed data. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** J.F. received grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FI 965/5-1, FI 965/5-2). S.W., O.J.M., H.A.K. and J.F. received funding from DZHK (81X2500129). J.F. received funding from DZHK (81Z5400153).

**Institutional Review Board Statement:** Animal procedures were performed in accordance with Max-Delbrück Center for Molecular Medicine guidelines, were approved by the Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Germany (G 0229/11), and followed the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and the current version of German Law on the Protection of Animals.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets during and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request. The transcriptome data can be found under EBI Annotare v.2.0 (Project-ID: E-MTAB-9585). All other data are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We thank Astrid Schiche and Jutta Meisel for TAC surgery, and Martin Taube, Stefanie Schelenz and Arnd Heuser for echocardiographic assessment. We thank Andreas Jungmann for AAV generation, Claudia Langnick for performing the RNA sequencing reaction and Daniele Yumi Sunaga-Franze for support with uploading the NGS data set to Annotare.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Levy, D.; Garrison, R.J.; Savage, D.D.; Kannel, W.B.; Castelli, W.P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322*, 1561–1566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bui, A.L.; Horwich, T.B.; Fonarow, G.C. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **2011**, *8*, 30–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frey, N.; Olson, E.N. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 45–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Willis, M.S.; Ike, C.; Li, L.; Wang, D.Z.; Glass, D.J.; Patterson, C. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 456–459. [[CrossRef](#)]
- Willis, M.S.; Schisler, J.C.; Li, L.; Rodriguez, J.E.; Hilliard, E.G.; Charles, P.C.; Patterson, C. Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 80–88. [[CrossRef](#)]
- Fielitz, J.; Kim, M.S.; Shelton, J.M.; Latif, S.; Spencer, J.A.; Glass, D.J.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 2486–2495. [[CrossRef](#)]
- Fielitz, J.; van Rooij, E.; Spencer, J.A.; Shelton, J.M.; Latif, S.; van der Nagel, R.; Bezprozvannaya, S.; de Windt, L.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; et al. Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4377–4382. [[CrossRef](#)]
- Lodka, D.; Pahuja, A.; Geers-Knorr, C.; Scheibe, R.J.; Nowak, M.; Hamati, J.; Kohncke, C.; Purfurst, B.; Kanashova, T.; Schmidt, S.; et al. Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2016**, *7*, 165–180. [[CrossRef](#)]
- Zhu, H.; Tannous, P.; Johnstone, J.L.; Kong, Y.; Shelton, J.M.; Richardson, J.A.; Le, V.; Levine, B.; Rothmel, B.A.; Hill, J.A. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1782–1793. [[CrossRef](#)]
- Nakai, A.; Yamaguchi, O.; Takeda, T.; Higuchi, Y.; Hikoso, S.; Taniike, M.; Omiya, S.; Mizote, I.; Matsumura, Y.; Asahi, M.; et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 619–624. [[CrossRef](#)]
- Tannous, P.; Zhu, H.; Nemchenko, A.; Berry, J.M.; Johnstone, J.L.; Shelton, J.M.; Miller, F.J., Jr.; Rothmel, B.A.; Hill, J.A. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation* **2008**, *117*, 3070–3078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, X.; Robbins, J. Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2014**, *71*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Olive, M.; Abdul-Hussein, S.; Oldfors, A.; Gonzalez-Costello, J.; van der Ven, P.F.; Furst, D.O.; Gonzalez, L.; Moreno, D.; Torrejon-Escribano, B.; Alio, J.; et al. New cardiac and skeletal protein aggregate myopathy associated with combined MuRF1 and MuRF3 mutations. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 3638–3650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Witt, C.C.; Witt, S.H.; Lerche, S.; Labeit, D.; Back, W.; Labeit, S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J.* **2008**, *27*, 350–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dong, Y.; Undyala, V.V.; Gottlieb, R.A.; Mentzer, R.M., Jr.; Przyklenk, K. Autophagy: Definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Pharm. Ther.* **2010**, *15*, 220–230. [[CrossRef](#)]
- Van der Ploeg, A.T.; Reuser, A.J. Pompe's disease. *Lancet* **2008**, *372*, 1342–1353. [[CrossRef](#)]
- Settembre, C.; Di Malta, C.; Polito, V.A.; Garcia Arencibia, M.; Vetrini, F.; Erdin, S.; Erdin, S.U.; Huynh, T.; Medina, D.; Colella, P.; et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **2011**, *332*, 1429–1433. [[CrossRef](#)]
- Sardiello, M.; Palmieri, M.; di Ronza, A.; Medina, D.L.; Valenza, M.; Gennarino, V.A.; Di Malta, C.; Donaudy, F.; Embrione, V.; Polishchuk, R.S.; et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **2009**, *325*, 473–477. [[CrossRef](#)]
- Palmieri, M.; Impey, S.; Kang, H.; di Ronza, A.; Pelz, C.; Sardiello, M.; Ballabio, A. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3852–3866. [[CrossRef](#)]
- Du Bois, P.; Pablo Tortola, C.; Lodka, D.; Kny, M.; Schmidt, F.; Song, K.; Schmidt, S.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N.; Fielitz, J. Angiotensin II Induces Skeletal Muscle Atrophy by Activating TFEB-Mediated MuRF1 Expression. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 424–436. [[CrossRef](#)]
- Pablo Tortola, C.; Fielitz, B.; Li, Y.; Rudebusch, J.; Luft, F.C.; Fielitz, J. Activation of Tripartite Motif Containing 63 Expression by Transcription Factor EB and Transcription Factor Binding to Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer 3 Is Regulated by Protein Kinase D and Class IIa Histone Deacetylases. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 550506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sato, Y.; Kobayashi, H.; Higuchi, T.; Shimada, Y.; Ida, H.; Ohashi, T. TFEB overexpression promotes glycogen clearance of Pompe disease iPSC-derived skeletal muscle. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2016**, *3*, 16054. [[CrossRef](#)]

23. Gatto, F.; Rossi, B.; Tarallo, A.; Polishchuk, E.; Polishchuk, R.; Carrella, A.; Nusco, E.; Alvino, F.G.; Iacobellis, F.; De Leonibus, E.; et al. AAV-mediated transcription factor EB (TFEB) gene delivery ameliorates muscle pathology and function in the murine model of Pompe Disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Awad, O.; Sarkar, C.; Panicker, L.M.; Miller, D.; Zeng, X.; Sgambato, J.A.; Lipinski, M.M.; Feldman, R.A. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 5775–5788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chen, Y.; Liu, H.; Guan, Y.; Wang, Q.; Zhou, F.; Jie, L.; Ju, J.; Pu, L.; Du, H.; Wang, X. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1574–1587. [[PubMed](#)]
26. Fielitz, J.; Kim, M.S.; Shelton, J.M.; Qi, X.; Hill, J.A.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3059–3063. [[CrossRef](#)]
27. Fielitz, J.; Hein, S.; Mitrovic, V.; Pregla, R.; Zurbrugg, H.R.; Warnecke, C.; Schaper, J.; Fleck, E.; Regitz-Zagrosek, V. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *37*, 1443–1449. [[CrossRef](#)]
28. Settembre, C.; De Cegli, R.; Mansueto, G.; Saha, P.K.; Vetrini, F.; Visvikis, O.; Huynh, T.; Carissimo, A.; Palmer, D.; Klisch, T.J.; et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 647–658. [[CrossRef](#)]
29. Settembre, C.; Zoncu, R.; Medina, D.L.; Vetrini, F.; Erdin, S.; Huynh, T.; Ferron, M.; Karsenty, G.; Vellard, M.C.; Facchinetti, V.; et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1095–1108. [[CrossRef](#)]
30. Rocznik-Ferguson, A.; Petit, C.S.; Froehlich, F.; Qian, S.; Ky, J.; Angarola, B.; Walther, T.C.; Ferguson, S.M. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra42. [[CrossRef](#)]
31. Kuiper, R.P.; Schepens, M.; Thijssen, J.; Schoenmakers, E.F.; van Kessel, A.G. Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2315–2322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhou, L.; Ma, B.; Han, X. The role of autophagy in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *57*, R143–R152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, Z.V.; Rothermel, B.A.; Hill, J.A. Autophagy in hypertensive heart disease. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8509–8514. [[CrossRef](#)]
34. Givvimani, S.; Munjal, C.; Tyagi, N.; Sen, U.; Metreveli, N.; Tyagi, S.C. Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (Mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32388. [[CrossRef](#)]
35. Dammrich, J.; Pfeifer, U. Cardiac hypertrophy in rats after supraaortic constriction. I. Size and number of cardiomyocytes, endothelial and interstitial cells. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1983**, *43*, 265–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, B.; Chi, R.F.; Qin, F.Z.; Guo, X.F. Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: Association with oxidative stress. *Exp. Physiol.* **2016**, *101*, 1050–1063. [[CrossRef](#)]
37. Yu, P.; Zhang, Y.; Li, C.; Li, Y.; Jiang, S.; Zhang, X.; Ding, Z.; Tu, F.; Wu, J.; Gao, X.; et al. Class III PI3K-mediated prolonged activation of autophagy plays a critical role in the transition of cardiac hypertrophy to heart failure. *J. Cell Mol. Med.* **2015**, *19*, 1710–1719. [[CrossRef](#)]
38. Puertollano, R.; Ferguson, S.M.; Brugarolas, J.; Ballabio, A. The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *EMBO J.* **2018**, *37*, e98804. [[CrossRef](#)]
39. Martina, J.A.; Chen, Y.; Gucek, M.; Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **2012**, *8*, 903–914. [[CrossRef](#)]
40. Vega-Rubin-de-Celis, S.; Pena-Llopis, S.; Konda, M.; Brugarolas, J. Multistep regulation of TFEB by MTORC1. *Autophagy* **2017**, *13*, 464–472. [[CrossRef](#)]
41. Palmieri, M.; Pal, R.; Nelvagal, H.R.; Lotfi, P.; Stinnett, G.R.; Seymour, M.L.; Chaudhury, A.; Bajaj, L.; Bondar, V.V.; Bremner, L.; et al. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14338. [[CrossRef](#)]
42. Zhang, D.; Contu, R.; Latronico, M.V.; Zhang, J.; Rizzi, R.; Catalucci, D.; Miyamoto, S.; Huang, K.; Ceci, M.; Gu, Y.; et al. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2805–2816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shende, P.; Plaisance, I.; Morandi, C.; Pellieux, C.; Berthonneche, C.; Zorzato, F.; Krishnan, J.; Lerch, R.; Hall, M.N.; Ruegg, M.A.; et al. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. *Circulation* **2011**, *123*, 1073–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Drolet, M.C.; Desbiens-Brassard, V.; Roussel, E.; Tu, V.; Couet, J.; Arseneault, M. Blockade of the acute activation of mTOR complex 1 decreases hypertrophy development in rats with severe aortic valve regurgitation. *Springerplus* **2015**, *4*, 435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Harrison, B.C.; Kim, M.S.; van Rooij, E.; Plato, C.F.; Papst, P.J.; Vega, R.B.; McAnally, J.A.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N.; et al. Regulation of cardiac stress signaling by protein kinase d1. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 3875–3888. [[CrossRef](#)]
46. Zhang, Y.D.; Zhao, J.J. TFEB Participates in the Abeta-Induced Pathogenesis of Alzheimer's Disease by Regulating the Autophagy-Lysosome Pathway. *DNA Cell Biol.* **2015**, *34*, 661–668. [[CrossRef](#)]

47. Meng, X.; Luo, Y.; Liang, T.; Wang, M.; Zhao, J.; Sun, G.; Sun, X. Gypenoside XVII Enhances Lysosome Biogenesis and Autophagy Flux and Accelerates Autophagic Clearance of Amyloid-beta through TFEB Activation. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *52*, 1135–1150. [[CrossRef](#)]
48. Spanpanato, C.; Feeney, E.; Li, L.; Cardone, M.; Lim, J.A.; Annunziata, F.; Zare, H.; Polishchuk, R.; Puertollano, R.; Parenti, G.; et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 691–706. [[CrossRef](#)]
49. Su, H.; Lu, R.; Kan, Y.W. Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13801–13806. [[CrossRef](#)]
50. Hulot, J.S.; Salem, J.E.; Redheuil, A.; Collet, J.P.; Varnous, S.; Jourdain, P.; Logeart, D.; Gandjbakhch, E.; Bernard, C.; Hatem, S.N.; et al. Effect of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a on ventricular remodelling in patients with advanced systolic heart failure: Results from the AGENT-HF randomized phase 2 trial. *Eur. J. Heart Fail.* **2017**, *19*, 1534–1541. [[CrossRef](#)]
51. Greenberg, B.; Butler, J.; Felker, G.M.; Ponikowski, P.; Voors, A.A.; Desai, A.S.; Barnard, D.; Bouchard, A.; Jaski, B.; Lyon, A.R.; et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): A randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* **2016**, *387*, 1178–1186. [[CrossRef](#)]
52. Schlegel, P.; Huditz, R.; Meinhardt, E.; Rapti, K.; Geis, N.; Most, P.; Katus, H.A.; Muller, O.J.; Bekereditian, R.; Raake, P.W. Locally Targeted Cardiac Gene Delivery by AAV Microbubble Destruction in a Large Animal Model. *Hum. Gene Ther. Methods* **2016**, *27*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Muller, O.J.; Leuchs, B.; Pleger, S.T.; Grimm, D.; Franz, W.M.; Katus, H.A.; Kleinschmidt, J.A. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *70*, 70–78. [[CrossRef](#)]
54. Goehring, C.; Rutschow, D.; Bauer, R.; Schinkel, S.; Weichenhan, D.; Bekereditian, R.; Straub, V.; Kleinschmidt, J.A.; Katus, H.A.; Muller, O.J. Prevention of cardiomyopathy in delta-sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *82*, 404–410. [[CrossRef](#)]
55. Inagaki, K.; Fuess, S.; Storm, T.A.; Gibson, G.A.; McTiernan, C.F.; Kay, M.A.; Nakai, H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: Efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pacak, C.A.; Mah, C.S.; Thattaliyath, B.D.; Conlon, T.J.; Lewis, M.A.; Cloutier, D.E.; Zolotukhin, I.; Tarantal, A.F.; Byrne, B.J. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.* **2006**, *99*, e3–e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Werfel, S.; Jungmann, A.; Lehmann, L.; Ksienzyk, J.; Bekereditian, R.; Kaya, Z.; Leuchs, B.; Nordheim, A.; Backs, J.; Engelhardt, S.; et al. Rapid and highly efficient inducible cardiac gene knockout in adult mice using AAV-mediated expression of Cre recombinase. *Cardiovasc. Res.* **2014**, *104*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kny, M.; Csalyi, K.D.; Klaeske, K.; Busch, K.; Meyer, A.M.; Merks, A.M.; Darm, K.; Dworzatzek, E.; Fliegner, D.; Baczko, I.; et al. Ninjurin1 regulates striated muscle growth and differentiation. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216987. [[CrossRef](#)]
59. Busch, K.; Kny, M.; Huang, N.; Klassert, T.E.; Stock, M.; Hahn, A.; Graeger, S.; Todiras, M.; Schmidt, S.; Chamling, B.; et al. Inhibition of the NLRP3/IL-1beta axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2021**, *12*, 1653–1668. [[CrossRef](#)]
60. Schmidt, F.; Kny, M.; Zhu, X.; Wollersheim, T.; Persicke, K.; Langhans, C.; Lodka, D.; Kleber, C.; Weber-Carstens, S.; Fielitz, J. The E3 ubiquitin ligase TRIM62 and inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Crit. Care* **2014**, *18*, 545. [[CrossRef](#)]
61. Hahn, A.; Kny, M.; Pablo-Tortola, C.; Todiras, M.; Willenbrock, M.; Schmidt, S.; Schmoeckel, K.; Jorde, I.; Nowak, M.; Jarosch, E.; et al. Serum amyloid A1 mediates myotube atrophy via Toll-like receptors. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2020**, *11*, 103–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zanders, L.; Kny, M.; Hahn, A.; Schmidt, S.; Wundersitz, S.; Todiras, M.; Lahmann, I.; Bandyopadhyay, A.; Wollersheim, T.; Kaderali, L.; et al. Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2022**, *13*, 713–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0034.1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. FastQC. Available online: [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) (accessed on 29 April 2022).
65. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

1 **The transcription factor EB (TFEB) sensitizes the heart to chronic pressure overload**

2

3 Sebastian Wundersitz<sup>1,2</sup>, Cristina Pablo Tortola<sup>1</sup>, Sibylle Schmidt<sup>1</sup>, Ramon Oliveira Vidal,

4 PhD<sup>3,4</sup>, Melanie Kny<sup>1</sup>, PhD, Alexander Hahn<sup>1</sup>, Lukas Zanders<sup>1</sup>, Hugo A. Katus<sup>5,6</sup>, MD, Sascha

5 Sauer<sup>3,4</sup>, PhD, Christian Butter<sup>7</sup>, MD, Friedrich C. Luft<sup>1</sup>, MD, Oliver J. Müller<sup>8,9</sup>, MD, Jens

6 Fielitz<sup>10,11</sup>, MD

7 **Table S1. Morphometric analysis is indicative for a heart failure phenotype in AAV9-Tfeb**  
 8 **but not AAV9-Luc mice following TAC.**

	AAV9-Luc		AAV9-Tfeb	
	<i>Sham</i>	<i>TAC</i>	<i>Sham</i>	<i>TAC</i>
<i>n</i>	9	9	9	14
<i>BW, g, prior to surgery</i>	28.1 ± 0.66	27.6 ± 0.47	27.6 ± 0.43	27.8 ± 0.38
<i>BW, g, 28 days post-surgery</i>	27.5 ± 0.72	27.0 ± 0.50	27.3 ± 0.50	25.9 ± 0.57
<i>HW, mg</i>	140.7 ± 3.95	194.0 ± 10.05***	148.0 ± 4.90	239.61 ± 8.12*** #
<i>Lung weight, mg</i>	142.7 ± 3.59	169.0 ± 12.60	146.1 ± 3.46	316.1 ± 30.34** #
<i>Liver weight, mg</i>	1265.4 ± 41.15	1301.8 ± 65.72	1280.3 ± 42.59	1053.0 ± 51.29** #
<i>TL, mm</i>	17.02 ± 0.09	16.98 ± 0.06	17.00 ± 0.07	16.95 ± 0.05
<i>HW/TL, mg/mm</i>	8.26 ± 0.20	11.41 ± 0.57***	8.71 ± 0.30	14.13 ± 0.47*** #

9

10 Data are shown as mean ± SEM. HW indicates heart weight; BW, body weight; TL, tibia length.

11 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to corresponding sham mice. † $p < 0.05$  AAV9-Luc sham

12 compared AAV9-Tfeb sham mice. # $p < 0.05$  AAV9-Luc TAC compared to AAV9-Tfeb TAC mice.



13 **Table S2. Echocardiographic analysis shows that cardiomyocyte-specific TFEB**  
 14 **overexpression leads to heart failure in response to pressure-overload.**

	AAV9-Luc		AAV9-Tfeb	
	<i>Sham</i>	<i>TAC</i>	<i>Sham</i>	<i>TAC</i>
n	9	9	9	14
HR, bpm	496.2 ± 14.5	503.9 ± 19.99	462.3 ± 11.8	521.5 ± 10.69**
Morphology				
LVEDD, mm	3.83 ± 0.09	4.08 ± 0.22	4.12 ± 0.09 <sup>†</sup>	5.16 ± 0.19***, ###
LVESD, mm	2.54 ± 0.11	3.20 ± 0.21*	2.94 ± 0.14 <sup>†</sup>	4.62 ± 0.25***, ###
IVSthd, mm	0.77 ± 0.02	1.02 ± 0.03***	0.73 ± 0.02	0.89 ± 0.03**, #
IVSths, mm	1.16 ± 0.02	1.32 ± 0.05*	1.03 ± 0.05 <sup>†</sup>	1.09 ± 0.04###
PWthd, mm	0.77 ± 0.02	1.01 ± 0.03***	0.74 ± 0.03	0.92 ± 0.04**
PWths, mm	1.15 ± 0.03	1.36 ± 0.07*	1.07 ± 0.06	1.10 ± 0.04###
Systolic function				
FS, %	33.84 ± 1.50	21.68 ± 2.46**	29.02 ± 2.51	10.17 ± 1.36***, ###
LVEF, %	64.6 ± 1.93	52.3 ± 5.54	56.34 ± 2.55 <sup>†</sup>	22.41 ± 2.92***, ###
SV, μl	27.3 ± 1.49	27.6 ± 2.23	26.5 ± 1.13	19.4 ± 1.62***, ###
Diastolic function				
Mitral E/A ratio	1.32 ± 0.162	1.57 ± 0.1*	1.57 ± 0.38	2.12 ± 0.36*, #
Mitral E velocity, mm/s	649.7 ± 52.9	770.1 ± 196.2	676.7 ± 114.1	600.7 ± 194.8
Mitral A velocity, mm/s	500.8 ± 72.3	487.9 ± 109.5	461.4 ± 152.9	283.8 ± 115.4 <sup>#</sup>
E/E'	27.3 ± 4.7	37.1 ± 10.5	28.8 ± 4.3	38.7 ± 6.3
IVRT, ms	16.7 ± 3.2	15.6 ± 3.9	18.5 ± 2.2	17.8 ± 3.5
IVCT, ms	19.8 ± 4.2	23.7 ± 8.7	20.6 ± 6.4	23.8 ± 9.5
ET, ms	38.8 ± 6.3	38.4 ± 9.0	36.8 ± 5.0	38.9 ± 8.9

16 ET indicates ejection time; HR, heart rate; IVCT, isovolumic contraction time; IVRT, isovolumic  
17 relaxation time; IVSths, interventricular septal wall thickness at systole; IVSthd, interventricular  
18 septal wall thickness at diastole; LVEDD, left ventricular enddiastolic diameter; LVESD, left  
19 ventricular endsystolic diameter; PWths, posterior wall thickness in systole; PWthd, posterior wall  
20 thickness in diastole; SV, left ventricular stroke volume; FS, left ventricular fractional shortening,  
21 LVEF, left ventricular ejection fraction. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to  
22 corresponding sham operated mice; † $p < 0.05$  AAV9-Luc sham compared to AAV9-Tfeb sham  
23 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  AAV9-Luc TAC  
24 compared to AAV9-Tfeb TAC mice.

25 **Table S3. Sequencing results for each experimental group.**

<b>Name</b>	<b>Initial Reads</b>	<b>Uniquely Mapped Reads</b>	<b>Uniquely Mapped Reads (%)</b>
<b>AAV9-Luc Sham1</b>	33.10 M	25.58 M	77.26
<b>AAV9-Luc Sham2</b>	26.45 M	20.35 M	76.95
<b>AAV9-Luc Sham3</b>	29.77 M	23.29 M	78.22
<b>AAV9-Tfeb Sham1</b>	26.43 M	20.56 M	77.80
<b>AAV9-Tfeb Sham2</b>	27.96 M	21.81 M	78.00
<b>AAV9-Tfeb Sham3</b>	31.03 M	23.86 M	76.90
<b>AAV9-Luc TAC1</b>	28.05 M	22.92 M	81.72
<b>AAV9-Luc TAC2</b>	29.38 M	23.33 M	79.43
<b>AAV9-Luc TAC3</b>	31.84 M	24.69 M	77.54
<b>AAV9-Luc TAC4</b>	34.98 M	28.48 M	81.44
<b>AAV9-Tfeb TAC1</b>	46.88 M	38.12 M	81.32
<b>AAV9-Tfeb TAC2</b>	32.51 M	25.75 M	79.21
<b>AAV9-Tfeb TAC3</b>	35.31 M	27.99 M	79.26

26

27 Overview of total reads and uniquely mapped reads generated by RNA-Sequencing for each  
 28 animal included. M indicates 1 Million reads.

29

30 **Table S4. RNA sequencing results**

31 Please refer to .xls Table.

32 **Table S5. KEGG pathway analysis of all DEG in hearts of AAV9-Luc TAC but not AAV9-**  
 33 **Tfeb TAC treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu05417:Lipid and atherosclerosis	20	3,571	3.6E-05	CCL12, CD40, HSPA5, APOA1, POU2F2, SOD2, PYCARD, NRAS, AKT2, TRP53, IL1B, CASP1, CCL2, NLRP3, CD36, TLR6, PLCB1, CALM1, LDLR, MYD88	276	216	8941	3,000	0,010	0,010	0,010
mmu04621:NOD-like receptor signaling pathway	18	3,214	2.7E-04	GSDMD, NLRP1B, CCL12, NLRP1A, CARD9, TNFAIP3, OAS1A, OAS1G, PYCARD, AIM2, NAIIP6, IL1B, CASP1, CCL2, NLRP3, PLCB1, MYD88, BIRC3	276	211	8941	2,764	0,075	0,033	0,030
mmu04064:NF-kappa B signaling pathway	12	2,143	3.7E-04	CD40, PRKCB, IL1B, ITA, TNFAIP3, TNFRSF11A, BCL2A1D, PTGS2, BCL2A1B, CARD11, MYD88, BIRC3	276	105	8941	3,702	0,102	0,033	0,030
mmu04110:Cell cycle	13	2,321	4.5E-04	BUB1B, TTK, CDC25C, CCNA2, CDC20, WEE1, CCNB1, CCNE1, TRP53, EZF1, MCM3, EZF2, BUB1	276	125	8941	3,369	0,124	0,033	0,030
mmu04625:C-type lectin receptor signaling pathway	12	2,143	6.4E-04	PYCARD, CLEC4E1, NRAS, PAK1, CCL22, IL1B, AKT2, CARD9, CASP1, NLRP3, CALM1, PTGS2	276	112	8941	3,471	0,171	0,038	0,034
mmu04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	20	3,571	1.6E-03	TNFSF1B, CCL24, CCL12, CD40, CCL22, MPL, OSM, LIF, INHBA, TNFRSF11A, BMP6, IL27RA, IL1RL2, IL1B, LTA, CCL2, CD27, CCR7, TNFSF8, IL7R	276	292	8941	2,219	0,385	0,081	0,074
mmu05132:Salmonella infection	18	3,214	2.0E-03	GSDMD, MLKL, RHOG, RHOH, DYNLL1, PYCARD, TUBB6, PAK1, TUBB5, NAIIP6, AKT2, IL1B, CASP1, NLRP3, TLR6, MYD88, S100A10, BIRC3	276	253	8941	2,305	0,454	0,086	0,079
mmu05200:Pathways in cancer	30	5,357	2.5E-03	GSTP2, EPAS1, FGF1, PTGS2, EGFR, RASGRB4, DLG4, NRAS, GNGT2, AKT2, CTNNA1, STAT4, EZF1, EZF2, PMAIP1, LAMB2, PRKCB, WNT9B, CCNA2, RADS1, GSTA3, CCNE1, TRP53, GSTA1, CKS2, BIRC5, IL7R, CALM1, PLCB1, BIRC3	276	543	8941	1,790	0,517	0,089	0,082
mmu01524:Platinum drug resistance	9	1,607	3.1E-03	TOP2A, GSTP2, GSTA3, AKT2, TRP53, GSTA1, PMAIP1, BIRC5, BIRC3	276	80	8941	3,644	0,598	0,089	0,082
mmu04210:Apoptosis	12	2,143	3.1E-03	PARP3, NRAS, AKT2, TRP53, PRF1, PMAIP1, BIRC5, CTSW, CTSF, BCL2A1D, BCL2A1B, BIRC3	276	136	8941	2,858	0,599	0,089	0,082
mmu04662:IL2 receptor signaling pathway	9	1,607	3.3E-03	NRAS, IFITM1, PIRAZ2, PRKCB, AKT2, PIK3AP1, CARD11, CD22, LILRA5	276	81	8941	3,599	0,626	0,089	0,082
mmu00270:Cysteine and methionine metabolism	7	1,250	5.5E-03	LDHB, MDH1, GOT1, PSAT1, KYAT3, MAT2B, BCAT2	276	53	8941	4,279	0,802	0,134	0,123
mmu05214:Glioma	8	1,429	7.5E-03	NRAS, PRKCB, AKT2, TRP53, EZF1, EZF2, CALM1, EGFR	276	74	8941	3,502	0,891	0,146	0,133
mmu05222:Small cell lung cancer	9	1,607	7.7E-03	LAMB2, CCNE1, AKT2, TRP53, EZF1, CKS2, EZF2, PTGS2, BIRC3	276	93	8941	3,135	0,898	0,146	0,133
mmu05144:Malaria	7	1,250	7.8E-03	CD40, CCL12, IL1B, CCL2, ACKR1, CD36, MYD88	276	57	8941	3,978	0,901	0,146	0,133
mmu04668:TNF signaling pathway	10	1,786	7.9E-03	CCL12, MLKL, IL1B, AKT2, LTA, LIF, CCL2, TNFAIP3, PTGS2, BIRC3	276	113	8941	2,867	0,904	0,146	0,133
mmu00620:Pyruvate metabolism	6	1,071	1.1E-02	LDHB, ADH1, MDH1, ME3, ACS1, ACACB	276	44	8941	4,417	0,960	0,188	0,171
mmu04936:Alcoholic liver disease	11	1,964	1.2E-02	ADH1, ACADVL, IL1B, AKT2, CSAR1, PRKAG1, MLYCD, LPIN1, ACACB, MYD88, C2	276	141	8941	2,527	0,968	0,189	0,173
mmu04710:Circadian rhythm	5	0,893	1.3E-02	PER2, PER1, CRY2, BHLHE40, PRKAG1	276	30	8941	5,399	0,978	0,198	0,181
mmu00640:Propanoate metabolism	5	0,893	1.4E-02	BCKDHA, LDHB, MLYCD, ACS1, ACACB	276	31	8941	5,225	0,986	0,211	0,193
mmu05164:Influenza A	12	2,143	1.8E-02	PYCARD, H2-DMB2, CCL12, PRKCB, IL1B, AKT2, CASP1, CCL2, OAS1A, NLRP3, MYD88, OAS1G	276	173	8941	2,247	0,995	0,249	0,227
mmu05208:Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	14	2,500	1.9E-02	EPH2, ATRPA1, SDHC, COX6C, SOD2, COX7C, EGFR, NRAS, GSTA3, AKT2, GSTA1, NDUFA1, NDUFS2, NDUFV1	276	222	8941	2,043	0,997	0,255	0,233
mmu05145:Toxoplasmosis	9	1,607	2.0E-02	H2-DMB2, CD40, SOCS1, LAMB2, AKT2, TLR11, LDLR, MYD88, BIRC3	276	110	8941	2,650	0,997	0,255	0,233
mmu00982:Drug metabolism - cytochrome P450	7	1,250	2.2E-02	ADH1, HPGDS, GSTP2, GSTA3, GSTA1, FMO1, FMO2	276	71	8941	3,194	0,998	0,261	0,238
mmu05218:Melanoma	7	1,250	2.3E-02	NRAS, AKT2, TRP53, EZF1, EZF2, FGFR, EGFR	276	72	8941	3,150	0,999	0,261	0,238
mmu05223:Non-small cell lung cancer	7	1,250	2.3E-02	NRAS, PRKCB, AKT2, TRP53, EZF1, EZF2, EGFR	276	72	8941	3,150	0,999	0,261	0,238
mmu05169:Epstein-Barr virus infection	14	2,500	2.6E-02	CD40, H2-M3, TNFAIP3, OAS1A, OAS1G, CCNA2, H2-DMB2, CCNE1, AKT2, TRP53, EZF1, EZF2, CD247, MYD88	276	231	8941	1,963	1,000	0,280	0,255
mmu05163:Human cytomegalovirus infection	15	2,679	2.7E-02	CCL12, PRKCB, H2-M3, PTGS2, EGFR, NRAS, GNGT2, AKT2, TRP53, IL1B, EZF1, CCL2, EZF2, PLCB1, CALM1	276	256	8941	1,898	1,000	0,280	0,255
mmu04964:Proximal tubule bicarbonate reclamation	4	0,714	2.9E-02	MDH1, ATP1A3, ATP1B2, CAR4	276	22	8941	5,890	1,000	0,283	0,258
mmu05161:Hepatitis B	11	1,964	2.9E-02	CCNA2, NRAS, CCNE1, PRKCB, AKT2, TRP53, STAT4, EZF1, EZF2, BIRC5, MYD88	276	163	8941	2,186	1,000	0,283	0,258
mmu05133:Pertussis	7	1,250	3.1E-02	PYCARD, IL1B, CASP1, NLRP3, CALM1, MYD88, C2	276	77	8941	2,945	1,000	0,285	0,260
mmu05143:African trypanosomiasis	5	0,893	3.1E-02	PRKCB, IL1B, APOA1, PLCB1, MYD88	276	39	8941	4,153	1,000	0,285	0,260
mmu05215:Prostate cancer	8	1,429	3.3E-02	NRAS, GSTP2, CCNE1, AKT2, TRP53, EZF1, EZF2, EGFR	276	99	8941	2,618	1,000	0,287	0,262
mmu05012:Parkinson disease	15	2,679	3.3E-02	UBA7, HSPA5, ATRPA1, SDHC, UBE2L6, COX5C, COX7C, TUBB6, TUBB5, TRP53, NDUFA1, NDUFS2, CALM1, NDUFV1, SLC18A2, TRIM30D, PRKCB, H2-M3, CDC25C, B2T2, NRAS, PAK1, WEE1, CCNB1, GNGT2, AKT2, CD247, CALM1, MYD88	276	264	8941	1,841	1,000	0,287	0,262
mmu05170:Human immunodeficiency virus 1 infection	14	2,500	3.4E-02	NRAS, TRP53, EZF1, EZF2, EGFR	276	41	8941	3,951	1,000	0,298	0,275
mmu05219:Bladder cancer	5	0,893	3.6E-02	CCL12, IL1B, AKT2, CCL2, CD247, TLR6, PLCB1, MYD88	276	103	8941	2,516	1,000	0,312	0,282
mmu05142:Chagas disease	8	1,429	3.9E-02	NRAS, CCNE1, AKT2, TRP53, CTNNA1, EZF1, WNT9B, EZF2, FGF1, EGFR	276	150	8941	2,160	1,000	0,319	0,291
mmu05225:Hepatocellular carcinoma	11	1,964	4.2E-02	NRAS, GSTP2, GSTA3, PRKCB, AKT2, TRP53, GSTA1, EZF1, WNT9B, EZF2, EGFR	276	174	8941	2,048	1,000	0,319	0,291
mmu05206:MicroRNAs in cancer	16	2,857	4.7E-02	HDAC5, PRKCB, CDCA5, KIF23, CDC25C, PTGS2, EGFR, NRAS, MARCKS, SOCS1, CCNE1, TRP53, STMN1, EZF1, TIMP3, EZF2	276	303	8941	1,711	1,000	0,342	0,312
mmu04970:Salivary secretion	7	1,250	4.9E-02	PRKCB, LY21, ATP1A3, ATP1B2, CALM1, PLCB1, PRKG1	276	86	8941	2,637	1,000	0,342	0,312
mmu04540:Gap junction	7	1,250	4.9E-02	NRAS, TUBB6, TUBB5, PRKCB, PLCB1, EGFR, PRKG1	276	86	8941	2,637	1,000	0,342	0,312

34



## 38 Table S7. KEGG pathway analysis of all DEG in hearts of AAV9-Tfeb but not AAV9-Luc

## 39 TAC treated mice

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Tot	Pop Tot	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu04835:Growth hormone synthesis, secretion and action	32	1.282	5.0E-06	SHC2, SHC1, IRS1, IRS2, ADCY2, ADCY1, ADCY8, SOX2, MAPK9, CREB3, AKT1, EP300, CACNA1E, MAP2K6, PRKCG, MAP2K3, STAT3, STAT6, MAP2K1, MAP2K2, IGF1R3, PRKCA, MAPK14, SSTR3, MTDOR, CREB1, ADCY9, GNAS, GSFAL5, RAF1, SOS2, BCAR1	1036	116	8941	2.381	0.002	0.001	0.001
mmu04140:Autophagy - animal	35	1.402	2.4E-05	IRS1, IRS2, PIK3R4, IRS2, CANNK2, PPP3CA, MAP9, LAMP1, ATG10L, CTSL, ATGL, CTSD, CTSE, GABARAP2, MAP2K1, GABARAP1, MAP2K2, BAF, DRAG2, DAPK3, ATG9A, ATG10, WIP1, TSC1, CFLAR, EIF2AK4, MTDOR, VMP1, RABGA, ART151, IRAG1, PRKCG, SHK2, RAF1, SOD1M	1036	142	8941	2.127	0.008	0.004	0.003
mmu04510:Focal adhesion	44	1.762	4.1E-05	ITGB1, SHC2, ROCK1, SHC1, ITGA2B, PDGFA, LAMC1, ARHGAP5, THBS1, ELK1, MYL23, COMP, VTN, MAP9, CND2, KDR, AKT1, PAK6, PIP5K4, ITGA9, PIP5K2, ITGB6, PAK3, PAK4, PRKCG, MAP2K1, JUN, LAMB3, EGF, BAD, CAV1, PRKCA, PARV9, VAV1, COL4A4, MYL2, ITGA11, NARGEF1, COL4A3, RAF1, PPP1R12B, MYL5, SOS2, RGS6	1036	201	8941	1.889	0.014	0.005	0.004
mmu04910:Insulin signaling pathway	33	1.322	9.2E-05	SHC2, SHC1, IRS1, PRKAG2, IRS2, PI3K, PI3K2, ELK1, PTPRF, IRL1, SOX2, MAPK9, WIP5A, PRKAG2B, MAP2K2, EGF, AKT1, FLT3L, SH2B3, PTPN11, PRKAG2, MAP2K1, MAP2K2, BAD, TSC1, MTDOR, GSK, PPP1R3D, TRIP10, RAPGEF1, RAF1, SOS2	1036	139	8941	2.049	0.030	0.007	0.006
mmu05017:Spinocerebellar ataxia	33	1.322	1.2E-04	BECN1, PSDM1, BEAN1, PSDM14, PSDM13, GTF2B, ATP2A3, PKNOX4, ATP2A1, OMA1, PSMA7, MAP3B, ATXN1, PSMB5, ATG10L, PSMB1, ATXN1, AKT1, GRIA3, PRKCG, TRPC3, WIP5A, KCNQ3, GRIIR1, WIP1, PRKCA, GRIN2C, MTDOR, SEM1, AFB2L2, VDAC3, ATN10, SLC25A5	1036	141	8941	2.003	0.040	0.007	0.006
mmu04920:Retinoid signaling pathway	31	1.241	1.2E-04	SHC2, SHC1, ADCY1, ADCY1, ARRB2, ADCY8, PRKCA, PRK2, ENPP1, MAPK9, EDNRB, GNG5, CREBB2, AKT1, GNG5, NOS1, MAP2K1, JUN, MAP2K2, NOS3, PRKCA, MAPK14, ACTA2, CREB1, ADCY9, COL4A4, GNAS, RLM3, COL4A5, GNB3, RAF1, SOS2	1036	129	8941	2.074	0.041	0.007	0.006
mmu04012:Erk8 signaling pathway	22	0.881	4.5E-04	PRKCG, CANKM2, STAT5A, STAT5B, SHC2, MAP2K1, JUN, MAP2K2, SHC1, EGF, BAD, PRKCA, ELK1, MTDOR, MAPK9, ERBB3, AKT1, PAK6, RAF1, PAK3, SOS2, PAK4	1036	84	8941	2.260	0.139	0.021	0.018
mmu03010:Ribosome	37	1.482	6.0E-04	RPL4, RPL10, RPL1, RPL11, RPL10, MRPS10, RPL8, MRPL12, MRPL3, RPS15, MRPS20, RPL18A, RPS19, RPL3B, RPL37, RPS11, RPL4, RPS10, RPS13, RPS19, RPS7, RPS5, RPL22, MRPS23, RPS26, MRPS9, RPS27B, RPL27A, RPS28, RPL27, FAU1, RPL26, RPL25, RPL28, UBASH2, RPS21, RPS23	1036	179	8941	1.784	0.182	0.025	0.021
mmu02000:Pathways in cancer	88	3.524	8.5E-04	ITGB1, SP1, ITGA2B, LAMC1, ELK1, FGF2, CND2, EDNRB, FGFR3, HEY1, HEY2, PIM1, AKT1, EP300, ITGAV, ELON, JAK3, NCOA1, PRKCG, MAP2K1, HSP90AA1, MAP2K2, WNT5B, GSTD1, DAPK2, WNT5A, DAPK3, PRKCA, AKR2B, PHL, CDKN2, AK, ADCY9, COL4A4, RAB4, COL4A3, RAF1, SOS2, CANKM2, NOTCH2, CSF1R, HCK, JUN, ROCK1, GTP1, NOTCH4, PTGER3, PDGFA, CCKA, ADCY1, ADCY8, HSP90B1, RASGEF1, MAPK9, ESRB2, HNRK2, MAP2K2, CACNA1E, MAP3K6, JUN, GADD45B, GADD45A, EGF, NFATC3, HSP24, MAPK14, GADD45G, NFKB2, NR4A1, KTI1, TEK, FGFR3, HSPA1B, HSPA1A, FGFR1	1036	543	8941	1.399	0.249	0.032	0.026
mmu04910:MAPK signaling pathway	53	2.123	1.1E-03	PTPRF, RASGEF3, ARRB2, ELK1, DUSP16, FGF2, RPS6KA4, PPP3CB, DUSP10, FGF9, RPS6KA2, KDR, AKT1, MAP3K6, MAP2K3, DUSP4, PRKCG, MAP2K1, MAP2K2, DUSP3, ILK1, PRKCA, DUSP5, MAPKAPK3, RAF1, SOS2, EPHA2, CFTR, SR, PDGFA, RASGEF1, MAPK9, ERBB2, HNRK2, MAP2K2, CACNA1E, MAP3K6, JUN, GADD45B, GADD45A, EGF, NFATC3, HSP24, MAPK14, GADD45G, NFKB2, NR4A1, KTI1, TEK, FGFR3, HSPA1B, HSPA1A, FGFR1	1036	204	8941	1.556	0.305	0.036	0.030
mmu04810:Regulation of actin cytoskeleton	42	1.682	1.3E-03	CYFIP2, ITGB1, CHRM3, ITGAM, ROCK1, ITGA2B, PDGFA, CCKA, IGF1R2, ACTR3B, FGFR3, MYL23A, SCN, FGF3, CFL1, PAK6, PIP5K4, ITGAV, NCOA1, PIP5K2, ITGB6, PAK3, MYH9, PAK4, MAP2K1, MAP2K2, EGF, LIMK2, LIMK1, VAV1, CXCL12, MYL2, SPATA13, ITGA11, RAF1, PPP1R12B, ARHGAP7, FGFR3, MYL5, SOS2, BCAR1, FGFR1	1036	220	8941	1.648	0.350	0.036	0.030
mmu04930:Tight Junction	34	1.362	1.4E-03	ITGB1, ROCK1, PRKAG2, MYL9B, GATA4, TUBA3B, PRKCG, ACTR3B, MYL23A, AMOT, PIP5K4, EPHA2B, MAP3B, PAR6B, MARVELD1, CND2, SYNE2, NHEK1, WIP5A, MAGI1, PRKAB2, JUN, TUBA4A, TIAP1, CLDN5, DGL1, OCLN1, CLDN15, PAR3, MYL2, PPP2R2D, RAB8, MYL5, TUBA8	1036	167	8941	1.757	0.366	0.036	0.030
mmu04930:Axon guidance	36	1.442	1.5E-03	ITGB1, CANKM2, SEMA5B, NRP1, SEMA7A, ROCK1, SEMA3B, CCKA, PRKCG, NTRN1, MYL23A, PAR6B, PIP5K4, CFL1, PAK6, PIP5K4, ITGAV, NCOA1, PIP5K2, ITGB6, EPHA2, WNT5B, TRPC3, UNC5B, LIMK2, WNT5A, NTRN1, NFATC3, PRKCA, CXCL12, PAR3, PLXNB2, RAF1, MYL5, EPHA2	1036	181	8941	1.717	0.389	0.036	0.030
mmu05166:Human T-cell leukemia virus 1 infection	46	1.842	1.6E-03	H2-T24, H2-T23, NRP1, H2-T22, SPH1, ANAPC15, SR, H2-DMA, H2-Q4, ADCY2, ADCY1, ADCY8, ELK1, MAPK9, PPP3CB, XPO1, CND2, PTTG1, CHEK2, CREBB2, AKT1, EP300, MCL1, JAK2, STAT3, STAT6, MAP2K1, JUN, CDKN2B, H2-B1, RANBP3, MAP2K2, ANAPC7, ILK1, NFATC3, H2-AA, NFKB2, DGL1, CREB1, ADCY9, IL2RA, CDC16, VDAC3, ATM, SLC25A5, H2-D1	1036	250	8941	1.588	0.415	0.036	0.030
mmu04145:Phagosome	36	1.442	1.6E-03	H2-T24, ITGB1, H2-T23, STX12, SCAR1B, H2-T22, ITGAM, NCF1, NCF2, H2-DMA, H2-Q4, TUBA8, THBS1, CTS3, COMP, LAMP1, CFL1, TUBB1, MRCL1, ITGAV, NOS1, SEC23B, ATRX1F, H2-FER1, ATRX1F, COX6F, H2-AA, TUBA4A, FCGR3, SEC23B, FCGR2B, H2-D1, ATRX1F, TLR2, TUBA8, VAMP3	1036	182	8941	1.707	0.419	0.036	0.030
mmu04144:Endocytosis	49	1.962	1.7E-03	H2-T24, AIF3, H2-T23, H2-T22, AIF2, CFL1, AP2A1, ARRB2, CAPZB, CHMP1B, CHMP1A, PSD3, LDBPAP1, CCR5, SHG11, PDCD9P, VPS37B, ZFYVE16, PAR3, CHMP1C, CHMP1D, CHMP1E, STAM2, AIF3, H2-D1, H2-Q4, ADAP1, CCKA, VPS38B, PRKCG, ACTR3B, SH4, GNS, PAR6B, GNS, APOE1, RPS19A, PIP5K2, GNS, ARFGEF1, CAV1, HSPA2, 261000DM00K, IL2RA, SMAP2, FGFR3, HSPA1B, SPG21, HSPA1A	1036	272	8941	1.555	0.443	0.037	0.030
mmu00230:Purine metabolism	28	1.121	2.4E-03	PRPS2, PDE1C, PRUNE1, GMPPR, ADCY2, ADCY1, ADCY8, NTSE, PNP, GUK1, PGM2, NID516, KDR, ASB2, SH2D2, RHO, ENTRO2, PDE2A, NME2, APOE, NHEK1, ADCY9, RRM2B, NME6, PDE3A, AOSL1, PDE7A, PDE9A	1036	133	8941	1.817	0.553	0.044	0.036
mmu04921:Oxytocin signaling pathway	31	1.241	2.5E-03	CANKM2, RYK2, ROCK1, PRKAG2, MYL9B, ADCY2, ADCY1, ADCY8, ELK1, PKNOX4, MAP2K2, TRPM2, RGS2, PPP3CB, CACNA1E, PRKCG, KCNA1, PRKAB2, MAP2K1, JUN, MAP2K2, NOS3, NFATC3, PRKCA, EGF, ADCY9, CANKA, GNAS, RAF1, PPP1R12B, MYL5	1036	153	8941	1.749	0.556	0.044	0.036
mmu04022:cGMP-PKG signaling pathway	34	1.362	2.5E-03	OPR1D1, ROCK1, IRS1, SR, ATP2A3, IRS2, ATP2A1, ATP1A2, ADCY2, GATA4, ADCY1, ADCY8, PI3K8, RGS2, PPP3CB, EDNRB, CREBB2, AKT1, CACNA1E, GTF2I, MAP2K1, MAP2K2, NOS3, BAD, PDE2A, NFATC3, AT2B2A, CREB1, ADCY9, PDE5A, VDAC3, RAF1, SLC25A5, MYL5	1036	173	8941	1.696	0.566	0.044	0.036
mmu01521:EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	19	0.761	3.4E-03	PRKCG, SHC2, MAP2K1, MAP2K2, SHC1, EGF, BAD, PDGFA, PRKCA, FGFR2, MTDOR, BCL11L, ERBB3, KDR, AKT1, RAF1, GSK3, FGFR3, SOS2	1036	79	8941	2.076	0.681	0.053	0.044
mmu04666:Fc gamma R mediated phagocytosis	21	0.841	3.7E-03	PRKCG, MAP2K1, SYK, NCF1, LIMK2, LIMK1, ASAP3, PRKCA, ACTR3B, VAV1, HCK, SCIN, NIPPO5, CFL1, PIP5K1A, AKT1, PIP5K1C, RAF1, PIP3, FCGR2B, PIP1	1036	92	8941	1.970	0.714	0.053	0.044
mmu05171:Coronavirus disease - COVID-19	44	1.762	3.8E-03	RPL4, NRP1, C1QA, RPL10, RPL1, RPL11, RPL10, RPS15, MAPK9, CBL, RPL18A, RPS19, RPL3B, RPL7, RPS11, RPL18, RPS10, RPS13, RPL9, PRKCG, JUN, RPS7, SYK, RPS5, RPL22, PRKCA, MAPK14, RPS3B, MCL1, DAD2, RPS9, RPL27A, TUBB, RPS20, RPL27, FAU1, RPL26, RPL28, UBASH2, RPS21, TLR2, RPS23	1036	247	8941	1.537	0.723	0.053	0.044
mmu04968:FoxO signaling pathway	27	1.081	3.9E-03	IRS1, SETD7, PRKAG2, IRS2, MAPK9, CND2, BCL2L1, TNFSF18, AKT1, EP300, HDMB1, GABARAP2, PRKAB2, MAP2K1, GABARAP1, CND2B, MAP2K2, GADD45B, GADD45A, EGF, FBOX32, MAPK14, KLF2, GADD45G, ATM, RAF1, SOS2	1036	131	8941	1.779	0.734	0.053	0.044
mmu04213:Longevity regulating pathway - multiple species	16	0.641	4.0E-03	PRKAB2, HDAC2, IRS1, PRKAG2, IRS2, ADCY2, ADCY1, HSPA2, ADCY8, MTDOR, ADCY9, ART151, AKT1, EIF4E2P2, HSPA1B, HSPA1A	1036	62	8941	2.227	0.736	0.053	0.044
mmu05214:Glioma	18	0.721	4.0E-03	PRKCG, CANKM2, SHC2, MAP2K1, MAP2K2, GADD45B, SHC1, GADD45A, EGF, PDGFA, PRKCA, MTDOR, GADD45G, DDB2, CANKA, AKT1, RAF1, SOS2	1036	74	8941	2.099	0.738	0.053	0.044
mmu04015:Rap1 signaling pathway	39	1.562	4.5E-03	ITGB1, CSF1R, RALB, ITGAM, ITGA2B, PDGFA, ADCY2, ADCY1, ADCY8, THBS1, PRKCG, FGFR2, MAP3GAP, RASGEF3, PAR6B, FGFR3, KDR, AKT1, MAP2K6, PRKCG, MAGI1, MAP3K6, MAP3K1, MAP3K2, EGF, PRKCA, MAP3K4, VAV1, ADCY9, KTI1, PAR6B, GNAS, RAPGEF7, TEK, RAF1, FGFR3, BCAR1, EPHA2, FGFR1	1036	214	8941	1.573	0.780	0.058	0.048
mmu04151:PKM-Akt signaling pathway	59	2.363	5.0E-03	ITGB1, WWA4B, IRS1, ITGA2B, LAMC1, FGF2, COMP, CND2, FGFR3, CREBB2, KDR, AKT1, ITGAV, ITGB6, JAK3, MAGI1, MAP2K1, HSP90AA1, MAP2K2, SYK, PPP2R5D, TSC1, PRKCA, CREB1, COL4A4, COL4A5, RAF1, SOS2, EPHA2, TLR2, CSF1R, PIP5K1, PDGFA, THBS1, HSP90B1, PKNOX4, PIP5K2, VTN, BCL11L, ERBB3, PPP2R5B, GNG5, GNSB, LAMB3, EGF, NOS3, BAD, PPP2R3A, MTDOR, NR4A1, KTI1, IL2RA, PPP2R2D, ITGA11, GNB3, PAKN1, TEK, FGFR1, FGFR3	1036	359	8941	1.418	0.817	0.063	0.052

41 **Table S8. KEGG pathway analysis of all genes that are upregulated in hearts of AAV9-Luc**  
 42 **TAC but not AAV9-Tfeb treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hit	Pop Tot	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu04621:NOT-like receptor signaling pathway	18	4.65	1.72E-06	GSDMD, NLRP1B, CCL12, NLRP1A, CARD9, TNFAIP3, OAS1G, OAS1G, PYCARD, AIM2, NAIP6, IL18, CASP1, CCL2, NLRP3, PLCB1, MYD88, BIRC3	187	211	8941	4.079	4.5E-04	4.5E-04	4.0E-04
mmu04054:NF-kappa B signaling pathway	12	3.10	1.07E-05	CD40, PRKCB, IL18, LTA, TNFAIP3, TNFRSF11A, BCL2L1, PTGS2, BCL2L1A, CARD11, MYD88, BIRC3	187	105	8941	5.464	2.8E-03	1.4E-03	1.2E-03
mmu04110:Cell cycle	12	3.10	5.54E-05	CDCA2, CCNA2, CCNB1, CCNE1, TRP53, E2F1, MCM3, E2F2, BUB1B, TTK, CDC25C, BUB1	187	125	8941	4.590	1.4E-02	4.7E-03	4.2E-03
mmu05132:Salmonella infection	17	4.39	7.21E-05	GSDMD, MXL1, RHOG, RHOD, DYNLL1, PYCARD, TUBB8, PAK1, TUBB5, NAIP6, IL18, CASP1, NLRP3, TLR6, MYD88, S100A10, BIRC3	187	253	8941	3.213	1.9E-02	4.7E-03	4.2E-03
mmu04625:C-type lectin receptor signaling pathway	11	2.84	1.07E-04	PYCARD, CLEC4B1, NRAS, PAK1, CCL22, IL18, CARD9, CASP1, NLRP3, CALM1, PTGS2	187	112	8941	4.696	2.8E-02	5.6E-03	5.0E-03
mmu05417:Lipid and atherosclerosis	15	3.88	1.59E-04	CCL12, CD40, POU2F2, PYCARD, NRAS, TRP53, IL18, CASP1, CCL2, NLRP3, TLR6, PLCB1, CALM1, LDUK, MYD88	187	216	8941	3.320	4.1E-02	6.9E-03	6.1E-03
mmu04050:Cytokine-cytokine receptor interaction	17	4.39	3.76E-04	TNFSF18, CCL12, CD40, CCL22, OSM, UF, INHBA, TNFRSF11A, IL27RA, IL1RL2, IL18, LTA, CCL2, CD27, CCR7, TNFSF8, IL7R	187	292	8941	2.784	9.4E-02	1.4E-02	1.2E-02
mmu04662:B cell receptor signaling pathway	8	2.07	1.43E-03	NRAS, IFITM1, PIRAZ, PRKCB, PIK3AP1, CARD11, CD22, LILRA5	187	81	8941	4.722	3.1E-01	4.7E-02	4.1E-02
mmu04210:Apoptosis	10	2.58	2.88E-03	PARP9, NRAS, TRP53, PRRF1, PHRF1, BIRC5, CTSW, BCL2L1A, BCL2L1B, BIRC3	187	136	8941	3.516	4.2E-01	6.1E-02	5.4E-02
mmu04668:TNF signaling pathway	9	2.33	2.40E-03	CCL12, MXL1, IL18, LTA, UF, CCL2, TNFAIP3, PTGS2, BIRC3	187	113	8941	3.898	4.7E-01	6.2E-02	5.5E-02
mmu05163:Human cytomegalovirus infection	14	3.62	2.62E-03	CCL12, PRKCB, H2-M3, PTGS2, EGFR, NRAS, GNGT2, TRP53, IL18, E2F1, CCL2, E2F2, PLCB1, CALM1	187	256	8941	2.615	5.0E-01	6.2E-02	5.5E-02
mmu05169:Epstein-Barr virus infection	13	3.36	3.16E-03	CD40, H2-M3, TNFAIP3, OAS1A, OAS1G, CCNA2, H2-DMB2, CCNE1, TRP53, E2F1, E2F2, CD247, MYD88	187	231	8941	2.691	5.6E-01	6.5E-02	5.8E-02
mmu05164:Influenza A	11	2.84	3.24E-03	PYCARD, H2-DMB2, CCL12, PRKCB, IL18, CASP1, CCL2, OAS1A, NLRP3, MYD88, OAS1G	187	173	8941	3.040	5.7E-01	6.5E-02	5.8E-02
mmu05214:Glioma	7	1.81	4.29E-03	NRAS, PRKCB, TRP53, E2F1, E2F2, CALM1, EGFR	187	74	8941	4.523	6.8E-01	7.6E-02	6.7E-02
mmu05200:Pathways in cancer	22	5.68	4.33E-03	PRKCB, WNT9B, PTGS2, EGFR, RASGEF1, CCNA2, NRAS, RASL1, GNGT2, CCNE1, TRP53, GSTA1, STAT4, E2F1, CKS2, PMAIP1, E2F2, BIRC5, IL7R, PLCB1, CALM1, BIRC3	187	543	8941	1.937	6.8E-01	7.6E-02	6.7E-02
mmu05133:Pertussis	7	1.81	5.22E-03	PYCARD, IL18, CASP1, NLRP3, CALM1, MYD88, C2	187	77	8941	4.347	7.5E-01	8.5E-02	7.6E-02
mmu05184:Malaria	6	1.55	6.40E-03	CD40, CCL12, IL18, CCL2, ACKR1, MYD88	187	57	8941	5.083	8.2E-01	9.8E-02	8.8E-02
mmu05161:Hepatitis B	10	2.58	6.90E-03	CCNA2, NRAS, CCNE1, PRKCB, TRP53, STAT4, E2F1, E2F2, BIRC5, MYD88	187	163	8941	2.933	8.4E-01	1.0E-01	8.9E-02
mmu04540:Gap junction	7	1.81	8.88E-03	NRAS, TRP53, TUBB8, PRKCB, PLCB1, EGFR, PRKGI	187	86	8941	3.892	9.0E-01	1.2E-01	1.1E-01
mmu05219:Bladder cancer	5	1.29	1.01E-02	NRAS, TRP53, E2F1, E2F2, EGFR	187	41	8941	5.831	9.3E-01	1.3E-01	1.2E-01
mmu05206:MicroRNAs in cancer	14	3.62	1.06E-02	PRKCB, CDCA5, KIF23, CDC25C, EGFR, NRAS, MARCKS, SOCS1, CCNE1, TRP53, STMN1, E2F1, E2F2	187	303	8941	2.209	9.4E-01	1.3E-01	1.2E-01
mmu05170:Human Immunodeficiency virus 1 infection	12	3.10	1.15E-02	BST2, NRAS, CCNB1, PAK1, GNGT2, TRIM30D, PRKCB, H2-M3, CD247, CDC25C, CALM1, MYD88	187	240	8941	2.391	9.5E-01	1.4E-01	1.2E-01
mmu05222:Small cell lung cancer	7	1.81	1.28E-02	CCNE1, TRP53, E2F1, CKS2, E2F2, PTGS2, BIRC3	187	93	8941	3.599	9.7E-01	1.5E-01	1.3E-01
mmu05171:Coronavirus disease - COVID-19	12	3.10	1.41E-02	CCL12, PRKCB, IL18, CSAN1, CASP1, CCL2, OAS1A, NLRP3, EGFR, MYD88, C2, OAS1G	187	247	8941	2.323	9.8E-01	1.5E-01	1.4E-01
mmu04218:Cellular senescence	10	2.58	1.46E-02	CCNA2, NRAS, CCNB1, CCNE1, TRP53, H2-M3, E2F1, E2F2, CALM1, FOXM1	187	184	8941	2.599	9.8E-01	1.5E-01	1.4E-01
mmu05166:Human T-cell leukemia virus 1 infection	12	3.10	1.52E-02	CDCA2, CCNA2, H2-DMB2, NRAS, CD40, CCNE1, TRP53, H2-M3, LTA, E2F1, E2F2, BUB1B	187	250	8941	2.295	9.8E-01	1.5E-01	1.4E-01
mmu05223:Non-small cell lung cancer	6	1.55	1.68E-02	NRAS, PRKCB, TRP53, E2F1, E2F2, EGFR	187	72	8941	3.984	9.9E-01	1.6E-01	1.4E-01
mmu05142:Chagas disease	7	1.81	2.03E-02	CCL12, IL18, CCL2, CD247, TLR6, PLCB1, MYD88	187	103	8941	3.349	1.0E+00	1.9E-01	1.7E-01
mmu05135:Yersinia infection	8	2.07	2.16E-02	PYCARD, CCL12, IL18, RHOG, CASP1, CCL2, NLRP3, MYD88	187	134	8941	2.854	1.0E+00	2.0E-01	1.7E-01
mmu01524:Platinum drug resistance	6	1.55	2.53E-02	TOP2A, TRP53, GSTA1, PMAIP1, BIRC5, BIRC3	187	80	8941	3.586	1.0E+00	2.2E-01	2.0E-01
mmu05165:Toxoplasmosis	7	1.81	2.70E-02	H2-DMB2, CD40, SOCS1, TLR11, LDUK, MYD88, BIRC3	187	110	8941	3.043	1.0E+00	2.3E-01	2.0E-01
mmu05168:Herpes simplex virus 1 infection	17	4.39	2.95E-02	CCL12, ALYREF, CARD9, H2-M3, ZFP954, OAS1A, PILRA, POU2F2, OAS1G, BST2, H2-DMB2, TRP53, IL18, LTA, CCL2, MYD88, BIRC3	187	459	8941	1.771	1.0E+00	2.4E-01	2.1E-01
mmu04217:Necroptosis	9	2.33	3.05E-02	PYCARD, ZBP1, MXL1, IL18, STAT4, CASP1, TNFAIP3, NLRP3, BIRC3	187	176	8941	2.445	1.0E+00	2.4E-01	2.1E-01
mmu04970:Salivary secretion	6	1.55	3.32E-02	PRKCB, IZT1, ATP1A3, CALM1, PLCB1, PRKGI	187	86	8941	3.336	1.0E+00	2.6E-01	2.3E-01
mmu05228:Rheumatoid arthritis	6	1.55	3.47E-02	ATP9A1A, H2-DMB2, CCL12, IL18, CCL2, TNFRSF11A	187	87	8941	3.297	1.0E+00	2.6E-01	2.3E-01
mmu05235:PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	6	1.55	3.62E-02	NRAS, BATF3, CD247, EGFR, MYD88, BATF	187	88	8941	3.260	1.0E+00	2.6E-01	2.3E-01
mmu05134:Leishmaniasis	5	1.29	3.78E-02	PYCARD, NAIP6, IL18, CASP1, MYD88	187	63	8941	3.819	1.0E+00	2.7E-01	2.4E-01
mmu04114:Oocyte meiosis	7	1.81	4.03E-02	CCDC3, CCNB1, CCNE1, CDC25C, CALM1, BUB1, AURKA	187	121	8941	2.766	1.0E+00	2.7E-01	2.4E-01
mmu04657:IL-17 signaling pathway	6	1.55	4.09E-02	CCL12, IL18, CCL2, TNFAIP3, PTGS2, S100A9	187	91	8941	3.152	1.0E+00	2.7E-01	2.4E-01
mmu04623:Cytosolic DNA-sensing pathway	5	1.29	4.18E-02	PYCARD, ZBP1, AIM2, IL18, CASP1	187	63	8941	3.795	1.0E+00	2.7E-01	2.4E-01
mmu04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	6	1.55	4.25E-02	CCNA2, CCNB1, KIF22, CDC25C, BUB1, AURKA	187	92	8941	3.118	1.0E+00	2.7E-01	2.4E-01
mmu05143:African trypanosomiasis	4	1.09	4.68E-02	PRKCB, IL18, PLCB1, MYD88	187	39	8941	4.904	1.0E+00	2.9E-01	2.5E-01
mmu04662:Chemokine signaling pathway	9	2.33	4.70E-02	NRAS, CCL12, PAK1, GNGT2, CCL22, PRKCB, CCL2, CCR7, PLCB1	187	192	8941	2.241	1.0E+00	2.9E-01	2.5E-01

43



44 **Table S9. KEGG pathway analysis of all genes that are upregulated in hearts of AAV9-Luc**  
 45 **TAC and AAV9-Tfeb treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hit	Pop Totl	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu05132:Salmonella infection	40	4.16	1.38E-09	RAB8C, ARPC1B, ACTB, ACTG1, CYTH3, CDC42, TUBA1C, TUBA1B, TUBA1A, CYTH4, RRAS, TUBB3, KIF5C, MYC, KIF5B, CASP4, BAK1, CD14, FLNC, ACTR3, ANXA2, AHNAK2, ARPC4, FOS, ARPC5, TNFRSF1A, DYNLC1L1, IL6, TUBB2B, TUBB2A, ARPC2, ARPC3, RHOJ, BCL2, ELMO1, PPN1, RAB7B, TLR4, ARL8A, ARF6	477	253	8941	2,964	4.1E-07	3.5E-07	2.8E-07
mmu05205:Proteoglycans in cancer	35	3.64	2.38E-09	CD63, CDKN1A, ITGB5, SDCA, HIF1A, ACTB, ACTG1, CDC42, RRAS, MYC, PLCG2, FLNC, FZD1, TGFBR2, TGFBR1, CAV3, LUM, MMP2, STAT3, PLAUR, FN1, MSN, RRM2, IGF1, DCN, COL1A1, COL1A2, CTN1, SDC1, HCL1S, ITGAS, TLR4, MET, CD44, HBEGF	477	205	8941	3,200	7.1E-07	3.5E-07	2.8E-07
mmu04512:ECM-receptor interaction	22	2.29	4.10E-09	ITGB5, SDCA, TNC, FN1, LAMC2, HMMR, THBS4, THBS3, COL1A1, COL1A2, COL4A2, COL4A1, COL6A2, COL6A1, SPP1, TNR, SDC1, COL9A2, ITGAS, FREM1, CD44, ITGA9	477	88	8941	4,686	1.2E-06	4.0E-07	3.1E-07
mmu04510:Focal adhesion	34	3.54	5.37E-09	SHCA, ITGB5, TNC, LAMC2, THBS4, ACTB, THBS3, ACTG1, RAP1B, CDC42, PDGFC, SPP1, TNR, FLNC, VASP, CAV3, ACTN1, FN1, IGF1, ACTN4, COL1A1, DIAPH1, COL1A2, COL4A2, COL4A1, COL6A2, COL6A1, ZYK, BCL2, ITGAS, COL9A2, TNL1, MET, ITGA9	477	201	8941	3,171	1.6E-06	4.0E-07	3.1E-07
mmu04145:Phagosome	31	3.23	2.47E-08	COLEC12, RAB8C, TFRIC, ITGB5, NCF4, H2-K1, CORO1A, THBS4, ACTB, THBS3, ACTG1, MRC2, TUBA1C, TUBA1S, TUBA1A, TUBB3, H2-DMB1, ATP9V1H, ATP9V0A4, CD14, CYBA, FCGRL1, DYNLC1L1, TUBB2B, TUBB2A, FCGR4, ATP6V1B2, ITGAS, RAB7B, TLR4, H2-AB1	477	182	8941	3,193	7.4E-06	1.5E-06	1.1E-06
mmu04933:AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	21	2.19	2.69E-07	TGFBR2, TGFBR1, TGFBR3, MMP2, PRKCD, SERPINE1, STAT3, FN1, TGFBR1, TGFBR2, ICAM1, COL1A1, CDC42, DIAPH1, IL6, COL3A1, COL1A2, COL4A2, COL4A1, BCL2, PLCG2	477	101	8941	3,897	8.0E-05	1.3E-05	1.0E-05
mmu05100:Bacterial invasion of epithelial cells	18	1.87	3.43E-07	ACTR3, SHCA, CAV3, ARPC1B, FN1, ARPC4, ARPC5, ACTB, DNMI1, ACTG1, CDC42, ARPC2, CTN1, ARPC3, ELMO1, HCL1S, ITGAS, MET	477	76	8941	4,439	1.0E-04	1.5E-05	1.1E-05
mmu04974:Protein digestion and absorption	21	2.19	6.33E-07	COL15A1, COL16A1, COL14A1, ELM, COL12A1, SLC3A2, PRCP, COL1A1, COL3A1, COL1A2, COL4A2, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL5A3, COL5A2, COL5A1, COL8A2, COL8A1, COL9A2, SLC39A2	477	108	8941	3,645	2.5E-04	3.1E-05	2.4E-05
mmu04666:Gamma R-mediated phagocytosis	19	1.98	1.28E-06	ACTR3, VASP, MARCKSL1, SPHK1, ARPC1B, PRKCD, PLA2G4A, ARPC4, GAB2, ARPC5, FCGR1, CDC42, ARPC2, FCGR4, ARPC3, CFL1, PLCG2, PIP2F, ARF6	477	92	8941	3,871	3.8E-04	4.2E-05	3.3E-05
mmu04810:Regulation of actin cytoskeleton	31	3.23	1.73E-06	ITGB5, ARPC1B, LPAR1, IQGAP3, ACTB, ACTG1, GNA13, CDC42, PDGF, RRAS, CFL1, PDGFC, ACTR3, ACTN1, F2R, FN1, MSN, RRM2, ARPC4, ACTN4, ARPC5, BAIAP2, GNG12, ENAH, DIAPH1, DIAPH3, ARPC2, ARPC3, ITGAS, PPN1, ITGA9	477	220	8941	2,641	5.2E-04	5.2E-05	4.0E-05
mmu05146:Amoebiasis	20	2.08	3.03E-06	TGFBR2, TGFBR1, RAB8C, TGFBR3, ACTN1, IL1R2, FN1, HSPB1, LAMC2, ACTN4, COL1A1, IL6, COL3A1, COL1A2, COL4A2, SERPINB6, COL4A1, CD14, RAB7B, TLR4	477	107	8941	3,504	9.0E-04	8.2E-05	6.4E-05
mmu04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	36	3.75	4.94E-06	CXCR1, IL4RA, IL20RA, TNFRSF11B, CSF2RB, CXCR6, CSF2RA, CXCL11, TNFSF13B, CXCL16, CCL8, IL21R, RELT, IL13RA1, TGFBR2, XCR1, TGFBR1, TNFSF12A, GDF15, IFNGR1, TGFBR3, IL1R2, INHBB, GDF6, OSMR, TNFRSF1B, TGFBR1, IL17RA, TNFRSF1A, TGFBR2, CSF2RB2, IL6, IL3RA, ACN6A, LTRB, CRLF2	477	292	8941	2,311	1.5E-03	1.1E-04	8.9E-05
mmu05161:Hepatitis B	25	2.60	5.01E-06	CDKN1A, CASP12, MYC, CREB3L1, PTX2B, EP3, BID, EGR2, TGFBR2, EGR3, TGFBR1, TGFBR3, STAT3, FOS, YWHAZ, TGFBR1, TGFBR2, CREB3, IL6, TRAF3, BCL2, IRF7, TLR4, ATFA, CREB5	477	163	8941	2,875	1.5E-03	1.1E-04	8.9E-05
mmu05166:Human T-cell leukemia virus 1 infection	32	3.33	6.68E-06	CDKN1A, H2-K1, SLC2A1, ADCTY1, ICAM1, RELB, CCR2B, MYC, H2-DMB1, CREB3L1, TSP2, EP3, B2M, RANBP1, EGR2, TGFBR2, TGFBR1, TGFBR3, IL1R2, FOS, TGFBR1, TNFRSF1A, TGFBR2, CREB3, IL6, ESPL1, LTRB, TNL1, MAP3K14, ATFA, H2-AB1, CREB5	477	250	8941	2,399	2.6E-03	1.8E-04	1.4E-04
mmu04800:Osteoclast differentiation	21	2.19	1.26E-05	TGFBR2, TGFBR1, IFNGR1, NCF4, CYBA, TREM2, TNFRSF11B, FOS, GAB2, TGFBR1, TNFRSF1A, RELB, TGFBR2, FCGRL1, TYROBP, FCGR4, CTSK, PLCG2, ACPS, MAP3K14, JUNB	477	128	8941	3,075	3.7E-03	2.5E-04	1.9E-04
mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway	40	4.16	1.52E-05	CDKN1A, ITGB5, FLT3, LPAR1, TNL1, IL4RA, LAMC2, THBS4, THBS3, FGF6, MYC, CREB3L1, PDGFC, SPP1, EIF4EBP1, TNR, F2R, FN1, IGF1, GNG12, OSMR, YWHAZ, EREG, COL1A1, CREB3, IL6, COL1A2, COL4A2, COL4A1, COL6A2, COL6A1, IL3RA, BCL2, ITGAS, COL9A2, TLR4, MET, ATFA, ITGA9, CREB5	477	359	8941	2,088	4.5E-03	2.8E-04	2.2E-04
mmu05171:Coronavirus disease - COVID-19	31	3.23	1.83E-05	C1QB, RPL3, RPL12, RPL14, RPL36A, RPS27L, RPL10A, C4B, RPS16, PLCG2, RPL13, RPL35, RPS27A, RPL17, RPL39, RPS12, RPL41, ACE, MX1, STAT3, FOS, TNFRSF1A, IL6, RPS28, TRAF3, TLR7, MASP1, TLR4, HBEGF, C1QC	477	247	8941	2,353	5.5E-03	3.2E-04	2.5E-04
mmu05152:Tuberculosis	25	2.60	2.77E-05	RAB8C, LSP1, CORO1A, MRC2, H2-DMB1, ATP9V1H, ATP9V0A4, LBP, CD14, BID, PLK3, TGFBR2, TGFBR1, FCER1G, IFNGR1, TGFBR3, SPHK1, TNFRSF1A, FCGRL1, IL6, FCGR4, BCL2, TLR4, CALM2, H2-AB1	477	180	8941	2,603	8.2E-03	4.6E-04	3.6E-04
mmu05323:Rheumatoid arthritis	16	1.66	4.75E-05	TGFBR2, TGFBR1, TGFBR3, CD8B, FOS, TNFSF13B, ICAM1, IL6, CTSK, H2-DMB1, ATP9V1B2, ACPS, ATP9V1H, ATP9V0A4, TLR4, H2-AB1	477	87	8941	3,447	1.4E-02	7.5E-04	5.8E-04
mmu05140:Leishmaniasis	14	1.46	6.83E-05	MARCKSL1, TGFBR2, TGFBR1, IFNGR1, TGFBR3, NCF4, CYBA, FOS, FCGR1, EEF1A1, FCGR4, H2-DMB1, TLR4, H2-AB1	477	70	8941	3,749	2.0E-02	1.0E-03	7.9E-04
mmu05410:Hypertrrophic cardiomyopathy	16	1.66	8.14E-05	TGFBR2, TGFBR1, ACTB, ITGB5, TGFBR3, TPM3, IGF1, ACTB, ACTG1, CACNB1, IL6, DES, LMNA, ITGAS, FOS, YWHAZ	477	91	8941	3,296	2.4E-02	1.1E-03	8.6E-04
mmu05135:Yersinia infection	20	2.08	8.18E-05	ACTR3, ARPC1B, FN1, ARPC4, FOS, ARPC5, BAIAP2, ACTB, ACTG1, CDC42, IL6, ARPC2, ARPC3, RPS6KA1, ELMO1, PTX2B, ITGAS, TLR4, ARF6, SKAP2	477	134	8941	2,798	2.4E-02	1.1E-03	8.6E-04
mmu04210:Apoptosis	20	2.08	1.00E-04	CTSD, CSF2RB, FOS, ACTB, ACTG1, BIRC3, TNFRSF1A, CSF2RB2, TUBA1C, TUBA1B, CASP12, TUBA1A, CTSK, LMNB1, IL3RA, BCL2, BAK1, BID, MAP3K14, ATFA	477	136	8941	2,757	2.9E-02	1.3E-03	9.9E-04
mmu04066:IF-1 signaling pathway	18	1.87	1.02E-04	CDKN1A, TFRIC, IFNGR1, SERPINE1, STAT3, SLC2A1, IGF1, ENO1, HIF1A, IL6, NPPA, BCL2, EIF4EBP1, PLCG2, TIMP1, LTRB, TLR4, PFKF	477	114	8941	2,960	3.0E-02	1.3E-03	9.9E-04
mmu04926:Relaxin signaling pathway	19	1.98	1.54E-04	SHCA, TGFBR1, MMP2, FOS, GNG12, ADCTY1, TGFBR1, TGFBR2, GNAI2, COL1A1, GNAO1, CREB3, COL3A1, COL1A2, COL4A2, COL4A1, CREB3L1, ATFA, CREB5	477	129	8941	2,761	4.5E-02	1.8E-03	1.4E-03
mmu04010:MAPK signaling pathway	32	3.33	2.00E-04	FLT3, HSPB1, RELB, RAP1B, CDC42, FGF6, MAPK7, RRAS, MYC, RPS6KA1, PDGFC, CD14, FLNC, DUSP5, DUSP2, TGFBR2, TGFBR1, TGFBR3, PLA2G4A, RRG2, IGF1, FOS, GNG12, TGFBR1, TNFRSF1A, EREG, TGFBR2, CACNB1, PTPN7, MET, MAP3K14, ATFA	477	294	8941	2,040	5.8E-02	2.3E-03	1.8E-03
mmu05200:Pathways in cancer	49	5.10	3.13E-04	CDKN1A, FLT3, SLC2A1, LAMC2, BEC3, FGF6, MYC, RASSF5, IL13RA1, TPM3, IFNGR1, MMP2, F2R, FOS, TGFBR1, TGFBR2, RUNX1, CSF2RB2, COL4A2, TRAF3, COL4A1, IL3RA, MET, PTERGEA, CEPPA, LPAR1, IL4RA, CSF2RB, HIF1A, CSF2RA, ADCTY1, GNAI2, GNAI3, CDC42, PLCG2, EP3, BAK1, BID, FZD1, TGFBR2, TGFBR1, TGFBR3, STAT3, FN1, IGF1, GNG12, IL6, BCL2, CALM2	477	543	8941	1,691	8.9E-02	3.5E-03	2.7E-03
mmu05142:Chagas disease	16	1.66	3.37E-04	C1QB, TGFBR2, TGFBR1, ACE, IFNGR1, TGFBR3, SERPINE1, FOS, TGFBR1, TNFRSF1A, TGFBR2, GNAI2, GNAO1, IL6, TLR4, C1QC	477	103	8941	2,912	9.5E-02	3.6E-03	2.8E-03
mmu05414:Dilated cardiomyopathy	15	1.56	4.17E-04	TGFBR2, TGFBR1, ITGB5, TGFBR3, TPM3, IGF1, ADCTY1, ACTB, ACTG1, CACNB1, DES, LMNA, ITGAS, ITGA9, MYH7	477	94	8941	2,991	1.2E-01	4.1E-03	3.2E-03

## 47 Table S10. KEGG pathway analysis of all genes that are upregulated in hearts of AAV9-

## 48 Tfeb but not AAV9-Luc TAC treated mice

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hit	Pop Tot	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu03010:Ribosome	35	2.58	1.3E-08	RPL4, RPL10, RPLP1, RPL11, RPLP0, MRPS10, RPL8, MRPL12, MRPL36, RPS15, MRPL20, RPL18A, RPS19, RPL38, RPL37, RPS11, RPL18, RPS10, RPS13, RPL19, RPS7, RPS5, RPL22, RPS26, RPS29, RPL27A, RPL28, RPS20, RPL27, FAU, RPL26, RPL29, RPL28, UBAS2, RPS21, TLR2, RPS23	587	179	891	2.978	4.2E-06	4.2E-06	3.8E-06
mmu05171:Coronavirus disease - COVID-19	38	2.80	1.7E-06	RPL4, C1QA, RPL10, RPLP1, RPL11, RPLP0, RPL8, RPS15, RPL18A, RPS19, RPL38, RPL37, RPS11, RPL18, RPS10, RPS13, RPL19, PRKCG, JUN, RPS7, SYK, RPS5, RPL22, PRKCA, RPS26, RPS29, RPL27A, TLR8, RPS20, RPL27, FAU, RPL26, RPL29, RPL28, UBAS2, RPS21, TLR2, RPS23	587	247	891	2.343	5.4E-04	2.4E-04	2.2E-04
mmu04145:Phagosome	31	2.28	2.2E-06	ITGB1, H2-T23, STX12, SCARB1, H2-T22, ITGAM, NCF1, NCF2, H2-DMA, H2-Q4, TUBA3B, THBS1, CTSS, COMP, LAMP1, CTSL, MRCL1, ITGAV, NOS1, SEC6B, ATP6V1F, H2-EB1, ATP6AP1, H2-AA, FCGR3, SEC22B, FCGR2B, H2-D1, ATP6V1E, TLR2, VAMP3, ARHGAP3, H2-T23, H2-T22, AMP2, CTSL, H2-Q4, CXCR4, AP2A1, ARHGAP2, GSK3, PAROD6, GRK5, CAPZB, CHMP1B, CHMP1A, AP2S1, PIP5K1A, PIP5K1C, CCR5, LDLRAP1, SNX5, SH3GL1, PDCD8P, VPS37B, HSPA2, ZFYVE16, CHMP4C, CHMP3, CHMP4B, STAM2, FGFRL3, ARHGAP5, HSPA1B, H2-D1, SPC21, HSPA1A	587	182	891	2.594	7.2E-04	2.4E-04	2.2E-04
mmu04144:Endocytosis	37	2.72	3.8E-05	ARHGAP3, H2-T23, H2-T22, AMP2, CTSL, H2-Q4, CXCR4, AP2A1, ARHGAP2, GSK3, PAROD6, GRK5, CAPZB, CHMP1B, CHMP1A, AP2S1, PIP5K1A, PIP5K1C, CCR5, LDLRAP1, SNX5, SH3GL1, PDCD8P, VPS37B, HSPA2, ZFYVE16, CHMP4C, CHMP3, CHMP4B, STAM2, FGFRL3, ARHGAP5, HSPA1B, H2-D1, SPC21, HSPA1A	587	272	891	2.072	1.2E-02	3.1E-03	2.8E-03
mmu04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis	18	1.32	8.3E-05	PRKCG, MAP2K1, SYK, NCF1, LIMK2, LIMK1, PRKCA, VAV1, HCK, SCIN, INP5D, CFL2, PIP5K1A, AKT1, PIP5K1C, PLPP3, FCGR2B, PLPP1	587	92	891	2.980	2.7E-02	5.4E-03	4.9E-03
mmu05017:Spinocerebellar ataxia	23	1.69	1.2E-04	PRKCG, BECN1, PSMO11, BEAN1, PSMO14, PSMO13, GTF2B, ADRM1, PRKCA, WIPI1, GRIN2C, PSM47, MTOR, SEM1, AFG3L2, PSM85, ATG101, PSM81, ATXN1L, AKT1, ATXN1B, SLC25A5, GRIK4	587	141	891	2.485	3.7E-02	6.0E-03	5.5E-03
mmu04140:Autophagy - animal	23	1.69	1.3E-04	GABARAPL2, BECN1, MAP2K1, GABARAPL1, MAP2K2, BAD, DAPK2, DAPK3, IRS2, WIPI1, E2F2A4, MTOR, CAMKK2, VMP1, PPP2CA, LAMP1, CTSL, ATG101, AKT1S1, AKT1, CTSD, SQSTM1, CTSD	587	142	891	2.467	4.1E-02	6.0E-03	5.5E-03
mmu04910:Insulin signaling pathway	22	1.62	2.6E-04	PI3K1, PRKAG2, SHC2, MAP2K1, MAP2K2, SHC1, BAD, PRKAG2, IRS2, PYGL, PTPRF, MTOR, GSK, HSK, SOCS2, INPP5A, MKNK2, RASGEF1, FLOT1, AKT1, IRT2, SH2B2	587	139	891	2.411	8.2E-02	1.1E-02	9.7E-03
mmu04510:Focal adhesion	27	1.99	6.4E-04	ITGB1, SHC2, SHC1, LAMC1, THBS1, MYL12A, COMP, CCND2, AKT1, PAK6, PIP5K1A, ITGAV, PIP5K1C, PAK3, PAKA, PRKCG, MAP2K1, JUN, BAD, PRKCA, PARVB, VAV1, COL4A4, ITGA11, RANGAP1, COL4A3, RCBT1	587	201	891	2.046	1.9E-01	2.1E-02	1.9E-02
mmu04612:Antigen processing and presentation	16	1.18	6.9E-04	H2-T23, CD74, H2-EB1, H2-T22, HSP90AA1, H2-DMA, H2-Q4, RFXANK, HSPA2, H2-AA, CTSS, CTSL, H2-D1, HSPA1B, CTSD, HSPA1A	587	90	891	2.708	2.0E-01	2.1E-02	1.9E-02
mmu04926:Relaxin signaling pathway	20	1.47	7.0E-04	SHC2, MAP2K1, JUN, MAP2K2, SHC1, NOS3, PRKCA, ADCY2, ARRB2, EDNRB, GNAS, COL4A4, CREBBP, GNAS, AKT1, GNB3, GNB5, CREB, JAK3, SCAR3, CCR2	587	129	891	2.362	2.0E-01	2.1E-02	1.9E-02
mmu04142:Lysosome	20	1.47	1.2E-03	ATP9A1, HEXB, FUCAL1, SLC11A1, GBA, CLTB, LAPTM5, ABCB9, CTSS, SUMF1, GM2A, LAMP1, CTSL, H2AL2, SMPD1, DMLX2, AP1S3, CTSD, CTSD, CTSD, AP1M1	587	135	891	2.257	3.3E-01	3.3E-02	3.0E-02
mmu01250:Biosynthesis of nucleotide sugars	9	0.66	2.7E-03	GPI1, UGP2, PHM1, MPL, UAP1L1, PGM2, GSK, GALK1, HK1	587	38	891	3.608	5.9E-01	6.8E-02	6.1E-02
mmu04530:Tight junction	22	1.62	2.9E-03	MAGI1, ITGB1, PRKAR1B, JUN, PRKAG2, MYL8B, GATA4, TUBA3B, MYL12A, ITAP1, AMOT, PPP3CA, CLDN5, PAR6B, OCCL1, CLDN15, MARVELD2, CLDN23, RAB13, PPP2R2D, SYNP0, MYH10	587	167	891	2.007	6.1E-01	6.8E-02	6.1E-02
mmu04935:Growth hormone synthesis, secretion and action	17	1.25	3.6E-03	PRKCG, MAP2K1, SHC2, MAP2K2, SHC1, IGFBR3, IRS2, PRKCA, ADCY2, MTOR, SOCS2, CREBBP, GNAS, AKT1, IGF1R1, IGF1R3, IGF1R2	587	116	891	2.232	6.9E-01	7.7E-02	7.0E-02
mmu05170:Human immunodeficiency virus 1 infection	28	2.06	4.0E-03	H2-T23, H2-T22, H2-Q4, CXCR4, GNS5, CFL2, AKT1, PAK6, GNS5, ELOB, AP1S3, CCR5, PAK3, AP1M1, PAK4, PRKCG, MAP2K1, MAP2K2, JUN, MAP2K2, BAD, LIMK2, LIMK1, PRKCA, MTOR, GNB3, H2-D1, TLR2	587	240	891	1.777	7.3E-01	7.2E-02	7.4E-02
mmu00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	10	0.74	5.3E-03	GPI1, UGP2, PHM1, HEXB, NPY, UAP1L1, PGM2, GSK, GALK1, HK1	587	51	891	2.987	8.2E-01	9.9E-02	9.0E-02
mmu05221:Acute myeloid leukemia	12	0.88	5.5E-03	CSF1R, MAP2K1, SPI1, ITGAM, MAP2K2, JUP, BAD, PIM1, RARA, AKT1, DUSP6, MTOR	587	70	891	2.611	8.3E-01	9.9E-02	9.0E-02
mmu04062:Chemokine signaling pathway	23	1.69	7.2E-03	CCR1, SHC2, MAP2K1, NCF1, SHC1, BAD, CXCR4, ADCY2, ARRB2, VAV1, PIK3R5, PREX1, HCK, GNB3, GNB5, GNS5, AKT1, GNB3, GNB5, CREB, JAK3, SCAR3, CCR2	587	192	891	1.825	9.1E-01	1.2E-01	1.1E-01
mmu01100:Metabolic pathways	129	9.49	8.0E-03	CHP, CERK, GALT1B, NDUFA11, GALT1B, EHMT2, MBI, MPI, APT, COMA1, CNOP2, PNP, FPG5, NUDT16, SEPHS2, GULU, ENTPD2, DGAT1, MIF, PGD, INPP4B, DPMS, PLPP3, PLPP1, POSEA, CDS1, MTRMR2, PDE1C, SHMT1, GMPR, PLA2G7, PLD3, PTDS1, INPP5A, ROR1L, INPP5D, UAP1L1, ESO1, ATP5D, SMYD2, INPPL1, PDE1, HMOX1, PIP5K1A, SIRT6, STSIA5, ASL, BAGALNT1, PIP5K1C, HMOX2, ATP6V1F, PSM1, AZIN2, GRNPR, ALPL, GALK1, BAGALT2, PIGT, HEXB, SETD7, PYGL, HK1, GPI, GYI, GUK1, SMPD1, H2AL2, PGM2, PGLS, NOS1, MAGAL1, COX8A, WDRK1, ELOVL1, TPPI, GPV4, ATP6AP1, GSTO1, CHP2, PGM4H, HMO2, ARAL1, RORNT1, ARNT, NME1, ADRA1A, ROR1, DADI1, ALDH1A1, ADSS1, PKIX, BLVRB, ACOX3, HAHG, RCBT1, GAPDH, BLVRA, CERS2, ATP6V0E, ANCY, GBA, PRUNEL1, ADCY2, HSD17B7, AGPAT2, SRM, CKMT2, NTSE, UGP2, MTHFD1L, LAO1, MAN1C1, MGAT1, CKB, CDIPT, ADSS, NQO1, TIGAR, RRM2, GK, NOS3, SC4A, HSD3B1, GSK, DHRS9, MGAT4B, SARDH, PLCD3, LPIN2, LPIN3	587	1609	891	1.221	9.3E-01	1.3E-01	1.1E-01
mmu04012:Erbb signaling pathway	13	0.96	8.3E-03	PRKCG, SHC2, MAP2K1, JUN, MAP2K2, SHC1, BAD, PRKCA, MTOR, AKT1, PAK6, PAK3, PAK4	587	84	891	2.357	9.3E-01	1.3E-01	1.1E-01
mmu04072:Phospholipase D signaling pathway	19	1.40	8.5E-03	SHC2, MAP2K1, ARF1, BAD, MAP2K2, SYK, SHC1, PRKCA, ADCY2, AGPAT2, MTOR, AGT, PIK3R5, GNAS, PIP5K1A, AKT1, PIP5K1C, PLPP3, PLPP1	587	149	891	1.942	9.4E-01	1.3E-01	1.1E-01
mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway	36	2.65	1.1E-02	ITGB1, CSF1R, YWHA8, LAMC1, THBS1, PIK3R5, PPP2CA, COMP, CCND2, PPP2R3D, GNS5, CREBBP, AKT1, GNS5, ITGAV, JAK3, MAGI1, MAP2K1, HSP90AA1, MAP2K2, SYK, NOS3, BAD, PRKCA, MTOR, NRAM1, COL4A4, PPP2R2D, ITGA11, COL4A5, GNB3, PKN1, FGFRL3, EPHA2, TLR2, FGFRL1	587	359	891	1.527	9.7E-01	1.6E-01	1.4E-01
mmu05145:Toxoplasmosis	15	1.10	1.2E-02	ITGB1, MAP2K1, H2-EB1, BAD, H2-DMA, ILDR4, LAMC1, HSPA2, H2-AA, PIK3R5, AKT1, CCR5, HSPA1B, HSPA1A, TLR2	587	110	891	2.077	9.8E-01	1.6E-01	1.5E-01
mmu05200:Pathways in cancer	50	3.68	1.3E-02	ITGB1, SPI1, LAMC1, CCND2, EDNRB, PIM1, AKT1, ITGAV, IRT2, JAK3, PRKCG, MAP2K1, HSP90AA1, MAP2K2, WNT5B, GSTO1, DAPK2, DAPK3, PRKCA, COL4A4, RARA, COL4A5, CSF1R, RALB, NOTCH4, PTGER3, CXCR4, ADCY2, GNS5, HMOX1, GNB3, HES1, NQO1, CDKN2B, JUN, FZD2, TNNR3D, GADD45B, JUP, GADD45A, BAD, TNNR31, MTOR, AGT, GADD45G, HNRB2, GNAS, GNB3, FGFRL3, FGFRL1, RRM2, ENTPD2, PDE1C, PRUNE1, NME2, GMPK, ADCY2, APR1, NME1, NTSE, PNP, GUK1, ADSS1, PGM2, NUDT16, ADSS, PDE9A	587	543	891	1.403	9.9E-01	1.6E-01	1.5E-01
mmu00230:Purine metabolism	17	1.25	1.3E-02	GPI1, UGP2, PHM1, HEXB, NPY, UAP1L1, PGM2, GSK, GALK1, HK1	587	133	891	1.947	9.9E-01	1.6E-01	1.5E-01
mmu04915:Estrogen signaling pathway	17	1.25	1.4E-02	SHC2, MAP2K1, JUN, HSP90AA1, MAP2K2, SHC1, NOS3, ADCY2, HSPA2, CREBBP, RARA, GNAS, AKT1, CTSD, HSPA1B, HSPA1A, FRBP	587	134	891	1.932	9.9E-01	1.7E-01	1.5E-01
mmu05140:Leishmaniasis	11	0.81	1.5E-02	ITGB1, FCGR3, H2-EB1, JUN, ITGAM, NCF1, NCF2, H2-DMA, PTPN6, H2-AA, TLR2	587	70	891	2.394	9.9E-01	1.8E-01	1.6E-01
mmu04136:Autophagy - other	7	0.52	1.6E-02	PPP2CA, BECN1, GABARAPL2, GABARAPL1, ATG101, WIPI1, MTOR	587	32	891	3.332	9.9E-01	1.8E-01	1.6E-01
mmu05169:Epstein-Barr virus infection	25	1.84	1.6E-02	H2-T23, H2-T22, PSMO11, PSMO14, PSMO13, H2-DMA, H2-Q4, ADCY2, CCND2, AKT1, HES1, JAK3, MAP2K1, JUN, H2-EB1, GADD45B, SYK, GADD45A, ADRM1, H2-AA, GADD45G, NFKB2, SEM1, NCOA2, H2-D1, TLR2	587	231	891	1.648	1.0E+00	1.8E-01	1.6E-01
mmu05134:Legionellosis	10	0.74	1.7E-02	EEF1G, ARF2, ITGAM, RAB1B, HSPA2, SEC22B, HSPA1B, NFKB2, TLR2, HSPA1A	587	61	891	2.497	1.0E+00	1.8E-01	1.6E-01
mmu04810:Regulation of actin cytoskeleton	24	1.77	1.7E-02	ITGB1, MAP2K1, ITGAM, MAP2K2, LIMK2, LIMK1, CXCR4, MYL12A, VAV1, SCIN, CFL2, ITGA11, PIP5K1A, PAK6, ITGAV, NCKAP1, PIP5K1C, ARHGAP7, PAK3, FGFRL3, MYH10, RCBT1, FGFRL1, PAK4	587	220	891	1.662	1.0E+00	1.8E-01	1.6E-01
mmu04213:Longevity regulating pathway - multiple species	10	0.74	1.9E-02	PRKAR2, AKT1S1, PRKAG2, AKT1, IRS2, ADCY2, HSPA2, HSPA1B, MTOR, HSPA1A	587	62	891	2.457	1.0E+00	1.8E-01	1.7E-01
mmu04514:Cell adhesion molecules	20	1.47	1.9E-02	CD86, ITGB1, H2-T23, NTNG2, H2-EB1, H2-T22, ITGAM, H2-DMA, H2-Q4, H2-AA, PTPRF, CLDN5, OCCL1, CDH5, CLDN15, CLDN3, NCAAM1, ITGAV, MPZL1, H2-D1	587	174	891	1.751	1.0E+00	1.8E-01	1.7E-01
mmu00900:Starch and sucrose metabolism	7	0.52	2.2E-02	GPI1, UGP2, GYG, PGM2, PYGL, GSK, HK1	587	34	891	3.136	1.0E+00	2.0E-01	1.8E-01
mmu05214:Glioma	11	0.81	2.2E-02	PRKCG, SHC2, MAP2K1, MAP2K2, GADD45B, SHC1, GADD45A, AKT1, PRKCA, MTOR, GADD45G	587	74	891	2.264	1.0E+00	2.0E-01	1.8E-01
mmu05166:human T-cell leukemia virus 1 infection	26	1.91	2.3E-02	H2-T23, H2-T22, SPI1, ANAPC15, SFK, H2-DMA, H2-Q4, ADCY2, CCND2, CREBBP2, AKT1, MSK1, JAK3, MAP2K1, JUN, CDKN2B, H2-EB1, RANBP3, MAP2K2, ANAPC7, ILIR1, H2-AA, NFKB2, CDC16, SLC25A5, H2-D1	587	250	891	1.584	1.0E+00	2.0E-01	1.8E-01
mmu04978:Mineral absorption	9	0.66	2.3E-02	SLC9A3, HEPH1L1, ATP2B4, HMOX1, TRP, MT2, TRPM6, ATOX1, HMOX2	587	54	891	2.539	1.0E+00	2.0E-01	1.8E-01
mmu04968:FoxO signaling pathway	16	1.18	2.4E-02	GABARAPL1, PRKAB1, CDKN2B, MAP2K1, GABARAP1, MAP2K2, GADD45B, GADD45A, SETD7, PRKAG2, IRS2, KIF2, GADD45G, CCND2, AKT1, HOMOXR3	587	131	891	1.860	1.0E+00	2.0E-01	1.8E-01
mmu04360:Axon guidance	20	1.47	2.8E-02	ITGB1, NTNG2, SEMA7A, WNT5B, UNC5B, LIMK2, LIMK1, SEMA3B, CXCR4, PRKCA, NTR1, MYL12A, PAROD6, CFL2, PAK6, PLNKB2, PAK3, EPHA8, PAK2, PAK1	587	181	891	1.683	1.0E+00	2.3E-01	2.0E-01
mmu04010:MAPK signaling pathway	29	2.13	2.9E-02	CSF1R, PTPRF, SFK, ARRB2, RPS6KA4, RIN2, AKT1, MAP3K6, PRKCC, MAP2K3, DUSP4, MAP2K1, JUN, DUSP3, MAP2K2, GADD45B, GADD45A, ILIR1, PRKCA, HSPA2, DUSP6, GADD45G, NFKB2, NRAM1, FGFRL3, HSPA1B, EPHA2, HSPA1A, FGFRL1	587	294	891	1.502	1.0E+00	2.3E-01	2.1E-01
mmu03050:Proteasome	8	0.59	3.2E-02	SEM1, PSMO11, PSM85, PSMO14, PSMO13, PSM81, ADRM1, PSM47	587	47	891	2.593	1.0E+00	2.4E-01	2.2E-01

50 **Table S11. KEGG pathway analysis of all genes that are downregulated in hearts of AAV9-**  
 51 **Luc but not AAV9-Tfeb TAC treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Totz	Pop Hit	Pop Totz	Fold Enrichmer	Bonferror	Benjamini	FDR
mmu01100:Metabolic pathways	40	22.86	8.9E-09	ACADVL, GSTP2, GALNT15, ATP5A1, MAT2B, OPLAH, COX7C, ACACB, ENO3, AGPAT3, PFS, LDHB, ADH1, CYP26B1, AUH, NNT, CYP2810, ME3, HMGC52, MLYCD, ACSS1, NDU5F1, CARA, BCKDHA, MDH1, GOT1, EPHX2, ACSL6, SDHC, COX6C, FAH, GIN1T, GSTA3, NDU5F1, ACOT2, KYAT3, NDUFS2, LPIN1, BCAT2, CDS2	89	1609	8941	2,497	2.0E-06	2.0E-06	1.8E-06
mmu05208:Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	11	6.29	6.0E-05	GSTA3, AKT2, EPHX2, ATP5A1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, COX6C, SOD2, COX7C, NDU5F1	89	222	8941	4,978	1.3E-02	4.8E-03	4.5E-03
mmu00620:Pyruvate metabolism	6	3.43	6.6E-05	LDHB, ADH1, MDH1, ME3, ACSS1, ACACB	89	44	8941	13,699	1.4E-02	4.8E-03	4.5E-03
mmu00270:Cysteine and methionine metabolism	6	3.43	1.6E-04	LDHB, MDH1, GOT1, KYAT3, MAT2B, BCAT2	89	53	8941	11,373	3.5E-02	8.4E-03	7.9E-03
mmu00640:Propanoate metabolism	5	2.86	2.3E-04	BCKDHA, LDHB, MLYCD, ACSS1, ACACB	89	31	8941	15,203	4.8E-02	8.4E-03	7.9E-03
mmu03220:PPAR signaling pathway	7	4.00	2.3E-04	ACSL6, PUNA, LPL, APOA1, ME3, HMGC52, CD36	89	89	8941	7,901	4.9E-02	8.4E-03	7.9E-03
mmu04714:Thermogenesis	10	5.71	4.3E-04	ATPSA1, NDU5F1, ACSL6, PRKAG1, NDUFS2, SDHC, SLC25A20, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	231	8941	4,349	8.9E-02	1.3E-02	1.2E-02
mmu04932:Non-alcoholic fatty liver disease	8	4.57	8.4E-04	AKT2, NDU5F1, PRKAG1, NDUFS2, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	156	8941	5,152	1.7E-01	2.3E-02	2.1E-02
mmu05415:Diabetic cardiomyopathy	9	5.14	1.1E-03	AKT2, ATP5A1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, CD36, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	211	8941	4,285	2.1E-01	2.6E-02	2.4E-02
mmu04146:Peroxisome	6	3.43	1.5E-03	EPHX2, PEKX, PXMP2, ACSL6, MLYCD, SOD2	89	86	8941	7,009	2.9E-01	3.4E-02	3.1E-02
mmu00190:Oxidative phosphorylation	7	4.00	2.1E-03	ATPSA1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	135	8941	5,209	3.7E-01	4.2E-02	3.9E-02
mmu04936:Alcoholic liver disease	7	4.00	2.6E-03	ADH1, ACADVL, AKT2, PRKAG1, MLYCD, LPIN1, ACACB	89	141	8941	4,987	4.3E-01	4.7E-02	4.4E-02
mmu04710:Circadian rhythm	4	2.29	3.1E-03	PER2, PER1, CRY2, PRKAG1	89	30	8941	13,395	4.9E-01	5.2E-02	4.9E-02
mmu05012:Parkinson disease	9	5.14	4.3E-03	HSPA5, ATP5A1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1, SLC18A2	89	264	8941	3,425	6.1E-01	6.8E-02	6.4E-02
mmu04920:Adipocytokine signaling pathway	5	2.86	5.2E-03	AKT2, ACSL6, PRKAG1, CD36, ACACB	89	71	8941	7,075	6.8E-01	7.1E-02	6.6E-02
mmu00982:Drug metabolism - cytochrome P450	5	2.86	5.2E-03	ADH1, GSTP2, GSTA3, FMO1, FMO2	89	71	8941	7,075	6.8E-01	7.1E-02	6.6E-02
mmu01200:Carbon metabolism	6	3.43	6.7E-03	MDH1, GOT1, ME3, SDHC, ACSS1, ENO3	89	121	8941	4,982	7.7E-01	8.6E-02	8.1E-02
mmu00071:Fatty acid degradation	4	2.29	1.4E-02	ADH1, ACADVL, ECI1, ACSL6	89	52	8941	7,728	9.6E-01	1.8E-01	1.6E-01
mmu05020:Prion disease	8	4.57	1.6E-02	HSPA5, ATP5A1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	268	8941	2,999	9.7E-01	1.9E-01	1.7E-01
mmu00280:Valine, leucine and Isoleucine degradation	4	2.29	1.8E-02	BCKDHA, AUH, HMGC52, BCAT2	89	57	8941	7,050	9.8E-01	2.0E-01	1.9E-01
mmu04964:Proximal tubule bicarbonate reclamation	3	1.71	1.9E-02	MDH1, ATP1B2, CARA	89	22	8941	13,699	9.9E-01	2.0E-01	1.9E-01
mmu00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	4	2.29	2.8E-02	LDHB, ADH1, ACSS1, ENO3	89	67	8941	5,998	1.0E+00	2.6E-01	2.5E-01
mmu05014:Amyotrophic lateral sclerosis	9	5.14	2.8E-02	HSPA5, ATP5A1, NDU5F1, ANXA11, NDUFS2, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	369	8941	2,450	1.0E+00	2.6E-01	2.5E-01
mmu05016:Huntington disease	8	4.57	2.9E-02	ATPSA1, NDU5F1, NDUFS2, SDHC, COX6C, SOD2, COX7C, NDU5F1	89	302	8941	2,661	1.0E+00	2.6E-01	2.5E-01
mmu05010:Alzheimer disease	9	5.14	3.4E-02	AKT2, ATP5A1, NDU5F1, NDUFS2, LPL, SDHC, COX6C, COX7C, NDU5F1	89	383	8941	2,361	1.0E+00	3.0E-01	2.8E-01
mmu04152:AMPK signaling pathway	5	2.86	3.5E-02	AKT2, PRKAG1, MLYCD, CD36, ACACB	89	126	8941	3,987	1.0E+00	3.0E-01	2.8E-01
mmu01230:Biosynthesis of amino acids	4	2.29	4.3E-02	GOT1, MAT2B, ENO3, BCAT2	89	79	8941	5,087	1.0E+00	3.5E-01	3.2E-01

52

53 **Table S12. KEGG pathway analysis of all genes that are downregulated in hearts of AAV9-**  
 54 **Luc and AAV9-Tfeb TAC treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hit	Pop Tot	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu01100:Metabolic pathways	102	14.23	2.5E-11	ALDH1L1, ACAA2, PANK1, ACSM5, OGDHL, HNM7, ALDH1L2, PPAT, NAMPT, CAR14, CHAC2, HADH, NUOT12, MCC2, GSTK1, DGAT2, GP1Z, ENTPD5, MCC1, DHOH, COX6B2, SDHA, GANC, GCAT, CYP11A1, ACOT1, SUG1E2, SUG1E1, AMY1, PFKFB1, GCDH, MAGB, GSTT2, ATP5I, GSTT1, ALDH12, PLA2G5, MTMR4, COX7A1, MAN2A2, LDH, PRODH, FOF1, GST5, GSTM1, SYN2, ACADSB, ALDH5A1, GGCK, ADI, GSTM7, ACY1, M0GAT2, AMD1, MTR, GPT, PFA5, DHTKD1, NADK2, ALDH2, AOX3, DBT, PDK4A, AOX1, ACADM, IDH3A, PKOXD, PLA2G4B, BCKDHB, PKCIC, AMT, SORD, PGM3L1, HMT, HADHB, HADHA, ALDH5A1, PCCA, IVD, PDESA, NDUFS1, ALDOB, FBP2, ALDH9A1, STGALNAC5, DDC, ACS3, ADCY6, SELENBP1, SELENBP2, ALOX5, FKTN, DUT, NDUFA5, AGL, GATB, DHODH, ALDH4A1, NTS3A, CTH, GALM, PFRM	301	1609	8941	1,883	6.7E-09	3.8E-09	3.8E-09
mmu00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	17	2.37	2.9E-11	MCC2, ACAA2, MCC1, BCKDHB, ACADSB, HADHB, HADHA, ALDH5A1, PCCA, ALDH2, IVD, AOX3, DBT, AOX1, ACADM, HADH, ALDH5A1	301	57	8941	8,859	7.7E-09	3.8E-09	3.8E-09
mmu00071:Fatty acid degradation	11	1.53	7.1E-06	HADHB, GCDH, HADHA, ACAA2, CPT2, ALDH2, CYP2J1, ACADM, HADH, ACADSB, ALDH5A1	301	52	8941	6,284	1.9E-03	4.7E-04	4.6E-04
mmu00380:Tryptophan metabolism	11	1.53	7.1E-06	GCDH, HADHA, DDC, MAGB, ALDH2, AOX3, AOX1, HADH, HMT, ALDH5A1, DHTK1	301	52	8941	6,284	1.9E-03	4.7E-04	4.6E-04
mmu00660:Propanoic acid metabolism	8	1.12	5.9E-05	HADHA, ACS3, ALDH5A1, PCCA, DBT, BCKDHB, SUG1E2, SUG1E1	301	31	8941	7,666	1.5E-02	3.1E-03	3.1E-03
mmu04020:Calcium signaling pathway	20	2.79	4.4E-04	CHRM2, PTGFR, CAMK2A, ATP2A2, ADRI1, AVPR1A, ADRA1B, ADRA1A, CACNA1H, MYLK, MYLK, MYLK, FGF16, P2RX6, PLN, PFKF1, P2RX1, HMC, CASQ1, FGF10	301	240	8941	2,475	1.1E-01	2.0E-02	1.9E-02
mmu01200:Carbon metabolism	13	1.81	7.2E-04	GP1Z, AMT, OGDHL, GPT, SDHA, ALDH9A1, PCCA, SUG1E2, SUG1E1, ALDOB, PFKM, FBP2, IDH3A	301	111	8941	3,191	1.8E-01	3.8E-02	3.7E-02
mmu04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	13	1.81	5.0E-03	CAMK2A, ATP2A2, CACNA2D2, ADRI1, ADRA1B, ADRA1A, ADCY6, CACNB2, PLN, RPS6KA5, PPP2R2C, TNNT3, MYH6	301	152	8941	2,541	7.4E-01	1.7E-01	1.6E-01
mmu04024:cAMP signaling pathway	16	2.23	7.1E-03	CHRM2, PTK1, PDE4, CAMK2A, PDE4C, ATP2A2, ADRI1, ADCY6, CHR2, PLN, ADORA1, PDE4A, TNNT3, CNR1A, PPARA, DRD2	301	220	8941	2,160	8.5E-01	2.1E-01	2.1E-01
mmu00982:Drug metabolism - cytochrome P450	8	1.12	9.5E-03	GSTK1, GSTM1, MAOB, AOX3, AOX1, GSTT2, GSTT1, GSTM7	301	71	8941	3,347	9.2E-01	2.5E-01	2.5E-01
mmu00760:Nicotinate and nicotinamide metabolism	6	0.84	1.1E-02	NADK2, NTS3A, NAMPT, AOX3, AOX1, NUOT12	301	41	8941	4,347	9.5E-01	2.8E-01	2.7E-01
mmu04022:cGMP-PKG signaling pathway	13	1.81	1.4E-02	ATP2A2, ADRI1, ADRA1B, ADRA2B, ADRA1A, ADCY6, MYLK3, MYLK, MYLK4, PLN, ADORA1, PDESA, MYH6	301	173	8941	2,232	9.7E-01	2.8E-01	2.8E-01
mmu04921:Oxytocin signaling pathway	12	1.67	1.4E-02	CACNB2, KCN15, KCN12, PLA2G4B, CAMK2A, CACNA2D2, KCN12, ADCY6, MYLK3, MYLK, KCN13, MYLK4	301	153	8941	2,330	9.7E-01	2.8E-01	2.8E-01
mmu00062:Fatty acid elongation	5	0.70	1.5E-02	HADHB, HADHA, ACAA2, ACOT1, HADH	301	29	8941	5,121	9.8E-01	2.9E-01	2.8E-01
mmu01230:Synthesis of amino acids	8	1.12	1.6E-02	ACT1, GP1Z, CTH, MTR, GPT, ALDOB, PFKM, IDH3A	301	79	8941	3,008	9.9E-01	2.9E-01	2.8E-01
mmu01212:Fatty acid metabolism	7	0.98	1.7E-02	HADHB, HADHA, ACAA2, CPT2, ACADM, HADH, ACADSB	301	62	8941	3,354	9.9E-01	2.9E-01	2.8E-01
mmu00020:Citrate cycle (TCA cycle)	5	0.70	2.1E-02	SUG1E2, SUG1E1, OGDHL, SDHA, IDH3A	301	32	8941	4,641	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu00070:One carbon pool by folate	4	0.56	2.4E-02	ALDH1L1, AMT, MTR, ALDH1L2	301	19	8941	6,254	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu05415:Diabetic cardiomyopathy	14	1.95	2.5E-02	NDUFA5, CAMK2A, ATP2A2, ATP5I, SLC2A4, SDHA, COX6B2, COX7A1, PLN, CPT2, TBC1D4, TNNT3, NDUFS1, PPARA	301	211	8941	1,971	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu04260:Cardiac muscle contraction	8	1.12	2.7E-02	CACNB2, HMC, ATP2A2, CACNA2D2, TNNT3, COX6B2, COX7A1, MYH6	301	87	8941	2,731	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu01202:Oxocarboxylic acid metabolism	4	0.56	2.8E-02	ACT1, GP1Z, GPT, IDH3A	301	20	8941	5,941	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu00051:Fructose and mannose metabolism	5	0.70	3.1E-02	PFKFB1, SORD, ALDOB, PFKM, FBP2	301	36	8941	4,126	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu04040:Glutathione metabolism	7	0.98	3.3E-02	GET5, GSTK1, GSTM1, GSTT2, GSTT1, CHAC2, GSTM7	301	72	8941	2,288	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu00130:Arginine and proline metabolism	6	0.84	3.4E-02	ALDH4A1, MAOB, ALDH2, AMD1, PRODH, ALDH9A1	301	54	8941	3,300	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu05200:Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	14	1.95	3.6E-02	GSTM1, NDUFA5, ATP5I, GSTT2, GSTT1, SDHA, FOXO3, COX6B2, COX7A1, ASBMT, NDUFS1, GSTM7, SLC26A5, MAP3K5	301	222	8941	1,873	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu05414:Dilated cardiomyopathy	8	1.12	3.8E-02	CACNB2, PLN, ATP2A2, CACNA2D2, ADRI1, TNNT3, MYH6, ADCY6	301	94	8941	2,528	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu04010:MAPK signaling pathway	17	2.37	3.9E-02	MAP3K5, ANGPT1, MAX, PLA2G4B, IGF2, CACNA2D2, RASGRP2, CACNA1H, DUSP7, FGF16, CACNB2, RPS6KA5, NTF3, RASGEF2, MAP3K3, MAP3K5, FGF10	301	294	8941	1,718	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu00250:Alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	0.70	4.1E-02	ALDH5A1, ALDH5A1, GPT, PPA1, GPT	301	39	8941	3,888	1.0E+00	3.0E-01	3.0E-01
mmu04713:Circadian entrainment	8	1.12	4.6E-02	KCN15, PFKFB1, RPS6KA5, CAMK2A, NOS1AP, CACNA1H, ADCY6, KCN13	301	98	8941	2,425	1.0E+00	4.2E-01	4.1E-01
mmu04919:Thyroid hormone signaling pathway	9	1.26	4.8E-02	PLN, RXRA, THRB, TBC1D4, ATP2A2, SLC16A10, PFKM, MYH6, MED12L	301	120	8941	2,228	1.0E+00	4.3E-01	4.2E-01

55

56 **Table S13. KEGG pathway analysis of all genes that are downregulated in hearts of AAV9-**  
 57 **Tfeb but not AAV9-Luc TAC treated mice**

Term	Count	%	PValue	Genes	List Totl	Pop Hit	Pop Totl	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
mmu05168:Herpes simplex virus 1 infection	48	4.21	1.9E-06	HD12A, ZFP788, ZFP128, ZFP763, ZFP961, ZFP109, ZFP807, ZFP866, ZFP947, ZFP60, CFP, ZFP728, ZFP909, ZFP78, ZFP12, ZFP14, A43003K08RHK, ZFP8748, ZFP74, ZFP674A, ZFP180, ZFP120, ZFP141, ZFP936, ZFP420, ZFP386, ZFP601, ZFP709, ZFP235, ZFP950, ZFP715, ZFP317, ZFP811, TSC1, ZFP958, ZFP7808, ZFP68, OAS2, ZFP273, ZFP597, ZFP113, SRSF7, ZFP112, ZFP398, ZFP870, ZFP551, ZFP275	449	459	8941	2,082	5.7E-04	5.7E-04	5.7E-04
mmu04022:cGMP-PKG signaling pathway	20	1.75	1.0E-03	OPR1D1, ROCK1, IRS1, PDE2A, ATP2A3, NFATC3, ATP2A1, ATP1A2, ADCY1, ADCY8, PPP3CB, RGS2, CREB1, ADCY9, RORA, VDAC3, CACNA1S, RAF1, MYL9, G12B	449	173	8941	2,302	2.7E-01	1.6E-01	1.6E-01
mmu04935:Growth hormone synthesis, secretion and action	15	1.32	1.9E-03	STAT5A, STAT5B, IRS1, ADCY1, MAPK14, ADCY8, SSTR3, MAPK3, CREB1, ADCY9, EP300, CACNA1S, RAF1, SOS2, MAP2K6	449	116	8941	2,575	4.4E-01	1.9E-01	1.9E-01
mmu04912:GnRH signaling pathway	11	0.96	1.4E-02	CAMK2B, MAPK9, ADCY9, CACNA1S, ADCY1, MAPK14, ADCY8, RAF1, ELK1, SOS2, MAP2K6	449	90	8941	2,434	9.9E-01	5.5E-01	5.5E-01
mmu05205:Proteoglycans in cancer	19	1.67	1.4E-02	CAMK2B, DDX5, ROCK1, CAV1, WNT5A, ANK2, MAPK14, ELK1, FGF2, VTN, ERBB3, PDCD4, GPC3, KDR, DROSHA, MPSE, PPP1R12B, RAF1, SOS2	449	205	8941	1,846	9.9E-01	5.5E-01	5.5E-01
mmu04919:Thyroid hormone signaling pathway	13	1.14	1.7E-02	NOTCH2, NCOA1, MED1, NCOA2, HMOX2, ATP2A3, ATP2A1, ATP1A2, SIN3A, EP300, RAF1, PLCD4, ROR2	449	120	8941	2,157	9.9E-01	5.5E-01	5.5E-01
mmu05414:Dilated cardiomyopathy	11	0.96	1.9E-02	RYR2, ADCY9, SGCA, MYL2, ITGA2B, ATP2A3, ATP2A1, CACNA1S, ITGB6, ADCY1, ADCY8	449	94	8941	2,330	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	15	1.32	2.0E-02	CAMK2B, RYR2, ATP2A3, ATP2A1, ATP1A2, PPP2R5D, ADCY1, PPP2K3A, MAPK14, ADCY8, CREB1, ADCY9, MYL2, CACNA1S, SCH4B	449	152	8941	1,965	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu00020:Citrate cycle (TCA cycle)	6	0.53	2.0E-02	CS, SUCLA2, IDH1, IDH3B, DLSD, FHL1	449	32	8941	3,734	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04921:Oxytocin signaling pathway	15	1.32	2.1E-02	CAMK2B, RYR2, ROCK1, NFATC3, ADCY1, ADCY8, ELK1, PPP3CB, RGS2, ADCY9, CAMK4, CACNA1S, PPP1R12B, RAF1, MYL9	449	153	8941	1,952	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04010:MAPK signaling pathway	24	2.11	2.2E-02	EGF, RASGRF2, NFATC3, PDGFA, MAPK14, ELK1, FGF2, DUSP16, RASGRF3, MAPK9, PPP3CB, DUSP10, MAPKAPK3, FGF5, ERBB3, KITL, RPS6KA2, MAP3K20, KDR, CACNA1S, TEK, RAF1, SOS2, MAP2K6	449	294	8941	1,626	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04024:cAMP signaling pathway	19	1.67	2.7E-02	CAMK2B, HCN4, RYR2, ROCK1, ATP2A3, ATP2A1, ATP1A2, ADCY1, ADCY8, MAPK3, CREB1, ADCY9, CAMK4, PPP1R12B, PDE1A, EP300, CACNA1S, RAF1, MYL9	449	220	8941	1,720	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu0540:Gap junction	10	0.88	2.8E-02	ADCY9, EGF, TUBB1, PDGFA, ADCY1, ADCY8, RAF1, SOS2, TUBA4A, TUBA8	449	86	8941	2,315	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04911:Insulin secretion	10	0.88	2.8E-02	CAMK2B, CHRM3, RYR2, CREB1, ADCY9, ATP1A2, KCNN2, CACNA1S, ADCY1, ADCY8	449	86	8941	2,315	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04005:Calcium signaling pathway	20	1.75	3.2E-02	CAMK2B, CHRM3, RYR2, EGF, ATP2A3, PDGFA, ATP2A1, ADCY1, ADCY8, FGF2, ITPB8, PPP3CB, ADCY9, FGF5, ERBB3, CAMK4, KDR, VDAC3, CACNA1S, PLCD4	449	240	8941	1,659	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu05200:Pathways in cancer	38	3.33	3.3E-02	NOTCH2, CAMK2B, HDAC2, ROCK1, GSTR1, ITGA2B, PDGFA, ADCY1, ADCY8, ELK1, FGF2, HSP90B1, RASGRF3, MAPK9, BCL1L1, FGF9, HEY1, HEY2, EP300, ROR2, STAT5A, NCOA1, STAT5B, EGR3, LAMB3, EGF, WNT5A, AXIN2, MUM1, FHL, DDN2, AR, CXCL12, ADCY9, KITL, IL2RA, RAF1, SOS2	449	543	8941	1,394	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04660:T cell receptor signaling pathway	11	0.96	3.3E-02	MAPK9, PPP3CB, DLG1, TEC, GRAP2, NFATC3, CTLA4, PRKCD, MAPK14, RAF1, SOS2	449	103	8941	2,127	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu02010:ABC transporters	7	0.61	3.3E-02	ABCA1, ABCA1, ABCD2, ABC5, ABCA7, ABCB1A, ABCB1B	449	50	8941	2,788	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04360:Axon guidance	16	1.40	3.3E-02	CAMK2B, SEMA5B, NRP1, EPHA7, EPHA7, ROCK1, TRPC3, WNT5A, NFATC3, PRKCD, PPP3CB, CXCL12, PARD3, RAF1, MYL9, EPHB3	449	181	8941	1,760	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu00563:Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis	5	0.44	3.9E-02	PIGU1, GCAP1, PIGO, PIGG, PIGV	449	26	8941	3,829	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu03310:Urine degradation	8	0.70	4.0E-02	CELSR3L2, KMT2A, SETDB1, KMT2C, PRDM2, DLID, EZH1, AASS	449	64	8941	2,489	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu04015:Rap1 signaling pathway	18	1.58	4.0E-02	EGF, ITGA2B, PDGFA, ADCY1, MAPK14, ADCY9, PRKCD, FGF2, RAP1GAP, RASGRF3, ADCY9, FGF5, KITL, PARD3, KDR, TEK, RAF1, MAP2K6	449	214	8941	1,675	1.0E+00	5.5E-01	5.5E-01
mmu05166:Human T-cell leukemia virus 1 infection	20	1.75	4.5E-02	HD12A, STAT5A, NRP1, STAT5B, NFATC3, ADCY1, ADCY8, ELK1, MAPK3, DLG1, PPP3CB, CREB1, RPS1, ADCY9, ITGB2, CREK1, IL2RA, VDAC3, EP300, ATM	449	250	8941	1,593	1.0E+00	5.6E-01	5.6E-01
mmu04510:Focal adhesion	17	1.49	4.5E-02	ROCK1, LAMB3, EGF, CAV1, ITGA2B, PDGFA, ARHGAP5, ELK1, VTN, MAPK3, MYL2, KDR, ITGB6, PPP1R12B, RAF1, MYL9, SOS2	449	201	8941	1,684	1.0E+00	5.6E-01	5.6E-01
mmu04720:Long-term potentiation	8	0.70	4.9E-02	CAMK2B, PPP3CB, RPS6KA2, CAMK4, EP300, ADCY1, ADCY8, RAF1	449	67	8941	2,378	1.0E+00	5.8E-01	5.8E-01
mmu04810:Regulation of actin cytoskeleton	18	1.58	5.0E-02	CYFIP2, CHRM3, ROCK2, EGF, ITGA2B, PDGFA, IQGAP3, ACTR8B, FGF2, CXCL12, FGF9, MYL2, SPATA13, ITGB6, PPP1R12B, RAF1, MYL9, SOS2	449	220	8941	1,629	1.0E+00	5.8E-01	5.8E-01

58

59

60 **Table S14. Primers for generation of AAV9-Tfeb cDNA expression plasmids.**

Name	Sequence
Mm_Tfeb_XbaI_forward	5'-GCT CTA GAA TGG CTC AGC TCG CTC AG-3'
Mm_Tfeb_XbaI_reverse	5'-GCT CTA GAT CAC AGA ACA TCA CCC TCC TC-3'

61

62 Tfeb indicates transcription factor EB; XbaI indicates the restriction enzyme used.

63 Table S15. Primer pairs for real time RT-PCR.

Gene	Primer sequence
<b>Mm_Atg101_forward</b>	5'-CCG GTC AGA ATT CTC GGT-3'
<b>Mm_Atg101_reverse</b>	5'-GCA AGA CAC AGG ATA CTT CAC C-3'
<b>Mm_Atp6v1h_forward</b>	5'-GCT CAC GAT GTT GGA GAA TAT GT-3'
<b>Mm_Atp6v1h_reverse</b>	5'-GCA TGT GGT TCA TCA CCA ACT-3'
<b>Mm_Becn1_forward</b>	5'-AGG ATG GTG TCT CTC GAA GATT -3'
<b>Mm_Becn1_reverse</b>	5'-GAT CAG AGT GAA GCT ATT AGC ACT TTC-3'
<b>Mm_Col1a1_forward</b>	5'-TGT AAA CAC CCC AGC GAA GAA-3'
<b>Mm_Col1a1_reverse</b>	5'-CTG AGT TGC CAT TTC CTT GGA-3'
<b>Mm_Col3a1_forward</b>	5'-CTC ACC CTT CTT CAT CCC ACT CTT A-3'
<b>Mm_Col3a1_reverse</b>	5'-ACA TGG TTC TGG CTT CCA GAC AT-3'
<b>Mm_Ctgf_forward</b>	5'-TTC CCG AGA AGG GTC AAG CT-3'
<b>Mm_Ctgf_reverse</b>	5'-TTG GGT CTG GGC CAA ATG T-3'
<b>Mm_Ctsd_forward</b>	5'-CAT TGC AAG ATA CTT GAC ATA GCC-3'
<b>Mm_Ctsd_reverse</b>	5'-CGT TCT TCA CAT AGG TGC TGG-3'
<b>Mm_Ctsl_forward</b>	5'-CAA ATA AGA ATA AAT ATT GGC TTG TCA-3'
<b>Mm_Ctsl_reverse</b>	5'-TTT GAT GTA GCC TTC CAT ACC C-3'
<b>Mm_Gabarapl2_forward</b>	5'-AGT CCC GCC TGT GGA GTA G-3'
<b>Mm_Gabarapl2_reverse</b>	5'-AGC GAC CAC AAC AAC AAC G-3'
<b>Mm_Ipo8_forward</b>	5'-GAG AAG ATG CCG AGT GCT ATG-3'
<b>Mm_Ipo8_reverse</b>	5'-GAC TTG CTC CAG TGT ATG GAA C-3'
<b>Mm_Map1lc3b_forward</b>	5'-GAC CAG CAC CCC AGT AAG AT-3'
<b>Mm_Map1lc3b_reverse</b>	5'-TGG GAC CAG AAA CTT GGT CT-3'
<b>Mm_Mrpl13_forward</b>	5'-ACA ATG ATG CAA AGG CTG C-3'
<b>Mm_Mrpl13_reverse</b>	5'-CGT GGC TGA GGA AGC TCT T-3'
<b>Mm_Myh6_forward</b>	5'-GCC AAG ACT GTC CGG AAT GA-3'
<b>Mm_Myh6_reverse</b>	5'-TGG AAG ATC ACC CGG GAC TT-3'
<b>Mm_Myh7_forward</b>	5'-CAA AGG CAA GGC AAA GAA AG-3'
<b>Mm_Myh7_reverse</b>	5'-TCA CCC CTG GAG ACT TTG TC-3'
<b>Mm_Nppa_forward</b>	5'-GGG GGT AGG ATT GAC AGG AT-3'
<b>Mm_Nppa_reverse</b>	5'-ACA CAC CAC AAG GGC TTA GG-3'
<b>Mm_Nppb_forward</b>	5'-GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG-3'

<b>Mm_Nppb_reverse</b>	5`-CTT CAA AGG TGG TCC CAG AG-3`
<b>Mm_Pgk1_forward</b>	5`-CAG ACA AGA TCC AGC TGA TCA-3'
<b>Mm_Pgk1_reverse</b>	5`-CTT CTT CAT CAT ACA GAG ATG TGC-3'
<b>Mm_Sqstm1_forward</b>	5`-AGA CCC CTC ACA GGA AGG AC-3'
<b>Mm_Sqstm1_reverse</b>	5`-CAT CTG GGA GAG GGA CTC AA-3'
<b>Mm_Tecpr1_forward</b>	5`-TAT GTG TGC TCC AGT GAT GTA CC-3'
<b>Mm_Tecpr1_reverse</b>	5`-CTC GGC AGG AGC TTC TCA-3'
<b>Mm_Tfeb_forward</b>	5`-GAG CTG GGA ATG CTG ATC C-3'
<b>Mm_Tfeb_reverse</b>	5`-CTT GAG GAT GGT GCC TTT GT-3'
<b>Mm_Wipi1_forward</b>	5`-CCT ATC CTG GAA GCC AGA GTA C-3'
<b>Mm_Wipi1_reverse</b>	5`-CGA GGA GTT GAA GGT GAT AGC-3'

64

65 *Atg101* indicates autophagy related 101; *Atp6v1h*, ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit  
66 H; *Becn1*, Beclin-1; *Ctgf*, connective tissue growth factor; *Ctsd*, Cathepsin D; *Ctsl*, Cathepsin L;  
67 *Gabarapl2*, gamma-aminobutyric acid A receptor-associated protein-like 2; *Nppa*, natriuretic  
68 peptide A; *Nppb*, B-type natriuretic factor; *Myh*, myosin heavy chain; *Ipo8*, Importin 8; *Map1lc3b*,  
69 microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B; *Mrpl13*, mitochondrial ribosomal protein  
70 L13; *Pgk1*, Phosphoglycerate Kinase 1; *Sqstm1/p62*, Sequestosome 1; *Tecpr1*, tectonin beta-  
71 propeller repeat containing 1; *Tfeb*, Transcription factor EB; *Wipi1*, WD repeat domain  
72 phosphoinositide-interacting protein 1.

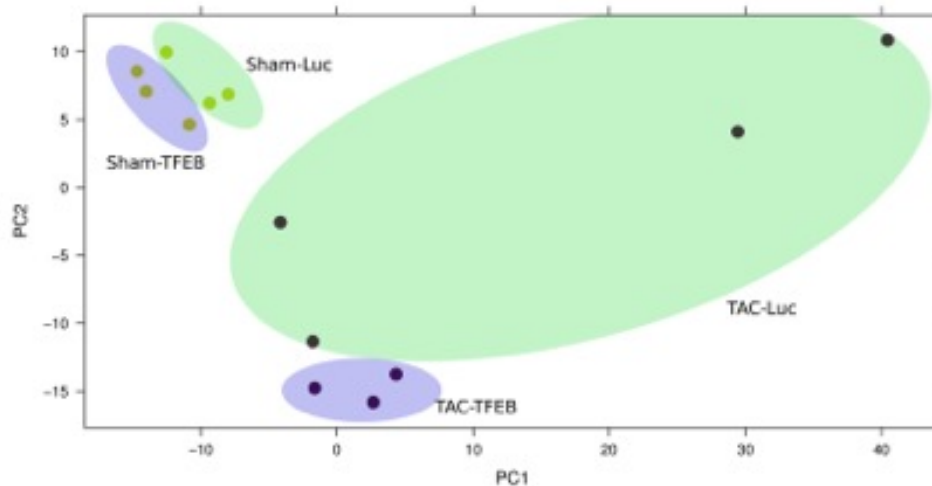
73



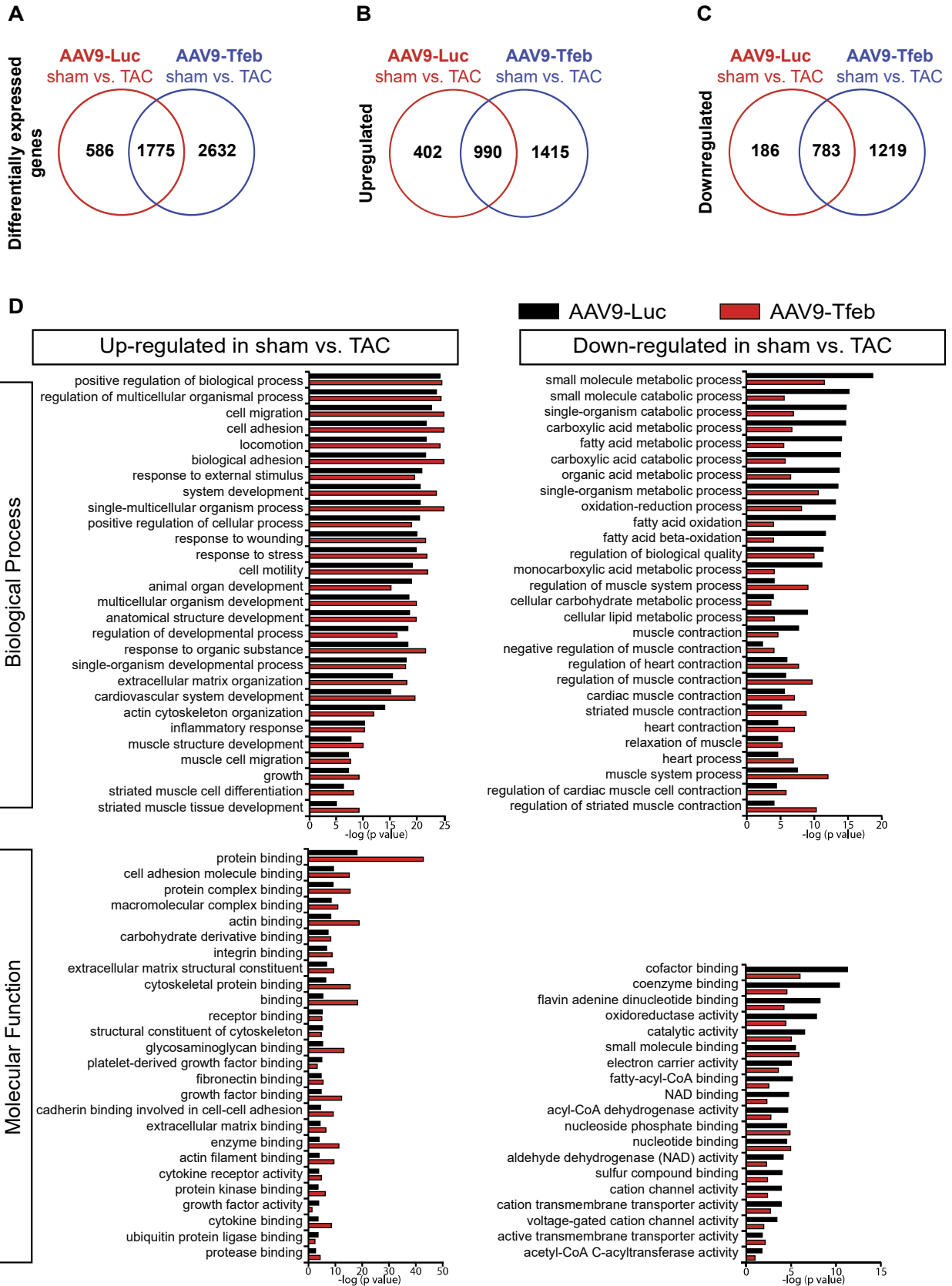
74 **Figure S1.** Principal component analysis (PCA).

75 **Figure S2. (a-c)** Venn Diagrams showing the number of genes that were differentially regulated  
 76 (A; adjusted  $p$ -value<0.05), upregulated (b; adjusted  $p$ -value<0.05) or downregulated (c; adjusted  
 77  $p$ -value<0.05) in hearts of TAC-treated AAV9-Luc or AAV9-Tfeb mice as compared to the  
 78 respective sham group. (d) Direct comparison of gene ontology (GO) term analysis of genes that  
 79 were upregulated (left panels) or downregulated (right panels) in TAC treated AAV9-Luc and  
 80 AAV9-Tfeb hearts. BP indicates biological process; MF, molecular function.

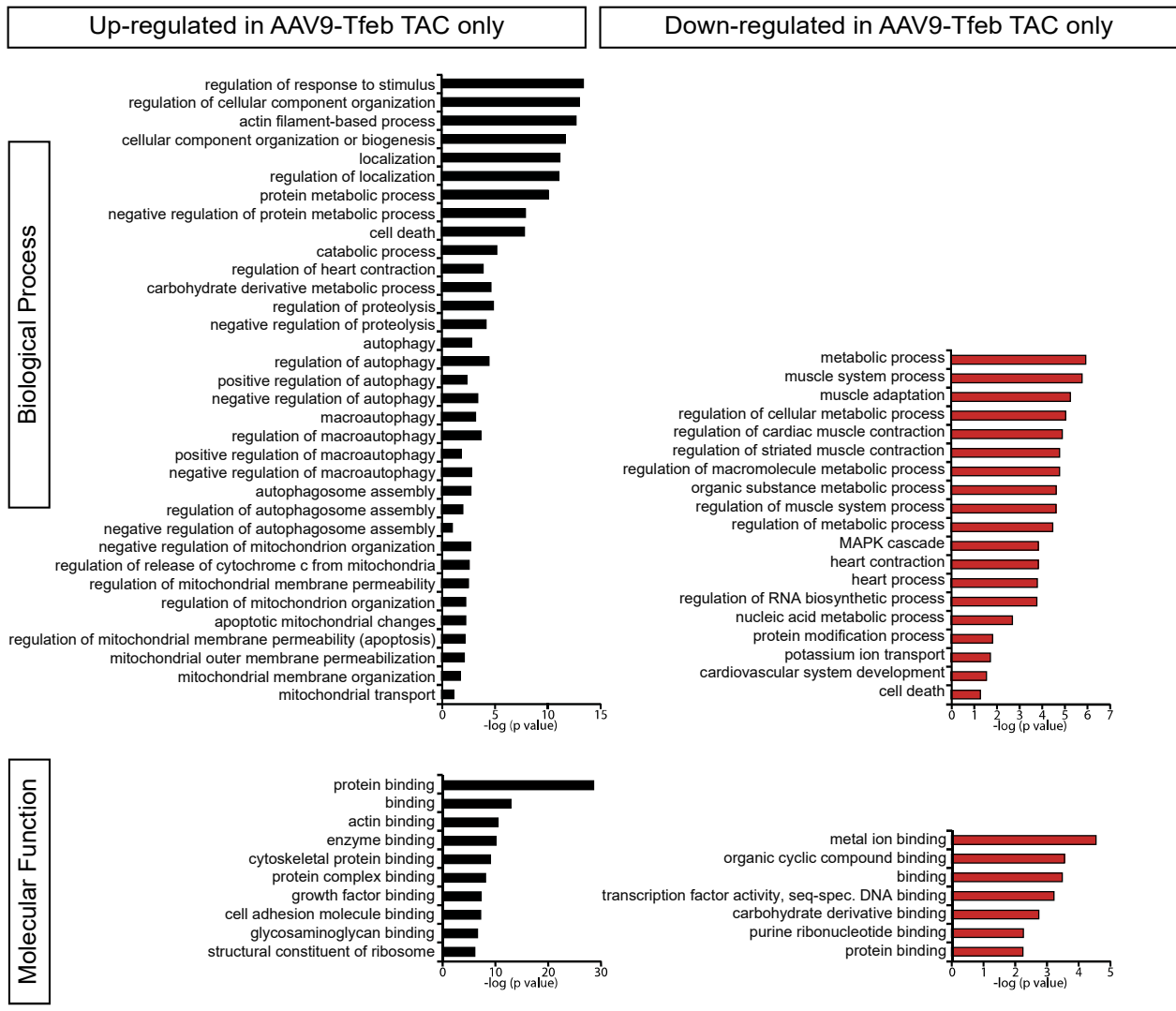
81 **Figure S3.** Gene ontology (GO) term analysis of genes that were only upregulated (left panels) or  
 82 downregulated (right panels) in TAC treated AAV9-Tfeb but not AAV9-Luc hearts. BP indicates  
 83 biological process; MF, molecular function.



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

### **Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects from Hypertensive Cardiovascular Damage.**

Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Markó L, Höges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kräker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt KU, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Müller DN, Stegbauer J, Wilck N.  
Circulation. 2019 Mar 12.

### **Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting.**

Zanders L, Kny M, Hahn A, Schmidt S, Wundersitz S, Todiras M, Lahmann I, Bandyopadhyay A, Wollersheim T, Kaderali L, Luft FC, Birchmeier C, Weber-Carstens S, Fielitz J.  
Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2022 Feb 13.

### **The Transcription Factor EB (TFEB) Sensitizes the Heart to Chronic Pressure Overload.**

Wundersitz S, Pablo Tortola C, Schmidt S, Oliveira Vidal R, Kny M, Hahn A, Zanders L, Katus HA, Sauer S, Butter C, Luft FC, Müller OJ, Fielitz J.  
International Journal of Molecular Science. 2022 May 25.

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jens Fielitz, für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und die stets offene Tür für Probleme und Besprechungen.

In diesem Zusammenhang danke ich allen Mitarbeiter:innen der AG Fielitz. Herzlicher Dank gilt Frau Dr. Cristina Pablo für die Einarbeitung in die Thematik sowie in die Arbeitsverfahren und Techniken sowie an Sibylle Schmidt, Alexander Hahn, Melanie Kny und Lukas Zanders für die offene und effektive Zusammenarbeit im Labor.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Freundin Fritzi für den Rückhalt und die Motivation auch in Phasen von Rückschlägen und hoher Arbeitsbelastung bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.