

Aus dem  
CharitéCentrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin  
Medizinische Klinik für Kardiologie und Pulmologie  
Campus Benjamin Franklin  
Direktor: Prof. Dr. H.-P. Schultheiss

## **Habilitationsschrift**

# **Molekulare Untersuchungen zur Charakterisierung der pro-angiogenen und hypertrophen Effekte der Wachstumsfaktor/PI3K/Akt – Signaltransduktionsachse**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Dr. med. Carsten Skurk  
aus Aschersleben

Eingereicht: Juni 2010

Dekanin:	Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Bernhard Maisch
2. Gutachter:	Prof. Dr. Georg Ertl

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4E-BP1	-	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
Adipo-R1, 2	-	Adiponectin Rezeptor 1, 2
AFX	-	forkhead box O4 (Transkriptionsfaktor)
Akt/PKB	-	cellular homolog of transforming oncogene of Akt-8 oncovirus/Proteinkinase B
AMPK	-	AMP-Kinase
APAF-1	-	apoptosis activating factor-1
LDL	-	low density lipoprotein
APC	-	adenomatosis polyposis coli Protein
APN	-	Adiponectin
Bcl-2	-	B-cell lymphoma 2 Protein
Bcl-6	-	B-cell lymphoma 6 Protein
bFGF	-	basic fibroblast growth factor
C. elegans	-	Caenorhabditis elegans
c-Jun	-	c-Jun-Transkriptionsfaktor
c-Myc	-	c-Myc-Transkriptionsfaktor
CREB	-	cAMP response element-binding
CrmA	-	cytokine response modifier A
DCM	-	Dilatative Kardiomyopathie
Delta- $\beta$ -Catenin	-	mutiertes $\beta$ -Catenin
DR4, 5	-	death receptor 4, 5
Dvl	-	Disheveled Protein
E2F	-	E2F-Transkriptionsfaktor
EC	-	endothelial cell, Endothelzelle
eIF2B	-	eukaryotic initiation factor 2B
EMB	-	Endomyokard-Biopsie
eNOS	-	endothelial nitric oxide synthase
EPC	-	endotheliale Progenitorzellen
ERK	-	extracellular-signal-regulated kinase
FADD	-	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas-L	-	Fas-Ligand
FGF-2	-	fibroblast growth factor -2
FKHR	-	forkhead box O1 (Transkriptionsfaktor)
FKHRL1	-	forkhead box O3a (Transkriptionsfaktor)
FLICE	-	Fas-associated death domain-like interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme
FLIP	-	FLICE-inhibiting protein
Fik-1	-	fetal liver kinase 1 (VEGF-Rezeptor-2)
FOXO	-	forkhead box O
GATA4	-	GATA4-Transkriptionsfaktor
GFP	-	green fluorescent protein
GLUT4	-	glucose transporter type 4
GSK3 $\beta$	-	Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
HDAC	-	histon deacetylase
HSF1	-	heat shock factor 1
HSP70	-	heat shock protein 70
hTERT	-	humane Telomerase reverse transcriptase
HUVEC	-	human vein endothelial cells
IGF	-	insulin growth factor
Igfbp5	-	insulin growth factor binding protein 5
IKK $\alpha$	-	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha

ILK	-	integrin-linked kinase
KM-GSK3 $\beta$	-	kinase-mutant GSK3 $\beta$
LEF	-	lymphoid enhancer factor (Transkriptionsfaktor)
LIN31	-	LIN31-Transkriptionsfaktor
LVAD	-	left ventricular assist device
LVEDD	-	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	-	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LY294002	-	PI3K-Inhibitor
MAPK	-	mitogen activated protein kinase
mTOR	-	mammalian target of Rapamycin
MuRF	-	Ubiquitin-Ligase
SCF	-	Skp1/Cul1/F-box complex (Ubiquitinligase)
NFAT	-	nuclear factor of activated Tcells
NGF	-	neuronal growth factor
p21 <sup>CIP1</sup>	-	CDK-interacting protein 1
p27	-	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	-	protein 53 (Tumorsuppressor)
PBMC	-	peripheral blood mononuclear cells
PDGF	-	platelet derived growth factor
PDK 1, 2	-	Phosphoinositol-dependent Kinase
PI3K	-	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP(3,4)P2	-	Phosphatidylinositol 3,4-Bisphosphat
PIP(4,5)P2	-	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP3	-	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat
PKA	-	Proteinkinase A
PKC	-	Proteinkinase C
PP2A	-	Protein phosphatase 2A
PTEN	-	phosphatase and tensin homolog
ROS	-	reactive oxygen species
S6-Kinase	-	ribosomale Kinase
S9A-GSK3 $\beta$	-	konstitutiv-aktive GSK3 $\beta$
Sca-1	-	Ataxin-1
SGK	-	serum/glucocorticoid regulated kinase
Sir2	-	silent mating type Information Regulation-2
siRNA	-	small interfering RNA
SIRT1	-	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1
DAF-2	-	<i>daf-2</i> -Gen kodiert den insulin-like Rezeptor in <i>C. elegans</i>
TCF	-	T-cell factor (Transkriptionsfaktor)
TM-FOXO3a	-	triple-mutant FOXO3a
TNF $\alpha$	-	tumor necrosis factor $\alpha$
TSC	-	tuberoses complex
VE-Cadherin	-	vascular endothelial-Cadherin
VEGF	-	vascular endothelial growth factor
VEGF-R2	-	vascular endothelial growth factor receptor-2
VSMC	-	vascular smooth muscle cells
Wnt	-	Wnt-Protein
WT-FOXO3a	-	Wildtyp-FOXO3a

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Mechanismus der Akt-Aktivierung nach Wachstumsfaktorstimulation	3
Abb. 2: Akt/GSK $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion	5
Abb. 3: Regulation der FOXO-Aktivität durch die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion	7
Abb. 4: Signaltransduktionswege der Hypertrophie	14
Abb. 5: PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion in Endothelzellen und Kardiomyozyten	133

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse-Aktivierung und Substrate</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Proteinkinase GSK3 $\beta$	3
1.1.2.	$\beta$ -Catenin	4
1.1.3.	FOXO-Transkriptionsfaktoren	6
1.2.	<b>Die Effekte der PI3K/Akt-Signaltransduktionsachse auf die Angiogenese</b>	<b>7</b>
1.2.1.	Studien zur Charakterisierung der downstream Substrate von PI3-Kinase/Akt-Signaling in Endothelzellen	9
1.3.	<b>Die Effekte des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges auf das Zellwachstum</b>	<b>11</b>
1.3.1.	Physiologisches/adaptives Wachstum	11
1.3.2.	Pathologisches/maladaptives Wachstum	13
1.3.3.	Regression der Hypertrophie	14
1.4.	<b>Koordination des Zellwachstums und der Angiogenese – Akt als Master-Regulator</b>	<b>15</b>
1.5.	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>EIGENE ARBEITEN</b>	<b>18</b>
2.1.	<b>Die Regulation der Angiogenese durch Glykogen-Synthase-Kinase 3<math>\beta</math></b> Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF Jr, Walsh K: Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3 beta. <i>J Biol Chem.</i> 2002 Nov 1;277(44):41888-96.	<b>18</b>
2.2.	<b>Die Glykogen-Synthase-Kinase 3<math>\beta</math>/<math>\beta</math>-Catenin-Signaltransduktionsachse fördert die Angiogenese über die Aktivierung von VEGF- Signaling</b> Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K: Glycogen-synthase kinase3 beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. <i>Circ Res.</i> 2005 Feb 18;96(3):308-18.	<b>29</b>
2.3.	<b>Der durch Akt regulierte Forkhead-Transkriptionsfaktor FOXO3a kontrolliert die endotheliale Zellviabilität durch die Modulation des Caspase-8-Inhibitors FLIP</b> Skurk C, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC, Walsh K: The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. <i>J Biol Chem.</i> 2004 Jan 9;279(2):1513-25.	<b>48</b>

<b>2.4.</b>	<b>Akt/FOXO3a-Signaling moduliert die endotheliale Stressantwort durch Regulation der Hitzeschockprotein 70 (HSP70)-Expression</b>	<b>63</b>
	Kim HS, Skurk C, Maatz H, Shiojima I, Ivashchenko Y, Yoon SW, Park YB, Walsh K: Akt/FOXO3a signaling modulates the endothelial stress response through regulation of heat shock protein 70 expression. <i>FASEB J.</i> 2005 Jun;19(8):1042-4.	
<b>2.5.</b>	<b>Der FOXO3a-Transkriptionsfaktor reguliert die Kardiomyozytengröße downstream von Akt</b>	<b>89</b>
	Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofler S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K: The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signalling. <i>J Biol Chem.</i> 2005 May 27;280(21):20814-23.	
<b>2.6.</b>	<b>Beschreibung eines kardialen Adiponectinsystems und seiner Deregulation in der dilatativen Kardiomyopathie</b>	<b>101</b>
	Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W: Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. <i>Eur Heart J.</i> 2008 May;29(9):1168-80.	
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>116</b>
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>131</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURANGABEN</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>150</b>

## 1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen und ihrer Liganden als bedeutende Mediatoren des Zellwachstums und der Gefäßentwicklung wurden umfangreiche Fortschritte in der Aufklärung der Prozesse der Hypertrophie und Angiogenese während der physiologischen postnatalen Entwicklung bzw. im Rahmen von Reparaturvorgängen nach Gewebeschädigung erzielt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Rolle der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse und deren downstream Substrate bei diesen Prozessen, welche durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert wird und die Gefäßhomöostase sowie das physiologische Wachstum steuert. Diese Daten sind insofern von Bedeutung, da in klinischen Studien verschiedene angiogene Faktoren in Hinsicht auf ihr Vermögen, eine Neovaskularisation in ischämischen Geweben zu induzieren bzw. Substanzen, die die Angiogenese inhibieren, um das Tumorwachstum zu begrenzen, evaluiert werden. Des Weiteren besteht ein „cross-talk“ zwischen Blutgefäßsystem und Kardiomyozyten bei der Entstehung einer Hypertrophie, das maßgeblich in der Pathogenese einer mit hoher Morbilität und Mortalität assoziierten Herzinsuffizienz beteiligt ist. In diesem Zusammenhang kommt der Aufklärung der molekularen Signaltransduktionsmechanismen der Angiogenese und der Hypertrophie eine steigende Bedeutung zu und bildet den Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.1. Die Wachstumsfaktor-PI3K-Akt-Signaltransduktionsachse-Aktivierung und Substrate

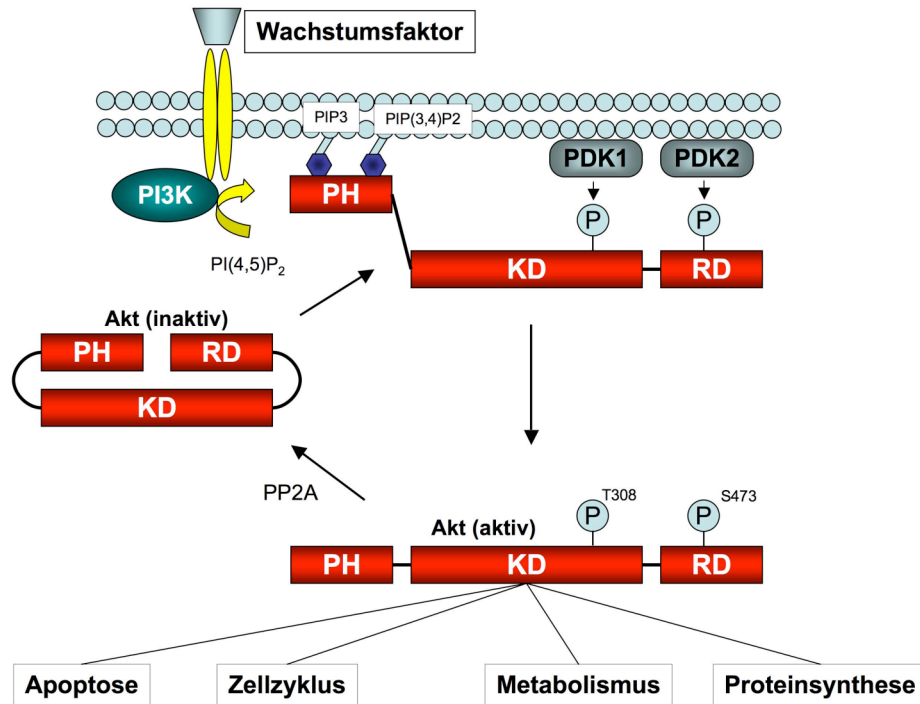
Die Proteinkinase PKB/Akt wurde initial als zelluläres Protein mit struktureller Verwandtschaft zum Onkogenprodukt des murinen AKT8-Retrovirus identifiziert [7, 173]. Dasselbe Genprodukt wurde als eine Proteinkinase mit Homologie zur Proteinkinase A und C isoliert und als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet. Das Säugetiergenom umfasst drei Akt-Gene, Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  und Akt3/PKB $\gamma$  [32] mit teilweiser funktioneller Redundanz. Die Akt (auch Proteinkinase B [PKB])-Kinasen sind evolutionär hoch konserviert. Sie weisen eine aminoternale Region homolog der Pleckstrin-Domäne vieler anderer Signalmoleküle, eine zentrale Kinase-Domäne sowie eine carboxyterminale regulatorische Domäne auf (48). Nach Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IGF, NGF, PDGF und Insulin, erfolgt über Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) (48). PI3K phosphoryliert Inositol-Lipide (Bildung von Phosphatidylinositol-3, -4, -5-Phosphat [PIP<sub>3</sub>]), welche als second Messenger durch Anbindung an die Pleckstrin-Domäne von Akt das Protein zur Plasmamembran

rekrutieren (Abb. 1). In einem zweiten Schritt erfolgt die Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung an einem Serin-473 und Threonin-308 durch die Phosphoinositol-abhängigen Kinasen 1 und 2 (PDK1, PDK2) [44, 70]. Vollständig aktiviertes Akt kann sich nun von der Membran lösen und seine Substrate in verschiedenen zellulären Kompartimenten phosphorylieren. Die Inaktivierung von Akt erfolgt über eine Dephosphorylierung durch das Enzym Phosphatase 2A (PP2A)[3]. Die Akt-Phosphorylierung wird weiterhin über die Modulation der PIP<sub>3</sub>-Konzentration durch PTEN reguliert [103] (Abb. 4).

Downstream Substrate von Akt umfassen Proteine, welche die Zellviabilität steuern (Forkhead-Transkriptionsfaktoren, Bad, Caspase-9, IKK $\alpha$ ), den Zellzyklus regulieren (E2F, hTERT, p21) sowie den Glucosemetabolismus (GSK3, GLUT4) und die Proteinsynthese modulieren (mTOR, S6Kinase, 4E-BP1). Wie aus dieser Übersicht einiger downstream Substrate abgeleitet werden kann, vermitteln Akt-Signale diverse funktionelle Eigenschaften [44]. Eine gut charakterisierte Funktion von Akt besteht in seiner anti-apoptotischen Wirkung. Akt-Signale inhibieren eine durch Mangel an Wachstumsfaktoren, durch ROS oder Strahlung induzierte Apoptose in verschiedenen Zelltypen [55, 70, 86, 87]. Weiterhin phosphoryliert Akt ein Serin im pro-apoptotisch wirksamen Molekül Bad [33]. Phosphoryliertes Bad wird von seinen Zielproteinen freigesetzt und durch das 14-3-3 Protein im Zytoplasma sequestriert [204]. Akt-1 phosphoryliert auch andere apoptoseregulierende Proteine wie Caspase-9, was zur verminderten proteolytischen Aktivität des Enzyms führt [17]. Weiterhin induziert die Akt-Signaltransduktion eine Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und FLIP [55, 126]. Auch die Zellproliferation wird durch die Phosphorylierung der cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p27<sup>KIP</sup> [100] und p21<sup>CIP</sup> [210] von Akt beeinflusst. Desweiteren reguliert Akt die Nährstoffaufnahme und den Metabolismus in einer für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Weise. So stimuliert Akt den Glukosetransport und die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran nach Insulinstimulation [91, 184]. In einigen Zellsystemen reguliert Akt die Glykogensynthese durch eine insulinabhängige Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK3 [29] und fördert die Glycolyse [101]. Zusätzlich kontrolliert Akt das zelluläre Wachstum via Aktivierung von mTOR, S6-Kinase und 4E-BP1, welche über die Initiation der Translation und Ribosomen-Biogenese die Proteinsynthese aktivieren [59, 187].

Auf die Regulation und Funktion der in dieser Arbeit untersuchten downstream Effektoren der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion - GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin und Forkhead-Transkriptionsfaktoren - soll im weiteren genauer eingegangen werden.





**Abb.1: Mechanismus der Akt-Aktivierung nach Wachstumsfaktorstimulation**

Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF-1, VEGF und FGF-1 binden an spezifische Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Hierdurch wird die PI3-Kinase aktiviert. PI3K synthetisiert bestimmte Phospho-Inositol-Phosphate [PIP<sub>3</sub> und PI(3,4)P<sub>2</sub>] aus PI(4,5)P<sub>2</sub>. Die erhöhte Konzentration von PIP<sub>3</sub> führt zur Rekrutierung von Proteinkinase B/Akt an die Zellmembran über die Bindung an der Pleckstrin-homologen Domäne (PH). Membrangebundenes Akt kann nun durch Phosphorylierung an spezifischen Serinen und Threoninen im Bereich der Kinase-Domäne (KD) und der regulatorischen Domäne (RD) durch die Enzyme PDK-1 und PDK-2 aktiviert werden. Phosphoryliertes Akt löst sich von der Zellmembran und aktiviert seinerseits downstream Substrate durch Phosphorylierung in verschiedenen Zellkompartimenten. Die Inaktivierung von PKB/Akt erfolgt über Dephosphorylierung durch Phosphatasen (PP2A) (modifiziert nach Shiojima et al. [166]).

### 1.1.1. Proteinkinase GSK-3β

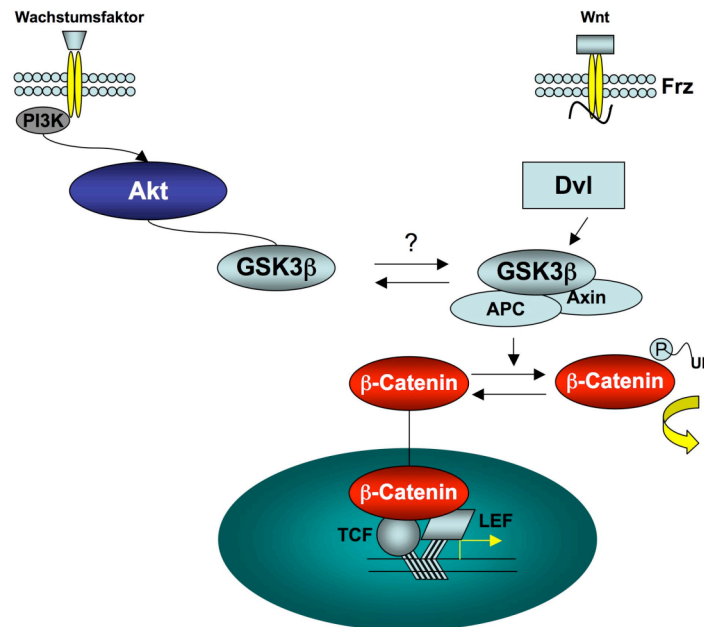
Ein downstream Substrat der PI3K/Akt- Signaltransduktion stellt das Enzym Glykogen-Synthase Kinase (GSK) dar. GSK ist eine hochkonservierte Serin/Threoninkinase, welche bedeutende biologische Prozesse wie den Metabolismus, die Differenzierung und die Proliferation in verschiedenen Geweben reguliert [25]. GSK3β phosphoryliert Proteine mit „clustered“ Serin/Threonin-Resten, welche durch vier Aminosäuren voneinander getrennt sind. Obwohl das Enzym initial als Kinase identifiziert wurde, welche die Glycogen-Synthase phosphoryliert, ergaben nachfolgende Studien einen breiteren Substratpool. So werden β-Catenin, tau, myelin basic protein, cyclin D1, GATA4, c-Jun, c-Myc, CREB, initiation factor eIF2B, HSF1 und p53 alle von GSK3β phosphoryliert [50]. Aufgrund dieser vielen Substrate spielt GSK3β eine zentrale Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung und der Proliferation adulter Gewebe sowie bei Erkrankungen

wie Morbus Alzheimer und Diabetes mellitus. Die Aktivität des Enzyms ist in Zellen unter Mitogenstimulation inhibiert. Die Proteinkinase B/Akt ist ein upstream Regulator des Enzyms, der die Aktivität als Antwort auf eine Wachstumsfaktorstimulation durch Phosphorylierung steuert. Die Phosphorylierung eines N-terminalen Serin-9-Restes durch Akt führt zur Autoinhibition von GSK3 $\beta$  [30] (Abb. 3). Die Aktivität von GSK3 $\beta$  kann auch durch Wnts während der embryonalen Entwicklung über einen Mechanismus, der von dem durch Wachstumsfaktorstimulation differiert, reguliert werden, um die biologische Bestimmung der Zelldifferenzierung („cell fate“) zu determinieren [43, 51]. Die Bindung von Wnt an frizzled-Rezeptoren resultiert in der Inaktivierung von GSK3 $\beta$ . Die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  führt zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und seiner Translokation in den Zellkern, wo es TCF-abhängige Gene aktiviert. Mitogene und Wnt-Signaltransduktion regulieren die GSK3 $\beta$ -Aktivität zelltypspezifisch differentiell, und dies kann zu unterschiedlichen Antworten führen [50, 56, 67, 186]. Die Rolle des Enzyms im kardiovaskulären System ist unvollständig untersucht. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass GSK3 $\beta$  in Kardiomyozyten eine Hypertrophie inhibiert [67, 112]. Es wurde auch nachgewiesen, dass GSK3 $\beta$  in glatten Muskelzellen eine Apoptose induziert [63]. Die Regulation sowie funktionelle Rolle von GSK3 $\beta$  in Endothelzellen wurde bisher nicht untersucht und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.2. $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin stellt ein downstream Substrat von GSK3 $\beta$  dar, welches Signale des Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges als auch der durch Wnts transduzierten Signale vermittelt. GSK3 $\beta$  phosphoryliert  $\beta$ -Catenin fortwährend an verschiedenen Serin- und Threoninresten, was zur Ubiquitinierung und subsequenten proteosomalen Abbau des Proteins führt [122] (Abb.3). Im canonischen Wnt-Signaltransduktionsweg erfolgt eine Aktivierung von Disheveled durch Wnt-Proteine. Aktiviertes Disheveled führt zur Dissoziation des sogenannten „Destruktionskomplexes“ (bestehend aus APC, Axin und GSK3 $\beta$ ) [138] und zur zytoplasmatischen Freisetzung von  $\beta$ -Catenin. Obwohl die Funktion von GSK3 $\beta$  unterschiedlich durch Mitogene und Wnts reguliert wird, kann Insulin die  $\beta$ -Catenin-Aktivität - zumindest in einigen Zelltypen - über eine Akt abhängige GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung direkt im Axin-Komplex regulieren [56]. Sowohl Wnt-, als auch Wachstumsfaktorstimulation führen somit zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin-Konzentration mit sequenzieller nukleärer Translokation des Proteins. Im Nukleus bindet  $\beta$ -Catenin an den lymphoid enhancer factor/T cell factor (LEF/TCF)-

Transkriptionsfaktor und aktiviert die spezifische Genexpression. Neben der Funktion als transkriptioneller Aktivator bindet  $\beta$ -Catenin auch an das zytosolische Ende von VE-Cadherin und fungiert als zytoskelettaler Bestandteil [141]. Sowohl Wnts als auch  $\beta$ -Catenin sind an der Gefäßentwicklung und dem Gefäßremodeling beteiligt [64, 78].



### Abb. 2: Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion

Die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion reguliert die GSK3 $\beta$ -Aktivität über eine inhibitorische Phosphorylierung am Serin-9. Die funktionelle Relevanz dieses Prozesses in Endothelzellen ist unbekannt. In einigen Zelltypen kann Akt GSK3 $\beta$  auch im APC-Axin-GSK3 $\beta$ - („Destruktions“-)Komplex phosphorylieren und somit die  $\beta$ -Catenin-Aktivität regulieren. In anderen Zelltypen führt die Phosphorylierung von Dishevelid (Dvl) zur Zerstörung des Komplexes mit Stabilisierung sowie nukleärer Translokation von  $\beta$ -Catenin mit Bindung an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren und spezifischer Genexpression. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin im APC-Axin-GSK3 $\beta$ -Komplex führt zur Phosphorylierung mit nachfolgender Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau des Proteins.

Endothelzellen exprimieren Wnt5a, Wnt7a, Wnt10b und verschiedene Frizzled-Rezeptoren [201]. Mutiertes Frizzled-4 beispielsweise inhibiert die retinale Angiogenese bei Patienten mit einer familiären exsudativen Vitreoretinopathie [135]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Endostatin, ein Angiogenese-Inhibitor, über den verstärkten proteosomalen Abbau von  $\beta$ -Catenin anti-angiogenetisch wirkt [65]. Außerdem ist die Apoptose von endothelialen Zellen bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) mit einer Herunterregulation der intrazellulären  $\beta$ -Cateninkonzentration assoziiert [151].  $\beta$ -Catenin wird durch den pro-angiogenen Wachstumsfaktor „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2) [73] und die E4-Region adenoviraler Vektoren, welche eine pro-angiogene Wirksamkeit aufweisen, stabilisiert [208]. Alle diese Studien weisen auf eine pro-angiogene Rolle von  $\beta$ -

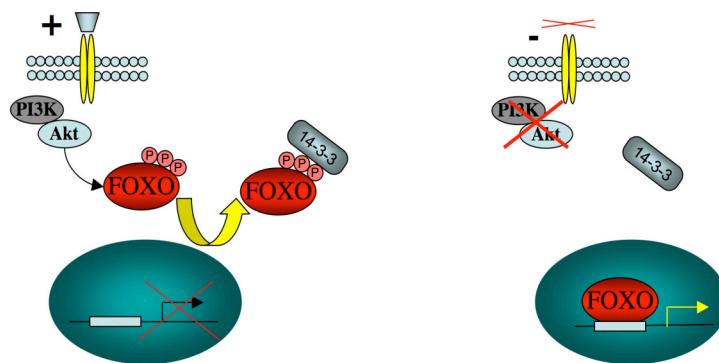
Catenin durch Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von LCF/TCF hin. Auch membrangebundenes (zytoskelettales  $\beta$ -Catenin) kann das vaskuläre „Patterning“ an Zell-Zell-Kontakten fördern [20]. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass der zytoplasmatische Pool von  $\beta$ -Catenin durch mitogenes Signaling über eine VEGF-VEGFR2-Interaktion mit Aktivierung von PI3-Kinase/Akt reguliert wird [19]. Somit können der zytoplasmatische als auch der nukleäre Pool von  $\beta$ -Catenin pro-angiogen wirken. Die Signalmechanismen downstream von  $\beta$ -Catenin, welche an der Angiogenese beteiligt sind, sind bisher nicht charakterisiert und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.3. FOXO-Transkriptionsfaktoren

Die FOXO-Unterfamilie der Forkhead-Transkriptionsfaktoren wird durch die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse reguliert. Diese Subfamilie ist durch eine sogenannte „Forkhead-Box“, einer aus 100 Aminosäuren bestehenden Domäne [84], gekennzeichnet und besteht aus FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX) und FOXO6. FOXO6 wird vorwiegend in einer spezifischen Region des Gehirns exprimiert. Die Proteinkinase B/Akt phosphoryliert FOXO an drei evolutionär konservierten Aminosäuren (zwei im Falle von FOXO6 [80]), was zum nukleären Export, der zytoplasmatischen Retention durch Bindung an 14-3-3-Proteine und zur Inhibition des transkriptionellen FOXO-Genprogramms führt. Die FOXO-Faktoren werden auch durch Phosphorylierung von der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase (SGK) [13] und der I $\kappa$ B-Kinase [74] reguliert. Ein weiterer, kürzlich identifizierter Regulationsmechanismus der FOXO-Aktivität stellt der Acetylierungsstatus der FOXO-Transkriptionsfaktoren dar. Die SIRT1-Deacetylase spielt eine bedeutende Rolle für die stressabhängige Regulation der FOXO-Transkriptionsfaktoren in Säugetierzellen [14, 114]. FOXO3a wird an mindestens fünf Lysin-Resten acetyliert. Vereinfacht beschrieben vermittelt die SIRT1-Deacetylase eine Stressadaptation und einen Zellzyklusarrest (und bedingt eine Langlebigkeit in niederen Organismen), während die Acetylierung von FOXO eine Apoptose induziert. Zusammengefasst kontrolliert die Phosphorylierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren deren nukleäre Translokation, ob allerdings FOXO im Zellkern Überleben oder Apoptose vermittelt, hängt von der Interaktion mit SIRT1 und dem Acetylierungsstatus des FOXO-Transkriptionsfaktors ab.

Die von Akt regulierten FOXO-Transkriptionsfaktoren kontrollieren diverse biologische Funktionen wie die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) [92, 120], die Induktion eines Zellzyklusarrests [190] und eines apoptotischen

Zelltods [12, 40], die DNA-Reparatur [190] sowie die Insulinresistenz [116, 118]. Die Rolle von FOXO-Transkriptionsfaktoren in der kardiovaskulären Biologie ist noch nicht untersucht. Für FOXO3a konnte gezeigt werden, dass es Apoptose in neuronalen Zellen und Fibroblasten durch die von Fas-Ligand vermittelte Aktivierung des extrinsischen „Death-Rezeptor“-Signalwegs induziert [12]. Dijkers et al. demonstrierten, dass der intrinsische mitochondriale Signalweg der Apoptose in hämatopoetischen Zellen nach Aktivierung von FOXO3a einen Zelltod verursacht [40]. In der vorliegenden Arbeit werden die Regulation und die funktionelle Rolle der FOXO-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen und kardialen Myozyten erstmals untersucht.



**Abb. 3: Regulation der FOXO-Aktivität durch die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion**

Die mitogene Stimulation mit Wachstumsfaktoren führt über PI3K zur Aktivierung von Akt. Akt phosphoryliert FOXO an drei konservierten Phosphorylierungsstellen. Diese regulatorische Phosphorylierung bedingt eine zytosolische Akkumulation durch die Bindung an 14-3-3-Proteine (rechts). Unter Bedingungen des Wachstumsfaktorentzugs ist Akt deaktiviert. Die fehlende Phosphorylierung von FOXO resultiert in einer nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors mit spezifischer Genexpression (links). Eine zweite Regulationsebene stellt die SIRT-abhängige Acetylierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren dar (nicht dargestellt). Diese führt zur Veränderung der transkriptionellen Aktivität von FOXO.

**1. 2. Die Effekte der PI3K/Akt-Signaltransduktionsachse auf die Angiogenese**

Die Angiogenese, der Prozess der Bildung neuer Kapillaren, stellt einen essentiellen Mechanismus für das postnatale physiologische Wachstum wie auch für das vaskuläre Remodeling und die Tumorgenese dar. Die Angiogenese wird durch pro-angiogene Faktoren wie VEGF und FGF getriggert. Diese angiogenen Faktoren induzieren die Aktivierung verschiedener Zellen über die Bindung an Tyrosinkinase-Rezeptoren. Während die Migration und Proliferation von Endothelzellen als „major angiogenic responses“ bezeichnet werden können, stellt die Angiogenese einen systemischen Prozess dar. Sie umfasst weitere Prozesse wie die vaskuläre Permeabilität und Hämostase, die Aktivierung von Elementen des

Immunsystems, die Rekrutierung von Progenitorzellen des Knochenmarks, die Aktivierung von Proteasen sowie die Rekrutierung und die Proliferation von perivaskulären Zellen während der Gefäßreifung. In Endothelzellen wird eine Vielzahl der durch Wachstumsfaktoren induzierten angiogenen Prozesse durch den PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt. VEGF, IGF-1, Insulin, Östrogen, Angiopoeitin-1 und „shear stress“ führen über die PI3-Kinase zur Phosphorylierung von Akt. Diese Aktivierung ist abhängig von der Zell-Matrix-Anhaftung. Das Lösen der Zell-Matrix-Interaktionen führt zur Apoptose der Endothelzellen, welche als Anoikis bezeichnet wird und durch einen konstitutiv-aktiven Gentransfer von Akt inhibiert werden kann [55]. Die Bindung an der Matrix wird durch verschiedene Integrine vermittelt, die über die „focal adhesion kinase“ (FAK) und die „integrin-linked-kinase“ (ILK) PI3-Kinase-abhängig Akt aktivieren („outside-in-signaling“). Über die downstream Substrate von PKB/Akt im Kontext der Zellviabilität ist bisher wenig bekannt. Flice-inhibitory protein (FLIP) und Survivin wurden als Kandidatenproteine identifiziert [178]. Eine Kombination dieser und anderer unbekannter Substrate könnte die Viabilität im Kontext von pro- und anti-angiogenen Stimuli regulieren. Die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion moduliert neben der Zellviabilität weitere essentielle pro-angiogene Funktionen wie Migration, Proliferation, Differenzierung, und Metabolismus der Endothelzellen [166]. Unter den drei Isoformen von Akt ist Akt-1 die prädominant exprimierte Form in Endothelzellen. Die zellulären Antworten nach Akt-Aktivierung werden durch Phosphorylierung der verschiedenen downstream Substrate vermittelt. So reguliert Akt die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung am Serin-1177, was zur verstärkten NO-Synthese und Vasodilatation führt [42].

Die Migration von Endothelzellen und die Bildung kapillärer Strukturen stellt einen essentiellen Faktor für die Angiogenese *in vivo* dar. VEGF verstärkt die Migration und Kapillarbildung von Endothelzellen in Abhängigkeit der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion [41]. Im Gegensatz dazu vermindert oxLDL die Migration gegen VEGF durch eine Dephosphorylierung von Akt [21].

Zusammenfassend verdeutlichen diese Daten die vitale Rolle der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse bei der Regulation angiogener Endothelzellfunktionen und bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität *in vitro* und *in vivo*. Die Identifizierung weiterer downstream Substrate ist im Sinne einer Verbesserung des Verständnisses des angiogenen Prozesses als auch in Hinsicht auf eine zukünftige therapeutische Anwendung in ischämischen Geweben oder bei Tumorerkrankungen von großem Interesse.

### 1.2.1. Studien zur Charakterisierung der downstream Substrate von PI3-Kinase/Akt-Signaling in Endothelzellen

GSK3 $\beta$  wird in einigen Zelltypen durch die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse reguliert. Über die funktionellen Effekte dieses Enzyms im kardiovaskulären System ist relativ wenig bekannt. Zwei Studien konnten zeigen, dass GSK3 $\beta$  die Hypertrophie von kardialen Myozyten inhibiert, ein Effekt, der durch den nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) oder den Transkriptionsfaktor GATA-4 vermittelt wird [67, 112]. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass GSK3 $\beta$  in kultivierten glatten Muskelzellen (VSMC) eine Apoptose induziert [63]. Um die Funktion von GSK3 $\beta$  in der Angiogenese zu untersuchen, wurden die Regulation des Enzyms in Endothelzellen und die Effekte auf die Migration, NO-Synthese, das Überleben der Endothelzellen und deren angiogene Eigenschaften charakterisiert [89] (siehe 2.1).

Um diese Studien zu vertiefen, wurden die Effekte von  $\beta$ -Catenin untersucht.  $\beta$ -Catenin ist in der Zelle als Bestandteil des Zytoskeletts membranös gebunden [141] und liegt gleichzeitig zytosolisch in einem Multiproteinkomplex bestehend aus Axin, APC und GSK3 $\beta$  vor [25]. Der zytoskelettale Anteil ist an der Bildung von Gefäßstrukturen beteiligt [20]. Durch die PI3-Kinase/Akt/GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion wird die frei verfügbare Menge an  $\beta$ -Catenin über Phosphorylierung mit nachfolgender Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau in verschiedenen Zellen reguliert [56]. Freies  $\beta$ -Catenin induziert nach Translokation in den Nucleus die TCF/LEF-Genexpression. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein  $\beta$ -Catenin regulierter, durch TCF gesteuerter Promoter in Gebieten embryonaler Neoangiogenese aktiviert wird, was für eine Beteiligung von nuklearem  $\beta$ -Catenin als transkriptioneller Aktivator in der Angiogenese spricht [104]. Die downstream liegenden Signaltransduktionsmechanismen und funktionellen Effekte von  $\beta$ -Catenin in Endothelzellen wurden in einer hier dargestellten Studie charakterisiert [170] (siehe 2.2).

Ein weiteres downstream Substrat von Akt ist der Forkhead-Transkriptionsfaktor FOXO3a. Der apoptotische Zelltod vaskulärer Zellen ist ein prominentes Merkmal des Remodeling-Prozesses der Blutgefäße während der normalen Entwicklung sowie bei fibroproliferativen Erkrankungen [194]. Fas Ligand ist ein Typ II-Membranprotein, welches einen apoptotischen Zelltod in Fas (CD95/APO-1) exprimierenden Zellen induziert [115]. Der Fas-Rezeptor ist ein

Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, welcher ubiquitär in den meisten Zelltypen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird Fas-Ligand gewebespezifischer auf der Oberfläche von Immunzellen und vaskulärer Zellen exprimiert [149, 177]. Die Bindung von trimärem Fas-L induziert ein „Clustering“ von Fas-Rezeptoren mit Oligomerisierung von Caspase-8 (Flice). Die Caspase-8-Oligomerisierung führt zur proteolytischen Selbstaktivierung des Enzyms, die von der Aktivierung anderer Caspasen begleitet wird. Die Empfänglichkeit von vaskulären Muskelzellen für einen durch Fas induzierten Zelltod wurde bereits nachgewiesen [145, 146]. Im Gegensatz zu VSMC weisen Endothelzellen (EC) eine Resistenz gegen eine durch Fas induzierte Apoptose auf, die selbst nach durch Interferon induzierter Hochregulation von Fas bestehen bleibt [146, 149]. Der Unterschied in der Sensibilität von vaskulären Zellen für eine durch Fas induzierte Apoptose ist zumindest teilweise auf die Expression von FLIP (FLICE-like inhibitory protein) zurückzuführen. FLIP-Isoformen sind in EC hoch exprimiert, agieren als dominant-negative Inhibitoren der Caspase-8-Funktion und könnten die durch Fas induzierte Apoptose inhibieren [77]. So kann oxLDL über eine Herunterregulation von endothelalem FLIP EC für einen durch Fas vermittelten Zelltod sensibilisieren [148, 178]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die FLIP-Expression nach Ballonangioplastie in Ratten-VSMC herunterreguliert wird. Es ist auch bekannt, dass aus vaskulären Plaques isolierte VSMC geringe intrazelluläre FLIP-Konzentrationen aufweisen, was für eine Rolle von FLIP beim VSMC-Umsatz in diesen Läsionen spricht [76]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die PI3Kinase/Akt-Signaltransduktion einen bedeutenden Modulator der durch Fas vermittelten Apoptose aufgrund der Regulation der FLIP-Expression in Endothel- und Tumorzellen darstellt [126, 178]. Die FLIP-Expression in Tumorzellen dient wahrscheinlich dem Schutz vor Apoptose, um dem Angriff von Immunzellen zu entgehen, da diese Zellen konstitutiv FasL exprimieren [62]. Trotz der potentiellen Bedeutung der durch Akt vermittelten FLIP-Regulation in der Angiogenese und der Tumorgenese ist bisher nichts über die downstream Effektoren, welche die FLIP-Expression kontrollieren, bekannt. Diese wurden in einer weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Studie untersucht [169] (siehe 2.3.).

Um zusätzliche durch Akt regulierte Substrate in Endothelzellen zu identifizieren, die an der angiogenen Antwort beteiligt sind, wurde eine Microarray-Studie initiiert. Hierbei wurde HSP70, ein Protein, welches einen toxischen Zellschaden durch missgefaltete Proteine inhibiert und die Oligomerisierung des apoptotic activating factor-1 (APAF-1) mit assoziierter Caspase-9-Aktivierung im intrinsischen Weg der Apoptose verhindert [5, 113, 142], als Akt abhängiges Protein



identifiziert. Um die Signaltransduktionsmechanismen und die Effekte der HSP70-Regulation in Endothelzellen zu untersuchen, wurde eine Studie initiiert [88], welche HSP70 als ein weiteres durch FOXO reguliertes und an der Stress-Antwort von Endothelzellen beteiligtes Protein downstream der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion in Endothelzellen charakterisierte und im weiteren dargestellt wird (siehe 2.4).

### **1.3. Die Effekte des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges auf das Zellwachstum**

Wie auch in primitiven Tieren ist das Wachstum in Säugetieren mit der Suppression der Apoptose und der zellulären Vergrößerung (Hypertrophie) und/oder der zellulären Proliferation (Hyperplasie) verbunden. Allerdings muss das Organwachstum auch mit der Rekrutierung von Blutgefäßen (Angiogenese) und der Produktion von Fett- und Kohlenhydratspeichern koordiniert werden, Prozesse, welche teilweise unter der Kontrolle des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges stehen. Adaptives Wachstum erfolgt im Rahmen des physiologischen Wachstums der Organe oder als Antwort auf physiologische Reize wie beispielsweise körperliches Training [153]. Im Gegensatz dazu entwickelt sich eine maladaptive oder pathologische Hypertrophie aufgrund einer verstärkten hämodynamischen Belastung wie beispielsweise bei der Aortenstenose. Im Rahmen dieses Prozesses reagiert der Organismus mit einer Hypertrophie als initialem funktionalem- allerdings nicht essentiellen- Kompensationsmechanismus, der im weiteren Verlauf der Erkrankung zum ventrikulären Remodeling und zur kardialen Dilatation mit assoziierter Dekompensation führt [48, 71, 144]. Von den oben genannten Formen kann eine dritte, durch genetische Mutationen der Sarkomer- und zytoskelettalen Proteine sowie von Effektoren der Calciumhomöostase bedingte Form der kardialen Hypertrophie unterschieden werden [157]. Die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion ist sowohl an der physiologischen als auch an der pathologischen Hypertrophie beteiligt und soll - da im weiteren Gegenstand der Untersuchungen- kurz dargestellt werden.

#### **1.3.1. Physiologisches/adaptives Wachstum**

Das physiologische kardiale Wachstum oder die adaptive Hypertrophie nach körperlichem Training ist durch eine normale oder verbesserte kontraktile Funktion der Herzmuskelzellen sowie eine normale Organisation der kardialen Struktur charakterisiert [52]. Insulin und IGF-1 wurden als Regulatoren des Organwachstums während der Entwicklung und der physiologischen Adaptation des Wachstums auf

entsprechende Reize identifiziert [175]. Sowohl IGF-Rezeptor 1 (IGF-R1)- als auch Insulin-Rezeptor-Nullmäuse zeigen eine generelle Wachstumsinhibition und verminderte Organgröße [6, 47]. Die Bindung dieser Wachstumsfaktoren an ihre spezifischen Rezeptoren der Zellmembran führt zur Aktivierung der PI3-Kinase. Die Überexpression von IGF-R1 resultiert in einer physiologischen myokardialen Hypertrophie verbunden mit verbesserter Kontraktion [108]. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigt der Ernährungsstatus eine sehr enge Korrelation zur Herzgröße: die Herzgröße ist in Patienten mit Anorexia nervosa reduziert [34], während Patienten mit Adipositas unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie beispielsweise Hypertonus oder Diabetes mellitus eine Zunahme der Herzgröße aufweisen [28]. Konsistent mit diesen Daten ist die kardiale Akt-Aktivität während schnellen postnatalen Wachstums hochreguliert. Im Gegensatz ist diese nach nächtlichem Fasten vermindert ist [167]. Diese Daten zeigen, dass die Signaltransduktion durch Insulin, als das den externen Ernährungsstatus reflektierende Hormon und durch IGF-1, als das die interne Aktivität der hypothalamisch-hypophysären Achse reflektierende Hormon, auf der Ebene von Akt konvergieren und das physiologische Organwachstum regulieren.

Die PI3-Kinase $\alpha$  wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Das Enzym besteht aus einer p85 regulatorischen und einer p110 $\alpha$  katalytischen Untereinheit. In Übereinstimmung mit den oben genannten Daten führt die Überexpression einer dominant-negativen Form der p110 $\alpha$ -Untereinheit zur Inhibition der myokardialen Hypertrophie nach Ausdauertraining bzw. des physiologischen Wachstums und hat keinen Einfluss auf die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie nach Konstriktion („Banding“) der Aorta [109], während das „knockdown“ der p85-Untereinheit die postnatale Hypertrophie und die Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps nach körperlichem Training inhibiert [102]. Umgekehrt induziert die Überexpression der p100 $\alpha$ -Untereinheit eine physiologische Hypertrophie mit erhaltener Pumpfunktion [163]. Im Gegensatz zum Phänotyp der p110 $\alpha$ -transgenen Tiere weisen transgene Mäuse mit einer Überexpression der p110 $\gamma$ -Untereinheit der PI3K $\gamma$  eine pathologischen Hypertrophie mit kardialer Dysfunktion nach Konstriktion der Aorta auf [129].

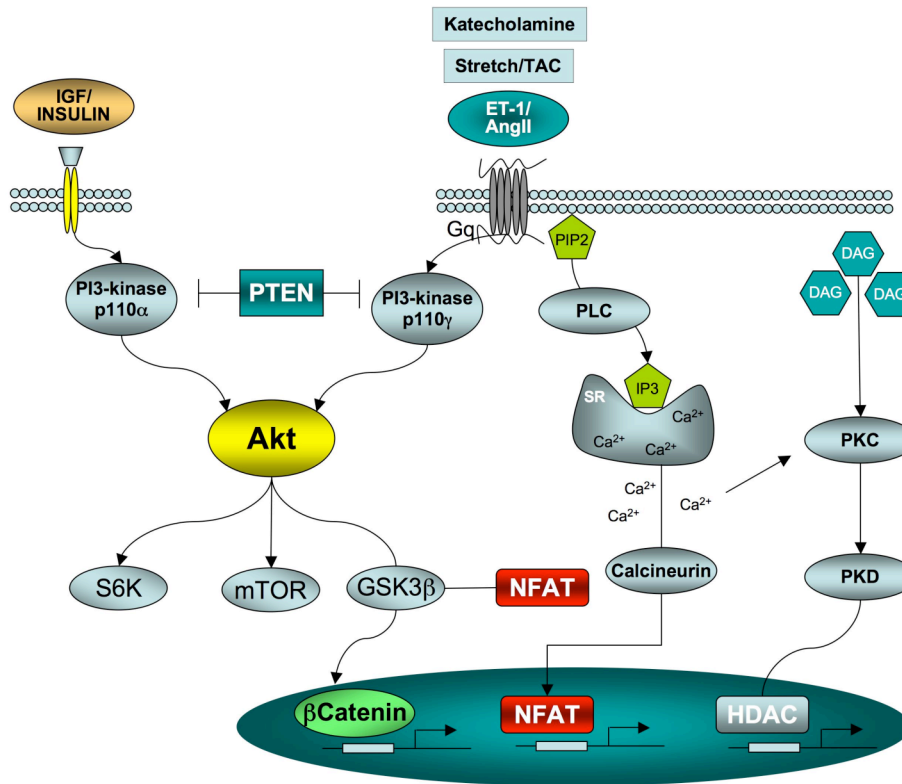
Eine Aktivierung der PI3-Kinase führt über die Generierung von Phosphoinositolphosphaten (PIPs) zur Rekrutierung von Akt an die Zellmembran durch Bindung der Plekstrin-Domäne mit konsekutiver Phosphorylierung und Aktivierung von PKB/Akt (Abb. 1). Akt-1 und Akt-2 werden im Herzen exprimiert. Der Einfluss von Akt auf das Zellwachstum konnte in Überexpressionsstudien

nachgewiesen werden. Die Überexpression von konstitutiv-aktivem Akt bedingt eine Hypertrophie des Herzmuskels mit oder ohne kardiale Dekompensation in Abhängigkeit von der Dauer und dem Grad der Überexpression [165]. In Übereinstimmung mit der generellen trophischen Funktion von Akt weisen Mäuse mit konventionellem knockout für Akt-1 ein ca. 20%ig geringeres Körpergewicht als auch eine proportionale Reduktion der Grösse aller somatischen Gewebe inklusive des Herzens auf [23]. Im Gegensatz hierzu zeigen Mäuse mit Akt-2 knockout nur eine geringe Reduktion der Organgröße. Akt-1/Akt-2 Doppel-Nullmäuse leiden unter einer bedeutenden Wachstumsretardierung und einem auffälligen Defekt der Zellproliferation. Zusammenfassend unterstützen die Daten aus Akt-Nullmäusen die kritische Rolle, insbesondere von Akt-1, beim normalen Wachstum und der physiologischen Hypertrophie des Herzens.

### 1.3.2. Pathologisches/maladaptives Wachstum

Determinanten der pathologischen Hypertrophie stellen kontraktile Dysfunktion, die Re-Expression eines fetalen Genprogramms (atrialess natriuretisches Peptid [ANP], schwere Kette des  $\beta$ -Myosins) und die Reorganisation der Myofibrillen dar [52]. Neben der Aktivierung von Tyrosin-Rezeptorkinasen (Insulin, IGF-1) via PI3-Kinase $\alpha$  kann die Phosphorylierung von Akt auch über die Aktivierung von G-Proteinen (Neurohormone wie Angiotensin II, Endothelin und Adrenalin) via PI3-Kinase $\gamma$  erfolgen [136]. In diesem Prozess ist die p100 $\gamma$  Untereinheit der PI3-Kinase $\gamma$  involviert. Diese unterscheidet sich strukturell von der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K $\alpha$ . Auch der Aktivierungsmodus ist verschieden [124]. PI3-Kinase $\gamma$  wird durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des aktivierten G-Proteins an das Sarkolemm transloziert, wo das Enzym nun Zugang zu Membraninositiden bekommt. Im Gegensatz zu durch Tyrosinrezeptor-Phosphatasen aktivierter PI3-Kinase $\alpha$ , welche die physiologische und durch Training induzierte, nicht aber die maladaptive Hypertrophie steuert [109], ist die durch G-Protein aktivierte PI3-Kinase $\gamma$  an der Entstehung einer pathologischen oder stressinduzierten, aber nicht an einer physiologischen Hypertrophie, beteiligt [27, 129]. Somit stellt die PKB/Akt ein Bindeglied konvergierender Signaltransduktionswege beider Hypertrophieformen durch die Aktivierung seiner downstream Substrate dar (Abb. 4). Neben der PI3-Kinase $\gamma$  sind die Enzyme Calcineurin und Proteinkinase C an der Signaltransduktion downstream von G-Proteinen beteiligt. Biomechanischer Stress und neurohumorale Faktoren aktivieren über das G-Protein Gq/11 die Phospholipase C (PLC $\beta$ ), welche durch die Synthese von Inositoltriphosphaten (IP $_3$ ) über einen Anstieg von zytosolischem Ca $^{2+}$  die

Synthese von Diacylglycerol (DAG) induziert. Erhöhtes zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert die Proteinphosphatase Calcineurin und ihr downstream Substrat NFAT, einen Transkriptionsfaktor, der nach Dephosphorylierung eine differentielle hypertrophe Genexpression initiiert. Die erhöhte Konzentration von DAG führt zur Aktivierung verschiedener Isoformen der Proteinkinase C ( $\text{PKC}\alpha, \beta, \delta, \epsilon$ ) (Abb. 4).



**Abb. 4: Signaltransduktionswege der Hypertrophie**

1. Adaptive/physiologische Hypertrophie: Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und Insulin führen über PI3-Kinase $\alpha$  zur Akt-Phosphorylierung. Aktiviertes Akt phosphoryliert downstream Substrate wie S6Kinase und mTOR, die ihrerseits die Transkription und Translation verschiedener Proteine erhöhen. GSK3 $\beta$  wird durch die Phosphorylierung inaktiviert. Hierdurch kommt es a) zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und b) zur Translokation von NFAT mit entsprechender Aktivierung der Transkription eines hypertrophen Genprogramms.

2. Maladaptive/pathologische Hypertrophie: Verschiedene Stimuli führen zu einer Aktivierung von G-Proteinen. Über die PI3-Kinase $\gamma$  erfolgt die Aktivierung von Akt und seiner downstream-Substrate. Zytokine und Stressoren aktivieren Phospholipase C, welche die Synthese von Inositoltriphosphaten (IP3) mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und Calcineurin-abhängiger Dephosphorylierung von NFAT vermittelt. Die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert Phosphokinase C (PKC) und Phosphokinase D (PKD), die Histone-Deacetylasen (HDAC) via Phosphorylierung inaktiviert.

### 1.3.3. Regression der Hypertrophie

Relativ wenig ist über die Mechanismen, welche die hypertrophe Antwort inhibieren, bekannt. Das Herz nimmt in der Größe aufgrund einer Vielzahl von Umwelteinflüssen wie beispielsweise einer Hungerphase (kalorische Restriktion) oder einer Druckentlastung ab. Zum Beispiel weisen Patienten mit einer Anorexia

nervosa eine kleine Herzgröße auf [34] und eine Gewichtsreduktion in Patienten mit einer Adipositas wird von einer Reduktion der Herzgröße- unabhängig von Veränderungen des Blutdrucks oder hämodynamischer Parameter- begleitet [72]. Die Herzgröße verkleinert sich auch unter der Therapie mit left ventricular assist devices (LVAD) [207] und durch Reduktion einer Volumen-oder Druckbelastung des linken Ventrikels [127, 189]. Eine substantielle Abnahme der Herzgröße wird auch nach heterotoper Herztransplantation beobachtet [36, 133]. Die FOXO-Transkriptionsfaktoren sind downstream Substrate von Akt und induzieren im Skelettmuskel eine Atrophie [143, 174]. Die Expression, Regulation und biologische Funktion dieser Transkriptionsfaktoren in Herzmuskelzellen, welche in diesem Zusammenhang von grossem Interesse sind, wurden bisher nicht untersucht und in einer hier dargestellten Studie charakterisiert [168] (siehe 2.5).

FOXO-Transkriptionsfaktoren induzieren die Adiponectin-Synthese [117]. Adiponectin wurde initial als spezifisch im Fettgewebe synthetisiertes Zytokin mit bedeutenden kardiovaskulären Effekten beschrieben. Adiponectin inhibiert das vaskuläre und kardiale Remodeling [161] nach Schädigung, erhöht die Insulinsensitivität und besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften [188]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten Adiponectin exprimieren [35, 172]. Die pro-angiogene Rolle von APN über eine Aktivierung von AMPK und Akt in Endothelzellen ist gut untersucht [123]. Im Rahmen einer hier aufgeführten klinischen Studie sollten die Adiponectin-Expression und die biologischen Effekte des Zytokins, insbesondere auf die Zellviabilität von Kardiomyozyten, bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie charakterisiert werden [172] (siehe 2.6).

#### **1.4. Koordination des Zellwachstums und der Angiogenese – Akt als Master-Regulator**

Die Proteinkinase B/Akt ist schon frühzeitig als Bestandteil des Insulin/IGF-1-Signaltransduktionsweges mit der Steuerung des Zell-und Körperwachstums als Antwort auf eine gesteigerte Ernährung/Kalorienzufuhr in Verbindung gebracht worden. Sowohl Drosophila als auch Vertebrata weisen eine Wachstumsretardierung nach Disruption einzelner Elemente des Signaltransduktionswegs auf [22, 23, 192]. Das Organwachstum in höheren Lebewesen ist eng mit dem Gefäßwachstum gekoppelt. Die duale Rolle des Wachstumsfaktor/Akt-Signaltransduktionswegs beim Zellwachstum als auch in der Angiogenese legt nahe, dass beide Prozesse durch den selben intrazellulären Signaltransduktionsweg gesteuert werden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Ausdauertraining, welches einen bekannten Faktor für

die Ausbildung einer physiologischen Hypertrophie darstellt, sowohl die VEGF-Expression als auch die Kapillardichte im Skelettmuskel erhöht und dass dieser Prozess durch die Gabe eines neutralisierenden VEGF-Antikörpers inhibiert werden kann [2]. Desweiteren bedingt die Deletion von VEGF im Herzmuskel eine Verringerung der Wanddicke und der Kapillardichte [60]. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass Akt direkt an der Hochregulation von VEGF bei der Hypertrophie beteiligt ist und somit die Rekrutierung des Gefäßwachstums steuert [179]. Zusammengenommen implizieren diese Daten, dass die Akt-Signaltransduktion im Skelettmuskel und in Endothelzellen das Wachstum des Muskelgewebes koordiniert und reguliert. Die Daten des Skelettmuskelwachstums können aufgrund neuerer Studien auch auf den Herzmuskel übertragen werden. Hier zeigte sich, dass eine kurzzeitige Aktivierung von Akt in Akt-1 transgenen Mäusen eine physiologische Hypertrophie mit erhaltener Kapillardichte induziert, welche auf eine Gefäßneubildung zurückgeführt werden kann, da die Akt-Aktivierung mit einer ca. 80%igen Zunahme der Organgrösse verbunden ist [165]. Desweiteren führt die Inhibition der Angiogenese mittels VEGF Decoy-Rezeptor während einer Akt-Induktion zur myokardialen Dysfunktion. Die Inhibition der VEGF-Signaltransduktion in einem Modell des Bandings der Aorta resultiert in einer Progredienz der Herzinsuffizienz [79]. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Akt-Signaltransduktion das Gleichgewicht des kardialen Wachstums und der kardialen Angiogenese reguliert und dass eine Inhibition der Angiogenese unter den Bedingungen einer Akt-Aktivierung zur Entstehung einer pathologischen Hypertrophie und Herzinsuffizienz führt. Die Beeinflussung der für das „cross-talk“ der Zellen verantwortlichen Signaltransduktionswege und derer Effektoren (wie beispielsweise GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin, Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Adiponectin) könnte daher neue therapeutische Strategien zur Therapie von strukturellen Herzerkrankungen definieren.

### 1.5. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Charakterisierung der biologischen Funktion des Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/PKB/Akt-Signaltransduktionsweges und der Aufklärung der molekularen Mechanismen seiner Effektoren in Bezug auf die Zellviabilität von Endothelzellen und Kardiomyozyten. Insbesondere soll die funktionelle Relevanz im Hinblick auf das Blutgefäßwachstum (Angiogenese) sowie die Effekte auf das Zellwachstum kardialer Myozyten („hypertrophes Remodeling“) untersucht werden.

Hierzu werden:

1. die Funktion und Regulation von GSK3 $\beta$  in Endothelzellen mittels adenoviralem Gentransfer mutanter Proteine des Enzyms in Hinblick auf Parameter wie Zellviabilität, Migration, NO-Synthese und Differenzierung/Angiogenese charakterisiert.
2. die unter 1) gewonnenen Ergebnisse mit Hilfe von Studien über die Effekte von  $\beta$ -Catenin, einem downstream Substrat von GSK3 $\beta$ , auf die Ausbildung pro-angiogener Eigenschaften von Endothelzellen und deren molekulare Ursachen untersucht.
3. die Expression und Regulation von FOXO3a, einem Akt-Substrat, in Endothelzellen determiniert und dessen funktionelle Effekte auf die Zellviabilität und deren molekulare Mechanismen aufgeklärt.
4. die Expression und Regulation von Forkhead-Transkriptionsfaktoren und deren biologische Funktion bei der Inhibition der hypertrophen Antwort in Kardiomyozyten charakterisiert sowie deren molekularbiologischen Ursachen beschrieben.
5. die Effekte von Adiponectin, einem durch Forkhead-Transkriptionsfaktoren freigesetzten Zytokin, auf die Aktivierung myokardialer Signaltransduktionswege sowie auf die myokardiale Akt-abhängige Apoptose untersucht.

Diese Studien werden das Verständnis der biologischen Prozesse Angiogenese und Hypertrophie durch Aufklärung der molekularen Mechanismen vertiefen und somit eine Grundlage für die zukünftige therapeutische Beeinflussung dieser Mechanismen im Rahmen von Erkrankungen darstellen.

## 2. EIGENE ARBEITEN

### 2.1. Die Regulation der Angiogenese durch Glykogen-Synthase-3 $\beta$

Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF Jr, Walsh K: Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41888-96.

Das Enzym Glykogen-Synthase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) spielt eine bedeutende Rolle im Metabolismus, der Embryonalentwicklung und der Tumorgenese der Gewebe. In dieser Studie wurde die Rolle der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion in der vaskulären Biologie durch die Charakterisierung seiner Funktion in endothelialen Zellen untersucht. Die regulatorische Phosphorylierung des Enzyms in Endothelzellen steht unter der Kontrolle von Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K)-, Mitogen-aktiverter Proteinkinase (MAPK)-, und von Proteinkinase A (PKA)- abhängigen Signaltransduktionswegen. Die Transduktion einer nicht-phosphorylierbaren, konstitutiv-aktiven Form des Enzyms vermittelte eine verstärkte Apoptose unter den Bedingungen eines verlängerten Entzugs mitogener Faktoren oder des Lösens von Zell-Matrix-Verbindungen. Im Gegensatz dazu führte die Transduktion mit katalytisch inaktiver GSK3 $\beta$  zu besserem Überleben von Endothelzellen unter zellulären Stressbedingungen. Unter normalen Zellkulturbedingungen inhibierte die Aktivierung der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion die Migration von Endothelzellen nach Stimulation mit vaskulärem endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) oder basic fibroblast growth factor (bFGF). Die Angiogenese in einem *in vivo* Matrigel-Assay wurde durch die Aktivierung von GSK3 $\beta$  inhibiert, wohingegen die Inhibition der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion die Kapillarbildung begünstigte. Diese Daten weisen daraufhin, dass GSK3 $\beta$  als Kreuzpunkt unterschiedlicher Signaltransduktionswege in Endothelzellen das Gefäßwachstum durch die Kontrolle der Migration und der Viabilität der Zellen reguliert.

Diese Studie charakterisierte erstmals das angiogene Potential von GSK3 $\beta$  in Endothelzellen und bildete die Grundlage für weitergehende Untersuchungen in endothelialen Progenitorzellen (EPC), welche zur Gefäßneubildung nach einer Schädigung beitragen.

Die Inhibition von GSK3 $\beta$  in EPC führte zur nukleären Translokation von  $\beta$ -Catenin mit assoziierter Hochregulation angiogener Wachstumsfaktoren (VEGF und IL-8). Die Inhibition der GSK3 $\beta$ -Aktivität verbesserte das Überleben und die Proliferation sogenannter früher ("early") EPC als auch das Überleben und die Differenzierung später ("late") EPC. Die Transplantation von genetisch modifizierten



---

EPC in athymic Mäuse in einem Modell der Ischämie der Hinterpfote in der Maus führte zu einem verbesserten Blutfluss, einer erhöhten Kapillardichte und einer Gewebeprotektion. Diese Daten zeigen, dass die Inhibition von GSK3 $\beta$  in EPC eine Schlüsselrolle für die angiogenen Eigenschaften dieser Zellen zukommt und dass die genetische Modifikation dieses Signaltransduktionsweges in endothelialen Progenitorzellen die Effektivität der zellbasierten Vaskulogenese verbessert.

Choi JH, Hur J, Yoon CH, Kim JH, Lee CS, Youn SW, Oh IY, **Skurk C**, Murohara T, Park YB, Walsh K, Kim HS: Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 beta activity. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):49430-8.

## 2.2. Die Glykogen-Synthase Kinase 3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsachse fördert die Angiogenese über die Aktivierung von VEGF-Signaling

**Skurk C**, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K: Glycogen-synthase kinase3 beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2005 Feb 18;96(3):308-18.

Die Glykogen-Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) reguliert als Kreuzpunkt verschiedener Signaltransduktionswege in Endothelzellen das Gefäßwachstum. Die Signalmechanismen downstream des Enzyms wurden jedoch bisher nicht erforscht. Wir konnten zeigen, dass  $\beta$ -Catenin ein bedeutendes Substrat der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion in der Angiogenese downstream von GSK3 $\beta$  darstellt und charakterisieren die Signaltransduktionswege, welche an der Entwicklung des pro-angiogenen Phänotyps beteiligt sind. Die Transduktion von human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) mit einer mutanten Form der Kinase-Domäne des Enzyms (KM-GSK3 $\beta$ ) erhöhte die zytosolischen  $\beta$ -Catenin Spiegel, während konstitutiv-aktive GSK3 $\beta$  (S9A-GSK3 $\beta$ ) die zytosolischen  $\beta$ -Catenin Konzentrationen verringerte. Die Promoter-Aktivität des lymphoid enhancer factor/T-cell factor (LCF/TCF) wurde durch KM-GSK3 $\beta$  hochreguliert und durch S9A-GSK3 $\beta$  verringert, während die Manipulation der Akt-Signaltransduktion keinen Effekt auf diesen Parameter ausübte. Die Transduktion mit  $\beta$ -Catenin induzierte die Bildung von kapillären Strukturen in einem Matrigel *in vivo* und begünstigte die Endothelzelldifferenzierung (Bildung kapillärer Netzwerke) auf Matrigel in der Zellkultur *in vitro*.  $\beta$ -Catenin aktivierte die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF)-A und VEGF-C in Endothelzellen und diese Effekte wurden auf Protein- und mRNA-Ebene sowie mittels Steigerung der Promoter-Aktivität vermittelt. In Übereinstimmung mit diesen Daten erhöhte  $\beta$ -Catenin den Phosphorylierungsgrad von VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) und vermittelte die Assoziation von VEGF-R2 mit PI3-Kinase. Die Aktivierung der PI3-Kinase führte zur dosisabhängigen Phosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase Akt. Die Inhibition der PI3-Kinase- oder der Akt-Signaltransduktion inhibierte die pro-angiogene Wirksamkeit von  $\beta$ -Catenin. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass der Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg downstream der GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion in Endothelzellen aktiviert wird um einen pro-angiogenen Phänotyp zu induzieren.

### 2.3. Der durch Akt regulierte Forkhead-Transkriptionsfaktor FOXO3a kontrolliert die endotheliale Zellviabilität durch die Modulation des Caspase-8-Inhibitors FLIP

**Skurk C**, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC, Walsh K: The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem.* 2004 Jan 9;279(2):1513-25.

FLIP (FLICE inhibierendes Protein) stellt ein nicht katalytisch aktives Homolog der Caspase-8 (FLICE) dar. Es schützt endotheliale Zellen vor apoptotischem Zelltod. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die FLIP-Expression durch die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB in Endothel- und Tumorzellen induziert wird. In der vorliegenden Studie wird die Rolle des Forkhead-Transkriptionsfaktors FOXO3a, eines downstream Substrats von Akt, in der Regulation der FLIP-Expression in Endothelzellen untersucht. Die nukleäre Translokation von FOXO3a wurde durch Akt in HUVEC reguliert. Die Transduktion einer nichtphosphorylierbaren, konstitutiv-aktiven Mutante von FOXO3a (TM-FOXO3a) führte zu einer Herunterregulation von FLIP. Die Transduktion mit TM-FOXO3a steigerte die Caspase-8-Aktivität und bedingte einen Anstieg des apoptotischen Zelltods in Endothelzellen. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von FOXO3a (DN-FOXO3a) zur Hochregulation von FLIP und inhibierte die Apoptose unter Bedingungen des Entzugs von Wachstumsfaktoren. Die Wiederherstellung der intrazellulären FLIP-Konzentration mittels adenoviralen Gentransfers inhibierte die Caspase-8-Aktivierung und den apoptotischen Zelltod in mit TM-FOXO3a transduzierten Zellen. Diese Daten zeigen, dass FOXO3a einen downstream von Akt aktivierten Transkriptionsfaktor in endothelialen Zellen darstellt, welcher die Apoptose durch Inhibition der FLIP-Expression und die assoziierte Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose induziert.

In weiterführenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Forkhead-Transkriptionsfaktoren FKHR (FOXO1), FKHL1 (FOXO3a) und AFX (FOXO4) in humanen Endothelzellen exprimiert werden und dass VEGF ihre Phosphorylierung, subzelluläre Verteilung und transkriptionelle Aktivität durch den PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg moduliert. VEGF inhibierte die Endothelzell-Apoptose, förderte die DNA-Synthese sowie die G1- zur S- Transition im Zellzyklus und inhibierte die Expression des Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p27<sup>kip1</sup>. Diese Effekte konnten durch einen PI3-Kinase Inhibitor (LY2940002) oder durch eine nichtphosphorylierbare Mutante von FOXO3a, nicht jedoch durch Wildtyp-FOXO3a

inhibiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die VEGF-Signaltransduktion über den PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg in Endothelzellen an die Forkhead-Transkriptionsfaktoren gekoppelt ist.

Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, **Skurk C**, Walsh K, Aird WC: Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):294-300.

#### 2.4. Akt/FOXO3a-Signaling moduliert die endotheliale Stressantwort durch Regulation der Hitzeschockprotein 70 (HSP70)-Expression

Kim HS, Skurk C, Maatz H, Shiojima I, Ivashchenko Y, Yoon SW, Park YB, Walsh K: Akt/FOXO3a signaling modulates the endothelial stress response through regulation of heat shock protein 70 expression. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):1042-4.

Um neue anti-apoptotische Zielproteine der PI3-Kinase-Signaltransduktionskaskade in endothelialen Zellen zu identifizieren, wurden Oligonucleotid-Microarrays nach durch Adenovirus vermitteltem Akt-1 Gentransfer benutzt. Die DNA Microarray-Analyse identifizierte das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) als höchstreguliertes Gen unter 12532 Transkripten, welche in mit konstitutiv-aktivem Akt-1 transduzierten HUVEC untersucht wurden. Der Akt-1 Gentransfer steigerte die Akt-1 abhängige HSP70 Transkript-Expression in der quantitativen Real-time PCR um das 24.8-fache und führte zu einer dosisabhängigen Hochregulation von HSP70-Protein in der Western-Blot-Analyse. Der Gentransfer von FOXO3a, einem downstream Substrat von Akt in Endothelzellen, inhibierte sowohl die basale als auch die durch verschiedene Stressoren (Hitzeschock, Anoxie/Reoxygenierung) induzierte HSP70 Protein-Expression. FOXO3a induzierte eine Caspase-9 abhängige Apoptose in HUVEC und eine Co-Transduktion mit Ad-HSP70 inhibierte die durch FOXO3a induzierte Apoptose unter Basal- und Stressbedingungen in Endothelzellen. Diese Resultate identifizieren HSP70 als ein neues, durch die Akt/FOXO3a-Signaltransduktion in Endothelzellen reguliertes anti-apoptotisches Protein, welches die Zellviabilität durch Modulation des stressinduzierten intrinsischen Signalweges des apoptotischen Zelltodes moduliert.

Diese *in vitro* Untersuchungen bildeten die Grundlage für weitergehende Studien in vaskulären Muskelzellen sowie für die therapeutische Anwendung des FOXO3a-Gentransfers in einem Modell der Ballonschädigung in der Ratte, um die neointimale Hyperplasie nach Ballonangioplastie zu inhibieren. TM-FOXO3a-Überexpression in VSMC führte über die Hochregulation von p27 zu einem G1-Zellzyklusarrest verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate. *In vivo* konnte eine Phosphorylierung von FOXO3a nach Ballonschädigung mit verzögerter Herunterregulation von p27 gezeigt werden. Der FOXO3a-Gentransfer induzierte eine Hochregulation von p27, eine erhöhte Apoptoserate von VSMC und eine Verringerung der Neointimabildung. Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit einer therapeutischen Nutzung von FOXO3a im Rahmen von Interventionen auf, um die Neointimabildung nach Angioplastie zu inhibieren.

---

Park KW, Kim DH, You HJ, Sir JJ, Jeon SI, Youn SW, Yang HM, **Skurk C**, Park YB, Walsh K, Kim HS: Activated forkhead transcription factor inhibits neointimal hyperplasia after angioplasty through induction of p27. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Apr;25(4):742-7.

## 2.5. Der Forkhead-Transkriptionsfaktor FOXO3a reguliert die Kardiomyozytengröße downstream von Akt

**Skurk C**, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofe S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K: The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signalling. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20814-23.

Obwohl die Signaltransduktionswege, welche zur kardialen Hypertrophie führen, Gegenstand extensiver Forschung sind, existieren nur wenige Studien über die Mechanismen, die eine Hypertrophie inhibieren. In dieser Arbeit wird die Existenz einer Akt/Forkhead-Signaltransduktionsachse in kardialen Myozyten *in vitro* und *in vivo* beschrieben, welche durch die Wachstumsfaktoren IGF-1, Insulin sowie durch mechanische Dehnung, Druckbelastung („Overload“) und Angiotensin II-Stimulation reguliert wird. Ein FOXO3a-Gentransfer inhibierte die durch IGF-1 und mechanische Dehnung induzierte Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten *in vitro*. Die Transduktion mit FOXO3a führte auch zu einer signifikanten Reduktion der Myozytengröße in Mäuseherzen *in vivo*. Die Akt/FOXO-Signaltransduktion steuerte die Expression multipler, eine Atrophie induzierender Gene („Atrogene“), wie beispielsweise der Ubiquitin-Ligase 1 (MAFbx). In der Kardiomyozytenkultur wurde die Expression von Atrogin-1 mRNA durch die Transduktion mit einer konstitutiv-aktiven Form von Akt oder durch Inkubation mit IGF-1 supprimiert. Im Gegensatz dazu führte die Transduktion von FOXO3a zur Herunterregulation der Genexpression. Die Überexpression von FOXO3a aktivierte den Atrogin-1 Promoter in Kardiomyozyten *in vitro* und im Mäuseherzen *in vivo*. Zusammenfassend aktiviert FOXO3a im Myokard wie auch im Skelettmuskel ein atrogenes Transkriptionsprogramm, welches die Hypertrophie verhindert bzw. verzögert und durch verschiedene physiologische und pathologische Stimuli des Myozytenwachstums herunterreguliert wird.

Grundlage dieser Studie bildeten Untersuchungen zur Atrophie im Skelettmuskel. Die Skelettmuskelatrophie ist eine Reaktion auf Hungern (Katabolismus), eine Funktionseinschränkung, verschiedene Tumore und andere systemische Erkrankungen. Im atrophierenden Muskel wird die Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 (MAFbx) dramatisch hochreguliert und diese Reaktion ist notwendig für die Entstehung einer Atrophie. In atrophierenden, *in vitro* kultivierten „Myotubes“ nimmt die Aktivität des PI3k/Akt-Signaltransduktionsweges ab und die der FOXO-Transkriptionsfaktoren zu, was mit einer Hochregulation von Atrogin-1 assoziiert ist. Die Gabe von IGF-1 oder die Überexpression von Akt inhibiert die FOXO-Aktivierung

---

und führt zur Herunterregulation von Atrogin-1. Konstitutiv-aktives FOXO3a bindet an den Atrogin-1-Promoter und führt zur Atrogin-1 Transkription verbunden mit einer dramatischen Atrophie von Myotubes und Skelettmuskelfasern. Die Blockade der Atrogin-1-Expression mit einem dominant-negativen Konstrukt *in vitro* bzw. durch siRNA in Mausmuskeln *in vivo* verhindert eine durch Glukokortikoide induzierte Atrophie von Myotubes *in vitro* bzw. durch Hungern induzierte Atrogin-1 Hochregulation *in vivo*. Diese Daten zeigen dass Forkhead-Transkriptionsfaktoren eine kritische Rolle bei der Entwicklung einer Muskelatrophie spielen und dass die Inhibition von FOXO einen attraktiven Ansatz zur Bekämpfung der Muskelatrophie darstellt.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, **Skurk C**, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL: Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**. 2004 Apr 30;117(3):399-412.



## 2.6. Beschreibung eines kardialen Adiponectinsystems und seiner Deregulation in der dilatativen Kardiomyopathie

**Skurk C**, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W: Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2008 May;29(9):1168-80.

Trotz kürzlicher Fortschritte in der medizinischen Therapie bleibt die Herzinsuffizienz eine führende Ursache für die kardiovaskuläre Mortalität und seine komplexe Pathogenese ist bis heute unvollständig verstanden. Um neue therapeutische Angriffsziele in der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zu identifizieren, wurden Oligonucleotid-Microarray Analysen von endomyokardialen Biopsien in Patienten mit früher DCM (LVEDD>55mm, LVEF<55%, n=5) und Kontrollen (LVEDD<55mm, LVEF>60%, ohne kardiale Pathologie n=4) durchgeführt. Adiponectin, ein Adipozytokin, welches an der Steuerung des zellulären Metabolismus, der Immunmodulation und des Überlebens beteiligt ist, war in der DCM-Gruppe 6fach herunterreguliert. Die Microarray Daten für Adiponectin wurden mittels Taq-Man-PCR bestätigt (9.2fache Herunterregulation, Kontrolle n=9 vs. DCM n=9, p<0.05). Eine immunhistologische Analyse der EMBs zeigte eine signifikante Herunterregulation der Adiponectin-Expression unabhängig von den Serumkonzentrationen von APN (p=0.36, NS) oder TNF $\alpha$  (p<0.46, NS). Weder Adiponectin-Rezeptor1 (Adipo-R1) noch Adipo-R2 waren in der frühen DCM dereguliert. Die Adiponectin-mRNA und - Protein-Herunterregulation wurde in explantierten Herzen von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz (LVEF<25%, n=8) bestätigt. *In vitro* führte die Inkubation von neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Aktivierung der pro-survival Kinase PkB/Akt, zu gesteigerter eNOS-Phosphorylierung und Inhibition der stressinduzierten Apoptose von Kardiomyozyten in einer Akt-abhängigen Art und Weise. Die Inhibition der Adiponectin-Sekretion wurde von einer Erhöhung der Expression des Zytokins und seiner Rezeptoren begleitet. Diese Daten weisen auf die Existenz und Deregulation eines lokalen Adiponectin Systems, welches unabhängig von den Plasmakonzentrationen von Adiponectin und TNF $\alpha$  reguliert wird, hin. Die Studie impliziert eine Rolle von Adiponectin in der Pathogenese der DCM. Adiponectin könnte ein Stellenwert in der zukünftigen Therapie der DCM zukommen.

Die Grundlage dieser klinisch-experimentellen Untersuchungen bildeten Studien über die Effekte des Adipozytokins Adiponectin in Endothelzellen und am Herzmuskel. Adiponectin aktiviert Akt und wirkt über diesen Signaltransduktionsweg

*in vitro* und *in vivo* pro-angiogen [123, 160]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Adiponectin die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen, die an der Gefäßneubildung beteiligt sind, erhöht. In APN-Nullmäusen kam es nach Induktion einer Ischämie im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen zu keinem Anstieg der Sca-1/Fli-1 positiven Zellfraktion im peripheren Blut. Ein adenoviraler Gentransfer von Adiponectin erhöhte die Anzahl von EPC im peripheren Blut in Wildtyp- und Nullmäusen. Die Inkubation von humanen PBMCs mit APN führte zur Proliferation dieser Zellen. Adiponectin induzierte die Bildung von Netzwerkstrukturen auf Matrigel und diente als Chemoattraktans in einem Migrationsassay. Diese Daten weisen auf einen Einfluss der Hypoadiponectinämie bei der Depression der EPC-Anzahl in Patienten mit metabolischen Erkrankungen wie beispielsweise Adipositas und Diabetes mellitus hin.

**Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K:** Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett.* 2008 May 14;582(11):1607-12.

Neben der pro-angiogenen Wirksamkeit des Zytokins via Akt-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung inhibiert Adiponectin das myokardiale Remodeling am Herzen [159]. Ob diese protektiven Effekte über eine Aktivierung des Wachstumsfaktor/Akt-Signaltransduktionsweges induziert werden, ist bisher nicht nachgewiesen. Interessanterweise sind FOXO-Transkriptionsfaktoren direkt an der Regulation der Adiponectinspiegel beteiligt [117] und die Expression des Zytokins ist bei Patienten mit PVB19 Infektion herunterreguliert.

Wittchen F, Suckau L, Witt H, **Skurk C**, Lassner D, Fechner H, Sipo I, Ungethüm U, Ruiz P, Pauschinger M, Tschope C, Rauch U, Kühl U, Schultheiss HP, Poller W: Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. *J Mol Med.* 2007 Mar;85(3):257-71.

### 3. DISKUSSION

Die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse reguliert mehrere downstream Substrate, die für die Ausprägung eines angiogenen Phänotyps und das Zellwachstum von Bedeutung sind [166]. In dieser Arbeit wurden die Funktion der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse und ihrer downstream Substrate in Endothelzellen und Kardiomyozyten untersucht. GSK3 $\beta$  und FOXO-Transkriptionsfaktoren stellen wichtige Effektoren der Akt-Signaltransduktion downstream von verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Aktivatoren der PI3-Kinase dar, die die Viabilität, das Zellwachstum, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration und somit wichtige anti-angiogene und anti-hypertrophe Effekte vermitteln. Im Gegensatz dazu wird  $\beta$ -Catenin in Endothelzellen zellspezifisch reguliert und aktiviert die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion durch die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren. Auch das durch FOXO-Transkriptionsfaktoren hochregulierte Adipozytokin Adiponectin führt über einen AMPK-abhängigen Mechanismus zur Aktivierung der PI3K-Akt-Signalachse und übt hierüber protektive Effekte in Kardiomyozyten aus.

Die Glycogen-Synthase Kinase 3 $\beta$  wird in verschiedenen Zelltypen von Akt phosphoryliert [25]. Bisher ist wenig über die Funktion des Enzyms in Endothelzellen bekannt. Die Regulation von GSK3 $\beta$  und seine Effekte auf die Blutgefäßbildung in Endothelzellen wurden daher untersucht [89]. Die Inhibition der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 zeigt, dass PI3-Kinase abhängige Signaltransduktionsmechanismen das Enzym nach Mitogenstimulation in Endothelzellen regulieren [89]. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinkinase B/Akt GSK3 $\beta$  in Endothelzellen direkt phosphoryliert. Die durch Serumstimulation induzierte GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung konnte durch die Transduktion mit einer dominant-negativen Mutante von Akt inhibiert werden, während die Transduktion mit einer konstitutiv-aktiven Form von Akt suffizient für die Phosphorylierung unter den Bedingungen eines Mitogenentzugs ist. Außerdem konnten wir zeigen, dass GSK3 $\beta$  nicht ausschließlich durch die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse, sondern auch durch die Mitogen-abhängige Proteinkinase (MAPK) und Proteinkinase A (PKA) reguliert wird. Somit konvergieren verschiedene Signaltransduktionswege an der GSK3 $\beta$ , was darauf hindeutet, dass das Enzym Signale von verschiedenen pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen integriert.

Die EC-Viabilität stellt einen bedeutenden, die Angiogenese und Gefäßintegrität beeinflussenden Faktor dar, und die Abwesenheit von

Wachstumsfaktoren führt zur Gefäßregression in Tumoren [8]. Wir konnten nachweisen, dass GSK3 $\beta$  eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der EC-Viabilität nach Wachstumsfaktorentzug in EC spielt. Die Aktivierung von GSK3 $\beta$  in EC durch Mitogenentzug verstärkte die Endothelzellapoptose während die Ablation der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion unter diesen Bedingungen die Zellen vor Apoptose schützte. Obwohl die Modulation der GSK3 $\beta$ -Aktivität in anderen, nichtvaskulären Zelltypen die Apoptose nach Mitogen-Deprivation induziert [63, 99] konnten wir erstmals zeigen, dass die GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion den Zelltod nach Unterbrechung von Zell-Matrix-Interaktionen (Anoikis) reguliert. Nach Trennung der Zell-Matrix-Verbindungen kam es zu einer zeitabhängigen Dephosphorylierung und damit verbundenen Aktivierung von GSK3 $\beta$ , die mit verstärkter Apoptose assoziiert war. Der apoptotische Zelltod unter diesen Bedingungen wurde durch die Überexpression einer katalytisch inaktiven Form des Enzyms inhibiert, während der Gentransfer einer konstitutiv-aktiven Form die Apoptoserate der EC erhöhte. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion als wichtigen Modulator der EC-Anoikis hin. Die Kontrolle der Anoikis spielt eine kritische Rolle in der Angiogenese, da Zell-Matrix-Interaktionen das Überleben von EC vermitteln und essentiell für die Neovaskularisation sind [11]. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die „pro-survival“-Signale von Zell-Matrix-Interaktionen durch die Enzyme Akt [55] und Integrin-linked Kinase (ILK) [66], welche sowohl Akt als auch GSK3 $\beta$  phosphoryliert, vermittelt werden [191]. Unsere Studie zeigt weiterhin, dass die GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion die Migration von Endothelzellen nach VEGF/bFGF-Stimulation und die von glatten Muskelzellen (VSMC) nach PDGF/bFbF-Stimulation kontrolliert. Diese Effekte resultierten nicht aus zytotoxischen bzw. zytoprotektiven Effekten der verschiedenen GSK3 $\beta$ -Vektoren, da die Assays über einen kurzen Zeitraum von ca. 5h durchgeführt wurden und eine Apoptose erst nach Serumentzug von ca. 48h auftritt. Da die Migration von EC einen essentiellen Mechanismus für die Angiogenese darstellt, wurde ein *in vivo* Maus-Angiogenese-Modell zur Charakterisierung der Effekte eines GSK3 $\beta$ -Gentransfers auf die Kapillarbildung in mit FGF behandeltem Matrigel etabliert. Die dominant-negative Mutante KM-GSK3 $\beta$  verstärkte die Kapillardichte im Matrigel-Plug, während die konstitutiv-aktive GSK3 $\beta$ -Mutante diese signifikant reduzierte. Diese Daten zeigen, dass die GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion in Endothelzellen die Angiogenese inhibiert, außerdem sind diese Ergebnisse konsistent mit den inhibitorischen Effekten auf die EC-Migration und Apoptose *in vitro*, welche oben beschrieben sind.

Vorangegangene Untersuchungen haben den PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg als bedeutenden Regulator eines pro-angiogenen Phänotyps in EC identifiziert [166]. Unsere in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse vertiefen das Wissen über die Signaltransduktionswege, welche die Angiogenese downstream von Akt regulieren. Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , eines mehrerer Substrate von Akt, ist essentiell für das Überleben und die Migration von EC *in vitro* sowie die Angiogenese *in vivo*. Die durch GSK3 $\beta$  vermittelte Regulation des pro-angiogenen Phänotyps war nicht mit Veränderungen der NO-Synthese assoziiert. Daher ist die Regulation der Angiogenese durch GSK3 $\beta$  unabhängig von der durch Akt vermittelten Phosphorylierung von eNOS. Desweiteren vermitteln die MAPK- und PKA-Signaltransduktionswege eine Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  am Serin-9, welche zur Inaktivierung des Enzyms führt und somit pro-angiogen wirkt. Diese Beobachtungen sind signifikant, weil pro-angiogene Faktoren wie beispielsweise bFGF die MAPK aktivieren. Eine GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung kann auch durch Wnt über einen Mechanismus, der sich von dem der mitogenen Faktoren unterscheidet, erfolgen [50] und die Wnt-Signaltransduktion kann das Endothelzell-Wachstum fördern [45]. Zusammenfassend implizieren unsere Daten, dass GSK3 $\beta$  als Knotenpunkt für verschiedene Signaltransduktionswege innerhalb der EC die unterschiedlichen pro-angiogenen Inputs koordiniert und so die Expression eines pro-angiogenen Phänotyps der Endothelzellen unabhängig von eNOS reguliert.

Im Weiteren sollte die Signaltransduktion downstream von GSK3 $\beta$ , welche den pro-angiogenen Phänotyp nach GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung induziert, untersucht werden [170]. Wir konnten erstmals zeigen, dass  $\beta$ -Catenin in Endothelzellen suffizient für die Expression eines pro-angiogenen Phänotyps *in vitro* und das Gefäßwachstum *in vivo* ist. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien ist die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin in EC abhängig vom Aktivierungszustand von GSK3 $\beta$ , aber unabhängig von der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion [25, 206]. Der Gentransfer von S9A-GSK3 $\beta$ , einer nichtphosphorylierbaren, konstitutiv-aktiven Mutante des Enzyms, verminderte die intrazellulären  $\beta$ -Catenin-Spiegel, während die Transduktion mit KM-GSK3 $\beta$ , einer dominant-negativen und katalytisch inaktiven Form, diese erhöhte. Weder konstitutiv-aktives, noch dominant-negatives Akt hatte einen Effekt auf die  $\beta$ -Catenin Konzentration oder die transkriptionelle Aktivität von TCF/LCF. Diese Daten implizieren, dass in EC verschiedene zytosolische Pools von GSK-3 $\beta$  existieren, welche durch Wachstumsfaktor- oder Wnt-Signaltransduktion reguliert werden [25, 43, 138]. Die Akt-Beteiligung an der Stabilisierung von  $\beta$ -

Catenin ist für andere Zellsysteme wie bspw. Kardiomyozyten beschrieben [68], existiert nach unseren Untersuchungen allerdings nicht in Endothelzellen. Diese Beobachtung zeigt, dass Akt die im „Destruktionskomplex“ gebundene GSK3 $\beta$  nicht inaktivieren kann.

In einem Matrigel-Plug Angiogenese-Assay konnte *in vivo* gezeigt werden, dass WT- und delta- $\beta$ -Catenin die Entstehung der Angiogenese fördern. Delta- $\beta$ -Catenin, welches nicht phosphorylierbar und somit proteosomal nicht abbaubar ist, zeigte stärkere Effekte.  $\beta$ -Catenin kontrollierte die Migration von EC auf VEGF sowie die Differenzierung endothelialer Zellen in Netzwerk- bzw. kapilläre Strukturen *in vitro*. Weiterhin konnte der anti-angiogene Phänotyp von EC nach Transduktion der Zellen mit konstitutiv-aktiver GSK3 $\beta$  durch die Co-Transduktion mit  $\beta$ -Catenin teilweise inhibiert werden. Die Transduktion von EC mit  $\beta$ -Catenin führte zur Hochregulation der Expression von VEGF-A und VEGF-C auf mRNA- und Proteinebene. Desweiteren aktivierte  $\beta$ -Catenin den VEGF-A Promoter in Co-Transfektionsstudien. Die Induktion von VEGF-C durch  $\beta$ -Catenin ist bisher nur in transformierten Epithelzellen beobachtet worden [209]. VEGF-A ist ein essentieller angiogener Faktor [18] und VEGF-C stimuliert die Angiogenese und verbessert die Revaskularisierung nach Ischämie der Hinterpfote [16, 199]. VEGF-A und VEGF-C binden beide an den VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) [83] und induzieren die Proliferation, die Migration und das Überleben von EC sowie eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität [57, 83]. VEGF-R2 wird durch die Bindung von VEGF selbst hochreguliert, was zu verstärkter VEGF-Signaltransduktion und Angiogenese führt [158]. In Übereinstimmung mit verstärkter VEGF-Signaltransduktion beobachteten wir nach  $\beta$ -Catenin-Transduktion eine Hochregulation von VEGF-R2-Transkript und -Protein in EC. Desweiteren konnten wir nachweisen, dass  $\beta$ -Catenin die VEGF-R2 Tyrosin-Phosphorylierung, welche mit der Migration und Kapillarbildung von EC direkt korreliert [119], erhöht.  $\beta$ -Catenin rekrutierte auch die PI3-Kinase zum VEGF-R2 und induzierte die Aktivierung von Akt. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Wnt- und PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion an der  $\beta$ -Catenin induzierten VEGF-Synthese konvergieren. Vorangegangene Studien konnten nachweisen, dass die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion ein Schlüsselregulator des pro-angiogenen Phänotyps darstellt [166]. Die  $\beta$ -Catenin induzierte EC-Differenzierung und EC-Migration werden durch Inhibitoren des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges gehemmt, was für die Signifikanz mitogener Signale downstream von  $\beta$ -Catenin spricht. Desweiteren implizieren unsere Daten, dass die Wnt/GSK3 $\beta$ -Signaltransduktion das Blutgefäßwachstum über die Induktion angiogener

Wachstumsfaktoren und autokriner Stimulation der PI3-Kinase/Akt in Endothelzellen fördert.

Neben GSK3 $\beta$  stellen die FOXO-Transkriptionsfaktoren ein weiteres durch Akt phosphoryliertes Substrat dar. Während der Neovaskularisation wird das Überleben der Endothelzellen durch das Gleichgewicht exogener pro-angiogener und anti-angiogener Faktoren determiniert. Die durch Akt regulierte FLIP-Expression vermittelt pro-angiogene „Survival“-Signale in Endothelzellen [178]. FLIP inhibiert die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges, welcher durch anti-angiogene Stimuli aktiviert werden kann [95, 193]. Die Forkhead-Transkriptionsfaktoren wurden als downstream Substrate von Akt identifiziert [12, 134, 180]. Deshalb untersuchten wir den Einfluss von FOXO auf die Zellviabilität [169]. Wir konnten erstmals zeigen, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen exprimiert und durch Akt reguliert werden. Desweiteren wurde die durch FOXO regulierte FLIP-Expression als Modulator der endothelialen Zellviabilität charakterisiert.

Wie für andere Zelltypen beschrieben, führt die Serumstimulation zur zytoplasmatischen Akkumulation von FOXO in Endothelzellen, während ein Serumentzug die Translokation in den Nukleus fördert [152]. In Übereinstimmung mit diesen Daten ist die Transduktion mit konstitutiv-aktivem Akt von einer Phosphorylierung und zytoplasmatischen Retention von FOXO3a gekennzeichnet, während die Transduktion der EC mit einer dominant-negativen Mutante von Akt zur nukleären Akkumulation des Transkriptionsfaktors führt. Die Effekte der Trennung der Zellen von der extrazellulären Matrix auf die FOXO-Lokalisation wurden untersucht, da das Lösen von Integrin-Matrix-Interaktionen mit einer Inhibition der Akt-Aktivierung, der Herunterregulation von FLIP, der Aktivierung von Caspase-8 und Anoikis einhergeht [55, 89]. FOXO3a akkumulierte in der Suspensionskultur im Nukleus. Diese Daten weisen darauf hin, dass FOXO3a in EC durch Akt reguliert wird und unter Bedingungen, welche den apoptotischen Zelltod fördern, in den Nukleus transloziert. Die funktionelle Relevanz der FOXO3a-Translokation in den Nukleus wurde mit Hilfe verschiedener adenoviraler Vektoren untersucht. Der konstitutiv-aktive Vektor exprimiert eine nichtphosphorylierbare Mutante von FOXO3a (TM-FOXO3a). Dieses Protein akkumuliert im Nukleus und wird nicht durch Akt oder Mitogene reguliert. Die Expression von TM-FOXO3a in mit Serum stimulierten Endothelzellen führte in einer dosis- und zeitabhängigen Weise zu einem ausgeprägten apoptotischen Zelltod. Die Apoptose wurde mittels verminderter mitochondrialer Funktion, der Bildung von hypodiploider DNA als auch durch den Nachweis pyknotischer Zellkerne determiniert. Der apoptotische Zelltod war mit einer

Erhöhung der Caspase-8-Aktivität assoziiert, was für die Induktion über den extrinsischen Signalweg der Apoptose spricht. Im Gegensatz dazu induzierte WT-FOXO3a keine Veränderung der Viabilität unter Serumstimulation, die zu einer zytosolischen Akkumulation des Transkriptionsfaktors führt. Allerdings resultierte die Überexpression von WT-FOXO3a unter Bedingungen des Serum-Entzugs, die durch eine nukleäre Translokation gekennzeichnet ist, in einer Apoptoseinduktion, während dominant-negatives FOXO3a keinen Effekt zeigte.

Der Mechanismus, durch den FOXO einen Zelltod induziert, scheint spezifisch für den jeweiligen Zelltyp zu sein. In cerebellären Neuronen, Fibroblasten und Jurkat-Zellen induziert die transiente Überexpression von TM-FOXO3a eine Apoptose über die Hochregulation von Fas-Ligand und die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs der Apoptose [12]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Forkhead-Transkriptionsfaktoren die Expression von TRAIL/APO2L, eines weiteren „death receptor“-Liganden, in Myelomzellen induziert [111]. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass in hämatopoetischen Zellen die Apoptose durch FOXO unabhängig von der durch Liganden vermittelten Aktivierung von Rezeptoren auftritt [39]. Weder die Caspase-8-Aktivierung noch eine Induktion des Fas-Ligand-Promoters konnte in dieser Studie nach Wachstumsfaktorentzug nachgewiesen werden. FOXO3a induzierte in diesen Zellen die transkriptionelle Hochregulation des pro-apoptotisch wirksamen Proteins BIM mit assoziierter Destruktion der mitochondrialen Membranintegrität, einer Cytochrom c –Freisetzung und Caspase-Aktivierung. Somit kann FOXO3a auch über die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose einen Zelltod induzieren.

Unsere Studie beschreibt einen neuen Mechanismus, über den Forkhead-Transkriptionsfaktoren Apoptose induzieren. Wir identifizierten FLIP, ein katalytisch inaktives Homolog von Caspase-8, als durch die FOXO3a-Signaltransduktion reguliertes Protein. Die Regulation von FLIP durch FOXO3a konnte auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden. Eine erhöhte FOXO3a-Aktivität (entweder durch TM-FOXO3a- oder WT-FOXO3a-Gentransfer) verringerte in dosisabhängiger Form die FLIP-Proteinkonzentration. TM-FOXO3a inhibierte auch die FLIP-mRNA Expression. Im Gegensatz dazu war die Transduktion mit dominant-negativem FOXO3a durch eine erhöhte FLIP-Protein- und mRNA-Expression gekennzeichnet. Desweiteren wurde die funktionelle Relevanz der FLIP-Regulation auf die Viabilität von Endothelzellen untersucht. Der Gentransfer von FLIP in Endothelzellen, welche TM-FOXO3a überexprimierten, konnte die Caspase-8-Aktivierung vollständig und die Apoptose teilweise unterdrücken. Weiterhin wurde die funktionelle Relevanz des extrinsischen Apoptose-Signalweges in Endothelzellen für



die durch FOXO vermittelte Toxizität mittels Inhibition der Caspase-8-Aktivität und teilweise Suppression der Apoptose nach CrmA-Transduktion, eines Caspase-8-Inhibitors, nachgewiesen. Unter normalen Bedingungen sind Endothelzellen resistent gegenüber der durch Ligand-„Death-Rezeptor“ vermittelten Apoptose [146]. Endothelzellen exprimieren Fas-Ligand an ihrer Oberfläche und können genetisch dahingehend modifiziert werden, diesen überzuexprimieren. Selbst die Überexpression von Fas-L *in vitro* und *in vivo* hat keinen detektierbaren Effekt auf die Zellviabilität oder pathologische- bzw. Entwicklungsstörungen [146, 149, 203]. Wahrscheinlich können Endothelzellen einer hohen Fas-Ligand-Expression aufgrund einer hohen FLIP Expression standhalten [147]. In diesem Zusammenhang werden Endothelzellen unter Serumentzug oder dem Einfluss von Akt inaktivierender Stimuli anfällig für den durch Fas vermittelten Zelltod [178]. Oxidierte Lipide, welche Akt inaktivieren [21], führen zu einer Herunterregulation von FLIP und induzieren eine durch Fas vermittelte Apoptose in Endothelzellen [147, 148]. Außerdem ist Anoikis mit durch Fas vermittelter Caspase-8-Aktivierung und FLIP-Herunterregulation verbunden [4, 176]. Da die Akt-Inaktivierung einen essentiellen Mechanismus in der Anoikis darstellt [55], könnte die durch FOXO3a vermittelte Herunterregulation von FLIP unter diesen Bedingungen zur Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose beitragen. Zusammenfassend stellt die hier beschriebene Akt/Forkhead/FLIP-Signaltransduktionsachse einen bedeutenden Regulator der endothelialen Zellviabilität in Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse dar.

Der Mechanismus der FLIP-Regulation durch Forkhead-Aktivierung ist unbekannt. Forkhead-Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren der Transkription fungieren [12]. Allerdings sind auch trans-Repressionen für FoxA2,-C2,-D2, -D3, und -G1 [10, 53, 195, 205] beschrieben und das Forkhead-Protein LIN31 in *C. elegans* kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription dienen [181]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass FOXO4 die Transkription des transkriptionellen Repressors Bcl-6, welcher eine Apoptose induziert, aktiviert [182]. In Endothelzellen konnten wir zeigen, dass FOXO3a die mRNA-Expression von FLIP herunterreguliert, was die Möglichkeit eröffnet, dass diese Regulation auf mRNA-Ebene stattfindet. Der FLIP-Promoter ist bisher nicht charakterisiert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die FLIP-Regulation durch eine Protein-Protein-Assoziation zwischen FOXO und einem Protein, welches als transkriptioneller Regulator fungiert, vermittelt wird. Kürzlich wurde eine durch FOXO vermittelte Repression des Cyclin D-Promoters über diesen Mechanismus beschrieben [132, 155]. Zusätzlich kann die beobachtete FLIP-Proteinregulation durch eine Caspase-Aktivierung durch FOXO hervorgerufen sein. In der Tat befindet sich eine Caspase-3/10 Spaltungsstelle in der

p12-Caspase-Domäne (LEVDG AS 373-377) des FLIP-Proteins [46] und eine FLIP-Degradation wurde in unserer und in anderen Studien beobachtet [150]. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass FLIP an einem positiven feedback-loop beteiligt ist, der die Caspase-Aktivität während des apoptotischen Prozesses erhöht. Übereinstimmend mit dieser Hypothese beobachteten wir, dass die durch FOXO3a vermittelte Reduktion der FLIP-Protein Expression und der Zellviabilität durch Caspase-8-Inhibition verringert waren. Unsere Daten implizieren zwei Mechanismen der FLIP-Herunterregulation durch FOXO3a, einen auf der mRNA- und einen auf der Protein-Ebene von FLIP. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass FOXO3a in Endothelzellen durch Akt reguliert wird und eine Apoptose durch die Herunterregulation von FLIP induziert. Die Herunterregulation von FLIP ist von einer Caspase-8-Aktivierung begleitet, und die Wiederherstellung der intrazellulären FLIP-Spiegel mittels FLIP-Gentransfer inhibiert die Caspase-8 Aktivierung sowie den apoptotischen Tod der Zellen.

Die Beobachtung, dass eine Caspase-8-Inhibition die durch FOXO3a induzierte Apoptose nur teilweise inhibiert impliziert, dass auch eine intrinsische regulatorische Signaltransduktion beim apoptotischen Zelltod involviert ist. Mittels Microarray-Analysen identifizierten wir HSP70 als weiteres durch die AKT/FOXO-Signaltransduktionsachse reguliertes Protein [88]. FOXO3a-Gentransfer führte zur Herunterregulation der HSP70 Proteinexpression in EC. HSP70 verhindert eine Zellschädigung durch toxische Stimuli oder missgefaltete Proteine. Es inhibiert die Oligomerisierung von apoptosis activating factor (APAF-1) durch die Bindung an die die Caspase rekrutierende Domäne des Proteins und damit die Aktivierung von Caspase-9, einer upstream Caspase im intrinsischen Apoptoseweg [5, 113, 142]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir zeigen, dass eine FOXO-Überexpression zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Die Überexpression von HSP70 in mit FOXO transduzierten Endothelzellen verhinderte diesen Prozess. Desweiteren konnte die Aktivierung der downstream Caspase-3 durch dominant-negative Caspase-9 inhibiert werden. Diese Daten zeigen, dass FOXO den intrinsischen und extrinsischen Weg des apoptotischen Zelltodes in Endothelzellen kontrolliert und dass die Induktion der Apoptose durch FOXO downstream der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion spezifisch für den jeweiligen Zelltyp ist. Diese Beobachtungen haben auch eine klinische Relevanz. Sowohl Homozystein als auch oxidiertes LDL als kardiovaskuläre Risikofaktoren inhibieren die Akt-Aktivierung und induzieren den apoptotischen Zelltod von EC. Desweiteren dienen VEGF,

Angiotensin und Statine als Aktivatoren von Akt und üben über die Inhibition der FOXO-Aktivität ihre protektiven Effekte auf das Gefäßsystem aus [171].

Zusammenfassend schützt Akt die Endothelzellen vor einer Apoptose durch die Inhibition von FOXO-Transkriptionsfaktoren und GSK3 $\beta$ , während  $\beta$ -Catenin die PI-3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse upstream aktiviert, um pro-angiogene Effekte auszuüben. Diese Effekte auf die Angiogenese konnten in einer weiteren *in vivo* Studie unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden [1]. Sowohl GSK3 $\beta$  als auch FOXO werden in Endothelzellen von Akt-1-Nullmäusen verringert phosphoryliert. Desweiteren weisen Endothelzellen dieser Mäuse eine gestörte Migrationsfähigkeit auf. Die Phosphorylierungs- und Migrationseffekte in diesen Zellen können durch Re-Introduktion von Akt-1 korrigiert werden. Weiterhin zeigen Akt-1-Nullmäuse eine gestörte Angiogenese nach Ischämie der Hinterpfote mit Verlust der unteren Extremität, was für die Signifikanz der oben dargelegten Beobachtungen über die Funktion der downstream Substrate spricht.

Die Induktion des apoptotischen Zelltodes in Endothelzellen durch FOXO steht im Gegensatz zu Beobachtungen in *C. elegans*, in welcher DAF-16, ein FOXO-Homolog, eine Verlängerung des Lebens bewirkt [121]. Außerdem zeigt *Drosophila*, die das FOXO-Homolog *forkhead* überexprimiert, ebenfalls eine verlängerte Lebensdauer. Auch in Säugetierzellen ist die Entgiftung von ROS eine bedeutende Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren [58, 92]. In diesem Zusammenhang konnten Brunet et al. zeigen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aber nicht UV-Strahlung oder Wachstumsfaktorstimulation, die Deacetylierung von FOXO propagiert und dass diese post-tranlationale Modifikation eine Stress-Adaptation und einen Zellzyklusarrest aber keine Apoptose in Säugetierzellen induziert [14]. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Fähigkeit von FOXO, eine Apoptose bzw. eine Stressresistenz zu induzieren, von den jeweiligen Wachstums/Umgebungsbedingungen der Zellen und der SIRT-Aktivität abhängig ist. Speziell unter den Bedingungen der „quiescence“ werden FOXO-Transkriptionsfaktoren einen Zellzyklusarrest und die Expression von ROS-entgiftenden Genen aktivieren.

In Bezug auf die Rolle von FOXO-Transkriptionsfaktoren in der Angiogenese konnten Potente et al. nachweisen, dass eine FOXO3a-Defizienz mit erhöhter eNOS-Expression sowie verbesserter Gefäßbildung und -reifung *in vivo* in einem Modell der Ischämie der Hinterpfote verbunden ist [131]. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die verschiedenen Mitglieder der Subfamilie überlappende, aber nicht identische regulatorische Funktionen in Endothelzellen ausüben. Desweiteren sind FOXO1/FOXO3/FOXO4-Nullmäuse durch die Bildung von Hämangiomen in

verschiedenen Organen als Hinweis für ein überschüssendes Gefäßwachstum charakterisiert [125].

Die Effekte der GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsachse in der Angiogenese wurden durch eine weitere Studie in endothelialen Progenitorzellen charakterisiert. Diese akkumulieren an Orten der Gefäßschädigung und partizipieren an der Gefäßneubildung [139]. Die Transduktion mit katalytisch-inaktiver GSK3 $\beta$  führte durch die Hochregulation pro-angiogener Wachstumsfaktoren, der Verbesserung des Überlebens und der verstärkten Proliferation und Differenzierung der Zellen zu einer verbesserten pro-angiogenen Potenz von endothelialen Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo*, die eine gesteigerte Angiogenese mit einer höheren Kapillardichte in einem Mausmodell der Ischämie der Hinterpfote zur Folge hatte [24]. Weitere pro-angiogene Gene, wie beispielsweise FGF, IL-8, Connexin 43 und MMP-3 wurden kürzlich als durch  $\beta$ -Catenin induziert beschrieben [105]. Kim et al. zeigten, dass  $\beta$ -Catenin eine bedeutende Funktion als Modulator der Angiogenese und Myozytenregeneration durch Induktion der Proliferation und Verbesserung der Zellviabilität sowie durch die Induktion von VEGF und die Mobilisation endothelialer Progenitorzellen besitzt [90]. Außerdem ist die defekte Angiogenese bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie mit einer geringen  $\beta$ -Catenin-Expression assoziiert [137]. Desweiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Inhibition von PDGF-DD, einem Wachstumsfaktor, der in Gebieten überschüssender Angiogenese verstärkt exprimiert wird, die Angiogenese durch die Inhibition von GSK3 $\beta$  in verschiedenen *in vivo* Modellen inhibiert [94]. Zusammenfassend bestätigen diese Studien unsere Beobachtungen, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin angiogene Effekte in Endothelzellen ausüben.

Aber nicht nur für das Blutgefäßwachstum, sondern auch für das Zellwachstum und die Entwicklung einer Hypertrophie ist die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion von Bedeutung [130]. Die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse steuert die Koordination des Blutgefäß- und Organwachstums [165]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass FOXO als downstream Substrat eine Atrophie der Skelettmuskulatur induziert [143]. Über die biologische Rolle von Forkhead-Transkriptionsfaktoren in Kardiomyozyten war bisher nichts bekannt. Aus diesen Gründen wurden die Expression, Regulation und Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren in kardialen Muskelzellen untersucht [168].

Die kardiale Hypertrophie ist durch eine Zunahme der Kardiomyozytengröße gekennzeichnet. Die Größe der kardialen Myozyten wird durch ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -degradation determiniert. In unserer Studie [168] charakterisieren wir die funktionellen Effekte von Forkhead-Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle der Expression atrogener Proteine sowie der Zellgröße in Kardiomyozyten. Alle drei Mitglieder der FOXO-Subfamilie, FOXO1, FOXO3a und FOXO4, werden in Kardiomyozyten exprimiert und über verschiedene hypertrophe Stimuli durch Phosphorylierung reguliert. Weiterhin konnten wir zeigen, dass FOXO3a als ein negativer Regulator der Kardiomyozytengröße über die Regulation eines atrogenen Gen-Expressionsprogrammes wirkt.

Die Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse stellt einen wichtigen Regulator der Herzgröße dar. Die Überexpression von IGF-1 Rezeptor [108], der PI-3-Kinase [27] oder von Akt [26, 107, 164] führen zu einer signifikanten Erhöhung der Herz:Körpergewichts-Ratio in Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einem kardiospezifischen Insulin-Rezeptor-knockout kleine Herzen aufgrund einer verringerten PI3-Kinase-Signaltransduktion [167]. Die Aktivierung dieses Signalwegs scheint eine prädominante Rolle beim physiologischen Herzwachstum zu spielen, da transgene Mäuse mit dominant-negativer PI3-Kinase (p110 $\alpha$ -Untereinheit) eine Hypertrophie nach Druckbelastung, aber nicht nach Ausdauertraining entwickeln [109]. Außerdem führt eine Überexpression von Akt in Kardiomyozyten zu einer Zellvergrößerung ohne Reorganisation der Myofibrillen oder der Expression eines fetalen Genprogramms, die bei der pathologischen Hypertrophie beobachtet werden [167]. Allerdings trägt das PI3-Kinase/Akt-Signalsystem auch zu der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie bei, da es auch bei der Druckbelastung aktiviert wird (PI3k $\gamma$ ) [93] und die chronische Überexpression von Akt suffizient für die Genese einer pathologischen Hypertrophie ist [107, 164]. Wir zeigen, dass die Regulation von FOXO-Transkriptionsfaktoren durch PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion eine bedeutende Determinante der Kardiomyozytengröße, ähnlich der Wirkung im Skelettmuskel, darstellt [81]. Verschiedene pro-hypertrophe Aktivatoren wie Wachstumsfaktoren, mechanische Dehnung, Angiotensin II und eine Druckbelastung führen zur Inaktivierung von FOXO über eine durch die PI3-Kinase vermittelte Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu bedingt eine Inhibition der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsaktivität nach Serum-Entzug eine nukleäre Translokation von FOXO3a mit assoziierter Hochregulation der atrogenen Genexpression in Muskelzellen [96, 110]. Zusätzlich zu der Beobachtung, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren downstream von Akt in Kardiomyozyten reguliert werden zeigten wir, dass die Überexpression von FOXO3a

zur aktivierenden Phosphorylierung von Akt beiträgt. Diese Daten weisen auf einen feedback-Mechanismus zwischen FOXO und Akt hin, welcher zu einer Autoinhibition von FOXO und somit zur Begrenzung seiner Aktivität führen würde. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu einem Bericht, dass die FOXO4-Überexpression in Tumorzellen zur Inhibition der Akt-Signaltransduktion führt [202].

Unsere Studie identifizierte eine Reihe potentieller transkriptioneller Zielgene der Akt/FOXO-Signaltransduktion im Herzen, die an der Verminderung der kardialen Muskelmasse beteiligt sind. Diese Proteine umfassen den Ubiquitinierungsfaktor E4B, die E3 Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1/MAFbx und MuRF-1, welche den proteosomalen Abbau von Proteinen steuern, Cathepsin L, welches den lysosomalen Abbau reguliert, und insulin growth factor binding protein 5 (Igfbp5). Diese Genprodukte werden im Rahmen einer Skelettmuskelatrophie in einer koordinierten Weise induziert bzw. im Fall von Igfbp5 herunterreguliert [81, 140, 143]. Atrogin-1 wird im Skelettmuskel während Hungerns [61], Sepsis [200], Niereninsuffizienz, Kachexie [61] und Denervation [9] induziert. Atrogin-1-Nullmäuse weisen einen geringeren Muskelmassenverlust nach Denervation auf, und beide Ubiquitin-Ligasen werden durch FOXO1 und FOXO3a im Skelettmuskel hochreguliert [143, 174]. Interessanterweise war die Regulation des Ubiquitinierungsfaktors E4B, welcher zusammen mit E3-Ligasen die Erhöhung der Ubiquitinierungseffizienz steuert [69], mit der Hochregulation von Atrogin-1 und MuRF assoziiert. Cathepsin L stellt eine lysosomale Cystein-Protease dar. Obwohl der lysosomale Proteinabbau eine limitierte Rolle bei der Proteolyse intrazellulärer Proteine spielt, wird Cathepsin L im Skelettmuskel von Nagetieren in der Sepsis und während Nahrungsentzugs induziert, was für eine Rolle beim Abbau extrazellulärer Komponenten während der Atrophie spricht [37]. Igfbp5 moduliert die Antwort auf eine IGF-1-Stimulation [156] und wird während der Skelettmuskelatrophie dramatisch herunterreguliert [96]. Die Ergebnisse transgener Mausmodelle zeigen, dass das Protein ein transkriptionelles „Target“ von FOXO1 sein könnte [85]. Zusammenfassend weisen diese Daten nach, dass die Akt/FOXO3a-Signaltransduktionsachse transkriptionelle Veränderungen im Herzen in Analogie zu den transkriptionellen Veränderungen bei der Skelettmuskelatrophie induziert und somit ähnliche Mechanismen der Reduktion der Zellgröße in beiden Zellsystemen existieren. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Atrogin-1 im Herzen exprimiert wird und die Calcineurin-abhängige Hypertrophie durch Ubiquitin vermittelte Proteolyse von Calcineurin selbst inhibiert [97]. Die durch IGF-1 und durch Calcineurin induzierte Hypertrophie wird über getrennte Signaltransduktionswege vermittelt [197]. Unsere Ergebnisse [168] und die Daten

von Li et. al [97] implizieren allerdings, dass Atrogin-1 als gemeinsamer negativer Regulator der kardialen Hypertrophie diese beiden Signaltransduktionswege verbindet. In diesem Modell bedingt eine Verminderung der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion die durch FOXO vermittelte Hochregulation von Atrogin-1 mit assoziiertem proteolytischem Abbau von Calcineurin im Atrogin-1/SCF/Ubiquitin-Ligase-Komplex. Die durch NFAT vermittelte Hypertrophie wäre somit unter Bedingungen einer Reduktion der Akt-Aktivierung in diesen Herzen nicht wirksam. Zusammenfassend charakterisieren unsere Daten die FOXO-Transkriptionsfaktoren als negative Regulatoren der kardialen Hypertrophie, welche wahrscheinlich eine wichtige Rolle am „reversen Remodeling“ während der Unterstützung mit LVADs [127], der Behandlung der Hypertrophie [38] und bei Hungerzuständen sowie Gewichtsverlust [167] spielen. Aufgrund des erhöhten Risikos für den plötzlichen Herztod oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, welches mit einer exzessiven Hypertrophie assoziiert ist, kann die weitere Erforschung der Rolle von FOXO der Entwicklung neuer therapeutischer Interventionen dienen.

Neben den Effekten der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion auf die Angiogenese und das kardiale Remodeling bestehen direkte metabolische Wirkungen. So steht die transkriptionelle Regulation von Adiponectin, einem Adipozytokin mit bedeutenden kardiovaskulären Effekten, unter FOXO-Kontrolle [117]. Adiponectin übt durch die Aktivierung von Akt in Endothelzellen pro-angiogene Effekte *in vitro* [123] und in einem Mausmodell der ischämischen Hinterpfote *in vivo* [160] aus. Außerdem besitzt das Adipozytokin durch die Freisetzung und Induktion der Differenzierung endothelialer Progenitorzellen eine pro-angiogene Wirkung [162]. Adiponectin steigert die Insulinsensitivität über eine Akt-Aktivierung und inhibiert das kardiale Remodeling [159]. Im Rahmen einer klinischen Studie, welche die kardiale Expression des Zytokins und deren Effekte bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) charakterisierte, wurden auch upstream Effekte auf die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse untersucht. Die Adiponectin-Expression im Herzmuskel war bei Patienten mit einer dilatativer Kardiomyopathie herunterreguliert. Um die funktionellen Effekte dieser Beobachtung aufzuklären, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit Adiponectin inkubiert. Adiponectin führte zu einer Aktivierung von PKB/Akt und eNOS in einer dosis- und zeitabhängigen Art und Weise. Eine erhöhte NO-Synthese durch die Stimulation der AMPK/Akt/eNOS-Signaltransduktion konnte in Endothelzellen beobachtet werden [123]. Die Proteinexpression von eNOS bei der DCM ist herunterreguliert [31] und die kardiospezifische Überexpression von eNOS verbessert die linksventrikuläre

Pumpfunktion, limitiert das linksventrikuläre Remodeling und reduziert die Entwicklung einer Hypertrophie in einem Mausmodell der Herzinsuffizienz [82]. Desweiteren wird durch eine chronische Druckbelastung in eNOS-Nullmäusen eine exzentrische Hypertrophie mit einer diastolischen und systolischen Dysfunktion induziert [75]. Klinisch konnte im American African Heart Failure Trial gezeigt werden, dass ein NO-Donor die Mortalität von Patienten mit einer Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III-IV signifikant senken kann [185]. Letztendlich schützt NO das Endothel vor Dysfunktion, welche charakteristischerweise bei der Herzinsuffizienz auftritt. Zusammenfassend könnte Adiponectin über die Stimulation der NO-Synthese das linksventrikuläre Remodeling und die endotheliale Dysfunktion bei der DCM positiv beeinflussen.

Außerdem inhibierte Adiponectin in unserer Studie die stressinduzierte Apoptose durch die Aktivierung von Akt. Verschiedene Studien unterstützen die These, dass der apoptotische Zelltod eine Rolle in der Pathogenese der DCM spielt und dass die Inhibition der kardialen Apoptose die linksventrikuläre Funktion verbessert [49]. Die Administration von IGF-1, einem upstream Aktivator des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges, reduziert die myokardiale Apoptose nach Ischämie und Reperfusion in Ratten [15] und wirkt als Überlebensfaktor in kardialen Myozyten [196]. Der zytoprotektive Effekt von IGF-1 kann durch die Transduktion der Zellen mit einer dominant-negativen Form von Akt blockiert werden, während konstitutiv-aktives Akt Kardiomyozyten vor einer Apoptose bei Fehlen von IGF-1 im Medium schützt [54, 106]. Der Gentransfer von konstitutiv-aktivem Akt inhibiert die kardiale Apoptose sowie die linksventrikuläre Dysfunktion nach Doxorubicin-Applikation [183]. Die Aktivierung von Akt durch Adiponectin, welche die Apoptose in Kardiomyozyten nach verlängertem Mitogenentzug und nach Doxorubicin-Inkubation *in vitro* inhibierte, könnte einer der Mechanismen sein, mit denen Adiponectin die Apoptose und kontraktile Dysfunktion in Patienten mit DCM vermindert. Weiterhin wirkt Adiponectin über durch ERK vermittelte Mechanismen anti-hypertroph [159]. Aufgrund seines pro-angiogenen, anti-apoptotischen und anti-hypertrophen Wirkungsspektrums stellt die Beeinflussung der Adiponectin-Expression einen interessanten Ansatz in der Therapie der DCM dar.

Zusammenfassend besitzt die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsachse einen bedeutenden Einfluss auf das Zellwachstum. Wie in Endothelzellen reguliert Akt auch in kardialen Muskelzellen die Forkhead-Transkriptionsfaktoren. In Kardiomyozyten steht die Expression eines atrogenen Genprogramms unter FOXO-Kontrolle. Eine FOXO-Aktivierung führt über die Expression von Ubiquitin-Ligasen



zum proteosomalen Abbau verschiedener intrazellulärer Proteine und über einen positiven feedback-Mechanismus zur Inaktivierung der Forkhead-Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang zeigen kürzlich publizierte Studien, dass Atrogin-1 über eine Ubiquitinierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren deren transkriptionelle Aktivierung erhöht und die Wachstumsfaktor/PI3K/Akt-abhängige Phosphorylierung von FOXO3a inhibiert [98]. Somit besteht neben dem negativen, von uns beschriebenen feedback-Mechanismus der FOXO induzierten Akt-Aktivierung ein zweiter Regulationsmechanismus der zum gesteigerten Proteinabbau führt [154]. Die Aufklärung der Regulation und Funktion der E3-Ubiquitin Ligasen Atrogin-1 und MuRF könnte aufgrund der Steuerung verschiedener zellulärer Prozesse zukünftig therapeutisch genutzt werden [198].

FOXO induziert auch die Expression von Adiponectin, welches seinerseits Akt und eNOS upstream aktiviert und den apoptotischen Zelltod in Akt-abhängiger Weise in Kardiomyozyten inhibiert. Aufgrund der Bedeutung der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion für die Koordination des kardialen Organwachstums und der Angiogenese stellen FOXO-Transkriptionsfaktoren neue interessante Substrate, welche als Stellfaktoren dieser physiologischen Prozesse dienen, dar. Die Imbalance zwischen Myozytenwachstum und der Angiogenese wurde als eine kritische Determinante der kardialen Funktion charakterisiert und spielt eine bedeutende Rolle beim Übergang einer adaptiven Hypertrophie in eine kardiale Dekompensation. Die weitere Aufklärung der PI3K/Akt-Signaltransduktion und der Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren könnte den Weg zur Einführung neuer anti-hypertropher und pro-angiogener Therapien bei der Herzinsuffizienz ebnen.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Relevanz und downstream Substrate des PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges in Endothelzellen und kardialen Myozyten sowie deren funktionelle Effekte untersucht. Sowohl für GSK3 $\beta$  als auch für FOXO3a lagen bislang keine Untersuchungen in Endothelzellen, und für FOXO-Transkriptionsfaktoren keine Daten in Kardiomyozyten vor.

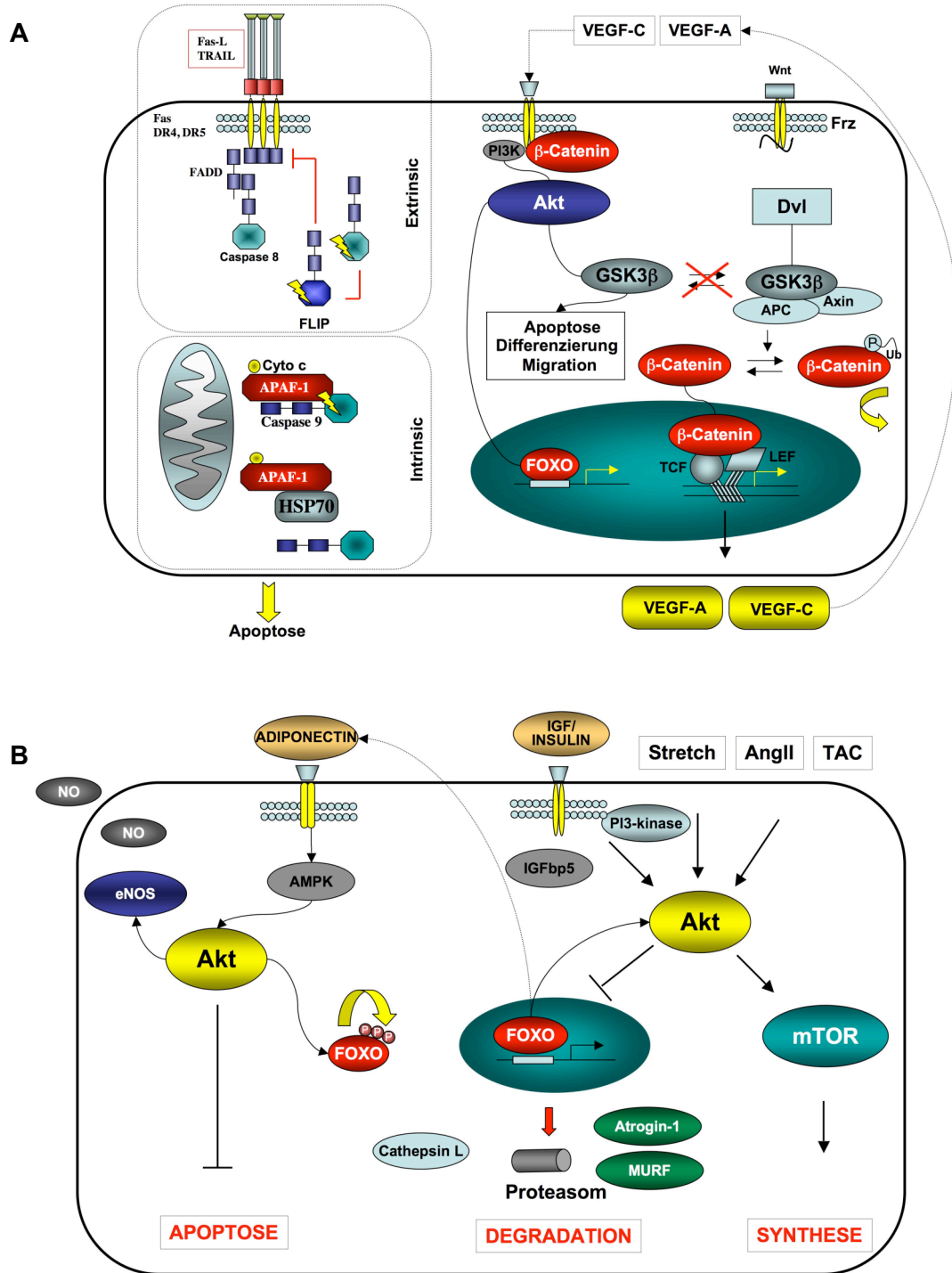
Die Ergebnisse zeigen, dass GSK3 $\beta$  in Endothelzellen in verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlicher funktioneller Signifikanz nachweisbar ist. Der Wachstumsfaktor/PI3-Kinase-Akt-Signaltransduktionsweg inaktiviert GSK3 $\beta$  durch Phosphorylierung am Serin-9. Hierdurch werden teilweise die pro-angiogenen Effekte von Akt über eine verbesserte Migration und eine verminderte Apoptose der Endothelzellen unabhängig von eNOS vermittelt. Desweiteren existiert ein GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin/TCF/LCF-Signaltransduktionsweg, der jedoch upstream von Proteinkinase B/Akt das Gefäßwachstum über die transkriptionelle Aktivierung von VEGF-A und -C moduliert und eine bedeutende Rolle in der Angiogenese spielt (Abb. 5).

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Aufklärung der Regulation und der funktionellen Effekte von FOXO3a in Endothelzellen dar. Wir konnten zeigen, dass FOXO3a durch den Wachstumsfaktor/PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg in Endothelzellen reguliert wird und als ein wichtiger Modulator des zellspezifischen apoptotischen Zelltodes via Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges fungiert (Abb. 5), was dafür spricht, dass der Transkriptionsfaktor am vaskulären Remodeling nach Zellschädigung und in der postnatalen Angiogenese beteiligt ist. Unsere Ergebnisse konnten in nachfolgenden Studien bestätigt werden. Potente et. al zeigten, dass FOXO3a durch die Inhibition der eNOS-Expression in Endothelzellen anti-angiogen wirkt und auch die Angiogenese *in vivo* reguliert [131]. Desweiteren konnten wir in zusätzlichen Untersuchungen nachweisen, dass die Restenose nach vaskulärer Schädigung durch FOXO3a inhibiert wird [128].

Die Rolle von Forkhead-Transkriptionsfaktoren wurde auch in Kardiomyozyten untersucht. Wir konnten zeigen, dass sowohl FOXO1, als auch FOXO3a und FOXO4 in kardialen Myozyten der Kontrolle durch die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion unterliegen. Verschiedene hypertrophe Stimuli wie Angiotensin II, IGF, Insulin, Noadrenalin und eine Druckbelastung sowie mechanische Dehnung

fürten zur Inaktivierung der Forkhead-Transkriptionsfaktoren. Die Überexpression von FOXO3a induzierte die Expression eines atrogenen Genprogramms (Abb. 5). Die Ergebnisse weisen auf eine Rolle von Forkhead-Transkriptionsfaktoren beim „reversen Remodeling“, wie es beispielsweise beim mechanischen Unloading nach Implantation linksventrikulärer Assisstsyste, nach Klappenersatz, bei der Kachexie, und Implantation biventrikulärer Schrittmachersysteme oder auch der Behandlung einer arteriellen Hypertrophie zu beobachten ist, hin. Desweiteren identifizierten sie die durch FOXO induzierte Expression von Atrogin-1 als gemeinsamen Antagonist der physiologischen und pathologischen Hypertrophie. Hier sind weitere Studien gerade auch über den Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf das Matrixremodeling dringend geboten. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass grundsätzlich gleiche Signaltransduktionswege eine Atrophie im Skelett- und Herzmuskel induzieren [143, 168].

Letztendlich wurden die Effekte von Adiponectin, eines Adipozytokins, dessen Expression durch FOXO induziert wird, untersucht. Adiponectin bindet über seine Rezeptoren an kardiale Zellen, um über AMPK die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion zu aktivieren. In einer klinischen Studie konnten wir zeigen, dass Adiponectin Akt in kardialen Myozyten aktiviert und die stressinduzierte Apoptose in diesen Zellen inhibiert (Abb. 5). Die Herunterregulation der lokalen kardialen Adiponectinexpression könnte somit ein Faktor im Fortschreiten der dilatativen Kardiomyopathie darstellen. Desweiteren konnten wir in nachfolgenden Untersuchungen nachweisen, dass Adiponectin durch die Aktivierung von PKB/Akt in Endothelzellen pro-angiogene Effekte besitzt und die Freisetzung und Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen reguliert [162]. Aufgrund dieses Wirkungsspektrums wäre ein therapeutischer Einsatz bei der Erkrankung sinnvoll.



**Abb. 5: PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion in Endothelzellen und Kardiomyozyten**

A) In Endothelzellen bedingt eine mitogene Stimulation durch Wachstumsfaktoren die Aktivierung von PI3K/Akt. Akt phosphoryliert und inaktiviert GSK-3β. Dadurch werden bedeutende Prozesse der angiogenen Antwort wie Inhibition der Apoptose, Förderung der Migration und Differenzierung der Zellen in einen angiogenen Phänotyp vermittelt. Im Axin-APC-Komplex befindliche GSK3β stellt kein Substrat für Akt dar. β-Catenin rekrutiert PI-3-Kinase an den VEGF-R2 und erleichtert die PI-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion. Desweiteren bindet es im Nukleus an TCF/LEF und induziert die Expression von VEGF-A und VEGF-C, potenter Induktoren der Angiogenese. FOXO3a transloziert in Abwesenheit von mitogenen Faktoren in den Nukleus und inhibiert die Expression von FLIP. Die hierdurch induzierte Caspase-8-Aktivierung führt im Rahmen eines Circulus vitiosus zur proteolytischen Spaltung von FLIP und zur Apoptoseinduktion über den extrinsischen Weg. FOXO reguliert auch

HSP70, so dass via Oligomerisierung von APAF-1 mit Cytochrom c Caspase-9 im intrinsischen Apoptoseweg aktiviert wird. Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren aktiviert Akt und wirkt über die verbesserte Zellviabilität pro-angiogen.

B) In Kardiomyozyten wird die FOXO-Aktivität durch multiple Stimuli wie Mitogene (IGF-1, Insulin, Adiponectin), Angiotensin II, Adrenalin, Dehnung und eine Druckbelastung über eine PI3-Kinase/Akt-abhängige Signaltransduktion reguliert. Die Aktivierung der FOXO-Genexpression führt zur Expression eines atrogenen Genprogramms (Induktion von Atrogin-1, MuRF und Repression von Igfbp5). Hierdurch wird das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese (vermittelt durch mTOR) und Proteindegradation (FOXO) zu Gunsten des Proteinabbaus verschoben. FOXO führt über die retrograde Aktivierung von Akt und die Freisetzung von Adiponectin verbunden mit AMPK/Akt-Signaltransduktion zur Inhibition seiner Aktivität (negativer feedback-loop).

**5. LITERATURANGABEN**

1. Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC (2005) Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115:2119-2127
2. Amaral SL, Papanek PE, Greene AS (2001) Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *American journal of physiology* 281:H1163-1169
3. Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5699-5704
4. Aoudjit F, Vuori K (2001) Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *The Journal of cell biology* 152:633-643
5. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology* 2:469-475
6. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeyer H, Severson D, Kahn CR, Abel ED (2002) Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *The Journal of clinical investigation* 109:629-639
7. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science (New York, N.Y)* 254:274-277
8. Benjamin LE, Keshet E (1997) Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:8761-8766
9. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, N.Y)* 294:1704-1708
10. Bourguignon C, Li J, Papalopulu N (1998) XBF-1, a winged helix transcription factor with dual activity, has a role in positioning neurogenesis in *Xenopus* competent ectoderm. *Development (Cambridge, England)* 125:4889-4900
11. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA (1994) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164
12. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868
13. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and cellular biology* 21:952-965

14. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, N.Y)* 303:2011-2015
15. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM (1995) Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8031-8035
16. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K (1998) Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14389-14394
17. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, N.Y)* 282:1318-1321
18. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertszenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439
19. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147-157
20. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, Kemler R, Dejana E (2003) The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *The Journal of cell biology* 162:1111-1122
21. Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation* 103:2102-2107
22. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* 15:2203-2208
23. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276:38349-38352
24. Choi JH, Hur J, Yoon CH, Kim JH, Lee CS, Youn SW, Oh IY, Skurk C, Murohara T, Park YB, Walsh K, Kim HS (2004) Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3beta activity. *The Journal of biological chemistry* 279:49430-49438
25. Cohen P, Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nature reviews* 2:769-776
26. Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico MV, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM, Ross J, Jr. (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility

- and cell size in vivo in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12333-12338
27. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM (2002) Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110:737-749
  28. Crisostomo LL, Araujo LM, Camara E, Carvalho C, Silva FA, Vieira M, Rabelo A, Jr. (1999) Comparison of left ventricular mass and function in obese versus nonobese women <40 years of age. *The American journal of cardiology* 84:1127-1129, A1111
  29. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789
  30. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721-732
  31. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 363:1365-1367
  32. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13:2905-2927
  33. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241
  34. de Simone G, Scalfi L, Galderisi M, Celentano A, Di Biase G, Tammaro P, Garofalo M, Mureddu GF, de Divitiis O, Contaldo F (1994) Cardiac abnormalities in young women with anorexia nervosa. *British heart journal* 71:287-292
  35. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM (2004) Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 145:5589-5597
  36. Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore ML, Stepkowski S, Davies PJ, Taegtmeyer H (1998) Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 4:1269-1275
  37. Deval C, Mordier S, Obled C, Bechet D, Combaret L, Attaix D, Ferrara M (2001) Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *The Biochemical journal* 360:143-150
  38. Devereux RB, Wachtell K, Gerds E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, Rokkedal J, Harris K, Aurup P, Dahlof B (2004) Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *Jama* 292:2350-2356
  39. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2002) FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *The Journal of cell biology* 156:531-542
  40. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10:1201-1204
  41. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS letters* 477:258-262



42. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605
43. Ding VW, Chen RH, McCormick F (2000) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  by insulin and Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 275:32475-32481
44. Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current opinion in cell biology* 10:262-267
45. Duplaa C, Jaspard B, Moreau C, D'Amore PA (1999) Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circulation research* 84:1433-1445
46. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 68:383-424
47. Efstratiadis A (1998) Genetics of mouse growth. *The International journal of developmental biology* 42:955-976
48. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA (2002) Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105:85-92
49. Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005) Death begets failure in the heart. *The Journal of clinical investigation* 115:565-571
50. Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* 359:1-16
51. Frame S, Cohen P, Biondi RM (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell* 7:1321-1327
52. Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* 65:45-79
53. Freyaldenhoven BS, Freyaldenhoven MP, Iacovoni JS, Vogt PK (1997) Avian winged helix proteins CWH-1, CWH-2 and CWH-3 repress transcription from Qin binding sites. *Oncogene* 15:483-488
54. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000) Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101:660-667
55. Fujio Y, Walsh K (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 274:16349-16354
56. Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME (2001) Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *The Journal of biological chemistry* 276:17479-17483
57. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* 273:30336-30343
58. Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science (New York, N.Y.)* 305:361
59. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* 12:502-513

60. Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, VanBruggen N, Bunting S, Ruiz-Lozano P, Gu Y, Nath AK, Huang Y, Hickey R, Dalton N, Peterson KL, Ross J, Jr., Chien KR, Ferrara N (2001) A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5780-5785
61. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:14440-14445
62. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science (New York, N.Y)* 274:1363-1366
63. Hall JL, Chatham JC, Eldar-Finkelman H, Gibbons GH (2001) Upregulation of glucose metabolism during intimal lesion formation is coupled to the inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis. Role of GSK3beta. *Diabetes* 50:1171-1179
64. Hall RA, Lefkowitz RJ (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circulation research* 91:672-680
65. Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S (2002) Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *The Journal of cell biology* 158:529-539
66. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91-96
67. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkentin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, Force T (2000) Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of cell biology* 151:117-130
68. Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B, Woodgett J, Kilter H, Force T (2003) Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4610-4615
69. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of biological chemistry* 276:33111-33120
70. Hemmings BA (1997) Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science (New York, N.Y)* 275:628-630
71. Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM (2000) Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* 101:2863-2869
72. Himeno E, Nishino K, Nakashima Y, Kuroiwa A, Ikeda M (1996) Weight reduction regresses left ventricular mass regardless of blood pressure level in obese subjects. *American heart journal* 131:313-319
73. Holthoner W, Pillinger M, Groger M, Wolff K, Ashton AW, Albanese C, Neumeister P, Pestell RG, Petzelbauer P (2002) Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277:45847-45853
74. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC (2004) I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117:225-237

75. Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M (2004) Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. *American journal of physiology* 286:H1070-1075
76. Imanishi T, McBride J, Ho Q, O'Brien KD, Schwartz SM, Han DK (2000) Expression of cellular FLICE-inhibitory protein in human coronary arteries and in a rat vascular injury model. *The American journal of pathology* 156:125-137
77. Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoop J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195
78. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH (1989) Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338:557-562
79. Izumiya Y, Shiojima I, Sato K, Sawyer DB, Colucci WS, Walsh K (2006) Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension* 47:887-893
80. Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *The Journal of biological chemistry* 278:35959-35967
81. Jagoe RT, Lecker SH, Gomes M, Goldberg AL (2002) Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *Faseb J* 16:1697-1712
82. Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD (2004) Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation research* 94:1256-1262
83. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal* 15:290-298
84. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development* 14:142-146
85. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O (2004) Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *The Journal of biological chemistry* 279:41114-41123
86. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385:544-548
87. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & development* 11:701-713
88. Kim HS, Skurk C, Maatz H, Shiojima I, Ivashchenko Y, Yoon SW, Park YB, Walsh K (2005) Akt/FOXO3a signaling modulates the endothelial stress response through regulation of heat shock protein 70 expression. *Faseb J* 19:1042-1044

89. Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF, Jr., Walsh K (2002) Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *The Journal of biological chemistry* 277:41888-41896
90. Kim KI, Cho HJ, Hahn JY, Kim TY, Park KW, Koo BK, Shin CS, Kim CH, Oh BH, Lee MM, Park YB, Kim HS (2006) Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:91-98
91. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 271:31372-31378
92. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316-321
93. Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR (2003) Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *The Journal of biological chemistry* 278:39422-39427
94. Kumar A, Hou X, Lee C, Li Y, Maminishkis A, Tang Z, Zhang F, Langer HF, Arjunan P, Dong L, Wu Z, Zhu LY, Wang L, Min W, Colosi P, Chavakis T, Li X PDGF-DD targeting arrests pathological angiogenesis by modulating glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3{beta}) phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*
95. LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS, Hembrough WA, Green SJ, Pribluda VS (2003) 2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway. *Cancer research* 63:468-475
96. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* 18:39-51
97. Li HH, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang DZ, Patterson C (2004) Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation* 114:1058-1071
98. Li HH, Willis MS, Lockyer P, Miller N, McDonough H, Glass DJ, Patterson C (2007) Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *The Journal of clinical investigation* 117:3211-3223
99. Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology* 20:9356-9363
100. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine* 8:1153-1160
101. Lum JJ, Bui T, Gruber M, Gordan JD, DeBerardinis RJ, Covello KL, Simon MC, Thompson CB (2007) The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & development* 21:1037-1049
102. Luo J, McMullen JR, Sobkiw CL, Zhang L, Dorfman AL, Sherwood MC, Logsdon MN, Horner JW, DePinho RA, Izumo S, Cantley LC (2005) Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biology* 25:9491-9502

103. Maehama T, Taylor GS, Dixon JE (2001) PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annual review of biochemistry* 70:247-279
104. Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, Volpin D, Bressan GM, Piccolo S (2003) Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:3299-3304
105. Masckauchan TN, Kitajewski J (2006) Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. *Physiology (Bethesda, Md)* 21:181-188
106. Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A (1999) Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation* 100:2373-2379
107. Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A (2002) Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* 277:22896-22901
108. McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *The Journal of biological chemistry* 279:4782-4793
109. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S (2003) Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12355-12360
110. Mitch WE, Goldberg AL (1996) Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *The New England journal of medicine* 335:1897-1905
111. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry* 277:47928-47937
112. Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J (2001) Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 276:28586-28597
113. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* 20:7146-7159
114. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116:551-563
115. Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science (New York, N.Y)* 267:1449-1456
116. Nakae J, Biggs WH, 3rd, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CV, Arden KC, Accili D (2002) Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nature genetics* 32:245-253
117. Nakae J, Cao Y, Oki M, Orba Y, Sawa H, Kiyonari H, Iskandar K, Suga K, Lombes M, Hayashi Y (2008) Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. *Diabetes* 57:563-576

118. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *The Journal of clinical investigation* 108:1359-1367
119. Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U, Vestweber D (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *The EMBO journal* 21:4885-4895
120. Nemoto S, Finkel T (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science (New York, N.Y)* 295:2450-2452
121. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389:994-999
122. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW (1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* 272:24735-24738
123. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 279:1304-1309
124. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH (2004) The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37:449-471
125. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA (2007) FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128:309-323
126. Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 276:6893-6896
127. Papadimitriou JM, Hopkins BE, Taylor RR (1974) Regression of left ventricular dilation and hypertrophy after removal of volume overload. Morphological and ultrastructural study. *Circulation research* 35:127-135
128. Park KW, Kim DH, You HJ, Sir JJ, Jeon SI, Youn SW, Yang HM, Skurk C, Park YB, Walsh K, Kim HS (2005) Activated forkhead transcription factor inhibits neointimal hyperplasia after angioplasty through induction of p27. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:742-747
129. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118:375-387
130. Pham FH, Cole SM, Clerk A (2001) Regulation of cardiac myocyte protein synthesis through phosphatidylinositol 3' kinase and protein kinase B. *Advances in enzyme regulation* 41:73-86
131. Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A, Kollipara R, DePinho RA, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation* 115:2382-2392
132. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell* 2:81-91

133. Razeghi P, Sharma S, Ying J, Li YP, Stepkowski S, Reid MB, Taegtmeyer H (2003) Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. *Circulation* 108:2536-2541
134. Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* 274:17179-17183
135. Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastry BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME (2002) Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nature genetics* 32:326-330
136. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415:206-212
137. Roura S, Planas F, Prat-Vidal C, Leta R, Soler-Botija C, Carreras F, Llach A, Hove-Madsen L, Pons Llado G, Farre J, Cinca J, Bayes-Genis A (2007) Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation. *Eur J Heart Fail* 9:995-1002
138. Ruel L, Stambolic V, Ali A, Manoukian AS, Woodgett JR (1999) Regulation of the protein kinase activity of Shaggy(Zeste-white3) by components of the wingless pathway in *Drosophila* cells and embryos. *The Journal of biological chemistry* 274:21790-21796
139. Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E (2004) Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *Journal of cellular and molecular medicine* 8:509-518
140. Sackey JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL (2004) IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E591-601
141. Sadot E, Simcha I, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B (1998) Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15339-15344
142. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature cell biology* 2:476-483
143. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412
144. Sano M, Schneider MD (2002) Still stressed out but doing fine: normalization of wall stress is superfluous to maintaining cardiac function in chronic pressure overload. *Circulation* 105:8-10
145. Sata M, Perlman H, Muruve DA, Silver M, Ikebe M, Libermann TA, Oettgen P, Walsh K (1998) Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1213-1217
146. Sata M, Suhara T, Walsh K (2000) Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas ligand and in sensitivity to Fas ligand-induced cell death: implications for vascular disease and therapy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20:309-316
147. Sata M, Walsh K (1998) Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *The Journal of biological chemistry* 273:33103-33106
148. Sata M, Walsh K (1998) Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 102:1682-1689

149. Sata M, Walsh K (1998) TNF $\alpha$  regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nature medicine* 4:415-420
150. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274:1541-1548
151. Schafer R, Abraham D, Paulus P, Blumer R, Grimm M, Wojta J, Aharinejad S (2003) Impaired VE-cadherin/beta-catenin expression mediates endothelial cell degeneration in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 108:1585-1591
152. Scheid MP, Woodgett JR (2001) PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nature reviews* 2:760-768
153. Scheuer J, Malhotra A, Hirsch C, Capasso J, Schaible TF (1982) Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *The Journal of clinical investigation* 70:1300-1305
154. Schisler JC, Willis MS, Patterson C (2008) You spin me round: MafBx/Atrogin-1 feeds forward on FOXO transcription factors (like a record). *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7:440-443
155. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and cellular biology* 22:7842-7852
156. Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, Lahm H (2002) IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *The Journal of endocrinology* 172:423-440
157. Seidman JG, Seidman C (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104:557-567
158. Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF (1998) Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *The Journal of biological chemistry* 273:29979-29985
159. Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K (2004) Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nature medicine* 10:1384-1389
160. Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* 279:28670-28674
161. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nature medicine* 11:1096-1103
162. Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K (2008) Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS letters* 582:1607-1612
163. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *The EMBO journal* 19:2537-2548
164. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S (2002) Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 22:2799-2809
165. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K (2005) Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis



- contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation* 115:2108-2118
166. Shiojima I, Walsh K (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation research* 90:1243-1250
167. Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED, Walsh K (2002) Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *The Journal of biological chemistry* 277:37670-37677
168. Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, Sato K, Zeng L, Schiekofer S, Pimentel D, Lecker S, Taegtmeyer H, Goldberg AL, Walsh K (2005) The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *The Journal of biological chemistry* 280:20814-20823
169. Skurk C, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC, Walsh K (2004) The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *The Journal of biological chemistry* 279:1513-1525
170. Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K (2005) Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation research* 96:308-318
171. Skurk C, Walsh K (2004) Death receptor induced apoptosis: a new mechanism of homocysteine-mediated endothelial cell cytotoxicity. *Hypertension* 43:1168-1170
172. Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W (2008) Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *European heart journal* 29:1168-1180
173. Staal SP (1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5034-5037
174. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* 14:395-403
175. Stocker H, Hafen E (2000) Genetic control of cell size. *Current opinion in genetics & development* 10:529-535
176. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of cell biology* 155:459-470
177. Suhara T, Kim HS, Kirshenbaum LA, Walsh K (2002) Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Molecular and cellular biology* 22:680-691
178. Suhara T, Mano T, Oliveira BE, Walsh K (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circulation research* 89:13-19
179. Takahashi A, Kureishi Y, Yang J, Luo Z, Guo K, Mukhopadhyay D, Ivashchenko Y, Branellec D, Walsh K (2002) Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Molecular and cellular biology* 22:4803-4814
180. Takahashi H, Konishi H, Matsuzaki H, Ono Y, Shirai Y, Saito N, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Kikkawa U, Nishizuka Y (1999) Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:11836-11841
181. Tan PB, Lackner MR, Kim SK (1998) MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during *C. elegans* vulval induction. *Cell* 93:569-580
  182. Tang TT, Dowbenko D, Jackson A, Toney L, Lewin DA, Dent AL, Lasky LA (2002) The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *The Journal of biological chemistry* 277:14255-14265
  183. Taniyama Y, Walsh K (2002) Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34:1241-1247
  184. Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffey PJ, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138:2005-2010
  185. Taylor AL (2005) The African American Heart Failure Trial: a clinical trial update. *The American journal of cardiology* 96:44-48
  186. Thiele A, Wasner M, Muller C, Engeland K, Hauschildt S (2001) Regulation and possible function of beta-catenin in human monocytes. *J Immunol* 167:6786-6793
  187. Thomas G, Hall MN (1997) TOR signalling and control of cell growth. *Current opinion in cell biology* 9:782-787
  188. Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783
  189. Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA (1982) Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation research* 51:295-304
  190. Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, Jr., DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science (New York, N.Y)* 296:530-534
  191. Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S (1999) Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Molecular and cellular biology* 19:7420-7427
  192. Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, Birnbaum MJ (1999) Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nature cell biology* 1:500-506
  193. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP (2002) Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nature medicine* 8:349-357
  194. Walsh K, Smith RC, Kim HS (2000) Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circulation research* 87:184-188
  195. Wang JC, Waltner-Law M, Yamada K, Osawa H, Stifani S, Granner DK (2000) Transducin-like enhancer of split proteins, the human homologs of *Drosophila* groucho, interact with hepatic nuclear factor 3beta. *The Journal of biological chemistry* 275:18418-18423
  196. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH (1998) Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circulation research* 83:516-522
  197. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkenin JD (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation research* 94:110-118

198. Willis MS, Schisler JC, Patterson C (2008) Appetite for destruction: E3 ubiquitin-ligase protection in cardiac disease. *Future cardiology* 4:65-75
199. Witzensichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, Isner JM (1998) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *The American journal of pathology* 153:381-394
200. Wray CJ, Mammen JM, Hershko DD, Hasselgren PO (2003) Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35:698-705
201. Wright M, Aikawa M, Szeto W, Papkoff J (1999) Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 263:384-388
202. Yang H, Zhao R, Yang HY, Lee MH (2005) Constitutively active FOXO4 inhibits Akt activity, regulates p27 Kip1 stability, and suppresses HER2-mediated tumorigenicity. *Oncogene* 24:1924-1935
203. Yang J, Jones SP, Suhara T, Greer JJ, Ware PD, Nguyen NP, Perlman H, Nelson DP, Lefer DJ, Walsh K (2003) Endothelial cell overexpression of fas ligand attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart. *The Journal of biological chemistry* 278:15185-15191
204. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396:584-587
205. Yao J, Lai E, Stifani S (2001) The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription. *Molecular and cellular biology* 21:1962-1972
206. Yuan H, Mao J, Li L, Wu D (1999) Suppression of glycogen synthase kinase activity is not sufficient for leukemia enhancer factor-1 activation. *The Journal of biological chemistry* 274:30419-30423
207. Zafeiridis A, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB (1998) Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation* 98:656-662
208. Zhang F, Cheng J, Hackett NR, Lam G, Shido K, Pergolizzi R, Jin DK, Crystal RG, Rafii S (2004) Adenovirus E4 gene promotes selective endothelial cell survival and angiogenesis via activation of the vascular endothelial-cadherin/Akt signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 279:11760-11766
209. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research* 61:6050-6054
210. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology* 3:245-252

## 6. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Walsh, der mir ermöglichte, meine experimentellen Arbeiten eigenständig durchzuführen. Neben der umfangreichen wissenschaftlichen Förderung und molekularbiologischen Ausbildung schaffte er ein Umfeld, welches mich beruflich und persönlich bereicherte. Desweiteren danke ich Henrike Maatz, die mich bei meiner Arbeit in Boston tatkräftig unterstützte und der ich noch immer in Freundschaft verbunden bin.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Schultheiss, der mich nach meiner Rückkehr aus den USA beim Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe unterstützte und ermunterte, eigenständig meinen klinischen und weiteren wissenschaftlichen Werdegang zu gestalten.

Und natürlich möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Jenny Stehr und Alexander Jenke, für die Unterstützung bei den bisherigen Forschungsprojekten wie auch beim Vorantreiben anstehender Vorhaben bedanken.

Letztlich wäre die vorliegende Arbeit ohne die Geduld und die Hilfe meiner Eltern, meines Bruders und meiner Freundin Ulli in dieser Form nicht entstanden.

**7. ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
  
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
  
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

06.06.2010

Dr. med. C. Skurk