hainvie fixin HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Isoform-spezifische Funktionen der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annika Raupach

Tönisvorst

Düsseldorf, November 2010

aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:Prof. Dr. Axel GödeckeKoreferent:Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung	1
	1.1	Proteinkinase Akt	2
	1.1.1	Isoformen von Akt	4
	1.1.2	Aktivierung von Akt durch den PI3K Signalweg	5
	1.1.3	Inaktivierung von Akt	8
	1.2	Kardiale Funktionen von Akt	8
	1.2.1	Wachstum	9
	1.2.2	Glukosemetabolismus	9
	1.2.3	Kardiale Hypertrophie	12
	1.3	Fragestellung	14
2	Mat	erial und Methoden	15
	2.1	Verwendete Geräte	15
	2.2	Antikörper	15
	2.3	Zelllinien	16
	2.3.1	HEK 293 T Zellen	16
	2.3.2	HL-1 Zellen	16
	2.3.3	HL-1 Kardiomyozyten mit transgenem Akt1-Tag oder Akt2-Tag	16
	2.4	Bearbeitung von Nukleinsäuren	17
	2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
	2.4.2	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	17
	2.4.3	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	18
	2.4.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	18
	2.4.5	DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion	18
	2.4.6	DNA-Ligation	18
	2.4.7	Sonstige Modifikationen von DNA-Fragmenten	18
	2.4.8	In-Fusion Klonierung	19
	2.4.9	Transformation kompetenter Escherichia coli (E. coli) Bakterien	19
	2.4.1	0 Kultivierung transformierter <i>E. coli</i> Bakterien	20
	2.4.1	1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien	20
	2.5	Herstellung von stabilen Zelllinien	20
	2.5.1	Transfektion von HEK293T Zellen	21
	2.5.2	Infektion von HL-1 Zellen	21
	2.5.3	Konstrukte	22
	2.6	Proteinanalyse	23
	2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Assay)	24
	2.6.2	Coomassie-Färbung	24
	2.6.3	Präzipitation	25

	2.6.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer	
	2.6.5	Immundetektion von Proteinen im Western Blot (WB)	
	2.7	mRNA-Analyse	
	2.7.1	mRNA-Isolierung und reverse Transkription	
	2.7.2	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	
	2.8	Stimulation oder Inhibition von HL-1 Zellen	
	2.9	Proliferationsratenbestimmung	
	2.10	Glukoseaufnahmebestimmung	
	2.11	Quantitative und qualitative Phosphoproteomics	
	2.11.	Proteinextraktion und -restriktion	
	2.11.	2 Dreifache Formaldehydmarkierung	
	2.11.	3 Phosphopeptidanreicherung	
	2.11.	4 nano-LC-ESI-MS	
	2.11.	5 Proteinidentifizierung und Datenbanksuche	
	2.12	Herstellung von konditionalen Knock Out Mäusen	
	2.12.	1 Generierung des Austauschvektors	
	2.12.	2 ES Zellkultivierung und Elektroporation	
	2.12.	3 Charakterisierung der ES Zellklone	
	2.12.	4 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten	
	2.12.	5 Vasektomie	
	2.12.	6 Embryo Transfer	
	2.13	Statistik	40
	2.14	Verwendete Computerprogramme	
3	Erg	ebnisse	41
	3.1	Charakterisierung der Knock Down (KD) Zelllinien	41
	3.1.1	Analyse der Akt1 und Akt2 Proteinspiegel	
	3.1.2	Analyse der relativen Proteinspiegel der Akt-Isoformen in HL-1 Kardiomyozyten	
	3.1.3	Analyse der Phosphorylierung/Aktivierung	
	3.1.4	Akt-Substrat Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3β)	
	3.1.5	Isoform-spezifische Komplexbildung nach Aktivierung von Akt	
	3.2	Akt und der Glukosemetabolismus	50
	3.2.1	Glukosetransporter 1 und 4	50
	3.2.2	AS160	
	3.2.3	Tbc1d1	
	3.2.4	Glukoseaufnahme	55
	3.3	Charakterisierung der Akt Plus (AP) Zelllinien	
	3.3.1	Analyse der Akt1 und Akt2 Proteinspiegel	59
	3.3.2	Analyse der Phosphorylierung/Aktivierung	61
	3.3.3	Einfluss von Akt1 und Akt2 auf die GLUT Proteinspiegel	
		- 11 -	

	3.4	Proliferationsratenbestimmung	. 64			
	3.5	Identifizierung spezifischer Signaltransduktion durch die Akt-Isoformen	. 65			
	3.6	Generierung einer konditionalen Knock Out Maus für Akt1	. 71			
	3.6.1	Herstellung des Austauschvektors Akt1	73			
	3.6.2	Erzeugung und Charakterisierung von ES Zellklonen	75			
	3.6.3	Generierung von chimären Mäusen	76			
4	Disk	cussion	. 78			
	4.1	Spezifische Eigenschaften von Akt1 und Akt2 in HL-1 Kardiomyozyten	. 79			
	4.2	Akt und der Glukosemetabolismus	. 83			
	4.3	Identifizierung neuer Akt-regulierter Proteine durch Phosphoproteomics	. 87			
5	Zus	ammenfassung	. 94			
6	Sum	ımary	. 95			
7	Lite	raturverzeichnis	. 96			
8	Abk	ürzungsverzeichnis	108			
9	Anhang111					
1(D	anksagung	114			

1 Einleitung

Zur Sicherstellung ihres Überlebens ist eine Zelle auf die ständige Anpassung an wechselnde Vielzahl Umweltbedingungen angewiesen. haben sich Dazu eine von Signaltransduktionsmechanismen entwickelt, die permanent Signale aus der Umwelt empfangen, diese in die Zelle weiterleiten und -wenn erforderlich- eine zelluläre Reaktion auslösen, die sich beispielsweise als verändertes Genexpressionsprofil manifestieren kann. Besonders komplex werden diese Mechanismen in höheren Pflanzen und Tieren, bei denen die Funktionen der einzelnen Organe aufeinander abgestimmt und die verschiedenen Zelltypen in ihrer Funktion koordiniert werden müssen. Diese Interorgankommunikation wird durch extrazelluläre Signale wie Hormone, Zytokine oder Neurotransmitter vermittelt (Abbildung 1). So binden ausgeschüttete Hormone häufig an die extrazelluläre Domäne spezifischer membranständiger Rezeptoren und induzieren hier eine Konformationsänderung oder Rezeptordimerisierung. Diese Rezeptor-Modulation hat zur Folge. dass Signaltransduktionskaskaden zur intrazellulären Signalweiterleitung in Gang gesetzt werden, die in der Regel durch posttranslationale Modifikation von Proteinen oder direkte Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Dabei spielt die Modulation von Proteinfunktionen durch Proteinkinasen eine wesentliche Rolle, die durch Phosphorylierung von Zielproteinen deren Aktivität steigern oder hemmen können. Häufig findet man in der Weiterleitung von Signalen eine Vielzahl von Proteinkinasen kaskadenartig angeordnet, wodurch ein Signal intrazellulär verstärkt und durch die Einschaltung mehrerer Kinasen diversifiziert werden kann. Unterschiedliche Rezeptoren sind dabei häufig mit verschiedenen nachgeschalteten Kinasen assoziiert, so dass einzelne Liganden unterschiedliche intrazelluläre Signalwege in Gang setzen können. Allerdings findet insbesondere auf der Ebene der nachgeschalteten Kinasen eine wechselseitige Beeinflussung durch gegenseitige Hemmung oder Verstärkung einzelner Signalwege statt, so dass auf diesem Wege auch eine Integration der zellulären Antwort bei mehreren eingehenden Signalen erfolgen kann.

Ein intensiv erforschter Signalweg ist –nicht zuletzt wegen seiner herausragenden medizinischen Bedeutung- die Insulin-abhängige Signaltransduktion. Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor induziert eine Vielzahl intrazellulärer Antworten, wie Steigerung der Glukoseaufnahme, Stimulation der Translation, Steigerung von Zellwachstum und -proliferation, Hemmung der Apoptose und andere. Man weiß heute, dass die Proteinkinase Akt eine zentrale Schnittstelle bei der Umschaltung des extrazellulären Signals zu den diversen intrazellulären Antworten darstellt.

1



Abbildung 1: Allgemeines Schema zur Signaltransduktion. Die Bindung von extrazellulären Liganden (L) an ihre spezifischen Rezeptoren führt zu Initiierung von unterschiedlichen, intrazellulären Signalkaskaden, die sich auch untereinander hemmen oder stimulieren können.

1.1 Proteinkinase Akt

Die Serin/Threonin Proteinkinase Akt, auch PKB (Proteinkinase B) genannt, wurde 1991 gleichzeitig von drei verschiedenen Forschungsgruppen entdeckt. Zwei Gruppen wählten eine Identifizierungsstrategie, indem sie nach verwandten Kinasen der Proteinkinase A (PKA) (Coffer & Woodgett, 1991) oder Proteinkinase C (PKC) (Jones *et al.*, 1991) suchten. Die dritte Gruppe klonierte Akt als zelluläres Homolog zu dem viralen Proto-Onkogen v-Akt des Retrovirus Akt8 (Bellacosa *et al.*, 1991)). Das Akt8 Virus wurde aus einem Lymphknotentumor einer AKR Maus (Tiermodell für Leukämie) isoliert und kann *in vitro* Zellen in Tumorzellen transformieren (Bellacosa *et al.*, 1991). Akt wurde zwar im Kontext der Krebsforschung entdeckt, aber nach intensiver Forschung konnte gezeigt werden, dass Akt eine wesentliche Rolle bei einer Vielfalt normaler zellulärer Prozesse spielt.

Heute zählt man Akt zu der Superfamilie der AGC Kinasen (verwandt mit PKA/cGMPabhängige Kinase und PKC), die durch eine hohe Homologie in ihrer katalytischen Domäne und einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus charakterisiert sind. In Säugern findet man drei Akt-Isoformen: Akt1 (PKBα), Akt2 (PKBβ) und Akt3 (PKBγ). Jedes Akt Familienmitglied besteht aus einer N-terminalen Pleckstrin-Homolgie-Domäne (PH), einer zentralen Kinase-Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM) (Abbildung 2). Die PH Domäne besteht aus ungefähr hundert Aminosäuren (AS) und wurde ursprünglich im Pleckstrin gefunden, welches das vorwiegende Phosphorylierungsziel der PKC in Blutplättchen darstellt (Tyers et al., 1988). Über diese Domäne können Interaktionen mit Komponenten der Lipidmembran, wie Phosphatidylinositol(3,4,5)tris-phosphat (PIP3), hergestellt werden. Dabei binden die PIP mit ihren Phosphatseitenketten an eine flache Tasche in der PH-Domäne, indem sie mit spezifischen basischen Resten des Proteins Salzbrücken ausbilden (Kumar & Madison, 2005;Thomas *et al.*, 2002). Die katalytische Kinase-Domäne ist mit circa 90 % die höchst konservierte Domäne zwischen den Akt-Isoformen. Sie besteht aus 250 AS und weist wie oben erwähnt eine sehr hohe Ähnlichkeit zur PKC, PKA und darüber hinaus zur **70** kDa ribosomale Proteinkinase **S6** 1 (p70S6K) auf (Peterson & Schreiber, 1999). In der Kinase Domäne befindet sich ein hoch konservierter Threoninrest (Akt1:Thr 308; Akt2: 309, Akt3: 305), dessen Phosphorylierung wichtig für die Aktivierung ist (Alessi *et al.*, 1996).

Die regulatorische Domäne am C-terminalen Ende ist 40 AS lang und beinhaltet das HM mit der Sequenz F-X-X-F/Y-S/T-Y/F (X steht für eine beliebige AS), die ein Charakteristikum der AGC Kinase Familie ist (Peterson & Schreiber, 1999). Eine Deletion des HM führt zu einem kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität (Andjelkovic *et al.*, 1997), da sich dort eine zweite konservierte Phosphorylierungsstelle, ein Serin (Akt1: Ser 473, Akt2: Ser 474, Akt3: Ser 472), befindet.



Abbildung 2: Schematische Darstellung von Akt. Eingezeichnet sind die Domänen und die beiden Phosphorylierungsstellen, die für die Aktivierung wichtig sind. PH: Pleckstrin-Homologie Domäne, RD: regulatorische Domäne, T: Threonin, S: Serin

Die Bedeutung der Proteinkinase Akt und ihres Aktivierungswegs, der Phosphatidyl-Inositiol-**3**-Kinase (PI3K) Signalweg, wird dadurch deutlich, dass dieser schon in einfachen Organismen konserviert zu finden ist. In *Saccharomyces cerevisiae* findet man eine Serin/Threonin Kinase Sch9, die eine hohe Sequenzhomologie zu Akt und S6 Kinase besitzt (Toda *et al.*, 1988;Urban *et al.*, 2007). Sch9 ist Mitglied des Sch9/Tor Signalwegs, der nach Bindung der Liganden Glukose oder Aminosäuren an den Rezeptor Gpr1 (**G-P**rotein gekoppelter **R**ezeptor) die Langlebigkeit von Hefe reguliert (Parrella & Longo, 2010). Auch in *Caenorhabditis elegans* sorgen die Akt Homologen AKT-1 und AKT-2 für Langlebigkeit. Des Weiteren regulieren sie die Entwicklung und den Metabolismus von *Caenorhabditis elegans*. Über 38 verschiedene Liganden (INS₁₋₃₈), die an das Homolog des Insulin-Rezeptors DAF-2 (*abnormal Dauer Formation-2*) binden, können AKT-1 und AKT-2 unter anderem über das PI3K–Homolog age-1 (*AGEing alteration-1*) aktivieren (Kimura *et al.*, 1997;Paradis & Ruvkun, 1998). *Drosophila melanogaster* besitzt ein Gen für Akt: *pkb*, welches über den PI3K/PKB/Tor Signalweg die Zellproliferation, Zellgröße, Organentwicklung, Lebensspanne und Abläufe in der Entwicklung reguliert (Parrella & Longo, 2010).

1.1.1 Isoformen von Akt

Die drei Akt-Isoformen werden auf unterschiedlichen Chromosomen des Menschen (der Maus) kodiert: 14q32 (12F1-2), 19q13 (7B1) und 1q44 (1H4-6) (Chan *et al.*, 1999;Murthy *et al.*, 2000). Darüber hinaus differiert das mRNA Expressionsmuster zwischen den Isoformen. So ist die mRNA Expression von Akt1 und Akt2 zwar ubiquitär verteilt, jedoch ist die Akt1 Expression in Pankreas und Skelettmuskel geringer als in anderen Organen. Akt2 mRNA wird besonders stark in Insulin-sensitiven Geweben exprimiert. Während der Entwicklung der Maus verändert sich das Expressionsmuster der Isoformen, da in embryonalen Stadien besonders Akt1 mRNA im Herzen und Akt2 mRNA im Muskel detektiert wird (Altomare *et al.*, 1998). Akt3 mRNA kann nur in Lunge, Testis, Gehirn, Milchleiste und Fett nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2003). Schaut man sich die Proteinexpression der Isoformen an, so können in Leber, Skelettmuskel und Niere nur geringe Mengen und in Testis, Thymus und Gehirn hohe Mengen an Akt1 Protein detektiert werden. (Yang *et al.*, 2003). Das Akt2 Protein konnte im Fettgewebe, Muskel und Leber nachgewiesen werden (Cho *et al.*, 2001a). Die Expression von Akt3 spielt sich hauptsächlich im Gehirn und in den Ovarien ab. Im Herzen befinden sich nur sehr geringe Akt3 Proteinmengen (Easton *et al.*, 2005).

Werden Akt1 (480 AS) und Akt2 (481 AS) einem AS-Sequenzvergleich unterzogen, so wird eine Homologie von 81 % erreicht (Abbildung 3). Vergleicht man weitere Proteineigenschaften, wie den isoelektrischen Punkt (Akt1: 5,7/ Akt2: 6,3) oder das Molekulargewicht (55,7 kDa/ 55,7 kDa), wird wieder die starke Ähnlichkeit zwischen den Isoformen deutlich.

Trotz der hohen Homologie zwischen den Isoformen, besitzen sie spezifische Funktionen. Dies haben auch die Untersuchungen an Knock Out (KO) Mäusen für die Akt-Isoformen gezeigt. Akt2-defiziente Mäuse bilden eine Insulinresistenz aus und entwickeln einen Typ 2 Diabetes mellitus ähnlichen Phänotyp. Auf Grund dieser Befunde wurde Akt2 eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Glukosehaushalts zugeschrieben (Cho *et al.*, 2001a). In Akt1 KO Mäusen hingegen ist der Glukosehaushalt (Glukosetoleranz und Regulation der Blutglukose nach Stimulation mit Insulin) nicht betroffen. Jedoch sind die Mäuse kleiner im Vergleich zu

4

ihren wildtypischen Geschwistern und zeigen eine erhöhte Apoptoserate in Testis und Thymus (Chen *et al.*, 2001;Cho *et al.*, 2001b). Damit scheint Akt1 eine zentrale Position in der Regulation des Zellüberlebens zu belegen. Der Verlust von Akt3 führt zu der Ausbildung von verkleinerten Gehirnen und scheint somit in der Gehirnentwicklung eine entscheidende Rolle zu spielen. Der Glukosehaushalt zeigte in Akt3 defizienten Mäusen keine Beeinträchtigung (Tschopp *et al.*, 2005a).



Abbildung 3: AS-Sequenzvergleich zwischen Akt1 (oben) und Akt2 (unten). Die identischen AS sind gelb unterlegt.

1.1.2 Aktivierung von Akt durch den PI3K Signalweg

Die Aktivierung von Akt wird durch die Phosphorylierung von Threonin 308 und Serin 473 erzielt. Ist Akt nur am Threonin 308 phosphoryliert, so kann es nur einen Teil seiner Substrate

regulieren. Erst bei der zusätzlichen Phosphorylierung von Ser 473 kann Akt alle seine Substrate beeinflussen (Guertin *et al.*, 2006;Jacinto *et al.*, 2006). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Akt, welches nur am Threonin 308 phosphoryliert ist, lediglich 10 % seiner Aktivität im Vergleich zum vollständig phosphorylierten Akt besitzt (Alessi *et al.*, 1996;Guertin *et al.*, 2006).

Die Phosphorylierung von Akt wird über den PI3K-Signalweg vermittelt (Abbildung 4). Dieser wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren (PDGF-R (platelet derived growth factor receptor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1) oder Insulin an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) initiiert (Chan et al., 1999). Des Weiteren kann der PI3K Signalweg auch über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden. Nach der Ligandenbindung dimerisieren die RTK und durchlaufen eine Autophosphorylierung. Aktivierte RTK rekrutieren PI3K über die regulatorische Untereinheit, die entweder direkt oder über die Adaptorproteine IRS (Insulin Rezeptor Substrate) mit den RTK interagieren. Durch die Rekrutierung wird die katalytische Untereinheit der PI3K aktiviert und phosphoryliert in der Membran Phosphatidylinositol(3,4)bis-phosphat (PIP2) zu PIP3 (Pawson, 2004;Wymann et al., 2003). PIP3 wird durch die PH-Domäne von Akt erkannt, welches so zur Plasmamembran rekrutiert wird. Die PH-Domäne ist essentiell für die Translokation zur Plasmamembran, da eine Mutante von Akt, der die Fähigkeit zur Interaktion mit PIP3 fehlt, nicht translozieren kann (Andjelkovic et al., 1997). Durch die PIP3 Bildung wird neben Akt auch die PDK1 (3-phosphoinositidedependent protein kinase-1) über ihre PH-Domäne zur Plasmamembran rekrutiert und kann dort Akt am Thr 308 phosphorylieren (Alessi et al., 1997). Die Phosphorylierung durch PDK1 setzt eine Konformationsänderung der Akt durch die Bindung an PIP3 voraus (Milburn *et al.*, 2003; Thomas et al., 2002). Nun ist der mTOR Komplex 2 (mTORC2 (mammalian target of Rapamycin complex 2) in der Lage die Phosphorylierung von Ser 473 zu katalysieren (Sarbassov et al., 2005). Durch das phosphorylierte Ser 473 kann das HM mit einer hydrophoben Grube in der Kinase Domäne interagieren. Diese Grube entsteht nur im aktiven Zustand durch die korrekte Anordnung von aC-Helices, die im inaktiven Zustand ungeordnet vorliegen (Balendran et al., 1999; Yang et al., 2002a; Yang et al., 2002b)

PI3-Kinasen bilden eine Lipidkinase-Familie, die sich dadurch auszeichnet, dass sie die Phosphorylierung der 3'-OH Position am Inositolring der Inositolphospholipide katalysieren kann (Stephens *et al.*, 1993). Sie sind Heterodimere, die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) bestehen. PI3K werden, abhängig von Funktion, Struktur und Substratspezifität, in die drei Klassen I, II und III unterteilt. Nur die Klasse I ist in der Lage PIP2 zu PIP3 zu katalysieren. Diese Klasse wird nochmals in die Unterklassen Ia (p110 α , β und δ) und Ib (p110 γ) unterteilt (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001;Wymann *et al.*, 2003). Ia PI3K werden über RTK und Ib über GPCR aktiviert, wobei p110 β mit beiden Rezeptorformen interagieren kann (Guillermet-Guibert *et al.*, 2008;Wymann *et al.*, 2003) Bei insulinstimulierter Aktivierung der PI3K, vermitteln IRS die Bindung zwischen dem Insulin-Rezeptor, einer RTK, und PI3K.



Abbildung 4: PI3K/Akt-Signalweg. Die Phosphorylierung/Aktivierung von Akt wird initiert über die Bindung von Wachstumsfaktoren (WF) oder Insulin (Ins) an Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bzw. über die Ligandenbindung an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Daraufhin wird die PI3K direkt oder indirekt über IRS phosphoryliert und katalysiert die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. Über PIP3 werden Akt und PDK1 an die Plasmamembran rekrutiert. Dort phosphoryliert PDK1 Akt am Thr 308. Zur vollständigen Aktivierung phosphoryliert mTORC2 Akt am Ser 473. Im aktiven Zustand kann Akt dann seine Substrate phosphorylieren und verschiedene Prozesse einer Zelle beeinflußen.

Zur vollständigen Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung von Ser 473 notwendig. Diese erfolgt in der Regel durch den Rapamycin-insensitiven Komplex mTORC2 (Sarbassov *et al.*, 2005), der aus den Untereinheiten mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) und mLST8 (*mammalian lethal with sec thirteen 8*) besteht. Allerdings gibt es starke Hinweise darauf, dass noch weitere Kinasen diese Phosphorylierung durchführen können. Exprimiert man Akt mit einem Myristoylierungssignal in Zellen, denen die mTORC2 Aktivität fehlt, so konnte trotzdem eine Phosphorylierung von Ser 473 nachgewiesen werden (Facchinetti *et al.*, 2008;Huang & Manning, 2009). Ein Beispiel stellt die **DNA**-abhängige **P**roteinkinase (DNA-PK) dar, die nach DNA-Schäden diese Phosphorylierung durchführt (Bozulic *et al.*, 2008).

1.1.3 Inaktivierung von Akt

Die Regulation der Akt Kinaseaktivität erfolgt auch über eine Inaktivierung mittels Dephosphorylierung. Hierbei spielt die PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP) eine wichtige Rolle. Sie dephosphoryliert Ser 473 im HM. Die PHLPP Familie besteht aus drei Mitgliedern: PHLPP1α, PHLPP1β und PHLPP2 (Gao et al., 2005a), wobei α und β Splicevarianten desselben Gens sind (Brognard *et al.*, 2007b). PHLPP Familienmitglieder bestehen aus einer PH Domäne, einer Region mit Leucin-reichen Wiederholungen, einer Proteinphosphatase 2C Domäne und einem C-terminalen PDZ Bindemotiv. Sie gehören der Familie der Mg²⁺-aktivierten Proteinphosphatasen an, die Mg²⁺ (Magnesium) oder Mn²⁺ (Mangan) für ihre katalytische Aktivität benötigen. Die PH-Domäne wird nicht für die Regulation von Akt benötigt, da eine Mutante, der die PH Domäne fehlt, sehr wohl Akt, jedoch nicht das zweite Substrat PKC, regulieren kann. Hingegen kann bei einem Verlust des PDZ Bindemotivs Akt nicht mehr dephosphoryliert werden (Gao et al., 2005b). Die Akt-Isoformen werden spezifisch von PHLPP1 und PHLPP2 reguliert. Knock down (KD) Studien zeigten, dass PHLPP1 die Phosphorylierung von Akt2 und Akt3 beeinflusst. Für die Dephosphorylierung von Akt1 und Akt3 ist PHLPP2 verantwortlich. Dies konnte mittels Immunopräzipitationsexperimenten untermauert werden, da PHLPP1 nur mit Akt2 und Akt3 interagiert. Hingegen konnte eine Interaktion mit PHLPP2 nur für Akt1 und Akt3 nachgewiesen werden (Brognard et al., 2007a).

1.2 Kardiale Funktionen von Akt

Der PI3K/Akt Signalweg spielt eine große Rolle in der Entwicklung, der Apoptose, dem Wachstum, dem Metabolismus und der Hypertrophie des Herzens. Schon zu Beginn der Herzentwicklung, bei der Differenzierung vom mesodermalen Zellen zu Kardiomyozyten, ist dieser Signalweg essentiell (Klinz *et al.*, 1999) und fördert in späteren Stadien das Überleben der differenzierten Myozyten (Matsui *et al.*, 1999). Die Proliferation von embryonalen Kardiomyozyten ist ebenfalls abhängig vom PI3K/Akt Signalweg, da dessen Inhibitoren *in vitro* die Proliferation hemmen (McDevitt *et al.*, 2005). Akt besitzt eine anti-apoptotische Wirkung, die unter anderem durch die Inaktivierung über direkte Phosphorylierung der Pro-Apoptose Faktoren BAD (*Bcl2-associated agonist of cell death*) oder Caspase9 vermittelt wird (Cardone *et al.*, 1998;Datta *et al.*, 1997). Für beide Faktoren konnte gezeigt werden, dass sie nach der Phosphorylierung durch Akt keine kardiale Apoptose nach Doxorubicin-Gabe mehr auslösen können (Wu *et al.*, 2000).

1.2.1 Wachstum

Das Wachstum des Herzens erfolgt während der Embryonalentwicklung hauptsächlich durch Proliferation der Kardiomyozyten. Nach der Geburt verlieren die Kardiomyozyten die Fähigkeit zur Proliferation und das postnatale Wachstum des Herzens erfolgt über eine Vergrößerung (Hypertrophie) der Kardiomyozyten (Olson & Schneider, 2003;Pasumarthi & Field, 2002). Die Beteiligung von Akt am postnatalen Wachstum des Herzens wird durch die erhöhte Akt Signalübertragung in dieser starken Wachstumsphase ersichtlich. Darüber hinaus reguliert das Nährstoffangebot über Akt das Herzwachstum, da eine Reduktion der Akt Signalübertragung nach kurzem Fasten gezeigt werden konnte. Die Initiierung von Akt wird in diesem Fall über Insulin und den Insulinrezeptor reguliert (Shiojima *et al.*, 2002). Dies wurde an Kardiomyozyten-spezifischen Insulinrezeptor KO Mäusen gezeigt, die eine geschwächte Kontraktilität und ein verkleinertes Herz besitzen (Belke *et al.*, 2002). Ein weiterer Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt Signalweg und dem Herzwachstum kann über PDK1 nachgewiesen werden, da eine Deletion von PDK1 in kardialen Muskelzellen von Mäusen zu einem verkleinerten Herz führt. Dieses Modell zeigt zusätzlich, dass Akt auch die Kardiomyozytengröße selbst beeinflusst (Mora *et al.*, 2003).

1.2.2 Glukosemetabolismus

Das Herz kann, abhängig von der Substratverfügbarkeit, als Energiequelle die Oxidation von Glukose oder langkettigen Fettsäuren nutzen. Dieser Effekt wird auch als Glukose/Fettsäureoder Randle-Zyklus bezeichnet (Randle *et al.*, 1963). Das Ungleichgewicht zwischen den beiden Energiequellen kann mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sein. Beispielsweise bewegt sich bei einer kardialen Hypertrophie die Präferenz zu einer gesteigerten Glukoseverwertung (van der Vusse *et al.*, 2000).

Auf Grund der hydrophilen Eigenschaften kann Glukose nicht mittels Diffusion die Plasmamembran passieren, sondern benötigt einen Transporter. Die vereinfachte Diffusion von Glukose und anderen Hexosen wird durch die Mitglieder der SLC2 (*solute carrier* 2) Familie, auch GLUT (**Glu**kosetransporter) genannt, durchgeführt (Bell *et al.*, 1990).

In Kardiomyozyten befinden sich der basale Glukosetransporter GLUT1 und der Insulininduzierbare GLUT4. Die Glukoseaufnahme über GLUT4 kann durch Insulinabgabe ins Blut oder durch erhöhte Kontraktilität gesteigert werden, indem die Translokation des GLUT4 von intrazellulären Speichern zur Plasmamembran gefördert wird (Becker *et al.*, 2001;Fischer *et al.*, 1997). GLUT4 befindet sich in einem kontinuierlichen Kreislauf zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten. Unter basalen Bedingungen befinden sich 5 % des gesamten GLUT4 in der Plasmamembran. Die restlichen 95 % befinden sich in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten. Bei einer Stimulation mit Insulin wird die GLUT4 Menge in der Plasmamembran auf 50 % durch eine erniedrigte Endozytoserate und eine erhöhte Exozytoserate gesteigert (Holman & Sandoval, 2001;Pessin *et al.*, 1999). Letzteres wird über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch den Insulinrezeptor initiiert. Das aktivierte Akt kann dann das Rab-*GTPase-activating protein* (GAP) *Akt substrate of 160 kDa* (AS160) phosphorylieren und damit inaktivieren. Im inaktiven Zustand kann AS160 nicht mehr die Umwandlung des aktiven Rab-GTP (Guanosintriphosphat) zum inaktiven Rab-GDP (Guanosindiphosphat) fördern. Rab-GTP kann dann die GLUT4 Translokation zur Plasmamembran unterstützen. (Kane *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2003). Das Resultat ist eine gesteigerte Glukoseaufnahme in die Zelle (Abbildung 5). Nach Absetzen des Insulinsignals wird die Verteilung wie unter basalen Bedingungen wieder hergestellt (Holman & Sandoval, 2001;Pessin *et al.*, 1999)

GLUT1 und GLUT4 zählen zur Klasse I der GLUT Familie (Joost & Thorens, 2001) und bestehen jeweils aus zwölf hydrophoben, transmembranalen α -Helices, die so angeordnet sind, dass der C- und der N-Terminus intrazellulär liegen (Hresko *et al.*, 1994;Mueckler *et al.*, 1985).

Der für die basale Glukoseaufnahme verantwortliche GLUT1 (Gensymbol SLC2A1) wird ubiquitär exprimiert (Mueckler *et al.*, 1985) und seine Bedeutung zeigt sich dadurch, dass homozygote GLUT1-KO Mäuse embryonal letal sind (Wang *et al.*, 2006).

Der induzierbare GLUT4 wird überwiegend im Muskel und Fettgewebe exprimiert. Im Zustand ist GLUT4 hauptsächlich auf zwei Populationen basalen aufgeteilt: Recyclingendosomen und GLUT4 storage vesicles (GLUT4 Speichervesikel). Das basal zirkulierende GLUT4 wird wahrscheinlich aus den Recyclingendosomen bereitgestellt und die GLUT4 Speichervesikel sind für das Insulin-induzierte GLUT4 verantwortlich. Die regulierte GLUT4 Zirkulation ähnelt der regulierten, sekretorischen Exozytose, die man auch bei der Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln beobachten kann (Sudhof, 2004). Die Endozytose von GLUT4 beginnt mit Clathrin-umhüllten Vesikeln über die GLUT4 in Sortierendosomen transportiert wird. Von dort wird GLUT4 in die Recyclingendosomen geleitet und gegebenenfalls weiter in die GLUT4 Speichervesikel transportiert (Abel et al., 2004; Bogan & Kandror, 2010; Bryant et al., 2002; Huang & Czech, 2007).



Abbildung 5: Stimulation mit Insulin führt über den PI3K/Akt-Signalweg zur GLUT4-Translokation. Die Aktivierung von Akt über den PI3K Signalweg nach Stimulation mit Insulin (Ins) führt zu einer Phosphorylierung von AS160 und Tbc1d1, welche sich dann im inaktiven Zustand befinden. Im aktiven Zustand verstärkt AS160/Tbc1d1 die Umwandlung von Rab-GTP in Rab-GDP. Das aktive Rab-GTP, das sich nach Inaktivierung von AS160 anreichert, fördert die Fusion von GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran. Durch den vermehrten Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran erfolgt ein gesteigerter Einstrom von Glukose in die Zelle. Darüber hinaus kann Akt beispielsweise GSK3β phosphorylieren, die dann über die Glykogensynthase den Glykogenaufbau aktiviert.

Die Inhibition der GAP-Aktivität von AS160 (auch Tbc1d4 (*Tbc1 domain family member 4*) genannt) durch die Phosphorylierung von Akt fördert die Glukoseaufnahme. AS160 besitzt sieben potentielle Akt Phosphorylierungsstellen, von denen *in vivo* nur sechs phosphoryliert werden (Kane *et al.*, 2002;Sano *et al.*, 2003). Nach einer Stimulation mit Insulin sind Thr 642 und Ser 588 die entscheidenden Phosphorylierungsstellen für die Akt-vermittelte Regulation der GLUT4 Translokation (Sano *et al.*, 2003). Durch die Phosphorylierung von Thr 642 wird die Bindung von 14-3-3 an AS160 ermöglicht (Ramm *et al.*, 2006). Dies ist neben dem Verlust der GAP Aktivität und der Dissoziation von den GLUT4 Speichervesikeln die Ursache für die Inaktivierung von AS160. AS160 kann neben Insulin auch über gesteigerte Muskelkontraktion, beispielsweise beim Sport, inhibiert werden. Dies konnte nach Sport in humanen Skelettmuskelbiopsien (Deshmukh *et al.*, 2009) und nach *in vitro* Kontraktion von Rattenskelettmuskeln (Bruss *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Die verantwortliche Kinase

ist in diesem Fall die AMPK (Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase) (Bruss *et al.*, 2005).

AS160 ist zu 50 % homolog zu Tbc1d1, das auch an der Regulation der GLUT4-Translokation beteiligt ist. Tbc1d1 ist ein Substrat von Akt, das nach der Aktivierung dieselben Prozesse wie AS160 durchläuft (Roach *et al.*, 2007).

Die Regulation des Glukosemetabolismus durch Akt beschränkt sich nicht nur auf die Glukoseaufnahme. Vielmehr moduliert Akt auch das intrazelluläre Schicksal der Glukose. So inaktiviert Akt durch die Phosphorylierung am Ser 9 die Glykogensynthasekinase β (GSK3 β) (Cross *et al.*, 1995), die dadurch nicht mehr in der Lage ist die Glykogensynthase zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren. Auf Grund der Hemmung der GSK3 β durch Akt wird die Glykogensynthese initiiert und fördert die Speicherung der Glukose in Form von Glykogen in der Zelle. In diesem Zusammenhang wurde GSK3 1980 als eine Ser/Thr Proteinkinase entdeckt (Embi *et al.*, 1980), die in Säugetieren mit zwei Isoformen, GSK3 α (51 kDa) und GSK3 β (47 kDa), ubiquitär vertreten ist. Die Isoformen besitzen meist gleiche Funktionen, jedoch konzentrierte sich die Forschung bisher auf GSK3 β . Mittlerweile konnten auch für GSK3 α wichtige Funktionen, beispielsweise im Glukosemetabolismus, identifiziert werden (MacAulay *et al.*, 2007).

Obwohl GSK3 im Zusammenhang mit dem Glukosemetabolismus entdeckt wurde, zeigen die neueren Forschungsergebnisse, dass GSK3 auch in vielen anderen Prozessen involviert ist. Im Herzen beeinflusst GSK3 das kardiale Wachstum nach physiologischen und pathologischen Stimuli negativ. Beispielsweise reduziert eine konstitutiv aktive Form von GSK3 β das kompensatorische Wachstum nach Drucküberbelastung oder chronischer β -adrenerger Stimulation (Haq *et al.*, 2000). Die Hypertrophie-hemmende Wirkung enfaltet GSK3 durch die Inhibition von Transkriptionsfaktoren, die eine Hypertrophie fördern. Darüber hinaus phosphoryliert GSK3 β -catenin (Peifer *et al.*, 1994), welches dann degradiert wird und so nicht mehr die Transkription von Genen initiieren kann, die eine Hypertrophie fördern.

1.2.3 Kardiale Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie kann in drei Formen gegliedert werden. Die physiologische oder adaptive Hypertrophie wird bei Schwangerschaft oder Sport induziert, während die Entwicklungshypertrophie beim postnatalen Wachstum erfolgt. Diese beiden Formen zeichnen sich durch eine normale oder verbesserte Kontraktilität und ein gleichmäßiges Wachstum der Ventrikelwand, des Septums und der Kammerdimension aus. Die Vergrößerung resultiert aus einer Verlängerung der Kardiomyozyten, die mit einer gleichzeitigen Verbreiterung einhergehen. Das innere Volumen des Herzen vergrößert sich, aber die Wanddicke bleibt unverändert. Dieser Prozess wird als exzentrische Hypertrophie bezeichnet (Heineke & Molkentin, 2006).

Die dritte Form wird pathologische bzw. maladaptive Hypertrophie genannt und durch abnormale Stresssignale oder Erkrankungen ausgelöst. Diese Signale oder Vorerkrankungen schließen Bluthochdruck, Myokardinfarkt, Herzklappenerkrankungen, Myokarditis, Diabetes mellitus und erblich bedingte Fehlbildungen ein (Klein et al., 2003;Lips et al., 2003). Die entstehende Hypertrophie geht meist einher mit kontraktiler Dysfunktion, interstitieller Fibrose und der Wiederaufnahme des fetalen Genexpressionsmuster. Zu diesen Genen gehören beispielsweise das atriale natriuretische Peptid (atrial natriuretic peptide) oder die schwere Kette des β-Myosin (β-myosin heavy chain) (Frey & Olson, 2003; Molkentin & Dorn, 2001). Die pathologische Hypertrophie ist zu Beginn eine adaptive Antwort auf zu hohen Druck im Herzen. Die daraus resultierende gesteigerte Wandspannung wird durch die Verdickung der Herzwand mit einer gleichzeitigen Verkleinerung des Ventrikelvolumens aufgefangen. Verliert das Herz die Fähigkeit zur Kompensation so dilatiert der linke Ventrikel. Dabei kommt es zu einer Vergrößerung des Kammervolumens und der Abnahme der Wandstärke. Die Folge ist eine Zunahme der Wandspannung, die bei bestehender kontraktiler Dysfunktion eine weitere Progression bis zur Herzinsuffizienz ermöglicht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hypertrophie von individuellen Myozyten ein Kennzeichen für ein versagendes Myokard darstellt (Gerdes, 1992).

Studien zum PI3K/Akt Signalweg zeigten, dass physiologische Stimuli, wie IGF oder Sport, über RTK und PI3K α zu einem adaptiven Wachstum führen. Mäuse, die eine konstitutiv aktive PI3K α exprimieren, besaßen ein vergrößertes Herz, das durch einen Anstieg der Akt-Aktivität und Kardiomyozytengröße verursacht wurde. Hingegen führte die Expression einer dominant-negativen Form zu verkleinerten Herzen und Kardiomyozyten. Da beide mutierten Formen der PI3K α zu keiner kardialen Dysfunktion oder verringerter Lebenserwartung führten, konnte davon ausgegangen werden, dass PI3K α für das physiologische Wachstum verantwortlich ist (Crackower *et al.*, 2002;McMullen *et al.*, 2003;Shioi *et al.*, 2000). Wird eine pathologische Hypertrophie induziert, so ist selektiv PI3K γ im Herzen hochreguliert und wird dann zum Hauptaktivator von Akt (Naga Prasad *et al.*, 2000;Patrucco *et al.*, 2004). Daraus kann man schließen, dass über RTK/PI3K α , β /Akt eine physiologische und über GPCR/PI3K γ /Akt eine pathologische Hypertrophie ausgelöst wird. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass die PI3K Isoform-spezifisch über unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden, jedoch endet die unterschiedliche Aktivierung in dem gemeinsamen Endziel Akt. Hier stellt sich die Frage, ob die Akt-Isoformen für die unterschiedliche Ausprägung der Hypertrophie verantwortlich sind.

1.3 Fragestellung

Bisherige Untersuchungen belegen, dass Akt im Herzen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Metabolismus und der Hypertrophieentwicklung spielt. Unklar ist bisher aber, ob die Akt-Isoformen spezifische Funktionen im Herzen besitzen oder ob ihre Funktionen vollständig redundant sind.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Isoform-spezifischen Eigenschaften in Kardiomyozyten. Als Modellsystem wurden die heart-like-1 (HL-1) Kardiomyozyten-Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich um eine kardiale Muskelzelllinie, die von einer murinen, atrialen Kardiomyozyten AT-1 Tumorzelllinie stammt. Die Isolierung erfolgte aus einem subkutanen AT-Tumor einer C57BL/6J Maus. Mit den HL-1 Kardiomyozyten gelang es erstmals eine Kardiomyozyten-Zelllinie zu etablieren, die den Phänotyp einer adulten Kardiomyozyte aufweist und ihre Proliferationseigenschaft, die für die dauerhafte Passagierung essentiell ist, aufrechterhalten kann. HL-1 Zellen haben ihre Kontraktionsfähigkeit beibehalten und besitzen die elektrophysiologischen, morphologischen und biochemischen Eigenschaften von Kardiomyozyten (Claycomb et al., 1998). Auf Grund dieser Eigenschaften sind HL-1 Zellen sehr gut für in-vitro Studien geeignet, die Kardiomyozyten-spezifische Funktionen als Fragestellung besitzen.

Da bekannt war, dass bei einer kardialen Hypertrophie die Glukoseverwertung gesteigert wird, sollte geklärt werden, ob der Glukosemetabolismus in Kardiomyozyten unterschiedlich von den Isoformen beeinflusst wird. Beeinflussen die Isoformen unterschiedlich die Expression der Proteine, die am Glukosemetabolismus beteiligt sind? Ist der Mechanismus der Glukoseaufnahme selbst betroffen?

Um mögliche identifizierte Funktionen *in vivo* untersuchen zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Generierung einer konditionalen, Herz-spezifischen Knock Out Maus für Akt1.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Tabelle	1:	Verwendete	Geräte
---------	----	------------	--------

Gerät und Bezeichnung	Firma		
Realtime PCR System, StepOne Plus	Applied Biosystems		
Zellkulturschrank, Function Line	Heraeus		
Sterilbank, antair BSK	Kendro		
PCR Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf		
Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab		
Plattenphotometer, SpectraCount	Packard		
Infrarot-Bildgebungs- System, Odyssey	LI-COR Biosciences		
Mini-Zentrifuge	Roth		
Tischzentrifuge, Centrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf		
LC, Ultimate 3000	Dionex Corporation		
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific		
Vakuumzentrifuge, Savant SPD 131DPA	Thermo		
Sorvall Superspeed Zentrifuge, RC-5B	Du Pont Instruments		
Mikromanipulator	Leica		
Mikroinjektor, CellTram vario	Eppendorf		
Gene Pulser	BioRad		

2.2 Antikörper

Tabelle 2:	Verwendete	primäre	Antikörper.	Die	Verdünnungen	sind	für	die	Western	Blot	Analysen
angegeben.											

Name	Verdünnung	Referenz	Produktnummer.
Maus-α-Akt1	1:1000	Cell Signaling	2967
Kaninchen-α-Akt1	1:1000	Cell Signaling	2938
Maus-α-Akt2	1:1000	Cell Signaling	5239
Kaninchen-α-Akt3	1:1000	Cell Signaling	4059
Kaninchen-α-Akt	1:1000	Cell Signaling	9272
Kaninchen-α-PhosphoAkt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling	9271
Kaninchen-pAkt-Substrat	1:1000	Cell Signaling	9611
Kaninchen-α-AS160	1:2500	Millipore	07-741
Kaninchen-α-GLUT4	1:2500	Abcam	ab654
Kaninchen-a-GLUT1	1:2500	Abcam	ab652
Kaninchen-α-GSK3β	1:1000	Cell Signaling	9315
Kaninchen-α-PDK1	1:1000	Cell Signaling	3062
Kaninchen-α-PhosphoGSK3β (Ser9)	1:1000	Abcam	ab11175
Kaninchen-α-mTOR	1:1000	Cell Signaling	2983
Kaninchen-α-Raptor	1:1000	Cell Signaling	2280
Kaninchen-α-Rictor	1:1000	Cell Signaling	2114
Kaninchen-α-GβL	1:1000	Cell Signaling	3274
Kaninchen-α-Tbc1d1	1:500	Abcam	ab56191

Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Referenz	Produktnummer
Ziege-α-Kaninchen	IRDye800CW	1:10000	Licor	926-32211
Ziege-α-Maus	IRDye800CW	1:10000	Licor	926-32210
Ziege-α-Maus	IRDye680CW	1:10000	Licor	926-32220
Ziege-α-Kaninchen	IRDye680CW	1:10000	Licor	926-32221

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

2.3 Zelllinien

2.3.1 HEK 293 T Zellen

Die humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK, *human embryonic kidney*) 293T wurden mit HEK-Medium kultiviert und für die Herstellung von viralen Partikeln verwendet.

HEK-Medium: *Dulbecco Modified Eagle* Medium (DMEM, GIBCO), 10% *Fetal Calf* Serum (FCS, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen), 1x *non-essential amino acids* (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

2.3.2 HL-1 Zellen

Die *heart-like* (HL)-1 Zellen waren ein freundliches Geschenk von Dr. W. C. Claycomb (Lousiana State University Medical Center, New Orleans, USA) und wurden nach seinen Angaben kultiviert (Claycomb *et al.*, 1998). Jeden zweiten Tag erhielten die Zellen frisches Medium. Zur Anheftung auf Zellkulturschalen waren sie auf die Beschichtung mit Fibronektin angewiesen. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden sie mit Hilfe von Trypsin gesplittet. Als Einfriermedium wurde 95 % FBS mit 5 % DMSO (**Dim**ethylsulfoxid) verwendet.

HL-1-Medium: Claycomb-Medium (Sigma-Aldrich), 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), 100 U/ml Penizillin/Streptomyzin, 2 mM Glutamin, 0,1 mM Norepinephrin (Invitrogen)

HL-1 Hungermedium: DMEM, 100 U/ml Penizillin/Streptomyzin, 2 mM Glutamin, 0,1 mM Norepinephrin

2.3.3 HL-1 Kardiomyozyten mit transgenem Akt1-Tag oder Akt2-Tag

Diese HL-1 Zelllinien exprimieren neben der endogenen Akt eine modifizierte Akt-Isoform, an die N-terminal ein Tripel-Tag (HA-, Strep- und Flag-Tag) angehängt wurde (Abbildung 18). Die Konstrukte für Akt1-Tag und Akt2-Tag wurden über eine lentivirale Infektion in die HL-1 Zellen eingebracht. Durch eine Selektion wurde eine stabile Zelllinie gewährleistet. Das Tag behindert nicht die Phosphorylierung/Aktivierung, Komplexbildung oder Lokalisation von den Akt-Isoformen (unveröffentlichte Daten). Die Zelllinien waren eine freundliche Gabe von Nina Blasberg, Institut für Molekulare Kardiologie.

2.4 Bearbeitung von Nukleinsäuren

Alle im Folgenden aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook, 2001).

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten angewandt. Für eine korrekte Amplifikation der DNA-Sequenz wurde die *Pfx*-DNA-Polymerase unter Beachtung der Reaktionsbedingungen laut Hersteller eingesetzt. Des Weiteren wurde die PCR zur Überprüfung von DNA-Konstrukten oder des Genoms genutzt. In diesem Fall wurde eine *Taq*-DNA-Polymerase nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.2 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch in einem 1-1,5%-igen Ethidiumbromidhaltigen (0,006% (v/v)) Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer aufgetrennt und anschließend ausgewertet. Als DNA-Größenmarker wurde für Fragmentlängen über 500 bp der Lambda-EcoRI/HindIII-Marker, für Fragmentlängen unter 700 bp der pBluescript-HpaII-Marker verwendet. Nach ihrer Vorbereitung im DNA-Ladepuffer wurden die DNA-Proben circa eine Stunde bei 100 V im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Tisch belichtet, photographiert und das Bild mit dem Computerprogramm QuantityOne 4.5.2 (BioRad) ausgewertet.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

DNA-Größenmarker:

Lambda DNA (Invitrogen) geschnitten mit EcoRI/HindIII (560, 831, 947, 1375, 1584, 1900, 2027, 4950, 5150, 21000 bp),

pBluescript DNA (Stratagene) geschnitten mit **HpaII** (710, 489, 404, 325, 242, 190, 157, 147, 110, 67, 57, 34, 26 bp)

2.4.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde das QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Mit Hilfe von Anionenaustauscher-Minisäulen kann das Gelmaterial entfernt werden und die Fragmente zur Weiterverwendung aufgereinigt werden.

2.4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die mit Hilfe des Photometers (Nanodrop) ermittelte OD_{260} ermöglichte die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} wurde als Maß für den relativen Proteingehalt und damit für die Reinheit der Proben herangezogen. Sowohl die Bestimmung der Konzentration, als auch des Reinheitsgrades, erfolgte mit Hilfe der zum Nanodrop gehörigen Software ND-1000 3.2.1.

2.4.5 DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion

Alle Reaktionen mit DNA-Restriktionsendonukleasen wurden laut den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. In der Regel erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, die zur Entfernung des Enzyms nach der Restriktionsreaktion diente. Dazu wurde das gleiche Reaktionsvolumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches zum Reaktionsansatz gegeben, vermischt und anschließend fünfzehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die in der oberen, wässrigen Phase gelöste DNA wurde mit DNA-Ladepuffer gemischt und in einem Agarosegel aufgetrennt.

2.4.6 DNA-Ligation

Zur Ligation mit T4-DNA-Ligase wurde Fragment-DNA mit Vektor-DNA (100-150 ng) sowohl im dreifachen als auch im fünffachen molaren Überschuss zusammengegeben. Die Ligation fand entweder bei Raumtemperatur für vier Stunden oder bei 16°C über Nacht statt. Die weiteren Reaktionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben eingestellt.

2.4.7 Sonstige Modifikationen von DNA-Fragmenten

Falls die Klonierungsstrategie es erforderte, wurden weitere DNA-Modifikationen vorgenommen. Die Religation der Vektor-DNA wurde durch eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase verhindert. Um trotzdem eine Ligation zu ermöglichen, mussten im

Gegenzug die Oligonukleotide, die für die Amplifikation der Fragment-DNA verwendet wurden, mit einer Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Alle Enzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.4.8 In-Fusion Klonierung

Das In-Fusion PCR Klonierungssystem (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ermöglicht das Klonieren durch homologe Rekombination von PCR-Fragmenten, die mit speziellen Oligonukleotiden hergestellt werden. Die Oligonukleotide werden so generiert, dass sich an den Fragmenten und dem Zielvektor homologe Sequenzen befinden, die durch das In-Fusion-Enzym miteinander verbunden werden können. Die Generierung der Oligonukleotide und die Reaktionen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 4: Oligonukleotide für die In-Fusion-Klonierung zur Herstellung der Konstrukte für die Akt Plus (AP) Zelllinien. Vektorsequenz: Großbuchstaben, Akt-Sequenz: Kleinbuchstaben, shRNA-Bindestelle: Unterstrich, veränderte Base: Fett

Isoform	Name	Sequenz
Akt1	In-Fusion Akt1 Vektor 5`>3`	CCACCGGTACCATTTatgaacgacgta
	In-Fusion Akt1 3`< 5` Mutation	tttaatatggccatccttgtccagcatgaggt
	In-Fusion Akt1 Mutation 5`>3`	tggccatattaaaaataacggacttcgggctgt
	In-Fusion Akt1 3`<5`Vektor	ACCGCCACCTCGGTTtcaggctgt
Akt2	In-Fusion Akt2 Vektor 5`>3`	CCACCGGTACCATTTatgaatgaggta
	In-Fusion Akt2 3`< 5` Mutation	aagtaaaaatatcttggcctccaggtcttgatg
	In-Fusion Akt2 Mutation 5`>3`	agatatttttacttaagagtgatggatctttcattggg
	In-Fusion Akt2 3`<5`Vektor	ACCGCCACCTCGGTTtcact

2.4.9 Transformation kompetenter Escherichia coli (E. coli) Bakterien

Die Transformation von kompetenten XL-1-Blue Zellen mit einem Ligationsansatz erfolgte über einen Hitzeschock von dreißig Sekunden bei 42°C. Nach einer kurzen Inkubation mit LB-Medium wurden die Zellen auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden zum Animpfen von 2 ml-Minikulturen verwendet. Diese wurden wiederum über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium (11): 10 g, Bactotrypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g Natriumchlorid , pH 7,5 LB-Agarplatten: 15g Agar /l LB-Medium

2.4.10 Kultivierung transformierter E. coli Bakterien

Zum Animpfen von 200 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) wurde entweder eine Minikultur verwendet oder eine Kolonie von einer Agarplatte gepickt. Anschließend wurde die angeimpfte Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.

2.4.11 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien

Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem NucleoBond PC500 Maxi DNA Kit (Macherey & Nagel, Düren). Die nach der Lyse und Neutralisation gewonnene Plasmid-DNA wurde über Anionen-Austauscher-Säulen gereinigt und mit Isopropanol bei 4°C gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 1x TE-Puffer aufgenommen. Bei Mini-Kulturen wurde auf den Reinigungsschritt über die Anionen-Austauscher-Säulen verzichtet. Stattdessen wurde die DNA direkt nach dem Neutralisationsschritt von kontaminierenden Zelltrümmern durch einen Zentrifugationsschritt getrennt und mit der Isopropanolfällung weiter dem Protokoll gefolgt.

TE-Puffer (pH 7,4): 10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.5 Herstellung von stabilen Zelllinien

Zur Untersuchung der spezifischen Funktionen der Akt-Isoformen wurden diese gezielt mittels RNA Interferenz (RNAi) herunterreguliert (Fire et al., 1998). Dazu wurden über lentivirale Infektion Zelllinien hergestellt, die stabil ihre Zielkonstrukte zur Produktion von shRNA (*short hairpin* RNA) exprimieren. Zur Virusherstellung wurden zuerst HEK293T Zellen transfiziert und die HL-1 Zellen mit den hergestellten Viren infiziert. Durch Selektion konnte dann eine stabile Infektion gewährleistet werden.

Als Transfektionsmethode wurde die Lipofektion gewählt. Dabei bilden kationische Lipide mit dem genetischen Material Komplexe aus, welche dann von der Zelle aufgenommen werden (Felgner et al., 1987). Für eine erfolgreiche Virusproduktion werden verschiedenste Gene benötigt, die aus Sicherheitsgründen auf drei separate Plasmide verteilt wurden: ein Helferplasmid, ein Verpackungsplasmid und das Plasmid mit dem zu verpackenden Konstrukt. Das Helferplasmid besitzt Gene für die Kapsidproteine (gag), die Expressionsregulatoren (rev, tat) und die Virion-assoziierten Enzyme (pol). Zum Letzteren werden die Protease, Reverse Transkriptase und die Integrase gezählt (Mochizuki *et al.*,

1998). Das Verpackungsplasmid pCZ-VSV-G beinhaltet das Glykoprotein **G** des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G), welches den viralen Eintritt in die Wirtszelle und die Knospung der Viren ermöglicht (Pietschmann et al., 1999). Das Plasmid mit dem zu verpackenden Konstrukt enthält die Signale für die Verpackung, die reverse Transkription, die Integration und einen Selektionsmarker (Neomyzin oder Puromyzin) (Mochizuki *et al.*, 1998).

Bei einer Virusinfektion wird die virale RNA, die das shRNA-Konstrukt trägt, in die Zelle eingeschleust. Nach einer reversen Transkription der viralen RNA durch die virale reverse Transkriptase kann die entstandene doppelsträngige DNA in das Genom stabil integriert werden. Durch die Transkription dieses Genomabschnitts wird eine shRNA hergestellt, die durch die Nuklease Dicer (aus der RNaseIII-Familie) in eine siRNA (*short interfering* RNA) prozessiert wird (Paddison et al., 2002). siRNA besteht aus doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden, die mit einem Überhang von zwei Nukleotiden am 3'Ende endet (Elbashir et al., 2001). Nun kann sich der Nuklease-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) anlagern und die doppelsträngige RNA entwinden. Der verbleibende Einzelstrang in dem nun aktivierten RISC kann sich dann an die exakt passende mRNA anlagern. Dies führt zur Spaltung und damit zur Zerstörung der mRNA (Zamore *et al.*, 2000;Zamore, 2006). Durch den Verlust der mRNA kann dann das entsprechende Protein nicht mehr gebildet werden.

2.5.1 Transfektion von HEK293T Zellen

Zur Durchführung einer Lipofektion wurden 45 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karslruhe) und die drei Plasmide separat in 1,5 ml Opti-Mem (Invitrogen, Karslruhe) für fünf Minuten inkubiert. Pro Plasmid wurden jeweils 5 µg DNA eingesetzt. Nach der dreißigminütigen Koinkubation der beiden Lösungen wurden sie auf eine 10 cm-Zellkulturschale gegeben, die zu 50 % konfluent mit HEK293T Zellen bewachsen war. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (Invitrogen, Karslruhe) vorgenommen und nach weiteren 24 Stunden der Überstand mit den enthaltenden Viren abgenommen.

2.5.2 Infektion von HL-1 Zellen

Der Virusüberstand, welcher von den transfizierten HEK293T Zellen gewonnen wurde, wurde mittels eines 0,45 μ m Sterilfilters von Zellüberresten gereinigt und auf die zu infizierenden HL-1 Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Infektion wurde das Medium gewechselt und mit der Selektion begonnen. Je nach Selektionsmarker wurden 3 μ g/ml

Puromyzin oder 600 µg/ml G418 zum Medium hinzugegeben. Die Selektion erfolgte bis eine parallele, nicht infizierte Kontrolle keine überlebenden Zellen mehr zeigte. Der Zeitraum belief sich auf drei bis fünf Tage. Danach wurde die Selektion aufgehoben. Zur Herstellung der Knock Down (KD) Zelllinien wurde eine Selektion auf Puromyzin durchgeführt. Für die Akt Plus (AP) Zelllinien erfolgte eine Selektion auf Neomyzin.

2.5.3 Konstrukte

Zur Herstellung der KD Zellen wurde der Vektor pLKO.1-puro der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dieser Vektor trägt die shRNA kodierenden Konstrukte (Tabelle 5) des RNAi *Consortium* des *Broad Institute* (Cambridge, MA), den Selektionsmarker Puromyzin und die nötigen Eigenschaften für die lentivirale Transfektion. Zur Kontrolle wurde eine shRNA (shC) verwendet, die kein Ziel in einer humanen oder murinen Zelle besitzt.

Tabelle 5: Sequenzen der shRNA, die in den Vektor pLKO.1-puro integriert sind. Fett dargestellt sind die Nummern mit denen die shRNA-Konstrukte in den ersten Untersuchungen gekennzeichnet wurden.

Zelllinie	Produktnummer	Klonnummer	Sequenz
ΔAkt1	TRCN0000022 934	NM_009652.11141s1c1	CCGGGCACATCAAGATAACGGACTTCTCG AGAAGTCCGTTATCTTGATGTGCTTTTT
ΔAkt2	TRCN0000055 258	NM_007434.2255s1c1	CCGGGCCACGGTACTTCCTTCTGAACTCGA GTTCAGAAGGAAGTACCGTGGCTTTTTG
shC	SHC002		CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT
Zielgen	Produktnummer	Klonnummer	Sequenz
Akt1	TRCN000022 935	NM_009652.1-713s1c1	CCGGCGTGTGACCATGAACGAGTTTCTCG AGAAACTCGTTCATGGTCACACGTTTTT
Akt1	TRCN000022936	NM_009652.1-379s1c1	CCGGTGGCACCTTTATTGGCTACAACTCGA GTTGTAGCCAATAAAGGTGCCATTTTT
Akt2	TRCN000022261	NM_007434.2-1475s1c3	CCGGTCACTTCAGAAGTGGACACAACTCG AGTTGTGTCCACTTCTGAAGTGATTTTTG
Akt2	TRCN000022262	NM_007434.2-222s1c1	CCGGCCACAAACGTGGTGAATACATCTC GAGATGTATTCACCACGTTTGTGGTTTTTG

Für selbst hergestellte lentivirale Vektoren wurde als Grundvektor der pGJ-C-CAGGS (Abbildung 6) verwendet, der von Marian Naguib ausführlich beschrieben worden ist (Naguib, 2009). Das jeweilige integrierte Gen in diesem Vektor wird unter die Kontrolle des starken CAGGS-Promotors gestellt. Dieser Promotor besteht aus dem <u>Cytomegalovirus-Enhancer, dem Hühner β -<u>A</u>ktin Promotor und dem Kaninchen β -<u>G</u>lobin poly-A Signal (Niwa *et al.*, 1991). Gene die unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt werden sollen, werden zwischen Aktin-Promotor und Poly-A Signal eingefügt. Zur Selektion besitzt dieser Vektor bakterielle (Ampicillin (AMP)) und eukaryotische (Zeozin (Zeo)) Antibiotika-Resistenzgene.</u>

Diese Gene stehen unter der Transkriptionskontrolle des β-Lactamase Promotors (bla) bzw. dem EM7-Promotor. Durch den bakteriellen Replikationsursprung pUCori wird die Herstellung von doppelsträngigen Plasmidkopien in E. coli sichergestellt. Eine einzelsträngige Plasmidkopie wird durch den F1 ori ermöglicht. Die Transkription der viralen DNA zur Virusverpackung steht unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotor (CMV).



Abbildung 6: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pGJ3-C-CAGGS. Die Beschriftung und Farbkodierung ist gültig für alle Vektorabbildungen in dieser Arbeit. RRE: REV (*regulator of virion expression*)-*responsive* Element, BGH pA: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*, env: *envelope* (Hüllprotein). Die restlichen Abkürzungen sind im Text definiert.

2.6 Proteinanalyse

Zur Analyse der Proteine wurden die Zellen mit Lysispuffer (10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% IGPAL CA-630) aufgeschlossen. Je nach Versuchsaufbau wurde der Lysispuffer mit 1,5 mM PMSF, 1x Halt *ProteaseInhibitor Single Use cocktail* (Thermo) oder Phosphataseinhibitoren (10mM NaF, 0,5mM Na₃VO₄) versetzt. Nach der Proteinmengenbestimmung mittels *BCA Protein Assay Kit* (Thermo, USA) wurden die Proben in 4xLämmli-Puffer aufgekocht und einer Western Blot Analyse unterzogen.

2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Assay)

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach Smith *et al.* (Smith et al., 1985), die mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt wurde. Zur Eichung wurde eine Konzentrationsreihe (25-1000 µg/ml) mit BSA *(bovine serum albumin, Serumalbumin vom Rind) verwendet. Die Proben konnten dann einer Absorptionsmessung im ELISA-Reader (Spectra-Count, Packard) bei 562 nm auf einer 96-Mikrotiterplatte unterzogen werden.*



Abbildung 7: Überprüfung der Genauigkeit des BCA-Assays durch eine Coomassie-Färbung. Es wurden 75 µg von zwei Zelllinien A und B mit je zwei biologischen Replikaten aufgetragen und die Intensitäten (Tabelle unter dem Blot) der gesamten geladenen Proteinmenge am Odyssey Scanner bestimmt.

Zur Überprüfung der Genauigkeit wurde ein Polyacrylamid-Gel mit 75 µg von zwei unabhängig infizierten Zelllinien (je zwei biologische Replikate) beladen und eine Coomassie-Färbung nach Kang durchgeführt (Abbildung 7). Die Detektion und Intensitätsbestimmung der Banden erfolgte im Odyssey Scanner im 700 nm Kanal. Die fast identischen Werte zeigen die sehr hohe Genauigkeit der Proteinmengenbestimmung und machen deswegen eine Ladekontrolle für die meisten Western Blot Analysen überflüssig.

2.6.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung von aufgetrennten Proteinen erfolgte mittels einem modifizierten Protokoll nach Kang *et al.* (Kang, 2002). Durch die Verwendung von Aluminiumsulfat konnte die Sensitivität der Färbung erhöht und der Hintergrund minimiert werden. Dafür wurden die Gele eine Stunde mit ddH₂O gewaschen, um störendes SDS zu entfernen.

Anschließend wurde das Gel drei Stunden gefärbt, eine Stunde mit der Entfärbungslösung (10 % Ethanol, 2 % Ortho-Phosphorsäure) behandelt und schließlich in ddH₂O gelagert.

2.6.3 Präzipitation

Für eine Präzipitation eines Proteins mit einem Strep-Tag wurde das Proteinlysat an Strep-Tactin-Sepharose (IBA, Göttingen) gebunden. Nach der Bindung wurde der Überstand über der Sepharose abgenommen und das Pellet mehrmals gewaschen. Daraufhin wurden die präzipitierten Proteine durch das Kochen in 4xLämmli-Puffer von der Sepharose abgelöst. Das entstandene Präzipitat wurde mittels Western Blot Analyse weiter untersucht.

2.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche Elektrophorese in Hoefer-Elektrophoresekammern angewandt (Tulchin et al., 1976). Zur Vorbereitung auf eine Elektrophorese wurden die Proteine in 4xLämmli-Puffer bei 95°C denaturiert. Bei der Analyse von GLUT-Proteinen wurde auf das Aufkochen verzichtet, da Membranproteine sonst Aggregate ausbilden und nicht in das Gel einwandern können. Zur Konzentrierung der Proteine vor der Auftrennung wurde ein 2,5 %-iges Sammelgel verwendet. In einem 7,5 bis 10 %-igem Trenngel erfolgte dann die Separation der Proteine nach ihrer Größe. Die Trennung erfolgte bei Spannungen zwischen 50-200 Volt. Bei dem Austritt der Lauffront aus dem Gel in den Elektrodenpuffer wurde die Auftrennung beendet. Bei sehr kleinen Proteinen wurde die Trennung vor dem Auslaufen der Lauffront abgebrochen.

Die aufgetrennten Proteine wurden dann aus den Gelen auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für Proteine bis 150 kDa wurde die Halb-Trocken-Transfermethode angewandt. Bei dieser Methode erfolgt der Transfer über 1,5 Stunden im Halb-Trocken-Blotpuffer bei einer Spannung, die sich wie folgt berechnet: 2,5 mA/cm² Membranfläche. Die Nass-Transfermethode wurde für Proteine ab einer Größe von 150 kDa angewandt. Bei einer Spannung von 300 mA erfolgte der Transfer im Ethanol-freien Halb-Trocken-Blotpuffer über eine Dauer von mindestens 16 h.

Proteingrößenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)
Lämmli-Puffer: 0,25 M Tris (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 100 mM DTT, 0,1 g/l Bromphenolblau

Sammelgelzusammensetzung für ein 2,5 %-iges Gel: 2,5 ml 40 % Acrylamid, 2,5 ml 1 M Tris (pH 6,8), 200 μl 10 % SDS, 30 μl TEMED, 60 μl 10 % APS, 14,9 ml H₂O

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 % (w/v) SDS

Halb-Trocken-Blotpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Trenngelzusammensetzung für ein 10 %-iges Gel: 10 ml Acrylamid, 10 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 400 μl 10 % SDS, 80 μl TEMED, 100 μl 10 % APS, 20 ml H₂O

2.6.5 Immundetektion von Proteinen im Western Blot (WB)

Vor der Immundetektion wurde die geblottete Membran in PBS/Licor-Blockierlösung (1:1) eine Stunde blockiert, um unspezifischen Bindungen der Antikörper vorzubeugen. Der primäre Antikörper, verdünnt in der entsprechenden Konzentration in 5 % BSA/TBST, wurde über Nacht auf 4°C oder 2 h bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben. Nach mehrmaligem Waschen in TBST erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBST/Licor-Blockierlösung (1:1). Wiederum wurde mehrfach mit TBST gewaschen. Zur Entfernung des Tweens wurde vor der Detektion mit TBS gewaschen. Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erfolgte im Odyssey Scanner (Licor Biosciences, Lincoln, USA), der im Infrarot-Bereich detektiert. Da der Scanner zwei unterschiedliche Wellenlängen (700 nm und 800 nm) erkennen kann, können zwei Proteine zur gleichen Zeit detektiert werden. Zusätzlich kann eine quantitative Auswertung der Banden erfolgen, da sich die Infrarot-Detektionsmethode im Vergleich zur Chemiluminiszenz in einem größeren Bereich linear verhält.

PBS: 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4
TBS: 150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7,4)
TBST: 150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7,4), 0,1 % Tween-20

2.7 mRNA-Analyse

Zur quantitativen Analyse von mRNA-Transkripten wurde eine RT-PCR (*real-timepolymerase chain reaction*) Analyse durchgeführt. Dafür wurde mRNA aus Zellen isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt, um die benötigte cDNA zu erhalten.

2.7.1 mRNA-Isolierung und reverse Transkription

Um vergleichbare und reproduzierbare Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurden 28 x 10⁵ Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer zweitägigen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und die mRNA mittels des *RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Während der mRNA-Isolierung über eine Säule wurde eine Behandlung mit DNase durchgeführt. Eine Überprüfung der mRNA mit Hilfe des BioAnalyzer 2100 (Agilent, Böblingen) durch das BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum), Düsseldorf, bescheinigte eine gute Qualität der Proben nach dieser Form der mRNA-Isolierung. Zur Qualitätskontrolle werden die 18 S und die 28 S ribosomale RNA herangezogen. In einem Ansatz mit elf Proben wurden RIN (**R**NA Integritäts**n**ummer)-Werte zwischen 9,3 und 10 gemessen (Abbildung 8), wobei 10 die höchste erreichbare Qualität angibt.



Abbildung 8: Qualitätsbestimmung der mRNA: Überprüfung der Integrität der mRNA nach ihrer Aufreinigung über das *RNeasy Kit* mit Hilfe des BioAnalyzer 2100. A Übersicht über elf Proben, die durch ihre gute Qualität das erwartete Doppelbandenbild der Kontrolle (NR) wiederspiegeln. B Detailansicht der Anaylyse von Probe 13, die den höchsten zu erreichenden RIN-Wert von 10 zeigt.

Zur Umschreibung der mRNA in cDNA (reverse Transkription) wurde eine reverse Transkriptase (Gibco, Karslruhe) verwendet. Dazu wurde die mRNA mit 5x Transkriptionspuffer (Gibco, Karslruhe) und RNase-Inhibitor (Roche, Mannheim) zehn Minuten auf 65°C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde 0,1 M DTT, 25 mM dNTPs, RNase-Inhibitor, Oligo dT_{20} , Random Hexamere und die reverse Transkriptase hinzugefügt. Es folgte eine zweistündige Inkubation auf 37°C. Danach wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.7.2 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der mRNA-Mengen wurde eine quantitative real-time-PCR durchgeführt. Für diese PCR werden Taqman-Sonden mit der Sequenz des Zielgens verwendet, die einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende und einen Löscherfarbstoff (Quencher) am 3'-Ende tragen. Als Quencher wurde TAMRA und als Reporter FAM verwendet. Befindet sich der Quencher in räumlicher Nähe zum Reporter, so wird die Fluoreszenzemission des Reporters durch Fluoreszenz-Energietransfer stark reduziert. Nach der Anlagerung der Sonde an die DNA kann die Taq-DNA-Polymerase während der DNA-Synthese den Quencher mit ihrer 5'-Nukleaseaktivität abschneiden. Dadurch kann dieser nicht mehr die Emission des Reporters reduzieren und der Reporter kann seine charakteristische Wellenlänge emittieren. Die Fluoreszenzsignale werden für die Darstellung der Amplifizierung während der PCR-Reaktion genutzt, die dann quantitativ ausgewertet werden kann. Eine PCR besteht aus drei verschiedenen kinetischen Phasen. Mit der ersten Phase beginnt die Amplifikation, bei der das Fluoreszenzsignal nicht die Grenze des Hintergrunds überschreitet. In der logarithmischen Phase der PCR kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des gebildeten PCR-Produktes, der durch das Fluoreszenzsignal messbar ist. Idealerweise sollte sich das PCR-Produkt in jedem PCR-Zyklus verdoppeln. Durch Verlust an Enzymaktivität und Substraten nimmt in der dritten Phase die Amplifikationsreaktion ab und kommt dann zum Erliegen (Schefe et al., 2006; Wilhelm & Pingoud, 2003). Für die Auswertung müssen der CT-Wert (threshold cycle, Schwellenwert Zyklus) und die Effizienz bestimmt werden. Ersterer beschreibt den Zyklus, an dem ein Benutzer-definierter Schwellenwert der Fluoreszenz innerhalb der logarithmischen Phase erreicht wird. Die Effizienz ist definiert als Prozent der PCR-Produktzunahme pro Zyklus. Die Taqman-Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen, die garantiert, dass die Amplifizierungseffizienz bei 100 % +/-10 % (Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays" Applied Biosystems Application Note (part number 127AP05)) liegt und deswegen in der Auswertung nicht mehr berücksichtigt werden muss.

Für die qRT-PCR wurde als Matrize die cDNA verwendet, die wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt wurde. Die verwendeten Taqman-Sonden sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis angesetzt und die qRT-PCR im StepOnePlusTMReal-Time

PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Als Quantifizierungsmethode wurde das vergleichende CT Experiment gewählt.

Standardansatz für eine qRT-PCR Reaktion:

0,15	μl	Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden)
0,2	μl	dNTPs (25 mM) (Invitrogen)
2	μl	10x Taq-Puffer
15,65	μl	dH ₂ O
1	μl	20x Taqman-Sonde
1	<u>µ1</u>	cDNA
20	μl	

PCR-Programm: (Whd.: Wiederholung)

	Temperatur (°C)	Zeit
1	50	2 min
2	95	10 min
3	95	10 sec
4	60	1 min
	40 x Whd ab 3	

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide der Firma Applied Biosystems für die qRT-PCR. Am 5`-Ende sind sie mit FAMTM-Farbstoff und am 3´-Ende mit TAMRATM-Farbstoff gekoppelt.

Genname	Sequenz	Assay ID
Tbc1d4 (AS160)	CGAATCTCTGGTGGATGAGGTCATG	Mm00557659_m1
Hprtl	GTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTGA	Mm00446968_m1
Slc2a4 (GLUT4)	GCAGATCGGCTCTGACGATGGGGAA	Mm01245502_m1
Slc2a1 (GLUT1)	ATCGCCCTGGCCTTGCTGGAACGGC	Mm00441480_m1
Tbcldl	TCATCGACCTCGGGCGAACCTTTCC	Mm00497989_m1

Je Zelllinie und Zielgen wurden drei unabhängige Infektionen der KD Zellen bezüglich der mRNA-Menge bestimmt. Pro unabhängig infizierte Zelllinie wurden vier biologische Replikate und jeweils davon drei technische Replikate analysiert. Als Referenzgen wurde *Hprt1* (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms StepOne 2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt). Zu Beginn wurde je biologischem Replikat der Mittelwert der CT-Werte für die technischen Replikate ermittelt und davon die Δ CT Werte bestimmt. Zur Berechnung des Δ CT-Wertes wird der CT des Referenzgens vom CT des untersuchten Gens (Zielgen) abgezogen.

 $\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen}$

Mit Hilfe der ΔCT Werte konnte dann der $\Delta \Delta CT$ Wert ermittelt werden, der den Genexpressionsunterschied zwischen der Kontrolle und den zu untersuchenden Proben verdeutlicht.

 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Proben} - \Delta CT_{Kontrolle}$

Der relative Genexpressionsunterschied zwischen Kontrolle und den zu untersuchenden Proben wird wie folgt bestimmt:

 $2^{-\Delta\Delta CT}$

Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte wurden je Zelllinie zusammengefasst und ein Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt (Livak & Schmittgen, 2001).

2.8 Stimulation oder Inhibition von HL-1 Zellen

Für Phosphorylierungsstudien wurden Zellen mit Insulin oder IGF stimuliert. Die Zellen wurden auf Sechs-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert, über Nacht in Hungermedium gehalten und am nächsten Tag stimuliert. Die Stimulation erfolgte für zehn Minuten mit 200 nM Insulin (Actrapid, Novo Nordisk) oder 130 nM IGF (Bulk IGF-1, #05-0111S GIBCO). Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit Lysispuffer (inklusive Phosphatase- und Proteaseinhibitoren) von der Platte geschabt. Die Proteinmenge des Proteinextraktes wurde in einem BCA-Assay bestimmt und danach die Extrakte mittels Western Blot analysiert.

Für eine Inhibition von Akt über den PI3K-Signalweg wurde der PI3K-Inhibitor LY-294002 Hydrochlorid (#L9908, Sigma-Aldrich) verwendet. Die Zellen wurden für eine Stunde mit 50 μ M LY-294002 inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS in entsprechender Weise (siehe oben) aufgearbeitet.

2.9 Proliferationsratenbestimmung

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zelllinien wurden am Tag 1.4×10^4 Zellen auf eine 24-Kammer-Zellkulturplatte ausgesät. Tag 2 und 3 dienten zur Regeneration vom Trypsinisierungsprozess. Von Tag 4- 8 wurden jeweils drei Kammern pro Zelllinie in einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Zwei Durchläufe pro Zelllinie wurden

vorgenommen und von den resultierenden Zellzahlen der Mittelwert bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test überprüft.

2.10 Glukoseaufnahmebestimmung

Zur Detektion unterschiedlicher Glukoseaufnahmeraten wurde ein Glukoseaufnahmetest mit radioaktiver 2-Deoxy-D-[2,6-³H]Glukose (³H DOG, #TRK672, Amersham, GE Healthcare, München) durchgeführt. DOG ist eine Form der Glukose, die nicht metabolisiert werden kann. Die HL-1 Zellen, die auf einer 12-Kammer-Zellkulturschale ausplattiert worden waren, wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz über Nacht mit HL-1-Hungermedium inkubiert. Zu Versuchsbeginn erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei 37°C im Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer für die Basalbedingungen bzw. im Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer mit 200 nM Insulin oder 130 nM IGF für die Stimulation. Die Glukoseaufnahme wurde durch die Zugabe von 1 mM DOG und 5 μ Ci/ml ³H DOG gestartet. Nach fünf Minuten wurde die Aufnahme durch die Applikation eines Überschusses an unmarkierter DOG (200 mM) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Lysispuffer lysiert und die Proteinmenge mittels BCA-Assay bestimmt. Nach Bestimmung der Radioaktivität der Zelllysate mit dem Liquid Scintillation Counter (Wallac, Waltham, USA) konnten die Aufnahmeraten von ³H DOG in die Zellen berechnet werden.

Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer:136 mM Natriumchlorid, 4,7 mM Kaliumchlorid, 1,25 mM Magnesiumsulfat, 1,25 mM Calciumchlorid, 20 mM HEPES (pH 7,4)

2.11 Quantitative und qualitative Phosphoproteomics

Zur Detektion Isoform-spezifischer Signaltransduktion wurden die Proteome der Knock Down und shC Zellen nach einer Insulinstimulation einer dreifachen stabilen Isotopen Markierung mit Formaldehyd unterzogen. Nach einer Phosphopeptidanreicherung über Titandioxid erfolgte die Fraktionierung und Detektion der Phosphopeptide mittels nano-LC-ESI-MS (Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie). Es wurde ein modifiziertes Protokoll nach Boersema *et al.* (Boersema et al., 2009) angewandt.
2.11.1 Proteinextraktion und -restriktion

Pro Zelllinie wurden jeweils zwei 15 cm Zellkulturschalen kultiviert, die Zellen über Nacht in Hungermedium inkubiert und dann mit 200 nM Insulin stimuliert. Das weitere Vorgehen ist unter 2.8 beschrieben. Das Zelllysat wurde in Lysispuffer inklusive Phosphatase- und Proteaseinhibitoren aufgenommen. Der Proteingehalt des isolierten Proteinextrakts wurde mittels BCA-Assay bestimmt und die Proben auf gleiche Proteinmengen eingestellt. Nach einer Proteinfällung mit Aceton erfolgte die Lösung der Pellets in 0,1 % Rapigest (Waters, Milford, USA) (Massenspektrometrie-kompatibles anionisches Detergenz), 8 M Harnstoff und 20 mM TRIS (pH 8). Um die Probenkomplexität zu reduzieren, wurden die Cysteinreste reduziert und alkyliert werden. Die Reduktion erfolgte mit 5 mM DTT und die Alkylierung mit 25 mM Iodacetamid. Zur Restriktion der Proben wurde Trypsin im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Zusätzlich wurde 3 mM Calciumchlorid als Kofaktor hinzugegeben. Die Proteolyse erfolgte über Nacht und wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE kontrolliert. Um die Proteolyse zu stoppen, wurden die Proben mit Trifluoressigsäure auf pH 2 angesäuert. Zur Probenentsalzung wurden SPEC C18AR Säulen (Varian/Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Nach der Konditionierung mit 100 % Methanol wurden die Säulen mit 4 % Methanol äquilibriert. Nach dem Probenauftrag erfolgte wieder ein Waschschritt. Mit 60 und 100 % Methanol wurden dann die Peptide von der Säule eluiert. Das Eluat wurde daraufhin in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.11.2 Dreifache Formaldehydmarkierung

Die Proben wurden mit Natriumacetat auf pH 5,4 angesäuert und auf 0,5 mg/ml eingestellt. Zur Markierung wurde 4 % Formaldehyd (CH₂O, leicht), deuteriertes Formaldehyd (CD2O, mittelschwer) oder ¹³C-markiertes, deuteriertes Formaldehyd (¹³CD₂O, schwer) zu den Proben gegeben. Zum Starten der Reaktion wurde deuteriertes Natriumcyanoborhydrid (NaBD₃CN) zur schweren Probe und Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN) zur leichten und mittelschweren Probe appliziert. Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurde die Markierung durch die Gabe von Ammoniak gestoppt und die Proben mit Ameisensäure auf pH 2 angesäuert. Es folgte wiederum eine Entsalzung der Proben über eine Säule und das Trockenen des Eluats in der Vakuumzentrifuge.

2.11.3 Phosphopeptidanreicherung

Aus 300 µg Probe wurden die Phosphopeptide mit dem Titansphere Phos-TiO Kit (ATAS GL International B.V., Niederlande) nach Herstellerangaben angereichert. Es folgte eine Entsalzung der Proben über SPEC PLUS PT Säulen (Varian/Agilent Technologies, Waldbronn) und die anschließende Trocknung des Eluats in der Vakuumzentrifuge.

2.11.4 nano-LC-ESI-MS

Die Proben wurden zur Analyse einer nano-LC-ESI-MS unterzogen. Zur Reduzierung der Probenkomplexität wurden die Peptide vor der online-gekoppelten MS-Analyse mit einer LC Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) in einem zweistündigen Gradienten getrennt (Abbildung 9). Die LC wurde mit dem Softwareprogramm Chromeleon 6.8 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) vollautomatisch gesteuert.

Lösungsmittel A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser

Lösungsmittel B: 0,1 % Ameisensäure in 84 % Acetonitril



Abbildung 9: Tabellarische (A) und graphische (B) Darstellung des LC-Gradienten

Die Messung am Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) wurde mit dem Start des Gradienten (nach dreißig Minuten) begonnen. Mit Hilfe des Softwareprogramms Xcalibur (Thermo Scientific, San Jose, CA) wurde das MS in einem datenabhängigen Modus mit den Parametern aus Tabelle 7 betrieben. Nach jedem MS-Scan folgten fünf MS-MS-Scans mit mehrstufiger Aktivierung, bei denen die jeweils fünf intensivsten Ionen aus dem MS-Scan mittels CID (*collision induced dissoziation*, Kollisionsinduzierte Fragmentierung) fragmentiert wurden. Um eine wiederholte Analyse von bereits fragmentierten Peptiden zu verhindern, wurde mittels dynamischem Ausschluss deren m/z (Masse/Ladung) für 30 Sekunden auf eine Ausschlussliste gesetzt. Insgesamt erfolgte die

Datenaufnahme über 140 min. Diese Analyse wurde von Dr. Michael Reinartz, Institut für Molekulare Kardiologie, durchgeführt.

FT MS	Fullscan
Massenbereich	350-2000 m/z
Auflösung	60000
Aktivierungsart	CID
normalisierte Kollisionsenergie	35
Aktivierung Q	0,25
Aktivierungszeit	30,000 ms
mehrstufige Aktivierung	aktiv
neutrale Massenverluste	24,49; 32,66; 48,99; 97,97
Suche nach Ladungszustand	aktiv

Tabelle 7: Parameter für die Einstellung des LTQ Orbitrap

2.11.5 Proteinidentifizierung und Datenbanksuche

Mit Hilfe des Datenbanksuchprogramms Mascot (Matrix Sci. Ltd, London, UK) wurden an Hand der Spektren aus der LC-MS Analyse in der UniProt/SwissProt 2010 (<u>www.expasy.ch</u>) Datenbank für *Mus musculus* die Proteine identifiziert. Zur Einstellung von Mascot wurden die Parameter aus Tabelle 8 verwendet.

Tabelle 8:	Parameter	zur	Datenbanksuche	mit Mascot.	. C:	Cystein,	K: Lysin,	M: Methionin	, S: Serin, T:
Threonin,	Y: Tyrosin,	, N-te	rm: N-terminal, I	Deut.: Deute	eriun	n, C13: ¹	³ C, ppm: :	x 10 ⁻⁶	

Parameter	Einstellung
Enzym	Trypsin
Fixe Modifizierungen	Carbamidomethylierung C Dimethylierung K: N-term. und/oder intern
Variable Modifizierungen	Oxidierung M Phosphorylierung S, T, Y Dimethylierung (mit Deut.) K: N-term. und/oder intern Dimethylierung (mit Deut. und C13) K: N-term. und/oder intern
Peptidmassentoleranz	+/- 10 ppm (C13 = 1)
Fragmentmassentoleranz	+/- 0,6 Da
Maximale Fehlspaltung	2
Ionenscore	40

Zur relativen Quantifizierung der bei der Mascot-Analyse identifizierten Peptide wurden die jeweiligen Ionenintensitäten aus den MS Spektren über die Elutionszeit integriert und eine relative Quantifizierung durchgeführt.

2.12 Herstellung von konditionalen Knock Out Mäusen

Ein Bestandteil dieser Arbeit ist die Generierung einer Herz-spezifischen, konditionalen Knock out (KO) Maus bei der das Cre/loxP System genutzt wird. 1987 gelang es Thomas und Capecchi (Thomas & Capecchi, 1987) erstmals gezielt Gene in der Maus über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu modifizieren. Zwei Jahre später konnte dann eine mutierte Maus publiziert werden, die aus rekombinierten ES-Zellen generiert worden war (Thompson *et al.*, 1989).

Das Cre/loxP-Rekombinasesystem stammt aus dem Bakteriophagen P1, bei dem das 38 kDa Enzym Cre (*causes recombination*) ortspezifisch an den loxP-Elementen (*locus of crossing over*) eine Rekombination katalysiert (Sternberg & Hamilton, 1981). Die loxP-Elemente bestehen aus einem asymmetrischen Zwischenelement (spacer), das von zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) eingerahmt wird. DNA-Sequenzen, die zwischen den loxP-Elementen liegen, können über diese Methode aus dem Genom herausgeschnitten werden (Hoess *et al.*, 1982). Ein weiteres Rekombinasesystem, das FRT/Flp System, stammt aus der Hefe. Die FRT-Elemente (*Flp recognition target*) sind ähnlich wie die loxP-Elemente aufgebaut und werden von der Rekombinase Flp zur Rekombination benutzt (Broach & Hicks, 1980;O'Gorman *et al.*, 1991).

Zur Erzeugung von konditionalen KO Tieren wird die Cre unter die Kontrolle von induzierbaren und gewebsspezifischen Promotoren gestellt. In dieser Arbeit wurde ein Herzspezifischer KO angestrebt und dafür der Kardiomyozyten-spezifische α -MHC (*myosin heavy chain*, schwere Kette des Myosins) Promotor gewählt (Palermo *et al.*, 1996;Sohal *et al.*, 2001). Um eine zeitliche Kontrolle über den KO zu bekommen wurde die Cre mit einer mutagenisierten Liganden-Bindungs-Domäne (mer) des humanen Östrogen-Rezeptors fusioniert (Littlewood *et al.*, 1995). Erst durch die Gabe des Östrogen-Antagonist 4-OH-Tamoxifen (OHTX), ein hochaffiner Ligand der mer, ist die Cre in der Lage einen inaktivierenden Komplex von Hitze-Schock-Proteinen zu verlassen und eine Sequenz zu deletieren (Sohal *et al.*, 2001).

Für die Herstellung einer konditionalen KO Maus wurde zu Beginn ein Austauschvektor mit dem benötigten Konstrukt kloniert. Dieser Vektor wurde in embryonale Stammzellen eingebracht und über homologe Rekombination in das Genom integriert. Nach einer Selektion wurde die erfolgreiche Integration mittels PCR und Southern Blot überprüft. Die entstandenen transgenen ES Zellen wurden mit Hilfe von Mikroinjektion in Blastozysten eingeführt und die Embryonen einer scheinschwangeren Leihmutter implantiert. Chimäre Nachkommen konnten über agouti Flecken im Fell von ihren komplett weißen, wildtypischen Geschwistern unterschieden werden. Die Keimbahngängigkeit der transgenen ES-Zellen in den Chimären konnte an Hand der Fellfarbe ihrer Nachkommen bestimmt werden. Homozygote transgene Tiere werden dann mit α -MHC-merCremer Mäusen verpaart. Wird diesen Nachkommen OHTX appliziert, wird die Cre nur in Kardiomyozyten aktiv und deletiert das gefloxte Exon. Das Resultat ist ein konditionaler KO für das jeweilige Gen.

Dieser Versuch wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.12.1 Generierung des Austauschvektors

Zur Generierung des Austauschvektors für Akt1 wurde als Basisvektor der Vektor MUP MK3 (Abbildung 10) verwendet. Die Klonierungsstrategie (Tabelle 9), bei der die Fragmente aus Tabelle 10 eingefügt wurden, ist in 3.6.1 näher erläutert. Die Fragmente wurden mit den jeweiligen Oligonukleotiden mittels PCR aus genomischer, muriner DNA amplifiziert.



Abbildung 10: Vektor MUP MK3. Schematische Darstellung (A) und diagnostische Restriktionsanalyse (B) mit NcoI und ApaL-1. Der Aufbau des Vorläufers pTVO ist im Ergebnisteil erläutert. Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben.

	Zielvektor	Fragment (Inhalt)	Schnittstellen	Endprodukt
1	MUP MK3	F1 (Intron 2-3 bis Intron 5-6)	Asc1/AsiS1	1.Umbau Akt1
2	1.Umbau Akt1	F2 (Intron 5-6 bis Intron 7-8)	SwaI	2.Umbau Akt1
3	2.Umbau Ak1	F3 (Intron 7-8 bis Exon 11)	SalI/NotI	Austauschvektor Akt1

Tabelle 9: Klonierungsstrategie für den Austauschvektor Akt1.

Fragmentname	Name	Größe (bp)	Oligonukleotide
	langer		R:CTAATCGCGATCGCGGGAGTCAGCGGGCATCTTCATAT
F1	Arm	6096	F:CTAAGTGGCGCGCCTGTTCATGTGTTTGTTAACACGGG
	mittlerer		R:AGCTACTGTAACTGAGCTTCACTAACA
F2	Arm	822	F:CAAGGCCCAGCGCTCTGACTAGACT
	kurzer		R: CTAGTACTCGAGCTAGATGGGGGGACTCTGTCAGCGT
F3	Arm	1099	F: AGTCTGCTCGAGATCTTGGGCTTATTCCACCCGTGGTC

Tabelle 10: Charakteristika der Fragmente zur Herstellung des Austauschvektors Akt1. R.: revers, F.: vorwärts

2.12.2 ES Zellkultivierung und Elektroporation

Die R1 ES Zellen (Nagy et al., 1993) wurden, wie in Kuhn *et al.* (Kuhn et al., 1991) beschrieben, kultiviert. Täglich wurde das Medium, welches mit 1000 U/mL LIF (*leukemia inhibitory factor*) versetzt war, gewechselt. Die ES-Zellen wurden auf Mitomyzinbehandelten embryonalen Fibroblasten (*Feeder*) herangezogen. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll von Gödecke *et. al.* (Godecke et al., 1998). Nach der Elektroporation mit dem linearisierten Austauschvektor erfolgte die Aussaat der ES Zellen auf Neomyzin-resistenten Fibroblasten. Nach einer zweifachen Selektion (400 μ g/ml Neomyzin und 1,5 μ g/ml Gancyclovir) wurden die isolierten Klone charakterisiert.

ES Medium: DMEM, 15 % FCS (Biochrom), 1 % 100 mM Glutamax (Invitrogen), 1 % 10 mM nichtessentielle Aminosäuren (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 0,1 % 100 mM β-Mercaptoethanol, 1 % 100 mM Natriumpyruvat (Invitrogen)

2.12.3 Charakterisierung der ES Zellklone

2.12.3.1 Klonidentifizierung mittels PCR

Nach der Selektion wurden die ES Zellklone mittels PCR1 auf eine homologe Rekombination getestet. Des Weiteren konnte mit PCR2 eine Aussage über die vollständige Rekombination des distalen loxP-Elements gemacht werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: PCR1 und PCR2. Angegeben sind die Oligonukleotidsequenzen (A) und die zugehörigen PCR-Programme (B). wdh.: Wiederholung, F: vorwärts, R: revers

.,	٩	
ŀ	1	

PCR Nr.	Oligonukleotide	Testziel
	F:GCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAG	
PCR1	R:CGGCCACACATCATCTCGTACATGA	Test auf positiven Klon
	F:CAGTGGACCACAGTCATTGAGCGC	
PCR2	R :CACACATTCCACAGCTGGTTCTTTC	Test aut distales loxP-Element

B

	PCR1		PCR2				
	Temperatur (°C)	Zeit	Temperatur (°C)	Zeit			
1	94	2 min	94	2 min			
2	94	30 s	94	30 s			
3	55	45s	55	45s			
4	72	90 s	72	2 min			
5	40 x wdh. ab Sc.	hritt 2	40 x wdh. ab	Schritt 2			
6	72	12 min	72	12 min			

2.12.3.2 Southern Blot

Mittels Southern Blot Analyse ist es möglich zu zeigen, ob das Konstrukt an der korrekten Position in das Genom integriert ist. Die Southern Blot Analyse wurde, wie in Sambrook und Russel (Sambrook, 2001) beschrieben, durchgeführt. Nach der Restriktion der genomischen DNA mit Restriktionsenzymen wurden die entstandenen Fragmente nach ihrer Größe auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel dreißig Minuten im Denaturierungspuffer geschwenkt und dann die Reaktion mit einer halbstündigen Inkubation in Neutralisierungspuffer abgestoppt. Darauf erfolgte der aufwärtsgerichtete Kapillartransfer der DNA auf eine Nitrozellulosemembran über Nacht in 10x SSC (saline-sodium citrate) und das anschließende Fixieren der DNA durch ein zweistündiges Backen bei 90°C. Die Vorlage für die Sonde wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden (Tabelle 12) in einer PCR generiert und über ein Agarosegel aufgereinigt. Zur Herstellung einer radioaktiven Sonde wurde eine Klenow-Polymerase verwendet, die die generierte Vorlage als Matrize benutzte. Mit Hilfe von Oligo Hexameren, dNTPs und radioaktivem [α-P38] dCTP (Desoxycytidintriphosphat) (2 MBql pro Ansatz) ist sie in der Lage radioaktiv markierte DNA zu synthetisieren. Zur Trennung der dNTPs von den Sonden wurde der Ansatz über G50 Sephadex geleitet und die Sonden bei 99°C für zehn Minuten vereinzelt. Die vereinzelten radioaktiven Sonden wurden dann bei 65°C in Hybridisierungslösung auf die prähybridisierte Membran hybridisiert. Anschließend wurde die Membran mehrfach mit 2x SSC/0,1 % SDS und 0,2x SSC/0,1 % SDS bei 65°C

gewaschen. Durch die Auflage eines Röntgenfilms wurden dann die spezifischen Bindungen detektiert.

Tabelle 12: Oligonukleotide zur Herstellung der Sonde 11/12 für die Southern Blot Analyse

Name	Sequenz
Akt1 Sonde Exon 11/12 fw	GGAGGACAACGACTACGGCCGTGC
Akt1 Sonde Exon 11/12 rev	GCATGCGTGTCTGAGCCAGCAAAA

Neutralisationspuffer: 0,5 M TRIS HCl (pH 7,5), 3M NaCl

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

20x SSC: 3 M NaCl, 300mM Na-Citrat

Hybridisierungslösung: 6x SSC, 1 % Milchpulver, 0,1 % SDS

2.12.4 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten

Am Tag 3,5 der Trächtigkeit wurden NMRI Mäusen die Uteri entnommen, ausgespült und die Blastozysten isoliert. In das Blastozoel der Blastozysten wurde mittels eines Mikromanipulators unter einem Stereomikroskop 10-15 ES-Zellen injiziert. Die Injektion erfolgt über eine Transferspitze (Eppendorf, Hamburg), wobei die Blastozysten durch das Ansaugen mit einer Haltekapillare (Eppendorf, Hamburg) fixiert waren. Je nach Anzahl der Leihmütter wurden die Embryonen direkt transferiert oder einen Tag in einem Inkubator (5 % CO₂, 37°C) kultiviert.

2.12.5 Vasektomie

Zur Vasektomie von Mäusen wurden diese mit Ketavet (100 mg/kg)/Rompun (5 mg/kg) intraperitonal (10 μ l/g Maus) betäubt und nach Eröffnung des Bauchraums die Samenleiter unter stereomikroskopischer Vergrößerung verschweißt. Zur Beendigung des Eingriffs wurden der Peritoneal- und der Hautschnitt vernäht.

2.12.6 Embryo Transfer

Der Transfer der Embryonen erfolgte wie in Hogan *et al.* (Hogan et al., 1994) beschrieben. Einer am Tag 3,5 scheinschwangeren Maus, die von einem vasektomierten Männchen begattet wurde, wurde unter Betäubung mit Ketavet/Rompun durch einen dorsalen Schnitt der Uterus freipräpariert. Unter stereomikroskopischer Vergrößerung wurden die manipulierten Embryonen mittels einer Transferpipette in den Uterus eingebracht. Je Uterusschenkel wurden ungefähr zehn Embryonen eingesetzt. Zur Beendigung des Eingriffs wurden der Peritoneal- und der Hautschnitt vernäht.

2.13 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung bestimmt. Die Signifikanz wurde mittels t-Test überprüft und bei einem Wert p < 0,05 angenommen. Die statistischen Auswertungen wurden durch Dipl.-Math. Dr. Dieter Hafner, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, auf ihre Korrektheit geprüft.

2.14 Verwendete Computerprogramme

Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, Odyssey 3.0 (Licor Biosciences, Lincoln, USA), Plate Reader Vision 3.0 (Packard Bioscience/Perkin Elmer, Waltham. USA); pDRAW32 (acaclone software). Die weiteren Computerprogramme sind im direkten Kontext des Experiments angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Knock Down (KD) Zelllinien

Zur Untersuchung der Isoform-spezifischen Funktionen von Akt in HL-1 Zellen sollten stabile KD Zelllinien für Akt1 (Δ Akt1) und Akt2 (Δ Akt2) generiert werden. Der KD wurde durch RNAi mittels Expression von shRNA erzielt. Die shRNA Konstrukte wurden über lentivirale Infektionen in die Zellen eingebracht. Durch die Selektion mit Puromyzin wurde die Generierung einer stabilen Zelllinie gewährleistet. Zu Beginn wurden pro Isoform drei verschiedene shRNA Sequenzen auf ihre Effektivität getestet, deren Bindestellen in Abbildung 11A dargestellt sind.



Abbildung 11: Test verschiedener shRNA Sequenzen zum KD der Akt-Isoformen. A) Bindestellen der verschiedenen shRNAs. B) Western Blot Analyse (WBA) für den Akt1 KD mit einem Antikörper gegen Akt1. C) WBA für den Akt2 KD mit einem Antikörper gegen Akt2. Unter den WB Analysen sind die jeweiligen Intensitäten der Signale aufgelistet. PH: Pleckstrin-Homologie Domäne, RD: regulatorische Domäne

Nach der Infektion mit den unterschiedlichen shRNA-Sequenzen wurden die Proteinspiegel der Akt-Isoformen in den generierten Zelllinien durch **WB** Analysen (WBA) überprüft. Abbildung 11B zeigt die WBA für Akt1 KD Zellen. Im Vergleich zu den untransfizierten HL-1 Zellen zeigen die #934 Zellen eine fast komplette Reduktion des roten Akt1 Signals. Die #935 Zellen weisen ebenfalls eine erfolgreiche Reduktion auf. Im Gegensatz dazu scheint in den #936 Zellen kein KD stattgefunden zu haben. In Abbildung 11C ist die Analyse mit einem Antikörper gegen Akt2 für die Überprüfung des Akt2 KD zu sehen. Im Vergleich zu den HL-1 Zellen zeigen alle drei Zelllinien eine Reduktion des Signals für Akt2, die bei #258 Zellen am stärksten ausfällt. Für die folgenden Experimente wurde die shRNA Sequenz der #934 Zellen für den Akt1 KD (ΔAkt1) und die shRNA Sequenz der #258 Zellen für den Akt2

KD (Δ Akt2) gewählt. Im Fall der Δ Akt2 Zellen konnte die Reduktion der Proteinmenge durch eine verbesserte Infektionsrate noch gesteigert werden (Abbildung 12B).

Zum Ausschluss von Effekten, die auf die shRNA selbst zurückzuführen sind, wurde die shC Zelllinie generiert, die shRNA ohne Zielsequenz in murinen Zellen exprimiert.

3.1.1 Analyse der Akt1 und Akt2 Proteinspiegel

Die Infektion der HL-1 Zellen und der daraus resultierende KD der jeweiligen Akt-Isoform wurde mittels WBA und einer quantitativen Auswertung überprüft. Abbildung 12A zeigt die WBA mit den Isoform-spezifischen Antikörpern. Im grünen Kanal werden die Signale für den Akt2 Antikörper detektiert, der nur für Δ Akt2 Zellen im Vergleich zu den anderen drei Zelllinien ein deutlich schwächeres Signal zeigt. Das Signal für Akt1 (roter Kanal) ist nur bei den Δ Akt1 Zellen reduziert. Dies wird auch gut in dem Fusionsbild sichtbar. Δ Akt2 Zellen zeigen ein gelb-rotes Signal, da die dominante Akt1 Bande nicht komplett durch das schwache Akt2 Signal abgedeckt wird. Ein fast ausschließlich grünes Signal wird bei den Δ Akt1 Zellen sichtbar, da das rote Akt1 Signal fast nicht zu detektieren ist.



Abbildung 12: Charakterisierung der KD Zellen. A) Exemplarische WBA von den Kontroll- und den KD Zelllinien, die mit Antikörpern gegen Akt1 (rot) und Akt2 (grün) durchgeführt wurde. Für die Ladekontrolle wurde β -Actin (rot) verwendet. B) Quantitative Auswertung von fünf unabhängigen WB Analysen. Die Werte wurden auf die Isoform-spezifische Proteinmenge von shC normiert. (n = 5 (3 unabhängig, infizierte Zelllinien), p < 0,05)

Zur Quantifizierung wurde die Proteinmenge der shC Zellen auf 100 % gesetzt und die Proteinmenge der anderen Zelllinien darauf normiert. Diese Art der Normierung gilt für die gesamte Arbeit, falls es nicht anders beschrieben ist. Die Quantifizierung der Signale in Abbildung 12B zeigt, dass die Proteinspiegel von Akt1 und Akt2 in HL-1 und shC Zellen gleich sind. In Δ Akt1 Zellen ist die Akt1 Proteinmenge um 90 % reduziert, während eine 85 %-ige Reduktion von Akt2 in den Δ Akt2 Zellen erzielt wurde. Eine signifikante Hochregulation der verbleibenden Isoform ist in der Quantifizierung nicht zu erkennen.

Zur Überprüfung einer kompensatorischen Proteinsynthese der dritten Isoform Akt3 wurde eine WBA mit einem Antikörper gegen Akt3 durchgeführt. In Abbildung 13 ist zu sehen, dass in den Kontrollzellen kein Signal für Akt3 erscheint. Dieses Ergebnis war erwartet, da Easton et al. schon gezeigt haben, dass Akt3 nur in sehr geringen Mengen im Herzen exprimiert wird (Easton *et al.*, 2005). In den KD Zellen sind ebenfalls keine Signale für Akt3 zu sehen und lassen damit den Schluss zu, dass Akt3 nicht durch die Reduktion von Akt1 und Akt2 im Sinne einer Kompensation induziert wird.



Abbildung 13: Proteinspiegel von Akt3. WBA der Kontroll- und KD Zelllinien mit einem Antikörper gegen Akt3 (grün). Als Ladekontrolle und Positivkontrolle wurde β-Actin (rot) verwendet.

3.1.2 Analyse der relativen Proteinspiegel der Akt-Isoformen in HL-1 Kardiomyozyten

Die KD Zelllinien erlaubten in diesem Experiment erstmals die Analyse der relativen Proteinspiegel für Akt1 und Akt2 in HL-1 Zellen. Diese Art der Analyse war an den wildtypischen HL-1 Zellen bisher nicht möglich. Es gibt zwar Isoform-spezifische Antikörper, jedoch können die damit erhaltenen Signale für Akt1 bzw. Akt2 nicht direkt miteinander verglichen werden. Zum einen besitzen die Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu ihrem Substrat und zum anderen führt die Reaktion der Sekundärantikörper mit dem jeweiligen Primärantikörper zu verschiedenen Signalstärken. Des Weiteren besteht durch die hohe Homologie der beiden Isoformen keine Möglichkeit, sie beispielsweise über den isoelektrischen Punkt oder das Molekulargewicht aufzutrennen. Die KD Zelllinien ermöglichen nun mit Hilfe eines PanAkt-Antikörpers, der Akt unabhängig von seinen Isoformen detektieren kann, eine Aussage über die quantitative Verteilung zu machen. In diesem Fall repräsentiert das Signal in den Δ Akt1 Zellen die Isoform Akt2 und umgekehrt steht das Signal in Δ Akt2 Zellen für Akt1. Die WBA mit einem PanAkt-Antikörper (Abbildung 14A) zeigt in den Δ Akt1 Zellen ein schwächeres Signal als in den Δ Akt2 Zellen. Die quantitative Auswertung (Abbildung 14B) ergab ein relatives Signal von 75 % für Δ Akt2 Zellen und von 25 % für Δ Akt1 Zellen, wobei die verbleibenden Reste von Akt1 in Δ Akt1 Zellen bzw. Akt2 in Δ Akt2 Zellen bei dieser Auswertung vernachlässigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Akt1 mit 75 % die quantitative dominante Isoform in HL-1 Kardiomyozyten ist.



Abbildung 14: Quantitative Verteilung der Akt-Isoformen in HL-1 Zellen. A) Eine exemplarische WBA der KD Zelllinien mit einem PanAkt-Antikörper (grün), der Akt unabhängig von der Isoform erkennt. Für die Ladekontrolle wurde β-Actin (rot) verwendet. B) Quantitative Auswertung des PanAkt-Signals von drei verschiedenen Analysen, wobei alle Werte auf shC bezogen wurden. (n = 3)

3.1.3 Analyse der Phosphorylierung/Aktivierung

Für die Untersuchung von unterschiedlichen Aktivierungs- und damit Phosphorylierungsmustern der KD Zelllinien wurden sie mit Insulin oder IGF stimuliert. Die Stimulation führt zu einer Initiierung des PI3K-Signalwegs, der zu einer Phosphorylierung von Akt führt. Die Phosphorylierung am Ser 473/474, die für die vollständige Aktivierung von Akt gebraucht wird, wurde dann mit einem Antikörper in einer WBA nachgewiesen.

Abbildung 15A zeigt, dass ohne Stimulation (K) in den HL-1 Zellen fast kein Signal im grünen Kanal für die Phosphorylierung von Ser 473/474 zu detektieren ist. Nach Stimulation mit Insulin (Ins) oder IGF wird eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von Ser 473/474 (grüne Signale) nachweisbar. Ein ähnliches Verhalten ist auch in den KD Zellen zu finden. Zur Quantifizierung der Signale (Abbildung 15B) wurden die Phosphorylierungssignale der KD Zellen auf das Phosphorylierungssignal des jeweiligen Stimulus der HL-1 Zellen normiert. Die quantitativen Daten zeigen, dass nach Stimulation mit Insulin oder IGF die Δ Akt1 Zellen ein ähnliches Ser 473/474 Phosphorylierungsniveau wie die HL-1 Zellen aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde für die Δ Akt2 Zellen ein 50 % geringeres Phosphorylierungsniveau im Vergleich zu den HL-1 Zellen ermittelt. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die quantitativ geringer exprimierte Isoform Akt2 das bevorzugte Phosphorylierungsziel nach Stimulation mit Insulin und IGF ist.



Abbildung 15: Phosphorylierung von Akt am Ser 473/474 vor (K) und nach zehn Minuten Stimulation mit 200 nM Insulin (Ins) oder 130 nM IGF in Kontrollzellen und den KD Zelllinien. A) WBA mit einem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Ser 473/474 (grün). Ladekontrolle β -Actin (rot). B) Quantitative Auswertung von sechs Analysen. Die Phosphorylierungssignale der KD Zellen wurden auf das Phosphorylierungssignal des jeweiligen Stimulus der HL-1 Zellen normiert. (n = 6, p < 0,05)

3.1.4 Akt-Substrat Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3β)

Die GSK3 β wurde als Beispiel herangezogen, um mögliche Unterschiede für Akt-Substrate nach dem Akt-Isoform KD zu analysieren. Dafür wurden WB Analysen mit einem GSK3 β Antikörper angefertigt. Abbildung 16A zeigt ein Beispiel für diese Analyse, bei der nur für Δ Akt1 Zellen ein leicht verstärktes Signal im Vergleich zu den anderen drei Zelllinien sichtbar wird. Durch die Quantifizierung der WB Analysen (Abbildung 16B) konnte in den Δ Akt2 und Kontrollzellen eine vergleichbare GSK3 β Proteinmenge ermittelt werden. Eine Steigerung der Proteinmenge um 25 % konnte für die Δ Akt1 Zellen berechnet werden. Dies lässt vermuten, dass Akt1 die Proteinspiegel von GSK3 β negativ beeinflusst.



Abbildung 16: A) Exemplarische WBA der Kontroll- und KD Zellen mit einem GSK3β Antikörper. B) Quantitative Auswertung der WB Analysen. (n = 5, 3 unabhängig, infizierte Zelllinien, p < 0,05)

3.1.4.1 Analyse der Phosphorylierung

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Phosphorylierung von GSK3 β durch einen Isoform KD beeinflusst ist, wurde nach Stimulation mit Insulin oder IGF eine WBA gegen die Phosphorylierungsstelle Serin (Ser) 9 der GSK3 β durchgeführt (Abbildung 17A). Für die HL-1 Zellen zeigt sich schon im basalen Zustand (K) ein Phosphorylierungssignal für Ser 9 im grünen Kanal. Die basale GSK3 β Phosphorylierung kann dadurch erklärt werden, dass es neben Akt weitere Kinasen gibt, die GSK3 β phosphorylieren können. Durch die Stimulation mit Insulin (Ins) oder IGF wird eine Verstärkung des Phosphorylierungssignals deutlich. Dabei zeigen die Δ Akt1 und Δ Akt2 Zellen ein vergleichbares Verhalten. Zur Quantifizierung wurden die Phosphorylierungssignale der KD Zellen auf das Phosphorylierungssignal des jeweiligen Stimulus der HL-1 Zellen normiert Mit der quantitativen Auswertung der Phosphorylierungssignale für Ser 9 (Abbildung 17B) konnte für beide KD Zelllinien eine circa 35 %-ige Reduktion der Phosphorylierung nach Stimulation mit Insulin oder IGF im Vergleich zu den HL-1 Zellen berechnet werden. Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass die Phosphorylierung der GSK3 β sowohl durch Akt1, als auch Akt2, reguliert wird.



Abbildung 17: Phosphorylierung von GSK3 β am Serin 9 nach zehn Minuten Stimulation mit 200 nM Insulin (Ins) oder 130 nM IGF. A) WBA von basalen und stimulierten Kontroll- und KD Zellen mit einem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle Ser 9 von GSK3 β (pGSK3 β). B) Quantitative Auswertung der WB Analysen. Die Phosphorylierungssignale der KD Zellen wurden auf das Phosphorylierungssignal des jeweiligen Stimulus der HL-1 Zellen normiert. (n = 6, p < 0,05)

3.1.5 Isoform-spezifische Komplexbildung nach Aktivierung von Akt

Da sich zeigte, dass Akt2 das bevorzugte Phosphorylierungsziel nach Insulin oder IGF Stimulation ist, stellte sich die Frage, ob Akt2 eine verstärkte Bindung zum mTOR Komplex 2 (mTORC2) aufweist, der für die Ser 474 Phosphorylierung verantwortlich ist. Für die Analyse von stabilen Komplexen zwischen Akt und Mitgliedern des mTOR Komplexes 2 wurde eine Präzipitation mit einer nachfolgenden WBA durchgeführt. Da sich herausstellte, dass Akt2 nicht vollständig präzipitiert werden kann, wurden in diesem Experiment HL-1 Zellen verwendet, die stabil Akt1-Tag oder Akt2-Tag exprimieren (Abbildung 18). Über dieses Tag kann die jeweilige Isoform und die möglichen Komplexpartner spezifisch isoliert werden.



Abbildung 18: N-terminal getaggtes Akt. An Akt1 und Akt2 wurde jeweils am N-Terminus ein Tripel-Tag, bestehend aus HA-, Strep- und Flag-Tag, angehängt. Dieses Konstrukt wurde stabil in HL-1 Zellen eingebracht. Reg.: regulatorisch

Nach einer Stimulation der Zellen mit Insulin erfolgte eine Präzipitation mit Strep-Tactin-Sepharose über das Strep-Tag. Das erhaltene Präzipitat wurde auf Kopräzipitation von Mitgliedern der mTOR-Komplexe 1 und 2 getestet.



Abbildung 19: WB Analysen zur Detektion von Isoform-spezifischen Komplexen mit mTORC1 und mTORC2. A), B) Nachweis der korrekten Präzipitation der getaggten Akt-Isoformen mit einem Antikörper gegen Akt1 (A, rot) und Akt2 (B, grün). C) Überprüfung der Akt-Phosphorylierung mittels pAktSer474-Antikörper am Beispiel der Akt2-Tag Zellen. D), E) Überprüfung der Präzipitate auf Kopräzipitation mit Mitgliedern der mTOR Komplexe 1 und 2. D) Analyse mit Antikörpern gegen mTor und G β L. E) Analyse mit Antikörpern gegen Rictor und Raptor

E: Gesamtextrakt, Ü: Präzipitatüberstand, P: Präzipitat, tAkt: Höhe der getaggten Akt, Akt: Höhe der endogenen Akt, K: Kontrolle, Insulin: Ins

Zu Beginn musste die korrekte Präzipitation überprüft werden. In Abbildung 19A ist eine WBA mit einem Antikörper gegen Akt1 zu sehen, der die Aufreinigung des Akt1-Tag Proteins analysiert. In den Akt1-Tag Zellen, die unter Kontrollbedingungen gehalten wurden, zeigt sich im Gesamtextrakt (E, 1. Spalte) jeweils ein Signal auf der Höhe des endogenen und des getaggten Akt (tAkt) Proteins. Im Präzipitatüberstand (Ü) gehen geringe Mengen an Protein für beide Akt-Fraktionen verloren. Eine Anreicherung von tAkt im Präzipitat ist durch die Signalverstärkung im Vergleich zum Extrakt erkennbar. Die Aufreinigung von tAkt ist frei von kontaminierendem endogenem Akt, da im Präzipitat keine endogene Akt mehr detektiert werden kann. Die Spezifität der Reaktion wird durch die Akt2-Tag Zellen deutlich, da diese nur Signale für das endogene Akt im Gesamtextrakt und im Überstand zeigen. Das gleiche Bild ist auch in den Insulin-stimulierten Zellen wiederzufinden. Abbildung 19B zeigt

die erfolgreiche Aufreinigung von Akt2-Tag Protein. Die WBA mit einem Antikörper gegen Akt2 zeigt im Präzipitat für Akt2-Tag Zellen unter basalen und stimulierten Bedingungen ein verstärktes Signal im Vergleich zum Gesamtextrakt auf der Höhe des tAkt. Da dieses Experiment eine Stimulation mit Insulin beinhaltete, musste die Aktivierung von Akt an Hand der Phosphorylierungsstelle Ser 473/474 überprüft werden. Abbildung 19C zeigt dies exemplarisch für die Akt2-Tag Zellen. Unter Kontrollbedingungen wurden schwache Phosphorylierungssignale für das endogene und das getaggte Akt im Gesamtextrakt erhalten. Nach Stimulation mit Insulin ist eine deutliche Signalsteigerung in beiden Akt Fraktionen zu sehen.

Da die getaggten Akt-Isoformen nahezu quantitativ über die Strep-Tactin-Sepharose aufgereinigt werden konnten, wurde nun überprüft, ob Komponenten des mTORC2 kopräzipitiert wurden. Da der mTOR Komplex 1 (mTORC1) teilweise aus den gleichen Untereinheiten wie der als Akt-Kinase wirkende mTORC2 besteht, wurden zusätzlich auch Antikörper gegen Proteine des mTORC1 eingesetzt. Abbildung 19D zeigt eine WBA mit Antikörpern gegen mTOR und G\u00f3L, die an beiden mTOR-Komplexen beteiligt sind. Das Präzipitat (P) von Akt1-Tag Zellen zeigt unter basalen (K) und stimulierten (Ins) Bedingungen (1. und 2. Spalte) kein Signal. Zur Kontrolle der Antiköper wurde jeweils der Gesamtextrakt (E) aufgetragen, in dem in beiden Fällen ein Signal für die Proteine detektierbar war. Dasselbe Bild zeigen auch die Akt2-Tag Zellen. Die Analyse mit Antikörpern gegen Rictor (mTORC2) und Raptor (mTORC1) ermöglicht die Unterscheidung zwischen den beiden Komplexen (Abbildung 19E). Akt1-Tag Zellen, die unter Kontrollbedingungen gehalten wurden (1. und 2. Spalte), zeigen für Rictor und Raptor jeweils nur ein Signal im Gesamtextrakt, aber nicht im Präzipitat. Dies gilt auch für stimulierte Akt1-Tag Zellen und für beide Bedingungen bei den Akt2-Tag Zellen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass weder Akt2 noch Akt1 stabile Komplexe mit mTORC1 oder mTORC2 eingehen.



Abbildung 20: WBA zur Detektion von Isoform-spezifischen Komplexen mit PDK1. K: Kontrolle, Insulin: Ins

Des Weiteren wurde die Komplexbildung mit PDK1 überprüft, die für die Phosphorylierung von Thr 308/309 verantwortlich ist. Abbildung 20 zeigt, dass nur im Extrakt und nicht im

Präzipitat Signale für PDK1 sichtbar werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Akt1 und Akt2 keine stabilen Komplexe mit PDK1 ausbilden.

3.2 Akt und der Glukosemetabolismus

Für Akt und im Besonderen Akt2 wurde eine wichtige regulatorische Rolle für die Glukoseaufnahme nachgewiesen (Gonzalez & McGraw, 2009b). Schon die Akt2 KO Maus zeigte durch den *Diabetes mellitus* Phänotyp, das Akt2 einen großen Einfluss auf den Glukosehaushalt besitzt (Cho *et al.*, 2001a). Der Befund, dass die gering exprimierte Akt2 Isoform das bevorzugte Phosphorylierungsziel nach Insulin/IGF Stimulation in den HL-1 Kardiomyozyten darstellt, führte zu der Frage, ob der KD von Akt zur Modulation von Faktoren führt, die an der Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten beteiligt sind.

3.2.1 Glukosetransporter 1 und 4

3.2.1.1 Analyse der Proteinspiegel

Der Glukosetransporter GLUT4 wird nach Stimulation mit Insulin über den PI3K/Akt-Signalweg verstärkt zur Plasmamembran transloziert und sorgt so für eine erhöhte Glukoseaufnahme. Zur quantitativen Analyse von GLUT4 wurden WB Analysen mit den Kontroll- und KD Zelllinien durchgeführt. Abbildung 21A zeigt eine exemplarische WBA für GLUT4, bei der das Signal nur in den Δ Akt2 Zellen reduziert erscheint. Die quantitative Auswertung der Signalintensitäten von neun Analysen in Abbildung 21B demonstriert eine Reduktion der Proteinmengen um 15 % in Δ Akt1 Zellen und um 20 % für die Δ Akt2 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass beide Isoformen einen Einfluss auf die Proteinspiegel von GLUT4 haben könnten. Akt2 jedoch scheint einen größeren Einfluss zu haben, wenn man bedenkt, dass der Verlust von 25 % Akt2 (Anteil am Gesamt-Akt) zu einem ähnlichen Effekt wie der Verlust von 75 % Akt1 führt.

Neben dem Insulin-induzierbaren GLUT4 sorgt der GLUT1 für die Glukoseaufnahme unter basalen Bedingungen. GLUT1 wurde ebenfalls auf die Proteinspiegel in Kontroll- und KD Zellen analysiert. Abbildung 21C zeigt eine exemplarische WBA für GLUT1. Über die quantitative Auswertung von sechs Analysen (Abbildung 21D) konnten für HL-1 und shC Zellen gleiche Proteinmengen ermittelt werden. Die Δ Akt2 Zellen wiesen im Gegensatz zu den Δ Akt1 Zellen eine Reduktion der Proteinmenge für GLUT1 von 20 % auf und damit scheint Akt2 auch eine Rolle bei der Modulation der Proteinspiegel von GLUT1 zu spielen.



Abbildung 21: Proteinspiegel der Glukosetransporter. A) Exemplarische WBA von GLUT4 an den KD und Kontrollzellen. B) Quantitative Auswertung der GLUT4 WB Analysen. (n = 9, 3 unabhängig, infizierte Zelllinien; p < 0,05) C) Exemplarische WBA von GLUT1 an den Kontroll- und den KD Zellen. D) Quantitative Auswertung der GLUT1 WB Analysen. (n = 6, 2 unabhängig, infizierte Zelllinien; p < 0,05)

3.2.1.2 Analyse der mRNA Expression

Auf Grund der verringerten Proteinniveaus der Glukosetransporter nach einem Verlust von Akt2, stellte sich die Frage, ob es schon zu einer Veränderung der Expression auf der mRNA Ebene kommt. Ferner ist Akt in der Lage die Transkription von Genen indirekt zu modulieren, in dem es die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise FOXO,

über die Phosphorylierung reguliert (Medema *et al.*, 2000). Zur Quantifizierung der mRNA von den beiden Glukosetransportern wurden quantitative RT-PCR Analysen durchgeführt, bei denen als Referenzgen *Hprt* verwendet wurde. Je Zielgen wurden drei unabhängig, infizierte Sets von Zelllinien mit vier biologischen Replikaten getestet, die wiederum mit drei technischen Replikaten abgesichert wurden. Eine Veränderung der mRNA Expression kann bei dieser Methode nur bei einer Verdopplung bzw. Halbierung vorliegen, da dieser Analyse eine Verdopplung der DNA Menge pro PCR-Zyklus zu Grunde liegt. Die Auswertung der qRT-PCR Analysen in Abbildung 22 ergaben weder für GLUT1 (Abbildung 22A) noch für GLUT4 (Abbildung 22B) einen Unterschied zwischen den vier verschiedenen Zelllinien. Daraus kann gefolgert werden, dass die mRNA Expression beider Glukosetransporter unabhängig von Akt ist.



Abbildung 22: Auswertung der quantitativen RNA-Analyse mittels qRT-PCR für GLUT1 (A) und GLUT4 (B). (n = 3 unabhängig, infizierte Zelllinien, 4 biologische Replikate, 3 technische Replikate)

3.2.2 AS160

3.2.2.1 Analyse der Proteinspiegel

AS160 wird durch die Phosphorylierung von Akt inaktiviert und kann dann die Translokation von GLUT 4 an die Plasmamembran nicht mehr hemmen. Zur Untersuchung der AS160 Proteinspiegel wurden WB Analysen angefertigt, von denen in Abbildung 23A eine Analyse exemplarisch abgebildet ist. Bei den Kontrollzellen und Δ Akt1 Zellen sind ähnliche Signalintensitäten für AS160 zu sehen. Im Gegensatz dazu ist in den Δ Akt2 Zellen ein schwächeres AS160 Signal sichtbar. Auch die quantitative Auswertung (Abbildung 23B) unterstützt diese Beobachtung, da für die Δ Akt2 Zellen eine 40 % geringere Proteinmenge von AS160 berechnet wurde. Die anderen drei Zelllinien besitzen gleiche Proteinniveaus für AS160. Aus diesem Ergebnis lässt sich ein Einfluss von Akt2 auf die Proteinspiegel von AS160 herleiten.



Abbildung 23: Bestimmung der relativen Proteinmengen von AS160 in Kontroll- und KD Zellen. A) Exemplarische WBA mit einem Antikörper, der gegen AS160 gerichtet ist. B) Quantitative Auswertung der WBA für AS160. (n= 10, 3 unabhängig, infizierte Zelllinien; p < 0,05)

3.2.2.2 Analyse der mRNA Expression

Auf Grund der verringerten Proteinspiegel von AS160 durch den Akt2 KD, wurde nun untersucht, ob sich diese Unterschiede auch schon auf der Ebene der mRNA finden lassen.



Abbildung 24: Quantitative Auswertung der q-RT-PCR Analysen für AS160. (n = 3 unabhängig, infizierte Zelllinien, 4 biologische Replikate, 3 technische Replikate)

Dazu wurden qRT-PCR Analysen für AS160 durchgeführt. In Abbildung 24 ist die quantitative Auswertung dargestellt, bei der HL-1 und shC Zellen keinen Unterschied in der relativen mRNA Expression zeigen. Hingegen ist die relative mRNA Expression in den beiden KD Zelllinien im Vergleich zu den shC Zellen leicht reduziert, wobei unter Beachtung der Analysebedingungen diese Unterschiede als Tendenzen zu betrachten sind. Beide Akt-Isoformen könnten also einen leichten Einfluss auf die mRNA Expression von AS160 haben.

3.2.3 Tbc1d1

Der Befund, dass der KD von Akt2 einen Effekt auf das Proteinniveau von AS160 (Tbc1d4) hatte, zog die Frage nach, ob auch das stark verwandte Tbc1d1 betroffen ist. Diese Annahme ist nicht unbegründet, da Tbc1d1 auch eine ähnliche Funktion wie AS160 in der Steuerung der Glukoseaufnahme besitzt.



Abbildung 25: Quantitative Auswertung der qRT-PCR Analysen für Tbc1d1. n = 3 unabhängig, infizierte Zelllinien (4 biologische Replikate mit 3 technischen Replikaten)

Zur Untersuchung der mRNA Expression von Tbc1d1 wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt, deren quantitative Auswertung in Abbildung 25 zu sehen ist. HL-1 und shC Zellen wiesen eine vergleichbare relative mRNA Expression auf, hingegen zeigten die KD Zellen fast eine Halbierung der relativen mRNA Menge im Vergleich zu den shC Zellen an. Die annähernd halbierte mRNA Expression von Tbc1d1 in den KD Zellen lässt den Schluss zu, dass die Akt-Isoformen die Tbc1d1 mRNA Expression regulieren.

Auf Grund der Ergebnisse zur mRNA Expression wurde ebenfalls eine Analyse an Hand einer WBA mit dem zu dieser Zeit einzigen, kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Tbc1d1

durchgeführt. Mit diesem Antikörper konnten keine Signale generiert werden. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass die Proteinmenge von Tbc1d1 im Herzen sehr gering ist (Chadt *et al.*, 2008).

3.2.4 Glukoseaufnahme

Aus den vorherigen Analysen geht hervor, dass der KD von Akt2 einen Einfluss auf die Proteinmengen der Faktoren des Glukosemetabolismus hat. Hieraus ergab sich die Frage, ob dies einen Effekt auf die Glukoseaufnahme hat.



Abbildung 26: Glukoseaufnahmeanalyse unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 200 nM Insulin oder 130 nM IGF an den Kontroll- und KD Zelllinien. HL-1: n = 37, shC: n = 10 (IGF: n = 6), ΔAkt2: n = 42, ΔAkt1: n = 43

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Glukoseaufnahmebestimmungen mit radioaktiver 2-Deoxy-D-[2,6-3H]Glukose (Abbildung 26) an den Kontroll- und KD Zelllinien durchgeführt. Unter basalen Bedingungen besaßen alle Zelllinien eine ähnliche Glukoseaufnahmerate. Die Stimulation durch Insulin oder IGF führte in allen Zelllinien zu einem erwarteten Anstieg der Glukoseaufnahme, deren Ausmaß für alle Zelllinien auf einem vergleichbaren Niveau war. Danach hat der KD der Akt-Isoformen keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahme.

3.3 Charakterisierung der Akt Plus (AP) Zelllinien

Zur Verifizierung der Befunde aus den KD Zellen wurden Zelllinien etabliert, in denen entweder Akt1 oder Akt2 überexprimiert wurde. Als Basis dienten die HL-1 und shC Zellen. Außerdem sollten beide Isoformen in die KD Zellen eingebracht werden, um zu prüfen, ob die Reduktion der Glukosetransporter auf der Proteinebene reversibel ist. Zu diesem Zweck wurden mutierte Varianten von Akt1 und Akt2 konstruiert, in denen die shRNA Bindestellen durch stille Mutationen verändert wurden (Abbildung 27). Da die shRNA nicht an die mutierten shRNA Bindestellen binden kann, kommt es in den KD Zellen nicht zum Abbau der mutierten mRNA und die Blockade der Translation wird umgangen.

<u>Akt1</u> DNA-Sequenz: AS-Sequenz: mut. DNA-Sequenz	AAG / -K- AAG /	' GAC / -D- / GA <u>T</u> /	GGG / -G- GG <u>C</u> /	CAC / -H- CA <u>T</u> /	ATC / - I- AT <u>T</u> / /	AAG / -K- AA <u>A</u> /	ATA / -l- ATA /	ACG / - T- ACG /	/ GAC / -D- / GAC /	/ TTC / -F- / TTC /	/ GGG -G- / GGG	/ CTG -L- / CTG
<u>Akt2</u> DNA-Sequenz: AS-Sequenz: mut. DNA-Sequenz	ACC / -T- ACC /	/ TGG / -W- / TGG /	AGG / -R- AGG /	CCA / -P- CCA /	CGG / - R- <u>A</u> G <u>A</u> /	TAC / -Y- TA <u>T</u> /	TTC / -F- TT <u>T</u> /	CTT / -L- (<u>T</u> T <u>A</u> /	CTG / -L- CT <u>T</u> /	AAG / - K- AAG /	/ AGT / -S- / AGT /	GAT - A- GAT

Abbildung 27: Sequenzen der shRNA Bindestellen und die entsprechenden Mutation, die die Bindung der shRNA verhindern. grau: shRNA Bindestelle, Fett und Unterstrich: veränderte Base, AS: Aminosäure

Die Vektoren für diese lentivirale Infektion wurden mittels dem In-Fusion PCR Klonierungssystem (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) hergestellt. Als Basisvektor für die Klonierung wurde der lentivirale Vektor pGJ3-C-CAGGS (Charakterisierung in Kapitel 2.5.3) (Naguib, 2009) verwendet (Abbildung 28A). Für die Selektion der HL-1 Zellen wurde in diesen Vektor zusätzlich die Neomyzin-Kassette inseriert. Die Neomyzin-Kassette wurde über EcoRV Schnittstellen aus dem Vektor MUP MK3 (Abbildung 10) entnommen und in den mit BsrGI und NheI geschnittenen Vektor pGJ3-C-CAGGS eingesetzt. Der neu generierte Zielvektor pGJ3-C-CAGGS-Neo (Abbildung 28A, Charakterisierung Abbildung 44) wurde für die In-Fusion Klonierung mit den Restriktionsenzymen HpaI und SwaI geöffnet. Um die Mutationen an der gewünschten Stelle in der Akt-Sequenz einzufügen, wurden je zwei Oligonukleotid-Paare für zwei PCR-Fragmente generiert (Abbildung 28B). Das zusammengehörige Oligonukleotid-Paar bestand aus einem Oligonukleotid mit einer Homologie benachbart zur Restriktionsschnittstelle des Vektors und aus einem Oligonukleotid mit einer homologen Sequenz zur mutierten shRNA-Bindestelle. Mit Hilfe dieser homologen Bereiche konnten die amplifizierten PCR-Fragmente über homologe Rekombination durch das In-Fusion Enzym *in vitro* mit dem geöffneten Zielvektor pGJ3-C-CAGGS-Neo fusioniert werden.



Abbildung 28: A) Klonierung des pGJ3-C-CAGGS-Neo. Der pGJ3-C-CAGGS wird über BsrGI und NheI geöffnet und die Neomyzin-Kassette (Neo) des Vektors MUP MK3 eingefügt. Die Neomyzin-Kassette wurde über EcoRV aus dem Vektor MUP MK3 herausgeschnitten. Für die weitere Klonierung wurde das Endprodukt pGJ3-C-CAGGS-Neo über SwaI und HpaI geöffnet und es konnten die Fragmente über die In-Fusion-Klonierung eingebracht werden. Die Abkürzungen und Farbkodierung der Vektoren ist in 2.5.3 erläutert. B) Klonierungsschema zur Herstellung der AP Vektoren. Es wurden Oligonukleotide generiert, die in ihrem homologen Bereich die veränderten Basen für die Mutation der shRNA Bindestelle trugen. Das jeweils zugehörige Oligonukleotid zur Amplifizierung der PCR-Fragmente trug eine Homologie zur Vektorsequenz. Nach einer PCR mit diesen Oligonukleotiden entstanden PCR-Fragmente, die zusammen mit dem geöffneten Zielvektor über homologe Rekombination durch das In-Fusion Enzym zum fertigen Endvektor fusioniert wurden. Die karierten und längsgestreiften Balken symbolisieren die Sequenzen/Bereiche des Vektors, die für die homologe Rekombination benötigt werden. Die Sequenz des *Akt* Gens ist mit grauen Balken dargestellt.

In der Abbildung 29 sind die entstandenen Vektoren pGJ3-C-AP-Akt1 und pGJ3-C-AP-Akt2 schematisch und in der diagnostischen Restriktionsanalyse dargestellt. Zur Herstellung der AP Zelllinien wurde nach der Infektion mit den Viren, die die jeweiligen Konstrukte enthielten, eine Selektion mit G418 durchgeführt, um stabile Zelllinien zu erhalten.



Abbildung 29: pGJ3-C-AP-Akt1 und pGJ3-C-AP-Akt2: Vektoren zur Generierung von AP Zelllinien und ihre diagnostische Restriktionsanalyse. A1) Schematische Darstellung des pGJ3-C-AP-Akt1 Vektor. A2) Diagnostische Restriktionsanalyse mit MscI, die zu den erwarteten Banden von 7505 bp, 2681 bp, 1365 bp und 442 bp (hier nicht sichtbar) führt. B1) Karte des pGJ3-C-AP-Akt2 und seine diagnostische Restriktionsanalyse (B2) mit SacI. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 5026 bp, 4286 bp, 2495 bp und 191 bp (letztere hier nicht sichtbar). Die schematische Darstellung des Ausgangsvektor pGJ3-C-CAGGS-Neo befindet sich in Abbildung 44 im Anhang. Erwartete Fragmentgrößen: MscI : 7878 bp, 2681bp; SacI: 5343 bp, 5026 bp. Die Abkürzungen und Farbkodierung des Vektors ist in 2.5.3 erläutert.

3.3.1 Analyse der Akt1 und Akt2 Proteinspiegel

Zur Charakterisierung der AP Zelllinien wurde die quantitative Verteilung der Akt-Isoformen über eine WBA bestimmt. Abbildung 30A zeigt die WBA mit Antikörpern gegen Akt1 (rot) und Akt2 (grün). Die Signale im roten und grünen Kanal der Spalte 1 verdeutlichen die Proteinmengen für die Akt-Isoformen der shC Kontrollzellen vor Infektion mit den AP-Akt1 oder AP-Akt2 Konstrukten. Infiziert man diese Zellen mit Viren, die den Vektor pGJ3-C-AP-Akt1 tragen, so ist eine deutliche Signalsteigerung für Akt1 erkennbar (shC/1: shC +Akt1), wobei das Akt2 Signal (grün) auf dem Basisniveau verbleibt. Dies verdeutlicht auch das Fusionsbild durch die stärkere Gelbfärbung des Signals auf der Höhe für Akt. Eine Infektion mit Viren, die den Vektor pGJ3-C-AP-Akt2 tragen, führt zu einem Anstieg des Akt2 Signals (grün), wobei das Akt1 Signal unverändert bleibt (shC/2: shC +Akt2). Das Fusionsbild unterstreicht die Beobachtung durch eine verstärkte grüne Färbung des Akt Signals. Zur quantitativen Analyse wurde die Proteinmenge der jeweiligen Isoform in shC Zellen auf 100 % gesetzt und die Proteinmengen der anderen Zelllinien darauf normiert. Die quantitative Analyse (Abbildung 30B) zeigt, dass in den shC/1 Zellen die Akt1 Proteinmenge auf über 250 % gesteigert wurde. Die Überexpression von Akt2 in shC Zellen führte zu einer Steigerung der Akt2 Proteinmenge auf 190 % (shC/2).

Werden $\Delta Akt1$ Zellen, in denen das Akt1 Signal stark reduziert ist, mit dem AP-Akt1 Konstrukt (Δ Akt1/1: Δ Akt1+Akt1) infiziert, so kommt es zu einer Steigerung und damit Wiederherstellung des Akt1 Signals (Abbildung 30A). Die quantitative Analyse (Abbildung 30B) zeigt, dass die Akt1 Proteinmenge von 15 % in Δ Akt1 Zellen auf 150 % in Δ Akt1/1 Zellen erhöht werden kann. Dasselbe Prinzip ist für die AAkt2 Zellen gültig, bei denen die Infektion des AP-Akt2 (+Akt2) zur Steigerung des Akt2 Signals führt (ΔAkt2/2: ∆Akt2+Akt2). Die quantitative Auswertung in Abbildung 30B zeigt, dass die Steigerung der Proteinmenge von Akt1 größer ist, als die Steigerung von Akt2. Deutlicher wird diese Beobachtung, wenn man die Auswertung der realen Verteilung der Isoformen in HL-1 Zellen zu Grunde legt. Bei dieser Auswertung (Abbildung 30C) wurden die Proteinniveaus von Akt1 auf 75 und Akt2 auf 25 arbiträre Einheiten (aE) in den shC Zellen gesetzt. Die Proteinniveaus der anderen Zelllinien wurden dann auf die shC Zellen normiert. In shC/1 Zellen stieg die Akt1 Menge auf 200 aE, die damit auch einen großen Anteil am gesamten Akt (200 aE Akt1 + 28 aE Akt2 = 228 aE Gesamt-Akt) ausmacht. Die Verdopplung der Akt2 Menge auf 48 aE in den shC/2 Zellen führte hingegen nur zu einem geringen Anstieg der gesamten Akt-Menge (106 aE Akt1 + 48 aE Akt2 = 154 aE Gesamt-Akt). Für die Analyse wurden zwei Sets von AP Zelllinien generiert, die aus unabhängig infizierten Basiszelllinien hervorgegangen sind. In der Charakterisierung zeigten diese Sets vergleichbare Eigenschaften, wobei hier zur Vereinfachung nur ein Set vorgestellt wurde.



Abbildung 30: Verteilung der Proteinmengen von Akt1 und Akt2 in den AP Zelllinien. A) WBA der Basisund der AP Zelllinien mit Antikörpern gegen Akt1 (rot) und Akt2 (grün). Als Ladekontrolle diente α-Tubulin (rot). B) Quantitative Verteilung der Akt-Isoformen. Für beide Isoformen wurde die Signalintensität in der shC Zelllinie auf 100 % gesetzt. C) Reale Verteilung der Akt-Isoformen in den verschiedenen Zelllinien. In dieser Auswertung wurde das Proteinniveau von 75 aE Akt1 und 25 aE Akt2 in shC Zellen als Grundlage verwendet und die Intensitäten der anderen Zelllinien darauf bezogen. shC + Akt1: shC/1; shC + Akt2: shC/2

3.3.2 Analyse der Phosphorylierung/Aktivierung

Für weitere Analysen an den AP Zelllinien musste zunächst geklärt werden, ob das Akt-Protein von den AP-Akt1 und AP-Akt2 Vektoren funktionsfähig ist. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung über die Phosphorylierung am Serin 473/474 analysiert. Nach Stimulation der AP Zellen mit Insulin wurde eine WBA mit dem pAktSer473/474-Antikörper angefertigt. In Abbildung 31 sind die AP- und die zugehörigen Basiszelllinien vor (K) und nach (Ins) Stimulation dargestellt. Am Bespiel der HL-1 Gruppe sieht man, dass es nach Stimulation (Ins) zu einer Signalsteigerung im Vergleich zur Kontrolle (K) kommt. In den HL-1/1 (HL-1+Akt1) und HL-1/2 (HL-1+Akt2) Zellen ist unter basalen (K) und stimulierten (Ins) Bedingungen ein stärkeres Signal als in den Vorläuferzellen HL-1 zu sehen. Dies ist auch in den anderen drei Gruppen zu beobachten und führte zu dem Schluss, dass die transgenen Akt-Proteine phosphoryliert und damit aktiviert werden können.

Auffällig war, dass trotz des deutlich stärkeren Anstiegs des Gesamt-Akts durch die Überexpression von Akt1 in den AP Zelllinien (3.3.1), die Phosphorylierung, im Verhältnis zu den Akt2 überexprimierenden Zellen, nicht deutlich gesteigert wurde. Sichtbar wird dies beispielsweise bei einem Vergleich zwischen den stimulierten HL-1/1 und HL-1/2 Zellen. Des Weiteren führt die Rettung des Δ Akt2 KD in Δ Akt2/2 zu einer deutlichen Signalsteigerung im Vergleich zu der Basiszelllinie Δ Akt2 unter basalen und stimulierten Bedingungen. Die Synthese von zusätzlichem Akt1 in Δ Akt2 Zellen (Δ Akt2/1) zeigt im Vergleich zu den Δ Akt2 Zellen keine Veränderungen. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass obwohl deutlich mehr Akt1 als Akt2 vorhanden ist, wieder Akt2 bevorzugt nach Stimulation mit Insulin phosphoryliert wird.



Abbildung 31: Phosphorylierungsanalyse der AP Zelllinien. WBA der Basis- (x) und AP Zelllinien (+Akt1 und +Akt2) vor (K) und nach (Ins) Stimulation mit Insulin. Der pAktSer473/474-Antikörper richtet sich gegen das phosphorylierte Ser 473/474.

3.3.3 Einfluss von Akt1 und Akt2 auf die GLUT Proteinspiegel

Auf Grund des Befunds, dass Akt2 eine wichtigere Rolle als Akt1 bei der Modulation der Proteinspiegel von GLUT1 und GLUT4 spielen könnte, wurde die Korrelation der Proteinniveaus von beiden Glukosetransportern und den jeweiligen Akt-Isoformen überprüft. Dazu wurden die Proteinniveaus der Glukosetransporter in den AP Zelllinien über WBA detektiert und mit den relativen Proteinmengen (bezogen auf shC) eine Regressionsanalyse durchgeführt, bei der die relative Proteinmenge des jeweiligen Glukosetransporters gegen die relative Proteinmenge der jeweiligen Akt-Isoform aufgetragen wurde.



Abbildung 32: Regressionsanalyse der relativen Proteinmenge für GLUT4 bezogen auf die relative Proteinmenge von Akt1 (A) oder Akt2 (B). (n = 42, 2 unabhängig, infizierte Zelllinien; für Akt1: p = 0.76; für Akt2: $p=3.2 \times 10^{-5}$)

Die Regressionsanalyse für GLUT4 ist in Abbildung 32 dargestellt. Für Akt1 (Abbildung 32A) konnte das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,0024$ berechnet und damit ein linearer Zusammenhang mit hoher Wahrscheinlichkeit (p = 0,76) ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu führte die Analyse im Fall von Akt2 mit $R^2 = 0,3545$ zu einem linearen Zusammenhang, der mit geringer Wahrscheinlichkeit (p = 3,2 x 10⁻⁵) auf Zufall basiert. Aus der Regressionsanalyse kann gefolgert werden, dass Akt2, aber nicht Akt1, die Proteinspiegel von GLUT4 reguliert.



Abbildung 33: Regressionsanalyse der relativen Proteinmenge für GLUT1 bezogen auf die relative Proteinmenge von Akt1 (A) oder Akt2 (B). (n = 24; für Akt1: p = 0,333; für Akt2: p= 0,002)

Da die Analyse der Proteinspiegel in den KD Zellen einen ähnlichen Effekt von Akt2 auf die GLUT1 Proteinspiegel vermuten ließ, wurde ebenfalls eine Regressionsanalyse für GLUT1 durchgeführt (Abbildung 33). Durch diese Analyse konnte für Akt1 (Abbildung 33A) mit

hoher Wahrscheinlichkeit (p = 0,333) ein linearer Zusammenhang ausgeschlossen werden, da ein R² von 0,0426 berechnet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte für Akt2 (Abbildung 33B) das Bestimmtheitsmaß R² = 0,3574 berechnet und damit ein linearer Zusammenhang mit hoher Wahrscheinlichkeit (p = 0,002) angenommen werden. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass Akt2 nicht nur die GLUT4 Proteinspiegel positiv moduliert, sondern auch die Proteinspiegel von GLUT1. Im Gegensatz dazu spielt Akt1 in diesem Kontext keine Rolle.

3.4 Proliferationsratenbestimmung

Akt kann die Proliferation, beispielsweise über die Inhibition der FOXO (*Forkhead box 0*) Transkriptionsfaktoren (Medema *et al.*, 2000), regulieren. Diese Regulation von FOXO spielt auch eine wichtige Rolle bei der Proliferation während des Herzwachstums (Evans-Anderson *et al.*, 2008). Auf Grund dieser Kenntnisse war es wichtig die Proliferation nach Effekten durch den Akt-Isoform KD zu überprüfen. Um mögliche Einflüsse durch die Infektion oder Selektion auf die Zellen auszuschließen, wurden die beiden Kontrollzelllinien, shC und HL-1, mit einem direkten Vergleich in einem Proliferationstest analysiert. Dieser Vergleich ist in Abbildung 34A dargestellt und weist keine unterschiedlichen Proliferationsraten auf. Bei dem Vergleich zwischen den HL-1 und KD Zellen (Abbildung 34B) zeigt sich ein identisches Proliferationsverhalten zwischen Δ Akt1 und HL-1 Zellen. Δ Akt2 Zellen weisen eine leicht erhöhte Proliferationsrate auf, die sich aber nicht signifikant von den anderen beiden Zelllinien abgrenzen konnte. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass beide Akt-Isoformen keinen Einfluss auf die Proliferation in HL-1 Kardiomyozyten haben.



Abbildung 34: Proliferationsratenbestimmung. A) HL-1 und shC im Vergleich. (n = 7) B) KD Zelllinien und HL-1 im Vergleich. (n = 9)

3.5 Identifizierung spezifischer Signaltransduktion durch die Akt-Isoformen

In den bisherigen Untersuchungen wurde, ausgehend von den KD Zellen der einzelnen Akt-Isoformen, der Einfluss auf Komponenten der Glukoseaufnahme untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Akt2 die Proteinspiegel der beiden Glukosetransporter und der Rab-GAP AS160 moduliert. Um unabhängig von einer definierten, biologischen Antwort die Bedeutung Isoform-spezifischer Signaltransduktion zu untersuchen, wurde in einem ersten Ansatz ein pAkt-Substrat-Antikörper eingesetzt, der sich gegen die phosphorylierte Erkennungssequenz R-X-R-X-X-S/T-B (X steht für eine beliebige AS, B steht für eine AS mit einem voluminösen hydrophoben Rest) für Akt-Substrate richtet. Abbildung 35 zeigt diese WBA, bei der die Zelllinien unter basalen Bedingungen (K), Insulin-Stimulation und PI3K-Hemmung mittels LY-294002 (Ly) untersucht wurden. Bereits unter basalen Bedingungen können eine Vielzahl von Signalen detektiert werden. Durch die Stimulation mit Insulin nehmen einige Banden an Signalstärke zu. Dies wird besonders deutlich im hochmolekularen Bereich (dünne Pfeile) und bei einem 40 kDa großen Protein (dicker Pfeil) im unteren Bereich des Blots. Dieses Protein, bei dem es sich wahrscheinlich um das Akt-Substrat PRAS40 (prolin-rich Akt substrate of 40 kDa) handelt, ist unter basalen Bedingungen leicht phosphoryliert, nach Stimulation mit Insulin nimmt die Signalstärke massiv zu und bei Inhibition mit LY-294002 verschwindet das Signal fast. Bei den meisten Banden führt die Inhibition mit LY-294002 zu einer schwächeren oder ähnlichen Signalstärke im Vergleich zu den basalen Bedingungen. Auffällig ist, dass die Inhibition der ΔAkt2 Zellen im hochmolekularen Bereich (dünne Pfeile) nicht zur Abnahme, sondern zu einer Zunahme der Signalstärke führt. Dieser Befund und die stärkere Phosphorylierung des 40 kDa großen Proteins (dicker Pfeil) in den $\Delta Akt2$ Zellen im Vergleich zu den $\Delta Akt1$ Zellen zeigen, dass es Isoform-spezifische Substrate in den HL-1 Zellen gibt. Allerdings zeigt diese WBA auch, dass die PI3K-Hemmung nicht zu einem völligen Verlust der positiven Signale führt, wie es bei einer Inhibierung des PI3K/Akt-Signalwegs erwartet werden würde. Man muss davon ausgehen, dass der pAkt-Substrat-Antikörper unspezifisch ähnliche Konsensus-Sequenzen anderer Proteinkinasen erkennt, die unabhängig von der PI3K sind.

Da eine Identifizierung Isoform-spezifischer Substrate über diesen Ansatz angesichts des hohen Hintergrunds wenig aussichtsreich erschien, wurde eine alternative Strategie mittels quantitativer Phosphoproteomics etabliert. Die quantitative Phosphoproteomics in Kombination mit einer dreifachen Formaldehyd-Markierung ermöglicht, zusätzlich zur Identifizierung von direkten Akt-Substraten, auch die Identifizierung von Proteinen, deren Phosphorylierung indirekt durch Akt beeinflusst wird. Somit kann die gesamte Signaltransduktion erfasst werden, die durch die Akt-Isoformen spezifisch oder gemeinsam moduliert wird.



Abbildung 35: WBA von basalen (K), Insulin-stimulierten (Ins) oder Ly-inhibierten (Ly) Kontroll-und KD Zelllinien mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Erkennungssequenz für Akt-Substrate (pAkt-Substrat). Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Die dünnen Pfeile markieren den hochmolekularen Bereich. Ein circa 40 kDa großes Protein wird durch den dicken Pfeil gekennzeichnet.

Der Ablauf dieses Experiments ist in Abbildung 36A dargestellt, das mit der Insulin-Stimulation der Kontrollzellen und den beiden KD Zelllinien beginnt. Die nach einer Zelllyse erhaltenen Proteinextrakte wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt, ihre Probenkomplexität reduziert und eine Restriktion mit Trypsin durchgeführt. Danach wurden die Proben der dreifachen Formaldehydmarkierung (B) unterzogen, die es ermöglicht, die identifizierten Peptide einer Zelllinie zuzuordnen und dadurch eine relative Quantifizierung erlaubt. Die Markierung erfolgt über die zweifache Methylierung der freien Aminogruppen mittels Formaldehyd, wobei durch die Kombination von unterschiedlich schwerem Formaldehyd und Natrium-Cyanoborhydrid drei unterscheidbare Massengewichtszunahmen für ein Peptid erzielt werden können. "Leichtes" Formaldehyd und "leichtes" Natrium-Cyanoborhydrid führt nach Methylierung je Aminogruppe zu einer 28 Da großen Massenzunahme. Führt man dieselbe Reaktion in Gegenwart von deuteriertem Formaldehyd durch, so kommt es infolge der "schweren" Isotope zu einer Massenzunahme um 32 Da pro Aminogruppe. Nutzt man in einem dritten Ansatz deuteriertes Formaldehyd und außerdem deuteriertes Natriumcyanoborhydrid, so ergibt sich eine Massenzunahme um weitere 4 Da auf 36 Da je Aminogruppe. Durch diese differentielle Methode lassen sich gleiche Peptide aus unterschiedlichen Proben relativ zueinander quantifizieren, da pro Aminogruppe eine Massenzunahme von 4 Da im MS Spektrum erfolgt. In diesem Experiment wurde die Markierung folgendermaßen auf die Zelllinien angewandt: shC leicht, Δ Akt2 mittelschwer, Δ Akt1 schwer. Nach der Formaldehydmarkierung fand eine Vereinigung der Proben im Verhältnis 1:1:1, eine Anreicherung der Phosphopeptide, die Probenanalyse mittels nano-LC-ESI-MS und eine Proteinidentifizierung durch eine Datenbanksuche statt.



Abbildung 36: A) Ablauf der Phosphoproteom-Analyse mit dreifacher Formaldehydmarkierung zur Identifizierung von Akt-Isoform-spezifischer Signaltransduktion. B) Prinzip der dreifachen Formaldehydmarkierung. Δm: Differenz des Massengewichts (modifiziert nach Boersema *et al.*, 2009)

In Abbildung 37 sind zwei Spektren der MS-Analyse dargestellt. Abbildung 37A zeigt ein Phosphopeptid des *Ras-GTPase activating protein-binding protein 1*, das durch den jeweiligen KD einer Akt-Isoform in seinem Phosphorylierungsniveau nicht verändert wird. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum eines Phosphopeptids des *Sec23-interacting protein* (Abbildung 37B), dass das Phosphopeptid der mittelschweren Δ Akt2 Probe nicht aus dem Hintergrundrauschen hervortritt und somit eine starke Reduktion im Phosphorylierungsniveau durch den Akt2 KD aufweist.


Abbildung 37: MS-Spektren. A) Spektrum eines Phosphopeptids des *Ras-GTPase activating proteinbinding protein 1*, das keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters aufweist. Dieses Spektrum verdeutlicht ebenfalls das korrekte 1:1:1 Verhältnis. B) Spektrum eines Phosphopeptids des *Sec23interacting protein*, bei dem das Phosphopeptid der mittelschweren Δ Akt2 Probe nicht aus dem Hintergrundrauschen hervortritt. schwarz: shC, leicht; grün: Δ Akt2, mittelschwer; rot: Δ Akt1, schwer

Mit der Phosphoproteom-Analyse konnten 113 Phosphopeptide identifiziert und diese insgesamt 90 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden, wobei einige Proteine durch mehrere Peptide vertreten waren (Tabelle 14 im Anhang). Die relative Quantifizierung wurde gegen shC als Referenz durchgeführt. Die berechneten Verhältnisse (Δ Akt1/shC bzw. Δ Akt2/shC) zeigen bei einem Wert über 1 eine Steigerung und unter 1 eine Abnahme der Phosphopeptidmenge und damit Phosphorylierung an. Mit Hilfe einer statistischen Analyse wurden von den 113 identifizierten Phosphopeptiden diejenigen bestimmt, die entweder eine starke Abweichung in mindestens einer KD Zelllinie im Vergleich zu den shC Zellen oder eine hohe Differenz zwischen den KD Zelllinien besitzen. Diese Kandidaten repräsentieren dann die Phosphopeptide, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Isoform-spezifischen Signaltransduktion unterliegen.

Für die statistische Analyse von starken Abweichungen zwischen KD und shC Zellen mussten die Verhältnisse symmetrisch um 1 verteilt werden. Dazu wurde von den Verhältnissen der Logarithmus auf der Basis 2 (log2-Werte) berechnet. Aus den Δ Akt2 log2 Werten ergab sich ein Mittelwert μ von 0,1260 und eine Standardabweichung σ von 0,7486 (Δ Akt1 log2 Werte: $\mu = 0,0886$, $\sigma = 0,2624$). Es wurde angenommen, dass Werte außerhalb eines Vertrauensintervalls von 95 % (Mittelwert μ +/- 1,96 x Standardabweichung σ) auf ein verändertes Phosphorylierungsmuster durch den KD schließen lassen. Dies führte zu Grenzen von -1,3412 und 1,5931 für \Delta Akt2 bzw. von -0,4257 und 0,6029 für \Delta Akt1. Damit keine potentiellen Kandidaten durch zu strenge Kriterien übersehen werden, wurden nach der ersten statistischen Analyse die Werte der abweichenden Phosphopeptide herausgenommen und mit den verbleibenden Werten eine erneute Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung durchgeführt. Für die ∆Akt2 log2 Werte berechneten sich dann die Grenzen -0,4949 und 0,8969 aus $\mu = 0,2010$ und $\sigma = 0,3550$. In Abbildung 38A wird diese statistische Auswertung bildlich dargestellt. Als grüne Punkte sind die $\Delta Akt2 \log 2$ Werte aller identifizierten Phosphopeptide eingezeichnet, wobei die Punkte der abweichenden Phosphopeptide aus der statistischen Analyse außerhalb der zuvor berechneten Grenzen liegen. Für die AAkt1 log2 Werte konnten nach der zweiten Analyse die Grenzen -0,3968 und 0,5422 aus $\mu = 0,0727$ und $\sigma = 0.2395$ ermittelt werden. Die statistische Auswertung für Δ Akt1 Zellen ist in Abbildung 38B veranschaulicht. Bei einem Vergleich zwischen ΔAkt2 und ΔAkt1 in Abbildung 38A bzw. B wird deutlich, dass die Abweichungen der Kandidaten aus der Analyse für ∆Akt2 viel stärker ausfallen als für die Kandidaten der AAkt1 Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Phosphorylierung von Akt2 einen stärkeren Einfluss auf die Signaltransduktion nach Stimulation mit Insulin als die Phosphorylierung von Akt1 hat.

Zur Analyse von stark abweichenden Verhältnissen zwischen den KD Zellen wurde die Differenz der Verhältnisse verwendet, die per se eine symmetrische Verteilung darstellt, so dass in diesem Fall keine Logarithmierung notwendig war. Es ergaben sich der Mittelwert μ von 0,086 und eine Standardabweichung σ von 0,266, mit denen die Grenzen von -0,435 und 0,606 bestimmt werden konnten (Abbildung 38C).



Abbildung 38: A) Verteilung der AAkt2 log2 Werte der identifizierten Phosphopeptide, die sich um den Mittelwert $\mu = 0,2010$ (gestrichelte Linie) verteilen. Mit durchgezogener Linie sind die Grenzen (-0,4949 und 0,8969) eingezeichnet, die nach doppelter statistischer Analyse bestimmten wurden. Diese Grenzen trennen Peptide veränderter Phosphorylierung Peptiden mit von mit unverändertem Phosphorylierungsmuster. B) Verteilung der Δ Akt1 log2 Werte der identifizierten Phosphopeptide, die sich um den Mittelwert $\mu = 0.0727$ (gestrichelte Linie) verteilen. Die statistisch ermittelten Grenzen liegen bei -0,3968 und 0,5422. C) Verteilung der Differenzwerte (Δ Akt2/shC - Δ Akt1/shC) um den Mittelwert μ = 0,086. Eingezeichnet sind die statistischen Grenzen von -0,435 und 0,606. Blau markierte Werte befinden sich außerhalb der statistisch ermittelten Grenzen.

In Tabelle 13 sind alle Phosphopeptide aufgelistet, die nach den statistischen Analysen als signifikant verändert bezeichnet werden konnten und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Akt-Isoform-spezifischen Signaltransduktion unterliegen. Grauunterlegte Kästchen kennzeichnen den Wert, der zur Auswahl des Peptids führte. Für die Δ Akt2 Zellen konnten sechs Peptide ausgewählt werden, die in zwei Fällen in eine Steigerung und in vier Fällen zu einer Abnahme der Phosphorylierung führten. Besonders auffällig war der Befund, dass ein Phosphopeptid des *sec23-interacting protein* durch den Verlust von Akt2 fast keine Phosphorylierung mehr aufweist, wobei der KD von Akt1 keinen Einfluss hat (Abbildung 37B). In Δ Akt1 Zellen zeigten insgesamt vier Peptide Abweichungen, die in zwei Fällen in eine Steigerung und in zwei Fällen in eine Reduktion der Phosphorylierung führte. Die drei Peptide, die über das Differenzkriterium ausgewählt wurden, besaßen in allen Fällen eine

verstärkte Phosphorylierung in Δ Akt2 Zellen. Insgesamt entstand der Eindruck, dass es durch den Verlust von Akt2 zu mehr Veränderungen des Phosporylierungsmusters kommt und das diese Veränderungen auch viel stärker ausfielen. Bis zu diesem Punkt sind die ausgewählten Peptide viel versprechende Kandidaten im Zusammenhang mit einer Isoform-spezifischen Signaltransduktion, die in weiterführenden Arbeiten verifiziert werden müssen.

Tabelle 13: Identifizierte Phosphopeptide aus der MS-Analyse, die laut statistischer Auswertung eine Veränderung des Phosporylierungsmusters durch den KD aufweisen. In der Peptidsequenz sind die phosphorylierten Aminosäuren fett und mit Unterstrich markiert. Grauunterlegte Kästchen kennzeichnen den Wert der zur Auswahl des Phosphopeptids führte. Differenz = ΔAkt2/shC – ΔAkt1/shC; log2 ΔAkt2: Logarithmus zur Basis 2 von ΔAk2/shC

Protein	Pepitidsequenz	AAkt2 shC	<u>AAkt1</u> shC	Differenz	log2 ∆Akt2	log2 ΔAkt1
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	K.KVEEEQEADEEDV <u>S</u> EEEAEDR.E	1,89	1,38	0,51	0,9184	0,4647
Protein disulfide-isomerase A6	K.DGELPVEDDIDL <u>S</u> DVELDDLEK.D	1,91	1,39	0,52	0,9336	0,4751
E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1	K.VFFD <u>T</u> DDDDDVPHSTSR.W	0,68	1,06	-0,38	-0,5564	0,0841
N-acylglucosamine 2-epimerase	R.LEPAPLDSSPAVSTHEGSK	0,7	0,91	-0,21	-0,5146	-0,1361
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	R.RV <u>S</u> VCAETFNPDEEEEDNDPR.V	0,37	0,9	-0,53	-1,4344	-0,1520
SEC23-interacting protein	R.KL <u>S</u> VGAYVSSVR.V	0,01	1,13	-1,12	-6,6439	0,1763
ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	K.AI S SDMFFGR.E	0,59	0,75	-0,16	-0,7612	-0,4150
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	K.VQGEAVSNIQENTQTPTVQEESEEEEVDET GVEVK.D	1,9	1,68	0,22	0,9260	0,7485
Heat shock protein HSP 90-alpha	K.ESDDKPEIEDVG <u>S</u> DEEEEEK.K	2,05	1,54	0,51	1,0356	0,6229
Smoothelin-like protein 2	R.SQ <u>S</u> FGVASASSIK.Q	0,92	0,75	0,17	-0,1203	-0,415
Oxysterol-binding protein 1	K.GDM <u>S</u> DEDDENEFFDAPEIITMPENLGHK.R	1,28	1,54	-0,26	0,3561	0,6229
Glucosaminefructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	R.VD <u>S</u> TTCLFPVEEK.A	1,12	0,74	0,38	0,1635	-0,4344
Stathmin	R.ASGQAFELIL <u>S</u> PR.S	1,13	1,52	-0,39	0,1763	0,6041
Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog	R.NPYLL <u>S</u> EEEDGDGDASIENSDAEAPK.G	1,84	0,99	0,85	0,8797	-0,0145
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	R.EFDELSP <u>S</u> AQR.D	1,6	0,93	0,67	0,6781	-0,1047
DNA replication licensing factor MCM3	K.ASEDE <u>S</u> DLEDEEEKSQEDTEQK.R	1,85	1,23	0,62	0,8875	0,2987

3.6 Generierung einer konditionalen Knock Out Maus für Akt1

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine konditionale Akt1 Knock Out Maus herzustellen, die nach Aktivierung der Cre-Rekombinase spezifisch im Herzen ein funktionell inaktives Gen für *Akt1* trägt.



Abbildung 39: A) Ablauf für die Generierung einer konditionalen KO Maus für Akt1. B) Einbau des Konstrukts des Austauschvektors Akt1 in das Genom über homologe Rekombination. In der rekombinierten Situation ist die Lage der Oligonukleotide für die PCR1 und PCR2 eingezeichnet, die zur späteren Charakterisierung der ES-Zellklone dienen. F1-F3 bezeichnen die Akt-Sequenz-Fragmente zur Klonierung des Konstrukts. I: Intron, E: Exon.

In Abbildung 39A ist der Ablauf für die Herstellung einer konditionalen KO Maus dargestellt. Dafür wird zu Beginn der Austauschvektor Akt1 hergestellt, dessen Konstrukt in embryonale Stammzellen (ES Zellen) integriert wird. Die transgenen ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert, die dann in scheinschwangere Mäuse implantiert werden. Die chimären Nachkommen werden durch weitere Verpaarungen auf die Keimbahnintegration des Konstruktes analysiert. Mäuse mit einer erfolgreichen Keimbahnintegration werden mit einer Maus verpaart, die eine Flp-Rekombinase exprimiert, um das Neomyzin-Resistenz-Gen zu deletieren.

3.6.1 Herstellung des Austauschvektors Akt1

Zunächst wurde ein Austauschvektor konstruiert, der durch homologe Rekombination in den Akt1 Genlocus integriert werden sollte (Abbildung 39B). In diesem Vektor wurden die Exons 6 und 7 (F2), die wesentliche Elemente der ATP-Bindestelle kodieren, von zwei loxP-Elementen flankiert. Diese Exons können bei einer späteren Cre-Rekombinase vermittelten Exzision über die loxP-Elemente deletiert werden, wodurch eine funktionelle Inaktivierung von Akt1 sichergestellt ist. In direkter Nachbarschaft befindet sich ein weiteres wichtiges Element, ein Neomyzin-Resistenz-Gen, das zur Selektion auf eine erfolgreiche Transfektion dient. Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert haben, werden durch das Neomyzin-Resistenz-Gen resistent gegen G418 (positive Selektion). Das Neomyzin-Resistenz-Gen wird von zwei FRT-Elementen flankiert, die von der Flp-Rekombinase aus Saccharomyces cerevisiae zur Rekombination benutzt werden. Die FRT/Flp-Rekombination wird später für die Exzision des Neomyzin-Resistenz-Gens aus dem Chromosom benötigt, um die Unterbrechung des Akt1 Gens durch das Neomyzin-Resistenz-Gen rückgängig zu machen. In ES Zellen erfolgt die homologe Rekombination nur sehr selten. Meistens integriert das DNA-Konstrukt über nicht-homologe Rekombination an beliebigen Stellen ins Genom. Aus diesem Grund wird zur Anreicherung von Klonen mit homologer Rekombination eine negative Selektion durchgeführt. Dazu wird vor die Anfangssequenz von Akt1 (F1) das Gen der Thymidin-Kinase (TK) des Herpes simplex eingesetzt, das nur bei nicht-homologer Rekombination in das Genom eingebaut wird. Mit einer 200-fach höheren Substratspezifität als die endogene TK phosphoryliert die virale TK das Thymidin-Homolog Gancyclovir, das eingebaut in neu synthetisierte DNA zum Kettenabbruch und Zelltod führt (Lottspeich & Engels, 2006).

Die Klonierung des Austauschvektors ist in Abbildung 40A dargestellt. Als Grundlage diente der Vektor MUP MK3, der auf der Basis der pUC Vektoren erzeugt wurde (Stefan Weser, Institut für Molekulare Kardiologie). Dieser Vektor trägt das Neomyzin-Resistenz-Gen aus dem Vektor pMC1Neo (Thomas & Capecchi, 1987), welches von flankiert von zwei FRT-Elementen ist. Ferner trägt dieser Vektor das Gen für die *Herpes simplex* TK (Mansour et al.,

1988) und zwei loxP-Elemente. Letztere dienen später in der Maus zur Exzision der Exons durch die Cre Rekombinase. In den Vektor MUP MK3 wurden die Fragmente F1-F3, die die jeweiligen *Akt1*-Sequenzen tragen, integriert. Die Fragmente wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden aus muriner genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Das Fragment F1 wurde über AsiSI und AscI, Fragment F2 über SwaI und Fragment F3 über SalI und NotI eingebracht. Das Endprodukt, der Austauschvektor Akt1, ist in Abbildung 40B dargestellt und wurde durch eine diagnostische Restriktionsanalyse auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 40C).



Abbildung 40: A) Klonierungsstrategie für den Austauschvektor Akt1, der durch den Einbau der Fragmente F1-F3 in den MUP MK3 entstanden ist. B) Schematische Darstellung des Austauschvektor Akt1. C) Diagnostische Restriktionsanalyse des Austauschvektor Akt1 mit den Restriktionsenzymen SbfI und XbaI. Die erwarteten Fragmentgrößen sind als Zahlen den entsprechenden Banden in Basenpaaren zugeordnet. Links ist der Größenstandard λ -HpaII und λ -EcoRI/Hind III zu sehen.

3.6.2 Erzeugung und Charakterisierung von ES Zellklonen

Mit dem Austauschvektor Akt1, der zuvor durch das Restriktionsenzym NotI linearisiert wurde, erfolgte mehrfach die Transfektion von R1 ES-Zellen. Nach der Selektion wurden die überlebenden Klone mittels PCR1 (Abbildung 39B) auf eine erfolgreiche Rekombination untersucht. Bei dieser PCR wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass das eine Oligonukleotid in der Sequenz der Neomyzin-Resistenzkassette bindet, während das andere Oligonukleotid außerhalb der im Vektor vorhandenen Akt1 Sequenz (benachbart zu F3) bindet. Aus diesem Grund kann nur bei homologer Rekombination ein PCR-Produkt entstehen. Zwei Klone, Nummer 5 und 13, zeigten die erwartete Bande von 1309 bp für ein positives Ergebnis in der PCR1 an (Abbildung 41A).



Abbildung 41: Charakterisierung der Klone 5 und 13 für Akt1. A) PCR1 (Test auf Integration des Konstrukts in das Genom). Die erwartete Bande hat eine Größe von 1309 bp. Der Marker ist Lambda EcoR1/HindIII. B) PCR2 (Test auf Integration des distalen LoxP-Elements). Das unverdaute (unverd.) PCR-Produkt besitzt eine Größe von 1724 bp und wurde dann jeweils mit den Restriktionsenzymen PvuI und SbfI verdaut. Der Marker ist Lambda EcoR1/HindIII. C) Schematische Darstellung für die Southern Blot Analyse. Die Darstellung der Exone in ihrer Größe ist nicht maßstabgetreu. Die Restriktionsschnittstellen für KpnI sind in Basenpaaren angegeben. D) Southern Analyse der Klone 5 und 13. Die Kontrolle (K) zeigt nur die genomische Bande von 4992 bp an. Die beiden positiven Klone zeigen zusätzlich zur genomischen Bande die Rekombinationsbande von 6931 bp.

Bei der Überprüfung auf die erfolgreiche Rekombination des distalen loxP-Elements (PCR2, Abbildung 39B), die essentiell für eine spätere erfolgreiche Exzision der Exons 6 und 7 durch die Cre ist, konnte ebenfalls ein positives Ergebnis generiert werden (Abbildung 41B). Das amplifizierte PCR-Produkt von 1724 bp aus PCR2 enthält nur im Falle einer erfolgreichen Rekombination des distalen loxP-Elements je eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme PvuI und SbfI. Die Restriktion mit diesen Enzymen zeigte für beide Klone einen erfolgreichen Verlauf. Zur Überprüfung der Rekombination des Konstrukts an der korrekten Stelle wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 41C), bei der zuvor die genomische DNA einer Restriktion mit dem Enzym KpnI unterzogen wurde. Die zur Detektion verwendete radioaktive Sonde war gegen den Bereich von Exon 11 und 12 gerichtet. Bei der genomischen Situation wird eine Bande von 4992 bp erwartet und die rekombinierte Situation wird durch eine Bande von 6931 bp repräsentiert. Abbildung 41D zeigt die Southern Analyse für die beiden Klone und eine Kontrolle, die jeweils eine Bande von 4992 bp zeigen. Für die beiden Klone 5 und 13 wird zusätzlich eine Bande von 6931 bp für eine rekombinierte Situation sichtbar, womit der korrekte Einbau des Konstrukts bewiesen war.

3.6.3 Generierung von chimären Mäusen

Zur Generierung von konditionalen KO Mäusen wurden die ES Zellen der Klone 5 und 13 mittels eines Mikromanipulators in Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden aus NMRI Weibchen am Tag 3,5 der Trächtigkeit gewonnen. Pro Blastozyst wurden zehn bis fünfzehn ES Zellen in das Blastozoel injiziert. Nach der Injektion wurden die Blastozysten in scheinschwangere Leihmütter implantiert, die 3,5 Tage zuvor mit vasektomierten Männchen verpaart worden waren.



Abbildung 42: Chimäre Mäuse für Akt1

Chimäre Nachkommen konnten an Hand von agouti Fellhaaren im weißen Haarkleid von den komplett weißen wildtypischen Nachkommen unterschieden werden. Insgesamt wurden sechs chimäre Mäuse (Abbildung 42) erzeugt, von denen drei männlich waren. Da die ES Zellen männlichen Ursprungs waren, wurden die drei Männchen mit NMRI Weibchen verpaart, um auf die Keimbahngängigkeit der transgenen ES-Zellen zu prüfen. Aus dieser Verpaarung würden bei einer Keimbahntransmission Nachkommen mit der Fellfarbe agouti erhalten werden. Zwei Männchen waren in der Lage Nachkommen zu produzieren. Bis zur Beendigung dieser Arbeit konnte kein agouti Nachkomme beobachtet werden, so dass noch weitere Injektionen durchgeführt werden müssen.

4 Diskussion

Die Signaltransduktion dient jedem Organismus der orchestrierten Kommunikation mit seiner Umwelt und zwischen seinen Zellen oder Organen. Ein bedeutender Signaltransduktionsweg ist der PI3K-Signalweg, der unter anderem zur Aktivierung der Proteinkinase Akt führt und verschiedene zelluläre Prozesse beeinflusst. Bisherige Untersuchungen belegen eine wichtige Rolle für Akt im Herzen, insbesondere beim Glukosemetabolismus (Debosch *et al.*, 2006) und der Hypertrophieentwicklung (Matsui *et al.*, 2002;Shioi *et al.*, 2002). Trotz der vielfältigen Untersuchungen konnte aber bisher nicht genau geklärt werden, welche Rolle die Akt-Isoformen in diesem Kontext spielen. In dieser Arbeit wurden daher erstmalig die Isoformspezifischen Funktionen von Akt1 und Akt2 in Kardiomyozyten analysiert. Diese Untersuchungen wurden an der Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 durchgeführt. Zur Analyse der Isoform-spezifischen Funktionen wurden Knock Down Zelllinien generiert, in denen jeweils eine Akt-Isoform mittels shRNA herunterreguliert wurde. An Hand dieser KD Zelllinien konnten gemeinsame und spezifische Funktionen von Akt1 und Akt2 in Kardiomyozyten aufgeklärt werden.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

- Erstmals konnte das prozentuale Verhältnis von Akt1 und Akt2 in HL-1 Kardiomyozyten ermittelt werden. Akt1 stellt mit 75 % die dominante Isoform über Akt2 mit 25 % dar.
- Akt2 ist das bevorzugte Phosphorylierungsziel nach Stimulation mit Insulin oder IGF, obwohl Akt1 die quantitativ dominierende Isoform ist. Diese Präferenz wird nicht über eine stabilere Komplexbildung mit mTORC2 reguliert.
- Die Proliferationsrate von HL-1 Zellen bleibt bei Knock Down einer Akt-Isoform unverändert.
- Das Akt-Substrat GSK3β wird durch beide Akt-Isoformen phosphoryliert. Dabei führt sowohl die Akt1, als auch die Akt2 Inaktivierung zu einer reduzierten Phosphorylierung.
- Die GLUT4 und GLUT1 Proteinspiegel werden durch Akt2 reguliert. Es konnte eine direkte Korrelation der Proteinniveaus zwischen Akt2 und den Glukosetransportern nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte diese Korrelation für Akt1 ausgeschlossen werden. Die mRNA Expression der beiden Glukosetransporter wird nicht von den Akt-Isoformen moduliert.

- AS160 wird auf der Proteinebene durch Akt2 moduliert.
- Die Glukoseaufnahme ist nicht durch die Reduktion einer Isoform beeinträchtigt.
- Die Phosphoproteom-Analyse führte zur Identifizierung neuer spezifisch durch Akt2 regulierter Substrate.

4.1 Spezifische Eigenschaften von Akt1 und Akt2 in HL-1 Kardiomyozyten

Die Ausbildung von verschiedenen Isoformen eines Enzyms im Laufe der Evolution ist häufig mit der Entwicklung spezialisierter Funktionen verbunden. Die Erforschung dieser Isoform-spezifischen Funktionen erlaubt häufig ein tieferes Verständnis von Signalwegen. Darüber hinaus stellt die Identifizierung solcher Funktionen eine wichtige Aufgabe bei der Entwicklung spezifisch wirkender Pharmaka dar. Dies ist besonders wünschenswert, wenn die selektive Hemmung einer spezifischen Isoform therapeutisch wirksam sein soll.

Ein großes Problem in der Analyse von spezifischen Funktionen von Akt1 und Akt2 stellt die hohe Homologie von über 81 % zwischen den Isoformen dar. Ihre Auftrennung kann nicht über das Molekulargewicht oder den isoelektrischen Punkt erfolgen, da sie einerseits ein nahezu identisches Molekulargewicht besitzen und andererseits bei der 2D-PAGE (2dimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese) während der isoelektrischen Fokussierung präzipitieren und damit für eine anschließende Trennung über SDS-PAGE nicht eingesetzt werden können. Auch eine Immunopräzipitation führte nicht zu einer kompletten Trennung der Isoformen, da Akt2 nur unvollständig präzipitiert werden kann.

Um nun die Isoform-spezifischen Eigenschaften zu untersuchen wurden KD Zelllinien generiert, bei denen über shRNA die Proteinmengen jeweils einer Isoform reduziert wurden. Bei der Generierung der KD Zelllinien zeigte sich, dass für Akt2 im Gegensatz zu Akt1 eine schlechtere Reduktion erzielt wurde. Die Reduktion der Akt2 Proteinspiegel lag zwischen 85 und 40 %. Im Gegensatz dazu erzielten einige ΔAkt1 Linien eine Reduktion von bis zu 95 %. In einem KD Ansatz in Adipozyten erreichten Jiang *et al.* eine fast komplette Reduktion für Akt1, aber nur eine Reduktion von 70 % für Akt2 (Jiang *et al.*, 2003). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte man in der Sequenz der verwendeten shRNAs sehen. Allerdings wurden in dieser Arbeit drei verschiedene shRNAs für Akt1 und Akt2 eingesetzt. Im Fall von Akt1 führte die Bindung vor und innerhalb der Kinase-Domäne zu einem erfolgreichen KD. Im Gegensatz dazu zeigte die Bindung an der PH-Domäne keine Auswirkung auf die Proteinmenge. Bei der Akt2 Isoform erzielte die Bindung in der

regulatorischen Domäne eine mäßige Reduktion, die stärker bei der Bindung an die PH-Domäne ausfiel. In dieser Arbeit wurde keine shRNA für Akt2 verwendet, die in der Kinase-Domäne bindet, jedoch wurden diese in zwei Ausführungen von Jiang et al. verwendet, die ebenfalls nur zu einer Reduktion von bis zu 70 % führte (Jiang *et al.*, 2003). Es scheint also, dass die Sequenz der shRNA eine wichtige Rolle spielt, aber sie erklärt trotzdem nicht die allgemein schlechtere Reduktion von Akt2. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Akt1 anscheinend selbst über eine Autoregulation seine Proteinspiegel reguliert. Transgene Mäuse, die zusätzlich zum endogenen Akt1 ein getaggtes Akt1 in Kardiomyozyten exprimieren, weisen eine gesteigerte Proteinmenge von endogenem Akt1 auf (Blasberg, Molekulare Kardiologie, persönliche Mitteilung). Eine solche positive *Feedback*-Regulation würde bei einer Reduktion der Akt1 Proteinspiegel durch die shRNA eine weitere Reduktion der Proteinspiegel nach sich ziehen und somit die höhere Effizienz der Akt1 shRNA erklären. Die genauen Mechanismen dieser Autoregulation werden derzeit im Detail untersucht.

Auf Grund der Schwierigkeiten die Akt-Isoformen aufzutrennen, wurde in den bisherigen Veröffentlichungen nur die quantitative Verteilung der Isoformen im Vergleich zwischen unterschiedlichen Organen oder Geweben dargestellt (Cho *et al.*, 2001a;Yang *et al.*, 2003). Jedoch fehlte bisher die Bestimmung der relativen Proteinspiegel von Akt1 und Akt2 innerhalb einer Zelle oder eines Organs. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den KD Zelllinien durch die Verwendung des PanAkt-Antikörpers erstmals ein quantitativer Bezug hergestellt. Die gesamte Akt-Menge besteht in HL-1 Kardiomyozyten zu 75 % aus Akt1 und zu 25 % aus Akt2, wobei Akt1 damit als quantitativ dominante Isoform identifiziert wurde. Neueste Arbeiten unterstützen diesen Befund, da auch in einem Mäuseherzen die Akt1 Proteinmenge auf 75 % der gesamten Akt-Menge bestimmt werden konnte. Dieser Wert wurde, ähnlich wie in dieser Arbeit, aus einem Vergleich der Akt1 Proteinmengen zwischen einem wildtypischen und einem Akt1^{-/-} Mausherzen ermittelt (Chang *et al.*, 2010).

Der Grund für die quantitative Vorherrschaft von Akt1, könnte durch eine unterschiedliche Regulation der Transkription verursacht werden. Jedoch zeigte sich bei der Generierung der AP Zelllinien, dass trotz gleicher Konstrukte für beide Isoformen mehr Protein von Akt1 als von Akt2 gebildet wurde. Da diese Konstrukte nicht der Regulation der endogenen Gene unterworfen sind, liegt die Vermutung nahe, dass die quantitativen Unterschiede zwischen den Isoformen durch eine divergente Translation, Proteinstabilität oder -degradation verursacht werden. Des Weiteren würde die vermutete Autoregulation von Akt1 ebenfalls die größeren Akt1 Proteinmengen erklären.

Die Stabilität und Degradation von Akt wird von unterschiedlichsten Mechanismen und Enzymen reguliert. Dazu zählen unter anderem das Ubiquitin-Proteasom-System, Caspasen, HSP90 oder Konformationsänderungen (Liao & Hung, 2010). Jedoch wurde bei den Untersuchungen zur Stabilität bisher nicht zwischen den Isoformen unterschieden. Angesichts der quantitativen Unterschiede wird es bei der zukünftigen Erforschung der Akt Kinasen unerlässlich sein, auf Isoform-spezifische Unterschiede auch im Hinblick auf den Akt-Abbau zu achten.

Die Aktivierung von Akt führt über den PI3K-Signalweg, wobei Insulin und IGF die wichtigsten Stimuli zur Initiierung des PI3K-Signalwegs darstellen. Im Hinblick auf Isoformspezifische Eigenschaften stellte sich die Frage, ob eine Isoform bevorzugt phosphoryliert wird und damit eine spezifische Wirkung ausführen kann. In Stimulationsexperimenten zeigte sich, dass Akt2 gegenüber Akt1 das bevorzugte Phosphorylierungsziel am Ser 473/474 ist. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, wenn man bedenkt, dass dreimal mehr Akt1 in HL-1 Kardiomyozyten vorliegt. Auch die Stimulation der AP-Zelllinien unterstreicht den Befund der bevorzugten Akt2 Phosphorylierung nach Stimulation mit Insulin. Die deutlich stärkere Überexpression von Akt1 und damit auch einer höheren Menge an Gesamt-Akt führte nur zu einem ähnlichen Phosphorylierungsniveau wie die geringe Überexpression von Akt2. In Adipozyten wurde ebenfalls gezeigt, dass überwiegend Akt2 nach Stimulation mit Insulin phosphoryliert wird. So detektierten Jiang et al. nach einer kompletten Reduktion der Akt1 Proteinmenge annähernd keinen Verlust des Phosphorylierungssignals am Threonin 308, jedoch einen Verlust von 40 % bei einer nur 70 %-igen Reduktion der Akt2 Proteinmenge (Jiang et al., 2003). Anders als in den hier verwendeten HL-1 Kardiomyozyten ist jedoch in Adipozyten Akt2 die dominante Isoform (Hill et al., 1999). Dieses Ergebnis war in Adipozyten daher auch nicht überraschend.

Die Befunde der HL-1 Kardiomyozyten und der Adipozyten zeigen, dass nach Stimulation mit Insulin Akt2, selektiv und unabhängig von der Proteinmenge, bevorzugt aktiviert wird. Man findet hier also bereits auf der Ebene der Kinasenaktivierung eine Isoform-Präferenz. Für die Realisierung einer bevorzugten Phosphorylierung bestehen mehrere Möglichkeiten. Eine Möglichkeit wäre, dass Akt2 eine stabilere Bindung mit mTORC2 eingeht, welches für die Phosphorylierung von Ser 473/474 verantwortlich ist. Die Überprüfung dieser Hypothese zeigte, dass dies nicht der Fall ist, da beide Isoformen keine stabilen Komplexe mit mTORC2 bzw. mTORC1 ausbilden. Ebenfalls konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Akt-Isoformen keinen stabilen Komplex mit PDK1, die für die Phosphorylierung von

Threonin 308/309 verantwortlich ist, ausbilden. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass die Methode der Präzipitation nur sehr stabile Komplexe identifizieren kann. Es könnte jedoch sein, dass Akt2 eine höhere Affinität zu mTORC2 besitzt als Akt1, wobei diese Interaktion nicht stabil genug für eine Präzipitation ist. Um diese Frage direkt in Zellen zu untersuchen, könnte man beispielsweise eine FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)-Analyse durchführen. Diese Methode erlaubt eine Aussage über den Abstand von zwei Molekülen und kann dies auch zeitabhängig darstellen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die bevorzugte Aktivierung von Akt2 könnte eine unterschiedliche Verteilung der Isoformen auf subzelluläre Kompartimente darstellen. Untersuchungen an Adipozyten ergaben, dass mehr Akt2 als Akt1 nach Insulin-Stimulation an der Plasmamembran akkumuliert (Gonzalez & McGraw, 2009a) und folglich Akt2 vermehrt phosphoryliert werden kann. Des Weiteren könnte die bevorzugte Akt2 Phosphorylierung durch eine Bindung von Adapterproteinen an eine Isoform realisiert werden, die die Phosphorylierung hemmen oder stimulieren. Es wurde wiederum in Adipozyten gezeigt, dass ein Komplex von Akt2 und APPL1 (adaptor protein containing PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1) nach Insulin Stimulation aufgelöst wird. Wird die APLL1 Proteinmenge reduziert, so wird eine geringere Akt-Phosphorylierung, Glukoseaufnahme und GLUT4-Translokation detektiert (Saito et al., 2007). Die Phosphorylierung von Akt2 scheint also durch die Bindung von APLL1 erleichtert zu werden. Eine weitere Option wäre, dass eine Isoform spezifisch dephosphoryliert wird und damit das relative Phosphorylierungsniveau der anderen erhöht. Diese Annahme ist nicht unbegründet, da in Skelettmuskelzellen von Diabetes Typ 2 Patienten eine reduzierte Phosphorylierung von Akt2 am Ser 474 detektiert wurde, die wahrscheinlich durch einen Anstieg der PHLPP1 Expression verursacht wird (Cozzone et al., 2008).

Akt, und im Besonderen Akt1, spielt eine Rolle in der Proliferation. Beispielsweise proliferieren Kardiomyozyten einer Akt1 KO Maus weniger als wildtypische Kardiomyozyten (Chang *et al.*, 2010). Auch bei der Herzentwicklung sorgt Akt für eine gesteigerte Aktivität der Proliferation, da die direkte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren FOXO1 und FOXO3 durch Akt zu ihrem Export aus dem Nukleus führt. Außerhalb des Nukleus können die beiden Transkriptionsfaktoren dann nicht mehr die Transkription von Genen, die die Proliferation inhibieren, initiieren (Evans-Anderson *et al.*, 2008). In HL-1 Zellen konnte hier bei der Bestimmung der Proliferationsraten keine Veränderung durch den KD der Akt-Isoformen beobachtet werden.

4.2 Akt und der Glukosemetabolismus

Bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie wird bei der Energiegewinnung ein Substratwechsel von Fettsäuren zur Glukose vollzogen (Sambandam *et al.*, 2002). Bisher wird kontrovers diskutiert, ob dieser Wechsel für die Hypertrophie mitverantwortlich ist oder ob er ein Teil eines Adaptationsprozesses bei der Entwicklung einer Hypertrophie darstellt (van Bilsen *et al.*, 2009). Da bekannt ist, dass Akt im Glukosemetabolismus des Herzens eine bedeutende Position einnimmt (Bertrand *et al.*, 2008), ist es wichtig die genauen Mechanismen der Akt-Isoformen in diesem Kontext zu erforschen.

Die meisten Ergebnisse zum Glukosemetabolismus wurden bisher mit Hilfe von Adipozyten erhalten. Schaut man sich jedoch die Verteilung der Akt-Isoformen in Adipozyten im Vergleich zu Kardiomyozyten an, so zeigt sich, dass Akt2, und nicht Akt1, die vorherrschende Isoform in Adipozyten ist. Dies konnte sowohl auf der Ebene der mRNA (Summers *et al.*, 1999) als auch auf der Ebene des Proteins (Hill *et al.*, 1999) gezeigt werden. Ferner zeigten Calera *et al.*, dass Akt2 sich in allen Kompartimenten des Adipozyten befindet (Plasmamembran, Nukleus, Zytosol, Mitochondrien, Mikrosomen). Akt1 hingegen konnte nur im Zytoplasma detektiert werden (Calera *et al.*, 1998). Daraus kann geschlossen werden, dass die Ergebnisse, die an Adipozyten für die Akt-Isoformen erhalten wurden, nicht ohne weiteres auf Kardiomyozyten übertragbar sind. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Akt-Isoformen auf den Glukosemetabolismus direkt an Kardiomyozyten untersucht.

Akt reguliert den Glukosemetabolismus über verschiedene Mechanismen, zu denen die Förderung der Glukoseaufnahme über die gesteigerte Translokation von GLUT4 gezählt wird (Kohn *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte erstmals für Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die GLUT4 Proteinspiegel bei Akt2 KD reduziert werden. In Akt2 KO Mäusen (Cho *et al.*, 2001a) und in vergleichbaren Experimenten an Adipozyten (Jiang *et al.*, 2003) wurden keine Veränderung im Proteinniveau für GLUT4 nachgewiesen. Eine genaue Analyse der GLUT4 Proteinspiegel der KD und AP Zelllinien in dieser Arbeit zeigte darüber hinaus, dass die GLUT4 Proteinmengen mit der Proteinmenge von Akt2, aber nicht mit der von Akt1, korrelierte. Eine direkte Verbindung zwischen den Akt2 und GLUT4 Proteinspiegeln konnten bereits Kaneko *et al.* für die Muskeldifferenzierung zeigen. Hier gibt es einen positiven *Feedback-loop* zwischen Akt2 und den Transkriptionsfaktoren MyoD und MEF2 (*Myocyte enhancer factor*). Beide Transkriptionsfaktoren fördern die Akt2 Expression, wobei Akt2 wieder die Aktivität von MyoD steigert (Kaneko *et al.*, 2002). Die GLUT4 Expression indessen wird auch durch diese beiden Transkriptionsfaktoren gesteigert (Liu *et al.*, 1994;Santalucia *et al.*, 2001). Eine weitere Verbindung kann über das Akt-Substrat FOXOI

gezogen werden, das die Transkription von GLUT4 moduliert. Ob es dabei zur Inhibition oder Stimulation der Expression kommt, ist abhängig vom Gewebetyp (Karnieli & Armoni, 2008). Angesichts dieser Befunde wurde die GLUT4 Expression mittels Real Time PCR untersucht. Hierbei ergaben sich aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen den KD Zellen und den Kontrollen. Die beobachtete Herunterregulation von GLUT4 scheint damit ein Effekt auf der Proteinebene zu sein. Akt2 könnte somit die Translation bzw. Proteinstabilität von GLUT4 modulieren. In der Literatur gibt es an verschiedenen Stellen ebenfalls Hinweise auf eine posttranskriptionelle Regulation von GLUT4 (Munoz *et al.*, 1996), jedoch sind die Mechanismen bisher nicht ausreichend aufgeklärt worden.

In Kardiomyozyten befindet sich neben GLUT4 auch der basale GLUT1 Transporter, für dessen Proteinspiegel hier ebenfalls eine Modulation durch Akt2 gefunden wurde. Ebenso wie für GLUT4 wurde auch für die Proteinspiegel von GLUT1 und Akt2 eine Korrelation nachgewiesen werden. Die Proteinspiegel von Akt1 und GLUT1 hingegen korrelierten nicht. Da die mRNA Expression sich durch den Akt-Isoform KD nicht veränderte, kann wiederum auf eine posttranskriptionelle Regulation geschlossen werden. Wie die Regulation von GLUT1 auf der Proteinebene verläuft, ist jedoch noch weniger als für GLUT4 erforscht. Eine Verbindung zwischen GLUT1 und Akt wird bis jetzt nur durch Taha *et al.* beschrieben. Diese Autoren zeigen, dass die Proteinspiegel von GLUT1 durch eine verstärkte mRNA Translation nach Insulin Stimulation über einen PI3K/Akt/mTOR/4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) Signalweg gesteigert wird (Taha *et al.*, 1999). Dieser oder ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die basalen Proteinspiegel von GLUT1 modulieren. Den hier erhaltenen Ergebnissen zufolge würde also Akt2 die gewichtigere Rolle bei der Regulation der Proteinspiegel von GLUT1 und GLUT4 in Kardiomyozyten zukommen.

Die Insulin-abhängige Steigerung der Glukoseaufnahme erfolgt durch stimulierte Translokation von intrazellulär gespeichertem GLUT4 zur Zellmembran. Diese Translokation wird unter anderem über AS160 und Tbc1d1 gesteuert. Über die Regulation ihrer Proteinspiegel ist bisher fast nichts bekannt, da der Fokus der Forschung erst seit kurzer Zeit auf diesen beiden Proteinen liegt. In dieser Arbeit wurde erstmals ein Einfluss von Akt auf die Proteinspiegel von AS160 und Tbc1d1 gezeigt. Bei der Analyse der Proteinspiegel von AS160 zeigte sich, dass der Verlust von Akt2 zu einer Reduktion von AS160 um ca. 40 % führte. Auf der Ebene der mRNA zeigten sich Tendenzen, dass der Verlust beider Akt-Isoformen eine Reduktion der AS160 Expression zur Folge hatte. Auffällig ist, dass die mRNA-Expressionsanalysen für das verwandte Tbc1d1 durch ähnliche Tendenzen gefunden wurden wie für AS160. Da beide Proteine sehr stark miteinander verwandt sind und auch ähnliche Funktionen besitzen (Roach *et al.*, 2007), ist eine gleichartige Expressionsregulation nicht verwunderlich. Einschränkend muss an dieser Stelle jedoch betont werden, dass die Unterschiede zwischen Kontrollen und KD Zellen in der qRT-PCR unter einem Zyklus lagen. Damit liegen die gemessenen Unterschiede unter der Auflösung der qRT-PCR. Die gefundenen Transkriptionseffekte sind daher nur mit Einschränkung zu beachten.

Auf Grund der reduzierten Proteinspiegel von GLUT4, GLUT1 und AS160 in den Δ Akt2 Zellen, stellte sich die Frage, ob sich dies auf die Glukoseaufnahme der Zellen auswirkt. Dabei war es nicht vorhersehbar, in welche Richtung sich die Glukoseaufnahme verändern würde. Die reduzierten Proteinspiegel von GLUT1 und GLUT4 könnten zu einer reduzierten Glukoseaufnahme führen. Gleichzeitig wurden aber auch reduzierte AS160 Proteinspiegel in Δ Akt2 Zellen festgestellt. Da AS160 bei Abwesenheit von Insulin die Translokation von GLUT4 Vesikeln zur Plasmamembran hemmt, könnte man eine verstärkte Lokalisation von GLUT4 in der Membran erwarten. Dieser Effekt konnte bereits in Adipozyten durch ein KD von AS160 beobachtet werden (Eguez *et al.*, 2005). Der Akt2 KD muss also nicht zwangsläufig in eine Reduktion der Glukoseaufnahme führen.

Tatsächlich ergaben Messungen der Glukoseaufnahme, dass weder die basale noch die Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme durch den Akt-Isoform KD verändert war. Eine mögliche Erklärung könnte man in einer gegenseitigen Kompensation der Effekte einer GLUT1/GLUT4 Reduktion einerseits und einer AS160 Reduktion andererseits sehen. Es stellt sich aber auch die Frage, ob ein fehlender Effekt durch das Modell bedingt sein könnte. Die effizienteste Akt2 Inaktivierung führte immer noch zu einer Restmenge von 15 % der normalen Akt2 Proteinmenge. Man kann also nicht ausschließen, dass diese Akt2 Proteinmenge, trotz der Reduktion des Akt2 Proteinspiegels, noch ausreichend ist, um eine unveränderte Glukoseaufnahme zu gewährleisten. In diese Richtung deuten auch Untersuchungen an L6-Myotuben hin. Für eine maximale GLUT4 Translokation zur Plasmamembran reichte in diesen Zellen die Stimulation mit einer Insulinmenge aus, die nur 10-20 % des gesamten zellulären Akt Proteins aktivierte (Hoehn et al., 2008). In den hier durchgeführten Experimenten betrug das restliche Phosphorylierungsniveau nach Akt2 KD immerhin noch 50 % des Niveaus der Kontrollzellen. Man kann also vermuten, dass für den offensichtlich sehr sensitiven Prozess der GLUT4 Translokation Restmengen an aktivierter Akt2 in Δ Akt2 Zellen ausreichend vorhanden waren. Dass der Zusammenhang zwischen Akt Stimulation und GLUT4 Translokation nicht notwendigerweise linear sein muss, belegt auch eine kürzlich erschienene, detaillierte Analyse der zeitlichen Abfolge Insulin-abhängigregulierter Prozesse in Adipozyten. So wurde nur eine schwache Korrelation zwischen der gesamten aktivierten Akt Menge und der GLUT4 Translokation nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte eine starke Korrelation zwischen GLUT4 Translokation und membranständiger, phosphorylierter Akt nachgewiesen werden, die nur einen geringeren Anteil der gesamten, phosphorylierten Akt Menge ausmachte (Ng *et al.*, 2010).

Neben den möglichen biologischen Ursachen muss aber auch betont werden, dass die Herunterregulation der GLUT4 und GLUT1 Proteinspiegel in einer Vielzahl von Experimenten konsistent und signifikant nachgewiesen wurde, jedoch war das Ausmaß der Änderung vergleichsweise gering. Daher könnte die Messung der Glukoseaufnahme zu ungenau sein, um die möglicherweise geringen Unterschiede herauszuarbeiten. Erschwerend kommt hinzu, dass die Glukoseaufnahme auch noch durch andere Faktoren, wie beispielsweise die AMPK (Jessen & Goodyear, 2005), beeinflusst werden kann. In neonatalen Kardiomyozyten der Ratte konnte sogar gezeigt werden, dass es bei Überexpression von konstitutiv aktiver Akt1 oder Akt2 zu einer Dephosphorylierung/Inaktivierung der AMPK kommt (Kovacic *et al.*, 2003). Für die KD Zellen würde dies eine gesteigerte AMPK Aktivität bedeuten, die wiederum in eine Zunahme der GLUT4-Translokation und Glukoseaufnahme resultieren würde.

Der Glukosemetabolismus wird nicht nur über die Glukoseaufnahme durch Akt moduliert, sondern auch das Schicksal der aufgenommenen Glukose unterliegt dem Einfluss von Akt, da die Phosphorylierung von GSK3 durch Akt die Glykogensynthese steigert (Cross et al., 1995). Bei der Untersuchung der GSK3 β in Δ Akt1 und Δ Akt2 Zellen, konnte eine leichte Steigerung der Proteinmenge bei $\Delta Akt1$ Zellen detektiert werden, die auf eine negative Regulation der GSK3ß durch Akt1 hindeutet. Eine Phosphorylierungsanalyse von GSK3ß ergab, dass die Phosphorylierung an Serin 9 sowohl durch den Verlust von Akt1, als auch durch den Verlust von Akt2, auf ein vergleichbares Niveau reduziert wurde. Das zeigt, dass Akt 1 und Akt2 unabhängig voneinander GSK3ß phosphorylieren. Bei einer Reduktion einer Isoform kommt es nicht zur Kompensation durch die andere Isoform. Dieser Befund ist interessant, da neben Akt noch weitere Kinasen, wie p70 S6 Kinase oder p90 S6 Kinase, PKA und PKC, die GSK3β am Ser 9 phosphorylieren können (Cohen & Frame, 2001;Fang et al., 2000;Goode et al., 1992). Der KD von Akt1 bzw. Akt2 kann also nicht nur durch die jeweils andere Isoform kompensiert werden, vielmehr können auch andere Kinasen diesen Defizit nicht kompensieren. In diesem Zusammenhang sind Befunde unserer Arbeitsgruppe interessant, in denen nachgewiesen wurde, dass GSK3ß Proteinkomplexe mit PKA ausbildet (Hamer *et al.*, 2010). Es könnte also sein, dass GSK3 β in der Zelle in verschiedenen Kompartimenten mit den einzelnen Kinasen vergesellschaftet ist und somit die gesamte GSK3 β Proteinmenge nicht für alle Kinasen zugänglich ist.

In dieser Arbeit konnten an Hand der KD Zelllinien gemeinsame und spezifische Funktionen für Akt1 und Akt2 identifiziert werden, die in Abbildung 43 noch einmal zusammengefasst sind. Dazu zählt die quantitative Dominanz von Akt1 und die bevorzugte Phosphorylierung von Akt2 nach Stimulation mit Insulin/IGF (Abbildung 43A). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Akt2 die Spiegel wichtiger Proteine des Glukosemetabolismus (GLUT1, GLUT4 und AS160) moduliert (Abbildung 43B).



Abbildung 43: A) Isoform-spezifische Signaltransduktion nach Stimulation mit Insulin oder IGF. B) Regulation der Proteinspiegel von Faktoren des Glukosemetabolismus durch Akt1 und Akt2

4.3 Identifizierung neuer Akt-regulierter Proteine durch Phosphoproteomics

Im ersten Teil der Arbeit wurde ausgehend von den KD Zellen die Bedeutung der Akt-Isoformen hinsichtlich des Glukosemetabolismus untersucht. Um neue Ziele zu identifizieren wurde zusätzlich ein systembiologischer Ansatz etabliert, der es erlaubt, unabhängig von der gezielten Suche innerhalb eines Signalweges, Proteine zu identifizieren, die unter der Kontrolle von Akt1 bzw. Akt2 stehen. Insbesondere haben neue Entwicklungen in der Massenspektrometrie den Weg zu Proteom-weiten Analysen geebnet. In dieser Arbeit wurden die etablierten Δ Akt1 und Δ Akt2 Zelllinien sowie Kontrollzellen (shC) genutzt, um neue Akt Ziele zu identifizieren. Wie in Abbildung 1 gezeigt, führt die Aktivierung eines Signalweges zur wechselseitigen Aktivierung/Hemmung verschiedener Wege, so dass hieraus eine integrierte Antwort entsteht. Die Phosphoproteom-Analyse kann also zur Identifizierung folgender Peptide führen:

- Phosphopeptide, die Akt-unabhängig phosphoryliert werden,
- direkte Akt-Substrate (Phosphopeptid reduziert),
- indirekte Akt-Substrate (Phosphopeptid reduziert oder gesteigert),
- in Abhängigkeit von Akt verstärkte Expression von Phosphoproteinen
- in Abhängigkeit von Akt reprimierte Expression von Phosphoproteinen.

Für die Proteom-weite Analyse der Akt-abhängig regulierten Proteine wurde die stabile Dimethylmarkierung unter Verwendung von Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid, die mit unterschiedlichen Kombinationen von Deuterium/¹³C markiert waren, genutzt. Die Markierung der Peptide mit drei unterschiedlichen Kombinationen stabiler Isotope ermöglichte es, die Peptide der drei verschiedenen Zelllinien in der MS Analyse zu unterscheiden. Dies wiederum erlaubte es, die Peptide untereinander direkt qualitativ und quantitativ zu vergleichen. Es kann also bei den identifizierten Proteinen unterschieden werden, wie stark die Präferenz einer Akt-Isoform für deren Regulation ist.

Diese Methode führte erfolgreich zur Identifizierung von insgesamt 113 Phosphopeptiden, die hauptsächlich quantitativ nicht verändert waren. Dies bedeutet, dass es sich hierbei um Proteine handelte, die entweder nicht durch Akt phosphoryliert wurden oder aber um Proteine, deren Phosphorylierungsgrad bei Akt1 bzw. Akt2 KD durch die jeweils unveränderte Isoform kompensiert wurde. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich bereits bekannte Akt-Substrate. Dazu zählen Filamin C (FLN-C) (Murray *et al.*, 2004), *Sorbin and SH3 domain-containing protein 2* (ArgBP2) (Yuan *et al.*, 2005), *E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like* (Nedd4-2) (Lee *et al.*, 2007), *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1* (DNMT1) (Hodge *et al.*, 2007), *Heat shock protein beta-1 (HSP27)* (Rane *et al.*, 2003), *Serine/threonine-protein kinase 3* (MST-2) (Romano *et al.*, 2010). und GSK3β/α.

Insgesamt sechzehn Kandidaten-Proteine wurden in ihrer Phosphorylierung signifikant durch den Akt-Isoform KD verändert. Diese Kandidaten besaßen entweder eine starke Abweichung in mindestens einer KD Zelllinie im Vergleich zu den shC Zellen oder eine hohe Differenz zwischen den KD Zelllinien. Drei der sechzehn Kandidaten (HSP90, regulatorische Untereinheit der PKA, Stathmin) weisen direkte Verbindungen zu Akt oder dem PI3K-Signalweg auf und belegen damit, dass die Veränderungen im Phosphorylierungsmuster mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Isoform KD zurückzuführen sind. Interessanterweise sind diese drei Kandidaten bisher nicht als Akt-Substrate bekannt, sondern interagieren mit Akt oder Akt dient eher selbst als Substrat dieser Proteine. Die Identifizierung als Akt-Isoformspezifisch modulierte Proteine eröffnet damit also die neue Sichtweise, dass es bei der Interaktion mit einer Akt-Isoform auch um einen *Feedback*-Mechanismen handeln kann, über den Akt die eigene Aktivierung oder Inhibition reguliert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, auf welche Weise Akt für die Phosphorylierung dieser Kandidaten verantwortlich ist.

Einer dieser drei Kandidaten ist HSP90 (*heat shock protein 90*), ein bekannter Komplexpartner von Akt, der zusammen mit dem Co-Chaperon cdc37 (*cell division cycle 37*) die Stabilität von Akt gewährleistet. Die Inhibition von HSP90 führt zur Ubiquitinierung und damit zur Degradation von Akt durch das Proteasom und zu einer Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 2A (Basso *et al.*, 2002;Sato *et al.*, 2000). In der Phosphoproteom-Analyse zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung von HSP90 nach Verlust von Akt1 und Akt2 (Δ Akt2: 100 % Steigerung, Δ Akt1: 50 % Steigerung).

Über die regulatorische Untereinheit II α der PKA ist bisher in der Literatur wenig bekannt, da meist nicht zwischen der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit unterschieden wird. Jedoch konnte in Endothelzellen gezeigt werden, dass Akt ein direktes Substrat von PKA ist und nach der Phosphorylierung einen Komplex mit PKA ausbildet (Bellis *et al.*, 2009). Laut der Phosphoproteom-Analyse wird die regulatorische Untereinheit II α der PKA in Δ Akt2 Zellen um ~60 % weniger phosphoryliert und scheint damit über eine Akt2spezifische Signaltransduktion reguliert zu werden.

Die Phosphorylierung von Stathmin ist nach einem Akt1 KD um ~ 50 % erhöht und lässt erstmal vermuten, dass Akt1 indirekt die Phosphorylierung von Stathmin hemmt. Zwischen Stathmin und Akt konnten bisher schon Verbindungen hergestellt werden. So führt die Reduktion der Stathmin Expression zu einer geringeren Aktivierung von Akt (Yoshie *et al.*, 2009), wobei die Aktivierung des PI3K Signalwegs zu einer gesteigerten Stathmin mRNA Expression führt (Ogino *et al.*, 2009).

Für die restlichen 13 Kandidaten wird hier erstmalig ein Zusammenhang mit Akt1 und Akt2 aufgezeigt. Vier dieser Kandidaten zeigen eine reduzierte Phosphorylierung in ihrem identifizierten Phosphopeptid in Δ Akt2 Zellen, dass eine direkte Phosphorylierung durch Akt2 nahe legt. Einer direkten Phosphorylierung durch Akt1 scheinen somit die zwei Kandidaten mit reduzierter Phosphorylierung in Δ Akt1 Zellen zu unterliegen. Es finden sich aber auch Kandidaten mit einer gesteigerten Phosphorylierung. Dies ist der Fall für zwei Kandidaten in Δ Akt1 und für fünf Kandidaten in Δ Akt2 Zellen. Bei diesen Kandidaten muss von einer indirekten Modulierung über eine reduzierte Phosphataseaktivität bzw. reduzierte Inhibition der Akt-nachgeschalteten Kinase ausgegangen werden.

Für einige der sechzehn Kandidaten kann über die Literatur eine direkte Verbindung zum Herzen geknüpft werden. Beispielsweise ist die Expression der *N-acylglucosamin 2-Epimerase* in ventrikulären Myozyten bei humaner Herzinsuffizienz gesteigert (Bohlmeyer *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist die SERCA2 (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2*), die die diastolische Calcium-Konzentration in murinen Herzen reguliert (Bers, 2002) und deren Expressionsreduktion bei der Induktion eines Herzversagens beobachtet werden konnte (Li *et al.*, 2009).

Des Weiteren war auffällig, dass viele Kandidaten eine Verbindung zum Vesikeltransport besitzen oder im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. Golgi-Apparat lokalisiert sind. Zu dieser Gruppe gehören Protein disulfide-isomerase A6, Nascent polypeptide-associated complex subunit α , ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2, SEC23-interacting protein, Thioredoxin-related transmembrane protein 1 und das Oxysterol-binding protein 1. In der neuesten Literatur kann Akt in den direkten Zusammenhang mit dem Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat gebracht werden. Akt kann beispielsweise Sec24 phosphorylieren, das eine COPII-Vesikel-Komponente darstellt, die für die Selektion der Fracht vom ER zum Golgi verantwortlich ist (Sharpe et al., 2010). Des Weiteren reguliert Akt nach Aktivierung über den PI3K-Signalweg den ER-Golgi-Vesikeltransport eines Hauptregulators der Cholesterolhomeostase, sterol regulatory element binding protein (SREBP) (Du et al., 2006), und von Ceramiden in Gliomazellen (Giussani et al., 2009). Die Verbindungen von Akt zum Vesikeltransport zwischen ER und Golgi sind relativ neu, jedoch zeigen die Kandidaten, dass sich in diesem Feld noch viele unbekannte Funktionen für Akt befinden. Durch die Identifizierung neuer Akt-Signaltransduktionspartner eröffnet sich gleichzeitig die Möglichkeit neue Funktionen für Akt zu finden.

Insgesamt konnten in den Δ Akt2 Zellen mehr veränderte Phosphorylierungsmuster als in den Δ Akt1 Zellen nachgewiesen werden, diese zeigten auch eine größere Abweichung.

Angesichts der bevorzugten Phosphorylierung von Akt2 nach Stimulation mit Insulin in HL-1 Zellen war dieser Effekt erwartet worden.

Aus den bisher durchgeführten Phosphoproteom-Analysen ergeben sich bereits neue mögliche Funktionen von Akt2, die im Zusammenhang mit dem zellulären Vesikeltransport stehen könnten. Hierbei ist aber noch zu prüfen, ob das veränderte Phosphorylierungsniveau der identifizierten Proteine die Konsequenz einer Regulation des jeweiligen Proteins auf Expressionsebene ist, ob es sich um ein direktes Akt-Substrat handelt, oder ob es sich um eine indirekte Veränderung durch Modulation einer Akt-abhängigen Kinase- bzw. Phosphatase Aktivität handelt.

Die Identifizierung der sechzehn Kandidaten, die sehr wahrscheinlich einer Akt-Isoformspezifischen Phosphorylierung unterliegen, stellt erst den Anfang dieses Experiments dar und setzt auch keine Vollständigkeit voraus. Dies wird schon deutlich an der bisher noch geringen Anzahl identifizierter Proteine. Phosphoproteom-Analysen an Myelom-Zellen führten zur Identifizierung von 530 Phosphorylierungsstellen (Ge et al., 2010), während in Gehirnproben von Mäusen 512 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten (Collins et al., 2008). Diese Daten lassen vermuten, dass auch in HL-1 Kardiomyozyten der Anteil phosphorylierter Proteine und damit auch der Anteil Akt-abhängig-phosphorylierter Proteine noch höher sein dürften. Insgesamt belegen aber die hier bereits erzielten Ergebnisse, dass die Verbindung von Isoform-spezifischen KD Zellen mit einer Phosphoproteom-Analyse ein interessanter und effizienter Weg zur Identifizierung neuer Akt-Isoform-spezifischer Funktionen ist.

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass HL-1 Kardiomyozyten ein interessantes Modell darstellen, in denen mit genetischen und proteomischen Analysen Rückschlüsse auf die Aktspezifische Signaltransduktion in Kardiomyozyten gezogen werden können. Allerdings ist dieses Modellsystem mit einer Vielzahl von Limitationen verbunden, die die Übertragbarkeit auf die Situation in vivo nur eingeschränkt erlauben. So ist das Herz, im Gegensatz zu den isolierten Zellen in der Kulturschale, ein Organ, das in erheblichem Maße mechanischen Belastungen, zirkulierenden Hormonen und lokal wirkenden neuronalen Einflüssen ausgesetzt ist. Ferner wird das Milieu um einen Kardiomyozyten zu einem beträchtlichen Maß durch die Umgebung beeinflusst. So sind die Kardiomyozyten des Herzens mit Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und auch einwandernden Endothelzellen, Zellen des Immunsystems vergesellschaftet. Alle diese Zellen entsenden zur Kommunikation untereinander eine Vielzahl von Signalmolekülen, die in ihrer Komplexität die Bedingungen in der Kulturschale bei weitem überschreiten dürften.

Um die in vitro gewonnen Erkenntnisse zu den Funktionen von Akt1 und Akt2 auf ihre Relevanz im Tiermodell zu überprüfen, wurde damit begonnen, eine konditionale Knock Out Maus für Akt1 zu generieren. Die entsprechende Maus für Akt2 wird in einem separaten Projekt im Institut für Molekulare Kardiologie bearbeitet. Neben einer kurzfristigen Regulation kann im Tiermodell vor allem die Fragestellung der Isoform-spezifischen Regulation einer kardialen Hypertrophie nicht in einem Zellkulturexperiment analysiert werden, sondern benötigt das entsprechende Tiermodell. Zurzeit gibt es für jede Akt-Isoform ein konstitutives KO Mausmodell(Chen et al., 2001;Cho et al., 2001a;Tschopp et al., 2005b), die jeweils Aussagen über die Funktion der Isoformen im Herzen zulassen. Allerdings muss einschränkend betont werden, dass bei einer konstitutiven Inaktivierung eines Gens, insbesondere wegen des Fehlens dieses Gens im Rahmen der Embryonal- und frühen postnatalen Entwicklung, häufig Adaptationsmechanismen aktiviert werden, die den Gendefekt kompensieren (Godecke & Schrader, 2000). Darüber hinaus wird das Gen in allen Zellen und Organen deletiert, so dass eine Zelltyp-spezifische Funktion des Gens in vivo nur mit Einschränkungen analysiert werden kann. Um dies zu ermöglichen und um weit reichende Veränderungen funktioneller und struktureller Eigenschaften der betroffenen Organe bei einer konstitutiven Gendeletion zu minimieren, wurde die Erzeugung von Herz-spezifischen, konditionalen KO Mäusen für die Akt-Isoformen vorangetrieben. Die zeitlich regulierbare und Kardiomyozyten-spezifische Deletion der jeweiligen Akt-Isoform ermöglicht dann eine genaue Analyse der Funktion im Herzen, bei der eine mögliche Adaptation auf den Defekt während der Embryonalentwicklung ausgeschlossen werden kann. Zur Identifizierung von Isoform-spezifischen Effekten ist ein direkter Vergleich zwischen dem konditionalen Mausmodell für Akt1 und Akt2 besonders effizient. In dieser Arbeit wurde die Generierung der konditionalen Akt1 KO Maus von der Klonierung des Austauschvektors (Targeting Vektor), der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen, der Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastozysten, den Embryotransfer in Leihmütter bis hin zur Erzeugung chimärer Mäuse durchgeführt. Damit steht dieses Projekt am Ende dieser Arbeit kurz vor seinem Abschluss. Aus Zeitgründen war die weitere Entwicklung bis hin zur Herz-spezifischen Inaktivierung nicht mehr durchführbar. Dennoch wird für die weitere Identifizierung Isoformspezifischer Funktionen im Herzen in vivo eine wesentliche Grundlage gelegt. Die Möglichkeiten dieser Maus gehen weit über das Potenzial der hier untersuchten Kardiomyozyten hinaus, da nur in der Maus die wirklichen in vivo Funktionen der Akt1 und Akt2 Isoformen studiert werden können. Dies gilt unter basalen Bedingungen für das gesunde Herz, aber darüber hinaus vor allem auch unter pathologischen Bedingungen wie

beispielsweise Hypertrophie und Myokarditis. Da die Technik der quantitativen Phosphoproteomics nicht an kultivierte Zellen gebunden ist, sondern auch am gesamten Mausherzen angewendet werden kann, ergibt sich mit den hier etablierten Methoden und Modellen eine hervorragende Basis um einerseits die an HL-1 Zellen gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* zu überprüfen und darüber hinaus auch noch neue Akt-abhängige Funktionen im Herzen zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die Proteinkinase B (Akt) ist eine zentrale Schnittstelle intrazellulärer Signaltransduktion. Nach Aktivierung über den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Signalweg beeinflusst sie zelluläres Wachstum, Apoptose und Metabolismus. In Säugern findet man drei Akt-Isoformen, die trotz hoher Homologie unterschiedliche Funktionen besitzen. Im Herzen werden hauptsächlich die beiden stark homologen Isoformen Akt1 und Akt2 exprimiert, deren spezifische Eigenschaften und Funktionen in Kardiomyozyten wenig erforscht sind. Zur Untersuchung dieser Isoform-spezifischen Funktionen wurden von der *heart-like-1* (HL-1) Kardiomyozyten Zelllinie stabile Knock Down Zelllinien für Akt1 und Akt2 mittels RNA Interferenz generiert.

Mit diesen Zelllinien konnten erstmals relative Proteinspiegel der beiden Isoformen gemessen werden. Akt1 stellt mit 75 % der gesamten Akt Proteinmenge die quantitativ dominante Isoform über Akt2 mit 25 % in Kardiomyozyten dar. Obwohl Akt2 die geringer exprimierte Isoform repräsentiert, wird sie nach Stimulation mit Insulin und IGF bevorzugt phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Akt Substrats Glykogensynthase 3 β wurde durch den Knock Down der jeweiligen Isoform gleichermaßen reduziert und stellt somit für beide Isoformen ein Substrat dar. Die Proliferationsrate der Zellen wurde durch den Knock Down nicht beeinflusst.

Da bekannt ist, dass Akt und im Besonderen Akt2, den Glukosemetabolismus reguliert, wurde untersucht, ob es zur Modulation von Faktoren der Glukoseaufnahme durch spezifische Akt Isoenzyme kommt. Nur der Verlust von Akt2 reduzierte die Proteinspiegel der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4, wobei die Expression der mRNA unverändert blieb. An Zelllinien, die stabil Akt1 bzw. Akt2 überexprimieren oder von Knock Down Zelllinien, in denen der Verlust der jeweiligen Isoform durch Expression mutagenisierter und somit shRNA resistenter Akt Isoformen rückgängig gemacht wurde, konnte gezeigt werden, dass die GLUT1 und GLUT4 Proteinspiegel durch Akt2 und nicht durch Akt 1 bestimmt wurden. Das *akt substrate of 160 kDa* (AS160), welches die Translokation des GLUT4 an die Plasmamembran moduliert, zeigte ebenfalls nur bei Verlust von Akt2 eine Reduktion der Proteinmenge. Die verringerte Proteinexpression der Glukosetransporter und AS160 führte nicht zu einer Veränderung der Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten.

Zur Identifizierung neuer Akt-Isoform-spezifischer Signaltransduktion wurde mit Hilfe der Knock Down Zelllinien und einer dreifachen Formaldehymarkierung eine quantitative Phosphoproteom-Analyse durchgeführt. Mit dieser Analyse konnten mittels nano-LC-ESI-MS insgesamt 113 Phosphopeptide identifiziert werden, von denen sechzehn Phosphopeptide ein unterschiedliches Phosphorylierungsniveau durch den Verlust der Akt-Isoformen aufwiesen. Hierbei wurden vor allem in Akt2 Knock Down Zellen neue Akt Substrate identifiziert, von denen mehrere im Zusammenhang mit dem intrazellulären Vesikeltransport standen.

Für weiterführende *in vivo* Untersuchungen wurde die Generierung einer herzspezifischen, konditionalen Akt1 Knock Out Maus bis zu der Erzeugung der Chimären vorangetrieben. Mit Hilfe dieses Mausmodells sollen Isoform-spezifische Funktionen *in vivo* untersucht und die Rolle der Akt-Isoformen in der Hypertrophieentwicklung aufgeklärt werden.

Schlussfolgerung: Akt2 ist in Kardiomyozyten trotz geringerer Expression nach Stimulation mit Insulin die funktionell dominante Akt-Isoform.

6 Summary

The protein kinase B (Akt) is a central interface of intracellular signal transduction. It is activated by the phosphatidyl-inositol-3-kinase pathway and modulates cellular growth, apoptosis and metabolism. In mammals, three distinct isoforms have been described which despite a high degree of homology exert specific functions. In the heart, Akt1 and Akt2 are expressed, but their specific functions in cardiomyocytes are only poorly understood. To analyse isoform-specific functions, stable Akt1 and Akt2 knock down cell lines were derived from heart-like 1 (HL-1) cardiomyocytes by means of shRNA expression.

These knock down cell lines allowed the first time to measure the relative isoform protein levels. Akt1 represented 75 % of total Akt in cardiomyocytes, whereas Akt2 accounted for only 25 % of total Akt. Although Akt2 was the minor isoform, insulin or IGF stimulation resulted primarily in phosphorylation of Akt2. The phosphorylation of the Akt substrate glycogen-synthase 3 β (GSK3 β) was evenly reduced in both knock down cell lines, which revealed GSK3 β as a substrate of both isoforms. The knock down of Akt-isoforms did not influence cell proliferation rate.

Since it is known, that Akt and especially Akt2 regulates glucose metabolism, it was investigated to what extent knock down of Akt isoforms modulated glucose uptake. Only loss of Akt2 reduced the protein levels of glucose transporters GLUT1 and GLUT4, while mRNA expression was unchanged. Cell lines stably over expressing Akt1 or Akt2 as well as knock down cell lines expressing mutated and thereby shRNA resistant Akt isoforms showed that GLUT1 and GLUT4 protein levels were determined by Akt2, but not by Akt1. Protein levels of Akt substrate of 160 kDa (AS160), which modulates GLUT4 translocation to the plasma membrane, were only reduced in cells lacking Akt2. Changes in protein levels of glucose transporters and AS160 did not modify the glucose uptake.

To identify novel isoform-specific functions, a quantitative phosphoproteomic approach with a triple formaldehyde labeling was performed by using the knock down cell lines. In total, 113 phosphopeptides were identified by nano-LC-ESI-MS. Sixteen of them showed a different phosphorylation pattern due to loss of one of the Akt isoforms. Interestingly, alterations were mainly detected in Akt2 knock down cells. Several of the identified proteins were linked to intracellular vesicle transport.

For in vivo studies, the generation of a cardiac-specific, conditional Akt1 Knock out mouse was performed till the generation of chimeric mice. This model will allow the investigation of isoform-specific functions *in vivo* and to decipher the role of Akt isoforms in the development of cardiac hypertrophy.

Conclusion: Despite a lower expression level Akt2 is the functionally predominant Akt isoform in cardiac myocytes.

7 Literaturverzeichnis

Abel, E. D., Graveleau, C., Betuing, S., Pham, M., Reay, P. A., Kandror, V., Kupriyanova, T., Xu, Z., & Kandror, K. V. (2004). Regulation of insulin-responsive aminopeptidase expression and targeting in the insulin-responsive vesicle compartment of glucose transporter isoform 4-deficient cardiomyocytes. *Mol.Endocrinol.* **18**, 2491-2501.

Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541-6551.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr.Biol.* **7**, 261-269.

Altomare, D. A., Lyons, G. E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J. Q., & Testa, J. R. (1998). Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* **16**, 2407-2411.

Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M., & Hemmings, B. A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J.Biol.Chem.* **272**, 31515-31524.

Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C. P., & Alessi, D. R. (1999). PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr.Biol.* **9**, 393-404.

Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tsichlis, P., & Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J.Biol.Chem.* **277**, 39858-39866.

Becker, C., Sevilla, L., Tomas, E., Palacin, M., Zorzano, A., & Fischer, Y. (2001). The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology* **142**, 5267-5276.

Belke, D. D., Betuing, S., Tuttle, M. J., Graveleau, C., Young, M. E., Pham, M., Zhang, D., Cooksey, R. C., McClain, D. A., Litwin, S. E., Taegtmeyer, H., Severson, D., Kahn, C. R., & Abel, E. D. (2002). Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J. Clin.Invest* **109**, 629-639.

Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., & Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**, 198-208.

Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., & Tsichlis, P. N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-277.

Bellis, A., Castaldo, D., Trimarco, V., Monti, M. G., Chivasso, P., Sadoshima, J., Trimarco, B., & Morisco, C. (2009). Cross-talk between PKA and Akt protects endothelial cells from apoptosis in the late ischemic preconditioning. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **29**, 1207-1212.

Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 415, 198-205.

Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C., & Vanoverschelde, J. L. (2008). Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc.Res.* **79**, 238-248.

Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., & Heck, A. J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat.Protoc.* **4**, 484-494.

Bogan, J. S. & Kandror, K. V. (2010). Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Curr.Opin.Cell Biol.* **22**, 506-512.

Bohlmeyer, T., Ferdensi, A., Bristow, M. R., Takahashi, S., & Zisman, L. S. (2003). Selective activation of N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase expression in failing human heart ventricular myocytes. *J.Card Fail.* **9**, 59-68.

Broach, J. R. & Hicks, J. B. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* **21**, 501-508.

Brognard, J., Sierecki, E., Gao, T., & Newton, A. C. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol.Cell* **25**, 917-931.

Bruss, M. D., Arias, E. B., Lienhard, G. E., & Cartee, G. D. (2005). Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* 54, 41-50.

Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 267-277.

Calera, M. R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A. K., Birnbaum, M. J., & Pilch, P. F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J.Biol.Chem.* **273**, 7201-7204.

Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., & Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321.

Chadt, A., Leicht, K., Deshmukh, A., Jiang, L. Q., Scherneck, S., Bernhardt, U., Dreja, T., Vogel, H., Schmolz, K., Kluge, R., Zierath, J. R., Hultschig, C., Hoeben, R. C., Schurmann, A., Joost, H. G., & Al Hasani, H. (2008). Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat. Genet.* **40**, 1354-1359.

Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., & Tsichlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 965-1014.

Chang, Z., Zhang, Q., Feng, Q., Xu, J., Teng, T., Luan, Q., Shan, C., Hu, Y., Hemmings, B. A., Gao, X., & Yang, Z. (2010). Deletion of Akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation. *Dev.Biol.* **347**, 384-391.

Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., 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 Dev.* **15**, 2203-2208.

Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., III, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., & Birnbaum, M. J. (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-1731.

Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., & Birnbaum, M. J. (2001b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J.Biol.Chem.* **276**, 38349-38352.

Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., & Izzo, N. J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 2979-2984.

Coffer, P. J. & Woodgett, J. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur.J.Biochem.* **201**, 475-481.

Cohen, P. & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2, 769-776.

Collins, M. O., Yu, L., Campuzano, I., Grant, S. G., & Choudhary, J. S. (2008). Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Mol.Cell Proteomics.* **7**, 1331-1348.

Cozzone, D., Frojdo, S., Disse, E., Debard, C., Laville, M., Pirola, L., & Vidal, H. (2008). Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* **51**, 512-521.

Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H. Y., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., Steinberg, S. F., Wymann, M. P., Backx, P. H., & Penninger, J. M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.

Debosch, B., Sambandam, N., Weinheimer, C., Courtois, M., & Muslin, A. J. (2006). Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J.Biol.Chem.* **281**, 32841-32851.

Deshmukh, A. S., Glund, S., Tom, R. Z., & Zierath, J. R. (2009). Role of the AMPKgamma3 isoform in hypoxia-stimulated glucose transport in glycolytic skeletal muscle. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **297**, E1388-E1394.

Du, X., Kristiana, I., Wong, J., & Brown, A. J. (2006). Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol.Biol.Cell* **17**, 2735-2745.

Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., & Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell Biol.* **25**, 1869-1878.

Eguez, L., Lee, A., Chavez, J. A., Miinea, C. P., Kane, S., Lienhard, G. E., & McGraw, T. E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* **2**, 263-272.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.

Embi, N., Rylatt, D. B., & Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur.J.Biochem.* **107**, 519-527.

Evans-Anderson, H. J., Alfieri, C. M., & Yutzey, K. E. (2008a). Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circ.Res.* **102**, 686-694.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., & Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* **27**, 1932-1943.

Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C., Jr., Woodgett, J. R., & Mills, G. B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 11960-11965.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 7413-7417.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806-811.

Fischer, Y., Thomas, J., Sevilla, L., Munoz, P., Becker, C., Holman, G., Kozka, I. J., Palacin, M., Testar, X., Kammermeier, H., & Zorzano, A. (1997). Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J.Biol.Chem.* **272**, 7085-7092.

Frey, N. & Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu.Rev.Physiol* **65**, 45-79.

Gao, T., Furnari, F., & Newton, A. C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol.Cell* **18**, 13-24.

Ge, F., Xiao, C. L., Yin, X. F., Lu, C. H., Zeng, H. L., & He, Q. Y. (2010). Phosphoproteomic analysis of primary human multiple myeloma cells. *J.Proteomics.* **73**, 1381-1390.

Gerdes, A. M. (1992). Remodeling of ventricular myocytes during cardiac hypertrophy and heart failure. *J.Fla.Med.Assoc.* **79**, 253-255.

Giussani, P., Brioschi, L., Bassi, R., Riboni, L., & Viani, P. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway regulates the endoplasmic reticulum to golgi traffic of ceramide in glioma cells: a link between lipid signaling pathways involved in the control of cell survival. *J.Biol.Chem.* **284**, 5088-5096.

Godecke, A., Decking, U. K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Godecke, S., & Schrader, J. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ.Res.* **82**, 186-194.

Godecke, A. & Schrader, J. (2000). Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice-lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic Res. Cardiol.* **95**, 492-498.

Gonzalez, E. & McGraw, T. E. (2009a). Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 7004-7009.

Gonzalez, E. & McGraw, T. E. (2009b). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502-2508.

Goode, N., Hughes, K., Woodgett, J. R., & Parker, P. J. (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J.Biol.Chem.* **267**, 16878-16882.

Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., & Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* **11**, 859-871.

Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A. J., Okkenhaug, K., & Vanhaesebroeck, B. (2008). The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 8292-8297.

Hamer, S., Gerlach, M., Naguib, M., Reinartz, M., & Gödecke, A. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B) forms multiple protein complexes. 24 (Meeting Abstract Supplement) 465.2. 2010. *The FASEB Journal*"*FASEB J.*

Haq, S., Choukroun, G., Kang, Z. B., Ranu, H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Molkentin, J. D., Alessandrini, A., Woodgett, J., Hajjar, R., Michael, A., & Force, T. (2000). Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J.Cell Biol.* **151**, 117-130.

Heineke, J. & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **7**, 589-600.

Hill, M. M., Clark, S. F., Tucker, D. F., Birnbaum, M. J., James, D. E., & Macaulay, S. L. (1999). A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol.Cell Biol.* **19**, 7771-7781.

Hodge, D. R., Cho, E., Copeland, T. D., Guszczynski, T., Yang, E., Seth, A. K., & Farrar, W. L. (2007). IL-6 enhances the nuclear translocation of DNA cytosine-5-methyltransferase 1 (DNMT1) via phosphorylation of the nuclear localization sequence by the AKT kinase. *Cancer Genomics Proteomics.* **4**, 387-398.

Hoehn, K. L., Hohnen-Behrens, C., Cederberg, A., Wu, L. E., Turner, N., Yuasa, T., Ebina, Y., & James, D. E. (2008). IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab* **7**, 421-433.

Hoess, R. H., Ziese, M., & Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**, 3398-3402.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., & Lacy, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Holman, G. D. & Sandoval, I. V. (2001). Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage. *Trends Cell Biol.* **11**, 173-179.

Hresko, R. C., Kruse, M., Strube, M., & Mueckler, M. (1994). Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **269**, 20482-20488.

Huang, J. & Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem.Soc.Trans.* **37**, 217-222.

Huang, S. & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. Cell Metab 5, 237-252.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., & Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-137.

Jessen, N. & Goodyear, L. J. (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* **99**, 330-337.

Jiang, Z. Y., Zhou, Q. L., Coleman, K. A., Chouinard, M., Boese, Q., & Czech, M. P. (2003). Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 7569-7574.

Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., & Hemmings, B. A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 4171-4175.

Joost, H. G. & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol.Membr.Biol.* **18**, 247-256.

Kane, S., Sano, H., Liu, S. C., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. C., & Lienhard, G. E. (2002). A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J.Biol.Chem.* **277**, 22115-22118.

Kaneko, S., Feldman, R. I., Yu, L., Wu, Z., Gritsko, T., Shelley, S. A., Nicosia, S. V., Nobori, T., & Cheng, J. Q. (2002). Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter. *J.Biol.Chem.* **277**, 23230-23235.

Kang, D. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis., SY Gho M Suh und C Kang. 23[*Bull Korean Chem Soc.*], 1511-1512. 2002. Paef Tume: Generic

Ref Type: Generic

Karnieli, E. & Armoni, M. (2008). Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **295**, E38-E45.

Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans. *Science* **277**, 942-946.

Klein, L., O'Connor, C. M., Gattis, W. A., Zampino, M., de Luca, L., Vitarelli, A., Fedele, F., & Gheorghiade, M. (2003). Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. *Am.J.Cardiol.* **91**, 18F-40F.

Klinz, F., Bloch, W., Addicks, K., & Hescheler, J. (1999). Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase blocks development of functional embryonic cardiomyocytes. *Exp. Cell Res.* **247**, 79-83.

Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., & Roth, R. A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J.Biol.Chem.* **271**, 31372-31378.

Kovacic, S., Soltys, C. L., Barr, A. J., Shiojima, I., Walsh, K., & Dyck, J. R. (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J.Biol.Chem.* **278**, 39422-39427.

Kuhn, R., Rajewsky, K., & Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* **254**, 707-710.

Kumar, C. C. & Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 24, 7493-7501.

Lee, I. H., Dinudom, A., Sanchez-Perez, A., Kumar, S., & Cook, D. I. (2007). Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *J.Biol.Chem.* **282**, 29866-29873.

Li, X. M., Ma, Y. T., Yang, Y. N., Liu, F., Chen, B. D., Han, W., Zhang, J. F., & Gao, X. M. (2009). Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **36**, 1054-1061.

Liao, Y. & Hung, M. C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. Am.J. Transl. Res. 2, 19-42.

Lips, D. J., deWindt, L. J., van Kraaij, D. J., & Doevendans, P. A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur.Heart J.* **24**, 883-896.

Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., & Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1686-1690.

Liu, M. L., Olson, A. L., Edgington, N. P., Moye-Rowley, W. S., & Pessin, J. E. (1994). Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding site is essential for C2C12 myotube-specific expression of the rat GLUT4/muscle-adipose facilitative glucose transporter gene. *J.Biol.Chem.* **269**, 28514-28521.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lottspeich, F. & Engels, J. W. (2006). Bioanalytik, 2 ed. Elsevier GmbH, München.

MacAulay, K., Doble, B. W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E. M., Drucker, D. J., Nagy, A., & Woodgett, J. R. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab* **6**, 329-337.

Mansour, S. L., Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352.

Matsui, T., Li, L., del, M., Fukui, Y., Franke, T. F., Hajjar, R. J., & Rosenzweig, A. (1999). Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation* **100**, 2373-2379.

Matsui, T., Li, L., Wu, J. C., Cook, S. A., Nagoshi, T., Picard, M. H., Liao, R., & Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J.Biol.Chem.* **277**, 22896-22901.

McDevitt, T. C., Laflamme, M. A., & Murry, C. E. (2005). Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. *J.Mol.Cell Cardiol.* **39**, 865-873.

McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Kang, P. M., & Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 12355-12360.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**, 782-787.

Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M., Price, N. C., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem.J.* **375**, 531-538.

Mochizuki, H., Schwartz, J. P., Tanaka, K., Brady, R. O., & Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* **72**, 8873-8883.

Molkentin, J. D. & Dorn, G. W. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu.Rev.Physiol* **63**, 391-426.

Mora, A., Davies, A. M., Bertrand, L., Sharif, I., Budas, G. R., Jovanovic, S., Mouton, V., Kahn, C. R., Lucocq, J. M., Gray, G. A., Jovanovic, A., & Alessi, D. R. (2003). Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *EMBO J.* **22**, 4666-4676.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., & Lodish, H. F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.

Munoz, P., Chillaron, J., Camps, M., Castello, A., Furriols, M., Testar, X., Palacin, M., & Zorzano, A. (1996). Evidence for posttranscriptional regulation of GLUT4 expression in muscle and adipose tissue from streptozotocin-induced diabetic and benfluorex-treated rats. *Biochem.Pharmacol.* **52**, 1665-1673.

Murray, J. T., Campbell, D. G., Peggie, M., Mora, A., & Cohen, P. (2004). Identification of filamin C as a new physiological substrate of PKBalpha using KESTREL. *Biochem.J.* **384**, 489-494.

Murthy, S. S., Tosolini, A., Taguchi, T., & Testa, J. R. (2000). Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* **88**, 38-40.

Naga Prasad, S. V., Esposito, G., Mao, L., Koch, W. J., & Rockman, H. A. (2000). Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J.Biol.Chem.* **275**, 4693-4698.

Naguib, M. Protein-Protein-Interaktion des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, mit dem zytoplasmatischen ß-Aktin. 2009

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8424-8428.

Ng, Y., Ramm, G., Burchfield, J. G., Coster, A. C., Stockli, J., & James, D. E. (2010). Cluster analysis of insulin action in adipocytes reveals a key role for Akt at the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **285**, 2245-2257.

Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.

O'Gorman, S., Fox, D. T., & Wahl, G. M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**, 1351-1355.

Ogino, S., Nosho, K., Baba, Y., Kure, S., Shima, K., Irahara, N., Toyoda, S., Chen, L., Kirkner, G. J., Wolpin, B. M., Chan, A. T., Giovannucci, E. L., & Fuchs, C. S. (2009). A cohort study of STMN1 expression in colorectal cancer: body mass index and prognosis. *Am.J.Gastroenterol.* **104**, 2047-2056.

Olson, E. N. & Schneider, M. D. (2003). Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev.* 17, 1937-1956.
Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., & Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948-958.

Palermo, J., Gulick, J., Colbert, M., Fewell, J., & Robbins, J. (1996). Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart. *Circ.Res.* **78**, 504-509.

Paradis, S. & Ruvkun, G. (1998). Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* **12**, 2488-2498.

Parrella, E. & Longo, V. D. (2010). Insulin/IGF-I and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain. *ScientificWorldJournal*. **10**, 161-177.

Pasumarthi, K. B. & Field, L. J. (2002). Cardiomyocyte cell cycle regulation. Circ.Res. 90, 1044-1054.

Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M. P., 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.

Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203.

Peifer, M., Pai, L. M., & Casey, M. (1994). Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev.Biol.* **166**, 543-556.

Pessin, J. E., Thurmond, D. C., Elmendorf, J. S., Coker, K. J., & Okada, S. (1999). Molecular basis of insulinstimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! *J.Biol.Chem.* **274**, 2593-2596.

Peterson, R. T. & Schreiber, S. L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr.Biol.* 9, R521-R524.

Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., & Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* **73**, 2613-2621.

Ramm, G., Larance, M., Guilhaus, M., & James, D. E. (2006). A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. *J.Biol.Chem.* **281**, 29174-29180.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

Rane, M. J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D. W., Wu, R., Cummins, T., Chen, Q., McLeish, K. R., & Klein, J. B. (2003). Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J.Biol.Chem.* **278**, 27828-27835.

Roach, W. G., Chavez, J. A., Miinea, C. P., & Lienhard, G. E. (2007). Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem.J.* **403**, 353-358.

Romano, D., Matallanas, D., Weitsman, G., Preisinger, C., Ng, T., & Kolch, W. (2010). Proapoptotic kinase MST2 coordinates signaling crosstalk between RASSF1A, Raf-1, and Akt. *Cancer Res.* **70**, 1195-1203.

Saito, T., Jones, C. C., Huang, S., Czech, M. P., & Pilch, P. F. (2007). The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J.Biol.Chem.* **282**, 32280-32287.

Sambandam, N., Lopaschuk, G. D., Brownsey, R. W., & Allard, M. F. (2002). Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail.Rev.* **7**, 161-173.

Sambrook, J. u. D. R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Auflage,Bde. 1-3. New York, USA[Coldspring Harbor Laboratory Press]. 2001. Ref Type: Generic

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W., & Lienhard, G. E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J.Biol.Chem.* **278**, 14599-14602.

Santalucia, T., Moreno, H., Palacin, M., Yacoub, M. H., Brand, N. J., & Zorzano, A. (2001). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J.Mol.Biol.* **314**, 195-204.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101.

Sato, S., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 10832-10837.

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J.Mol.Med.* **84**, 901-910.

Sharpe, L. J., Luu, W., & Brown, A. J. (2010). Akt phosphorylates Sec24: New clues into the regulation of ER-to-Golgi trafficking. *Traffic*.

Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C., & Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537-2548.

Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley, L. C., & Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* **22**, 2799-2809.

Shiojima, I., Yefremashvili, M., Luo, Z., Kureishi, Y., Takahashi, A., Tao, J., Rosenzweig, A., Kahn, C. R., Abel, E. D., & Walsh, K. (2002). Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J.Biol.Chem.* **277**, 37670-37677.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**, 76-85.

Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M., & Molkentin, J. D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ.Res.* **89**, 20-25.

Stephens, L. R., Jackson, T. R., & Hawkins, P. T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim.Biophys.Acta* **1179**, 27-75.

Sternberg, N. & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J.Mol.Biol.* **150**, 467-486.

Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. Annu. Rev. Neurosci. 27, 509-547.

Summers, S. A., Whiteman, E. L., Cho, H., Lipfert, L., & Birnbaum, M. J. (1999). Differentiation-dependent suppression of platelet-derived growth factor signaling in cultured adipocytes. *J.Biol.Chem.* **274**, 23858-23867.

Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al Hasani, H., Sonenberg, N., & Klip, A. (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J.Biol.Chem.* **274**, 33085-33091.

Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. (2002). High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr.Biol.* **12**, 1256-1262.

Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.

Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L., & Melton, D. W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**, 313-321.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., & Wigler, M. (1988). SCH9, a gene of Saccharomyces cerevisiae that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev.* **2**, 517-527.

Tschopp, O., Yang, Z. Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., & Hemmings, B. A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-2954.

Tulchin, N., Ornstein, L., & Davis, B. J. (1976). A microgel system for disc electrophoresis. *Anal.Biochem.* 72, 485-490.

Tyers, M., Rachubinski, R. A., Stewart, M. I., Varrichio, A. M., Shorr, R. G., Haslam, R. J., & Harley, C. B. (1988). Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* **333**, 470-473.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J. R., De Virgilio, C., Hall, M. N., & Loewith, R. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell* **26**, 663-674.

van Bilsen, M., van Nieuwenhoven, F. A., & van der Vusse, G. J. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc.Res.* **81**, 420-428.

van der Vusse, G. J., van Bilsen, M., & Glatz, J. F. (2000). Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc.Res.* **45**, 279-293.

Vanhaesebroeck, B., Leevers, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J., & Waterfield, M. D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu.Rev.Biochem.* **70**, 535-602.

Wang, D., Pascual, J. M., Yang, H., Engelstad, K., Mao, X., Cheng, J., Yoo, J., Noebels, J. L., & De Vivo, D. C. (2006). A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum.Mol.Genet.* **15**, 1169-1179.

Wilhelm, J. & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. Chembiochem. 4, 1120-1128.

Wu, W., Lee, W. L., Wu, Y. Y., Chen, D., Liu, T. J., Jang, A., Sharma, P. M., & Wang, P. H. (2000). Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 40113-40119.

Wymann, M. P., Zvelebil, M., & Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol.Sci.* **24**, 366-376.

Yang, J., Cron, P., Good, V. M., Thompson, V., Hemmings, B. A., & Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat.Struct.Biol.* **9**, 940-944.

Yang, Z. Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., & Hemmings, B. A. (2003). Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J.Biol.Chem.* **278**, 32124-32131.

Yoshie, M., Miyajima, E., Kyo, S., & Tamura, K. (2009). Stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with hypoxia-inducible factor-1alpha levels in human endometrial and endothelial cells. *Endocrinology* **150**, 2413-2418.

Yuan, Z. Q., Kim, D., Kaneko, S., Sussman, M., Bokoch, G. M., Kruh, G. D., Nicosia, S. V., Testa, J. R., & Cheng, J. Q. (2005). ArgBP2gamma interacts with Akt and p21-activated kinase-1 and promotes cell survival. *J.Biol.Chem.* **280**, 21483-21490.

Zamore, P. D. (2006). RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. Cell 127, 1083-1086.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.

8 Abkürzungsverzeichnis

А	Ampere
aE	arbiträre Einheiten
AGC	Proteinfamilie, verwandt mit c <u>A</u> MP-abhängiger Protein Kinase/cGMP- abhängiger Kinase und PKC
Amn	Amnicillin
ΛΜΡΚ	Adenosinmononhosnhat-aktivierte Proteinkinase
	Ammoniumperovodisulfat
	Aminosäura
AS AS160	Animosaurc $Abt substrate of 160 kDa. The 1dA$
ASI00	Aki substrute of 100 kDa, 100104 Delvedenvlienungesingnel des heurige grout heuriges
bun pA	Polyadenynerungssingnal des <i>bovine growin normone</i>
DIa ha	p-Lactamase Promotors
DD A	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Serumalbumin vom Rind
Bql	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
env	envelope (Hüllprotein)
c	centi-
CT	threshold cycle, Schwellenwert Zyklus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
$^{13}\text{CD}_2\text{O}$	¹³ C markiertes deuteriertes Formaldehyd
CD_2O	deuteriertes Formaldehyd
CH ₂ O	Formaldehyd
CMV	Cytomegalovirus
Cre	causes recombination
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppeltdeionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	embryonaleStammzellen
FBS	fetal bovine serum, fötales Rinderserum
FRT	Flp recognition target
g	Gramm
GAP	GTPase-activating protein
Gβl	G Protein β subunit-like, zweite Bezeichnung für mLST8
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogensynthase Kinase
h	hour. Stunde
HEK	Human embryonic kidney
³ H DOG	radioaktive 2-Deoxy-D-[2.6- ³ H]Glukose
HL-1	heart like Zelllinie
HM	hydrophobes Motiv
Hprt 1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
·r · · ·	

IGPAL CA-630	Octyl-phenoxy-poly-ethoxy-ethanol
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IGF-1	insulin-like growth factor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
k	kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KD	Knock Down
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	Knock Out
1	Liter
LB	lysogenv broth
LC	liquid chromatography Flüssigkeitschromatographie
loxP	locus of crossing over
	micro-
μ m	milli- Meter
M	molar
mor	mutagenisierter Östrogenrezentor
MHC	muagenisierter Ostrogeniezeptor
mDNA	myosin neavy chain, schwere Kelle des Myosin massanger BNA Doton DNA
menul	messenger KIVA, DOICH-KINA
IIISIINI IIITOD	mammalian stress-activated protein kindse interacting protein 1
TOPC	mammalian target of Kapamycin
mIUKC	m I OR Komplex
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n N DH GN	nano-
NaBH ₃ CN	Cyanoborhydrid
NaBD ₃ CN	deuteriertes Cyanoborhydrid
NaCH ₃ COOH	Natriumacetat
NaCl	Natrimchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH,	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
OD	optische Dichte
OHTX	4-OH-Tamoxifen
p70S6K	70 kDa ribosomale Proteinkinase S6 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (PBST)	Phosphate bufferd Saline (mit 0,1 % Tween)
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI3K	Phosphatidyl-Inositiol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3.4.5)trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
РКВ	Proteinkinase B
РКС	Proteinkinase C
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
aRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
Rantor	regulatory associated protein of mTOR
P ****	· · · · · · · · · · · · · · · · ·

REV	regulator of virion expression
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIN	RNA Integritätsnummer
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RRE:	REV-responsive Element
rRNA	ribosomale RNA
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate, Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tbc1d1	Tbc1 domain family member 1
TBS (TBST)	Tris bufferd Saline (mit 0,1 % Tween)
TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TK	Thymidin-Kinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
shC	Zellline, die shRNA exprimiert ohne Ziel in murinen oder humanen
	Zellen
shRNA	short hairpin RNA
Ser	Serin
siRNA	short interfering RNA
SSC	saline-sodium citrate
SV40	Simian virus 40
WB	Western Blot
WBA	Western Blot Analyse
Zeo	Zeozin

9 Anhang



Abbildung 44: pGJ3-C-CAGGS-Neo. Schematische Darstellung (A) und diagnostische Restriktionsanalyse mit StuI (B). Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben. Der Vektor MUP MK3, aus dem die Neo-Kassette entnommen wurde, besitzt zusätzlich die Fragmente 599 bp und 71 bp, die in dieser Darstellung nicht sichtbar sind. Als Zielvektor wurde der pGJ3-C-CAGGS verwendet.

Tabelle 14: Auflistung aller Phosphopeptide die bei der quantitativen Phosphoproteomics identifiziert
werden konnten. Die Phosphopeptide sind jeweils ihren Proteinen zugeordnet. In der Peptidsequenz sind
die phosphorylierten Aminosäuren mit Unterstrich markiert. Differenz = ΔAkt2/shC – ΔAkt1/shC; log2
ΔAkt2: Logarithmus zur Basis 2 von ΔAk2/shC

		Akt2	Akt1		log2	log2
Protein	Pepitidsequenz	shC	shC	Differenz	ΔAkt2	ΔAkt1
Elongation factor 1-beta	K.DDDDIDLFG <u>S</u> DDEEESEEAK.K	1,57	1,36	0,21	0,6508	0,4436
Microtubule-associated protein 1B	K.SPSLSPSPP <u>S</u> PIEK.T	0,88	0,82	0,06	-0,1844	-0,2863
	K.EEQ <u>S</u> PVKAEVAEK.Q	1,33	1,09	0,24	0,4114	0,1243
	R <u>.</u> TIK <u>S</u> PCDSGYSYETIEK.T	0,95	0,89	0,06	-0,0740	-0,1681
	R.SVSPGVTQAVVEEHCA <u>S</u> PEEK.T	1,09	0,98	0,11	0,1243	-0,0291
	K <u>.</u> GEAEQ <u>S</u> EEEGEEEDKAEDAR.E	1,38	1,17	0,21	0,4647	0,2265
	R <u>.</u> SV <u>S</u> PGVTQAVVEEHCASPEEK.T	1,23	0,82	0,41	0,2987	-0,2863
	K.FEDEGAGFEE <u>S</u> SETGDYEEK.A	1,52	1,29	0,23	0,6041	0,3674
	K <u>.</u> QGFPDRE <u>S</u> PVSDLTSTGLYQDK.Q	1,32	1,41	-0,09	0,4005	0,4957
	K.VLSPLR <u>S</u> PPLLGSESPYEDFLSADSK.V	0,91	0,93	-0,02	-0,1361	-0,1047
Elongation factor 1-delta	K.DIDLFG <u>S</u> DEEEEDKEAAR.L	1,65	1,32	0,33	0,7225	0,4005
	K.GATPAEDDEDKDIDLFG <u>S</u> DEEEEDK.E	1,55	1,33	0,22	0,6323	0,4114
	K.GATPAEDDEDKDIDLFGSDEEEEDKEAAR.L	1,63	1,2	0,43	0,7049	0,2630
Heat shock protein HSP 90-alpha	K.ESDDKPEIEDVG <u>S</u> DEEEEEK.K	2,05	1,54	0,51	1,0356	0,6229
Eukaryotic translation initiation factor 5B	K.SVPTVD <u>S</u> GNEDDDSSFK.I	0,96	0,93	0,03	-0,0589	-0,1047
	K.TARPNSEAPL <u>S</u> GSEDADDSNK.L	1,15	1,13	0,02	0,2016	0,1763
STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase	K.TEDGDWEW <u>S</u> DDEMDEK.S	1,31	0,99	0,32	0,3896	-0,0145
Prostaglandin E synthase	K.DWEDD <u>S</u> DEDMSNFDR.F	1,13	1,12	0,01	0,1763	0,1635

Heat shock protein HSP 90-beta	K.IEDVG <u>S</u> DEEDDSGK.D	1,41	1,14	0,27	0,4957	0,1890
	R.EKEI <u>S</u> DDEAEEEK.G	1,57	1,23	0,34	0,6508	0,2987
Septin-2	K.IYHLPDAE <u>S</u> DEDEDFK.E	1,1	1,24	-0,14	0,1375	0,3103
CLIP-associating protein 1	R.SR <u>S</u> DIDVNAAASAK.S	1,12	0,76	0,36	0,1635	-0,3959
		1,15	1,07	0,08	0,2016	0,0976
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	K.QPLLLSEDEEDTKR.V	1,48	1,28	0,2	0,5656	0,3561
Translocation protein SEC62	K.EELEOOTDGDCDEEDDDKDGEVPK.S	1.13	1.06	0.07	0.1763	0.0841
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	R.IOOFDDGGSDEEDIWEEK.H	1.24	1.19	0.05	0.3103	0.2510
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	K STSPAPADVAPAOEDLR T	1.09	1.02	0.07	0.1243	0.0286
Uncharacterized protein C10orf78 homolog	R ENPPSPPTSPA APOPR E	0.86	0.96	-0.1	-0 2176	-0.0589
Tubulin aluke 14 abain	K TICCODDSENTEESETCACK H	1 12	1 20	0.16	0 1763	0.3674
Tubulin alpha-1A chain	K.HGGGDD <u>S</u> FNIFFSETGAGK.II	1,15	1,29	-0,10	0,1705	0,3074
Tubulin alpha-16 chain						
Tubulin alpha-3 chain						
7 ing finger Dan hinding domain containing protoin 2	V EVENVESECEFENENENI SV V	1.42	1 26	0.06	0 5050	0 4436
Smoothalin Eleanutain 2	R.EVEDRESEQUELEDEDEDEDEDESK. 1	1,42	1,50	0,00	0,3039	0,4450
Smoothelm-like protein 2	R.SL <u>2</u> 05010AV1AGK.K	0,0	0,00	-0,00	-0,5219	-0,2170
Smootneun-uke protein 3	R.SQ <u>S</u> FGVASASSIK.Q	0,92	0,75	0,17	-0,1203	-0,4150
	R.SP <u>S</u> VEHDEASDLEVR.R	0,92	0,89	0,03	-0,1203	-0,1681
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	K <u>.</u> KVEEEQEADEEDV <u>S</u> EEEAEDR.E	1,89	1,38	0,51	0,9184	0,4647
Glucosaminefructose-6-phosphate aminotransferase	R.VD <u>S</u> TTCLFPVEEK.A	1,12	0,74	0,38	0,1635	-0,4344
[isomerizing] 1						
Membrane-associated progesterone receptor component 1	K.EGEEPTVY <u>S</u> DDEEPKDETAR.K	0,99	1,28	-0,29	-0,0145	0,3561
Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases	K.VVDYSQFQE <u>S</u> DDADEDYGR.D	1,23	1,14	0,09	0,2987	0,1890
substrate						
G-protein-signaling modulator 1	R.AP <u>S</u> SDEECFFDLLSK.F	1,03	1,05	-0,02	0,0426	0,0704
Stathmin	K.ESVPDFPL <u>S</u> PPK.K	1,7	1,18	0,52	0,7655	0,2388
	R.ASGQAFELIL <u>S</u> PR.S	1,13	1,52	-0,39	0,1763	0,6041
Hematological and neurological expressed 1 protein	R.SN <u>S</u> SEASSGDFLDLK.G	1,08	0,85	0,23	0,1110	-0,2345
DnaJ homolog subfamily C member 5	R <u>.</u> SL <u>S</u> TSGESLYHVLGLDK.N	1,21	1,16	0,05	0,2750	0,2141
DNA excision repair protein ERCC-6-like	R.IL <u>S</u> DDEDEDEEDAFK.G	1,19	1,35	-0,16	0,2510	0,4330
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	R.SDLIEDEELEDTGKG <u>S</u> EDEWEQVGPK.N	1,24	1,1	0,14	0,3103	0,1375
Large proline-rich protein BAT3	R.ENA <u>S</u> PAPGTTAEEAMSR.G	1,04	1,1	-0,06	0,0566	0,1375
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	R_SSSPVTELTAR.S	1,13	1,01	0,12	0,1763	0,0144
	K.NSGPVSEVNTGFSPEVK.E	1,17	1.09	0.08	0.2265	0.1243
	 K.SEOPLSOVLPSLSPEHK.E	1.13	1.02	0.11	0.1763	0.0286
Serine/arginine renetitive matrix protein 1	R KETESEAEDDNI DDI FR H	1 25	1.06	0.19	0 3219	0.0841
WD repeat-containing protein 44	P SNSCREI TDEEH ASVMIK N	0.79	1,00	-0.21	-0.3401	0,0011
wD repeat-containing protein 44	K.SA <u>B</u> GRELI DEEILAS YMIK,N	0,73	1 22	-0,21	0.2245	0,0000
Suria // Lanceira and dia kina 2	R_EI VSNDATQ <u>S</u> DDEERLQSQQTDTDGGR.L	0,65	1,22	-0,37	-0,2345	0,2009
Serine/threonine-protein kinase 3	R.ELEEEEEN <u>S</u> DEDELDSHIMVK.I	1,01	1,38	0,23	0,08/1	0,4047
Nucleosome assembly protein 1-like 4	R.EFTIGDVEPTDAESAWH <u>S</u> ENEEEDK.L	1,37	1,36	0,01	0,4542	0,4436
Calnexin	K.SDAEEDGVTG <u>S</u> QDEEDSKPK.A	1,77	1,39	0,38	0,8237	0,4751
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory	R.EDEI <u>S</u> PPPPNPVVK.G	0,81	0,98	-0,17	-0,3040	-0,0291
subunit						
	R <u>.</u> TDSREDEI <u>S</u> PPPPNPVVK.G	0,74	0,82	-0,08	-0,4344	-0,2863
UNA replication licensing factor MCM3	K.ASEDE <u>S</u> DLEDEEEKSQEDTEQK.R	1,85	1,23	0,62	0,8875	0,2987
Cysteine and glycine-rich protein 1	K.GFGFGQGAGALVH <u>S</u> E	0,89	1,01	-0,12	-0,1681	0,0144
Protein Niban	R.RV <u>S</u> AILPGAPDNELPSNEVFQEPEEK.K	1,03	1,12	-0,09	0,0426	0,1635
SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein	K.SGENEAQKEDSEDTGELSE <u>S</u> QEK.K	1,12	1,05	0,07	0,1635	0,0704
Transmembrane protein 163	R.ISE <u>S</u> GQFSDGLEDR.G	0,94	1	-0,06	-0,0893	0,0000
Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	R.RN <u>S</u> LTGEEGELVK.V	0,97	0,88	0,09	-0,0439	-0,1844
HIV Tat-specific factor 1 homolog	R <u>.</u> VFDDD <u>S</u> DDIEEEEEADEK.E	1,24	1,45	-0,21	0,3103	0,5361
Heat shock protein beta-1	R.SP <u>S</u> WEPFR.D	0,92	0,83	0,09	-0,1203	-0,2688
	R <u>.</u> QL <u>S</u> SGVSEIR.Q	1,2	0,91	0,29	0,2630	-0,1361
Leiomodin-2	K <u>.</u> YE <u>S</u> IDEDELLASLSPEELK.E	1,15	0,91	0,24	0,2016	-0,1361
Ras-related GTP-binding protein C	K.MSPNETLFLE <u>S</u> TNK.I	0,9	0,88	0,02	-0,1520	-0,1844
Glycogen synthase kinase-3 beta	R.GEPNVS <u>Y</u> ICSR.Y	0,9	0,9	0	-0,1520	-0,1520
Glycogen synthase kinase-3 alpha						
Nucleolin	K.NLSFNITEDELK.E	1.18	1.18	0	0,2388	0,2388
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	K.EADDDEEADDDVSEMPSPK.K	1.23	0.92	0.31	0.2987	-0.1203
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	K.DAPTTLAESPSSPK.K	1.5	1.1	0.4	0.5850	0.1375
muscle-specific form		1,0	-,1	0,4	.,0000	.,
	K.VQGEAVSNIQENTOTPTVQEESEEEEVDETGVEVK.D	1.9	1.68	0.22	0,9260	0,7485
		<i>,</i> -	,	., =	,	

Oxysterol-binding protein 1	K.GDM <u>S</u> DEDDENEFFDAPEIITMPENLGHK.R	1,28	1,54	-0,26	0,3561	0,6229
Osteoclast-stimulating factor 1	R.TLSNAEDYLDDEDSD	1,25	1,02	0,23	0,3219	0,0286
UPF0690 protein C1orf52 homolog	R.LLPEGEETVESDDDKDER.A	1,17	0,98	0,19	0,2265	-0,0291
ATP-binding cassette sub-family F member 1	K.QLSVPASDEEDEVPAPIPR.G	1,26	1,27	-0,01	0,3334	0,3448
Myosin-10	R.QLHIEGASLELSDDDTESK.T	1,31	1,39	-0,08	0,3896	0,4751
Protein disulfide-isomerase A6	K.DGELPVEDDIDL <u>S</u> DVELDDLEK.D	1,91	1,39	0,52	0,9336	0,4751
A-kinase anchor protein 2	R.TL <u>S</u> MIEEEIR.A	0,86	1,07	-0,21	-0,2176	0,0976
Cellular tumor antigen p53	R.ALPTCTSA <u>S</u> PPQK.K	1,22	1,02	0,2	0,2869	0,0286
DNA replication licensing factor MCM2	R_ISDPLTSSPGR.S	1,3	0,91	0,39	0,3785	-0,1361
	R.GLLYDSSEEDEERPAR.K	1,52	1,21	0,31	0,6041	0,2750
Importin subunit alpha-3	R <u>.</u> NVPQEESLED <u>S</u> DVDADFK.A	1,25	0,98	0,27	0,3219	-0,0291
Cardiac phospholamban	R <u>.</u> RA <u>S</u> TIEMPQQAR.Q	1,03	0,84	0,19	0,0426	-0,2515
E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1	K.VFFD <u>T</u> DDDDDVPHSTSR.W	0,68	1,06	-0,38	-0,5564	0,0841
Membrane-associated progesterone receptor component 2	R.LLKPGEEPSEY <u>T</u> DEEDTK.D	1,36	1,28	0,08	0,4436	0,3561
Ribonuclease H2 subunit	K <u>.</u> EAEDVIWED <u>S</u> EAEEDPERPGK.I	1,05	0,98	0,07	0,0704	-0,0291
Microtubule-associated protein 4	K.DM <u>S</u> PSAETEAPLAK.N	1,12	1,13	-0,01	0,1635	0,1763
Protein kinase C alpha type	R. <u>T</u> FCGTPDYIAPEIIAYQPYGK.S	0,96	1,02	-0,06	-0,0589	0,0286
Protein kinase C beta type						
Protein kinase C gamma type						
cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory	R.RV <u>S</u> VCAETFNPDEEEEDNDPR.V	0,37	0,9	-0,53	-1,4344	-0,1520
subunit						
Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1	R.SS <u>S</u> TSDILEPFTVER.A	0,78	0,98	-0,2	-0,3585	-0,0291
Serum deprivation-response protein	R <u>.</u> DEEALED <u>S</u> AEEK.M	1,29	1,28	0,01	0,3674	0,3561
Rho guanine nucleotide exchange factor 7	R.M <u>S</u> GFIYQGK.L	0,88	0,96	-0,08	-0,1844	-0,0589
Choline-phosphate cytidylyltransferase A	R.MLQAI <u>S</u> PK.Q	0,86	0,86	0	-0,2176	-0,2176
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	R <u>.</u> SL <u>S</u> SPTVTLSAPLEGAK.D	1,07	0,87	0,2	0,0976	-0,2009
Catechol O-methyltransferase	K <u>.</u> AVYQGPGS <u>S</u> PVKS	1,23	0,86	0,37	0,2987	-0,2176
Cell division protein kinase 1	K <u>.</u> IGEGT <u>Y</u> GVVYK.G	0,89	0,94	-0,05	-0,1681	-0,0893
Cell division protein kinase 2						
Cell division protein kinase 3						
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	R.RG <u>S</u> GDTSSLIDPDTSLSELR.E	0,75	0,98	-0,23	-0,4150	-0,0291
FACT complex subunit SSRP1	K.EGINPGYDDYADSDEDQHDAYLER.M	1,18	1,12	0,06	0,2388	0,1635
Protein SLC7A6OS	K.EFDYDSPHGLD <u>S</u> D	1,16	1,04	0,12	0,2141	0,0566
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	R <u>.</u> EFDELSP <u>S</u> AQR.D	1,6	0,93	0,67	0,6781	-0,1047
AP-3 complex subunit beta-1	K.NFYE <u>S</u> EEEEEEKEK.S	1,42	1,21	0,21	0,5059	0,2750
Chromosome-associated kinesin KIF4	R.TF <u>S</u> YDEIHGQDSGAEDSIAK.Q	0,84	1,11	-0,27	-0,2515	0,1506
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	R.GSGTA <u>S</u> DDEFENLR.I	0,98	0,86	0,12	-0,0291	-0,2176
N-acylglucosamine 2-epimerase	R.LEPAPLDSSPAVSTHEGSK	0,7	0,91	-0,21	-0,5146	-0,1361
Sorbin and SH3 domain-containing protein 2	R <u>.</u> T <u>S</u> PGRADLPGSSSTFTK.S	1,11	0,87	0,24	0,1506	-0,2009
SEC23-interacting protein	R.KL <u>S</u> VGAYVSSVR.V	0,01	1,13	-1,12	-6,6439	0,1763
Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein	R <u>.</u> ED <u>S</u> GTFSLGK.M	1,05	0,86	0,19	0,0704	-0,2176
kinase activator A						
Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog	R <u>.</u> NPYLL <u>S</u> EEEDGDGDASIENSDAEAPK.G	1,84	0,99	0,85	0,8797	-0,0145
ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	K.AI <u>S</u> SDMFFGR.E	0,59	0,75	-0,16	-0,7612	-0,4150
Filamin-C	R.LG <u>S</u> FGSITR.Q	1,27	0,76	0,51	0,3448	-0,3959
Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	R.GW <u>S</u> PPPEVR.R	0,88	1,2	-0,32	-0,1844	0,2630

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke möchte ich für die Ermöglichung an diesem interessanten Thema zu arbeiten danken. Deine Bürotür stand immer für Fragen offen und ich habe stets volle Unterstützung, viele Anregungen und ein paar nette, aufbauende Worte von dir bekommen. Danke!

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst, der nach meiner Diplomarbeit auch die Begutachtung meiner Doktorarbeit übernommen hat.

Claudia Kessels möchte ich danken, dass sie mich zum Durchhalten animiert hat und zu einer Freundin geworden ist, die ich nicht mehr missen möchte.

Mein großer Dank geht auch an die beste Chauffeurin und Freundin Susanne Küsters für die vielen, langen, lustigen, manchmal traurigen, aufbauenden und interessanten Gespräche während unserer fast täglichen Fahrgemeinschaft und natürlich für deine große praktische Unterstützung.

Vielen Dank an Sabine Hamer für die schönen Gespräche unter Freundinnen und die tolle Zeit bei unserer Kongressreise in die USA.

Danke an die Mitglieder des Instituts der Molekularen Kardiologie für eure große Unterstützung und Freundschaft. Dr. Sarah Möllendorf, Dr. Michael Reinartz und Dr. Stephan Weser möchte ich für die theoretische und praktische Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt Katharina Bottermann, Nina Blasberg, Julia Albrecht, Dr. Marian Naguib, Dr. Stephanie Gödecke, Dr. Torben Söker, Martin Gerlach und Andreas Hiesters.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie für die Hilfe und die schöne Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank an Dr. Christoph Jacoby für dein offenes Ohr meiner (vielen) Fragen rund um PC und Wahrscheinlichkeitsrechnung. Besonderer Dank gilt Claudia Viethen, die mich die gesamte Zeit der Doktorarbeit als Leidensgenossin begleitet hat: geteiltes Leid ist halbes Leid!

Insgesamt habe ich während meiner Promotionszeit tolle Menschen kennen gelernt, die mir in vielen Fällen zu guten Freunden geworden sind und mir hoffentlich noch sehr lange erhalten bleiben!

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Düsseldorf, den

Unterschrift