



Identifizierung Akt-spezifischer Funktionen im Herzen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nina Stefanie Blasberg

Solingen

Düsseldorf, Juni 2014

Anhang 3 zur Promotionsordnung

aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Axel Gödecke

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2014

Meiner Familie

„Alles ist möglich, vorausgesetzt, dass es genügend unvernünftig ist“

Nils Bohr

Inhaltsverzeichnis

Inaugural-Dissertation	1
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	2
Referent: Prof. Dr. Axel Gödecke	2
1 Einleitung	1
1.1 Die Proteinkinase Akt	1
1.1.1 Der PI3-Kinase Signalweg vermittelt die Aktivierung von Akt	2
1.1.2 Isoformspezifische Funktionen von Akt	4
1.2 Die Rolle von Akt im Herzen	5
1.2.1 Zellüberleben	5
1.2.2 Akt und kardialer Metabolismus	5
1.2.3 Akt als Modulator der Kontraktilität	6
1.2.4 Akt und kardiale Hypertrophie	7
1.2.5 Akt und koronare Angiogenese	11
1.3 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Laborgeräte	13
2.2 verwendete Antikörper	14
2.2.1 Antikörper für die Western Blot Analyse	14
2.2.2 Antikörper für Histologie	14
2.3 Oligonukleotide	14
2.4 verwendete Plasmide	15
2.4.1 Vektoren für die stabile Expression von Akt1 N-TAG in HEK293T Zellen	15
2.4.2 Vektoren für die kardiomyozytenspezifische Expression von Akt1 und Akt2 N-TAG im Herzen	17
2.5 Methoden zur Bearbeitung von Nukleinsäuren	17
2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.5.2 Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	18

2.5.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	19
2.5.4	Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	19
2.5.5	DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion	19
2.5.6	DNA-Ligation	19
2.5.7	Sonstige Modifikationen von DNA-Fragmenten	19
2.5.8	Transformation kompetenter E. coli Bakterien	20
2.5.9	Kultivierung der transformierten E. coli Bakterien.....	20
2.5.10	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli.....	20
2.5.11	Sequenzierung	20
2.6	mRNA-Analyse	21
2.6.1	Isolierung und reverse Transkription	21
2.6.2	Real Time-PCR (RT-PCR).....	21
2.7	Zellkultur und Zelllinien.....	22
2.7.1	HEK293T Zellen	23
2.7.2	Transgene Akt1 N-TAG HEK293T Zellen.....	23
2.8	Lentivirale Infektion	24
2.9	Proteinanalyse.....	24
2.9.1	Proteinisolierung	24
2.9.2	BCA-Assay.....	25
2.9.3	Coomassie-Färbung.....	25
2.9.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	25
2.9.5	Western Blot (WB).....	26
2.9.6	Immundetektion von Proteinen	27
2.10	Methoden zur Aufreinigung und Identifizierung von Akt-Interaktionspartnern ...	27
2.10.1	N-terminaler TAG zur Tandemaffinitätsaufreinigung	27
2.10.2	Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP).....	28
2.10.3	Silberfärbung von aufgetrennten Proteinen.....	29
2.10.4	Trypsin-Verdau im Gel	30
2.10.5	Trypsin-Verdau in Lösung	31
2.10.6	Entsalzen	31
2.11	Quantitative Proteomics.....	31

2.11.1	SILAC-Labeling.....	31
2.11.2	Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung der Peptide aus Mausherzen.....	32
2.11.3	Messung und Analyse der isolierten Proteine im Massenspektrometer.....	33
2.12	verwendete Mausstämme.....	34
2.12.1	Herstellung der transgenen Akt N-TAG Mäuse.....	35
2.12.2	Genotypisierung der transgenen Akt N-TAG Mäuse.....	35
2.12.3	Ubiquitäre und konditionale Akt Knock Out (KO) Mäuse.....	35
2.13	Phänotypisierung der transgenen Mäuse.....	37
2.13.1	Maus-Echokardiographie.....	37
2.13.2	Vevo Strain.....	41
2.13.3	Isoproterenol-induzierte kardiale Hypertrophie.....	42
2.13.4	Präparation von Herz und Lunge.....	43
2.14	Histologische Methoden.....	43
2.14.1	Anfertigung histologischer Gewebeschnitte der Herzen.....	43
2.14.2	DAPI Kernfärbung.....	44
2.14.3	Siriusrot-Färbung.....	44
2.14.4	Weizenkeimagglutinin und CD 31 - Färbung.....	44
2.14.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.14.6	Enzymatische Isolierung adulter Maus-Kardiomyozyten.....	45
2.15	PLA (Proximity Ligation Assay).....	47
2.16	verwendete Computerprogramme und Software.....	49
2.17	Statistik.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Etablierung der Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP) von Akt1 Interaktionspartnern in HEK293T Zellen.....	50
3.1.1	Akt1 N-TAG Konstrukt für HEK293T Zellen.....	51
3.1.2	Funktionale Analyse des Akt1 N-TAG Proteins.....	53
3.1.3	TAP/MS-Analyse der stabil transfizierten Akt1 N-TAG HEK293T Zellen.....	54
3.1.4	Relative Quantifizierung der Akt1 Bindungspartner mittels SILAC.....	56
3.2	Verifizierung von ausgewählten Akt1-Interaktionspartnern mittels <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).....	61

3.2.1	Verifizierung von Phgdh und ATP-Synthase als Bindungspartner von Akt1	61
3.3	Generierung transgener Akt N-TAG Mäuselinien	63
3.4	Genotypisierung und Zucht der transgenen Akt N-TAG Mäuse.....	66
3.5	Charakterisierung des Akt N-TAG Proteins.....	67
3.5.1	Nachweis der herzspezifischen Expression der Akt N-TAG Isoformen.....	67
3.5.2	Analyse der Proteinmenge der Akt Isoformen im Herzen	68
3.5.3	Analyse des mRNA-Gehaltes der Akt Transkripte mittels RT-PCR.....	71
3.5.4	Nachweis des proteolytischen Abbaus des Akt N-TAG Proteins	73
3.5.5	Phosphorylierung der Akt N-TAG Isoformen	76
3.6	Phänotypisierung der Herzfunktion und Morphologie der Akt N-TAG Mauslinien	77
3.6.1	Echokardiographische Untersuchungen.....	77
3.6.2	Vermessung der Herzgeometrie	80
3.6.3	Histologische Untersuchungen.....	81
3.6.4	Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche sowie der Kapillardichte	81
3.6.5	Beurteilung des interstitiellen Kollagengehaltes.....	83
3.7	Identifikation von Akt1 Interaktionspartnern im Mauserzen mittels der TAP/MS-	
	Methode.....	84
3.7.1	Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung (DML) zur relativen Quantifizierung von	
	Akt1 Bindungspartnern	86
3.8	Verifizierung der Akt1-Bindungspartner in Kardiomyozyten.....	88
3.8.1	PLA zur Bestätigung des Akt1-ATP5A1-Komplexes	88
3.8.2	Verifizierung des Akt1-Phgdh-Komplexes	89
3.9	Akt KO Mäuse.....	91
3.9.1	Charakterisierung der KO Mäuse mittels WB	91
3.10	Untersuchung von Herzfunktion und Morphologie der KO1- und KO2-Tiere nach	
	chronischer β -adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol.....	92
3.10.1	Analyse der Hypertrophie mittels Echokardiographie.....	92
3.10.2	Analyse der Herzfunktion mittels Echokardiographie.....	93
3.10.3	Analyse der kardialen Wandbewegung mittels Strain	95

3.10.4	Beurteilung der Morphologie des Myokards	99
3.10.5	Beurteilung der Lunge.....	99
3.11	Untersuchung von Herzfunktion und Morphologie der ICM KO1 nach chronischer β -adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol.....	100
3.11.1	Analyse der Hypertrophie mittels Echokardiographie	100
3.11.2	Analyse der Herzfunktion mittels Echokardiographie	101
3.11.3	Beurteilung der Morphologie des Myokards	103
4	Diskussion	104
4.1	Identifizierung von Proteinkomplexen mittels der TAP/MS-Methode	105
4.2	Expression und proteolytischer Abbau der Akt N-TAG Proteine im Mauserzen .	107
4.3	Identifizierung Akt1-assoziiierter Proteine.....	109
4.3.1	Akt1 und Hitzeschockproteine	109
4.3.2	Akt1 und ATP-Synthase.....	110
4.3.3	Akt1 und Phgdh.....	111
4.4	Auswirkungen der Akt1 N-TAG Überexpression auf Herzfunktion und Morphologie	113
4.5	Das Fehlen der Akt1-Isoform im Herzen führte unter chronischem β -adrenergem Stress zu einem maladaptiven kardialen Remodeling und einem Verlust der systolischen Pumpfunktion.....	115
5	Zusammenfassung	118
6	Summary	119
7	Literaturverzeichnis	120
8	Abkürzungsverzeichnis	133
9	Anhang	137
10	Danksagung	142
11	Eidesstattliche Erklärung	143

1 Einleitung

Die inter- und intrazelluläre Übertragung von Signalen in einem vielzelligen Organismus ist ein hochkomplexer Prozess mit dem Zellen auf Veränderungen ihrer Umgebung reagieren. Dabei wird die interzelluläre Kommunikation durch primäre Botenstoffe wie Hormone, Zytokine oder Transmitter vermittelt. Diese Signale werden von spezifischen Rezeptoren erkannt. Im Falle von membranständigen Rezeptoren werden nach Bindung eines solchen Liganden intrazelluläre Signalkaskaden initiiert, bei denen die Signale zunächst durch sekundäre Botenstoffe verstärkt und dadurch eine Vielzahl von Effektormolekülen aktiviert werden. Diese wiederum kommunizieren in komplexen Netzwerken miteinander. Eine Art der Kommunikation ist die posttranslationale Proteinmodifikation, bei der die Information über reversible kovalente Modifizierung an ein Zielprotein weitergegeben wird, um dessen Aktivität oder subzelluläre Lokalisation zu regulieren. Ein wichtiger Mechanismus der Proteinmodifikation ist die Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen.

1.1 Die Proteinkinase Akt

Die Serin/Threonin Kinase Akt oder Proteinkinase B (PKB) ist eine zentrale Schaltstelle in der Regulation von Überleben, Wachstum, Proliferation und Metabolismus einer Zelle. Die Kinase wurde im Rahmen der Tumorforschung entdeckt und im Jahr 1991 erstmals beschrieben (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991). Akt gehört zur Familie der AGC-Kinasen, die ähnlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen und eine hohe Sequenzhomologie ihrer katalytischen Domäne aufweisen (Hanks and Hunter, 1995). In Säugern wurden insgesamt drei Isoformen von Akt identifiziert: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ). Diese Isoformen zeichnen sich, obwohl sie von unterschiedlichen Genen codiert werden, durch eine hohe Sequenzhomologie von über 80 % aus und bestehen aus drei hoch konservierten Domänen (Liao and Hung, 2010). Diese setzen sich zusammen aus der N-terminalen Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, einer zentral gelegenen katalytischen Domäne, sowie der C-terminalen regulatorischen Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM) (Abb.1). Die PH-Domäne umfasst etwa 100 Aminosäuren (AS) und dient der Interaktion mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat in der Plasmamembran, welche Voraussetzung für die Aktivierung von Akt ist (Bellacosa et al., 1998). Die PH-Domäne ist über eine ca. 40 AS- lange Helix mit der 250 AS- umfassenden katalytischen Kinase-Domäne verbunden, in der sich ein hoch konserviertes Threonin (Thr) befindet (Akt1: Thr 308, Akt2:

Einleitung

Thr 309, Akt3: Thr 305), welches für die Aktivierung benötigt wird. Das HM der C-terminalen regulatorischen Domäne enthält eine weitere konservierte Phosphorylierungsstelle, ein Serin (Ser) an Position 473 (Akt1), bzw. Ser 474 (Akt2) oder Ser 472 (Akt3), welche für die vollständige Aktivierung der Kinase benötigt wird (Hanada et al., 2004; Peterson and Schreiber, 1999).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von Akt. Abgebildet sind die Domänen, sowie die für die Aktivierung benötigten Phosphorylierungsstellen der Akt Isoformen (Akt1: Thr 308, Akt2: Thr 309, Akt3: Thr 305 sowie Akt1 Ser 473, Akt2: Ser 474, Akt3: Ser 472).

1.1.1 Der PI3-Kinase Signalweg vermittelt die Aktivierung von Akt

Die Aktivierung von Akt ist ein mehrstufiger Prozess, der über den Phosphatidylinositol-3- (PI3)-Kinase Signalweg vermittelt wird. Dieser wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren wie Insulin, IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), EGF (*Epidermal growth factor*), oder PDGF (*Platelet derived growth factor*) an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK's) eingeleitet. Auch Agonisten wie Katecholamine, AngII (Angiotensin II) oder ET-1 (Endothelin 1), die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) binden, können den PI3-Kinase Signalweg aktivieren. In Folge wird eine PI3-Kinase (PI3K) an den Rezeptor rekrutiert und dort entweder direkt oder indirekt durch Adaptermoleküle, wie z.B. IRS (Insulin Rezeptor Substrat) aktiviert.

Insgesamt gibt es drei Klassen von PI3K, Klasse I, II und III, wobei Klasse I die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) generieren kann. Anhand des Aufbaus und Aktivierungsmechanismus wird Klasse I nochmals in Typ IA- und IB-PI3K unterteilt. In Säugern sind IA-PI3K durch die katalytischen Untereinheiten p110 α , β bzw. δ definiert. In Klasse IB bildet p110 γ die katalytische Untereinheit des Enzyms. IA-PI3K werden durch aktivierte RTK's oder deren assoziierte Adapterproteine aktiviert, während die Aktivierung der IB-PI3K über GPCR erfolgt (Katso et al., 2001).

Aktivierte PI3K katalysiert die Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃ in der Plasmamembran, an welches u.a. die PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) und Akt über ihre PH-Domänen binden können. Dadurch wird die unmittelbare Nähe zwischen Akt und PDK1 hergestellt, welche Akt daraufhin an Thr 308 phosphoryliert (Osaki et al., 2004). Für die

Einleitung

vollständige Aktivierung von Akt wird die Phosphorylierung des Ser 473 in der regulatorischen Domäne benötigt, welche in erster Linie durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) erfolgt (Manning and Cantley, 2007; Sarbassov et al., 2005). Die Aktivierung resultiert in einer Translokation von Akt in Zytoplasma und Nukleus, wo in der Folge ein breites Spektrum von Effektorproteinen phosphoryliert wird, die unter anderem Zellüberleben, Zellproliferation und Zellwachstum beeinflussen.

Die Inaktivierung von Akt kann indirekt durch die Lipidphosphatase PTEN (*protein phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) erfolgen, die im Wesentlichen den PI3K-Signalweg durch Dephosphorylierung des PIP3 zu PIP2 terminiert (Stambolic et al., 1998). Die direkte Inaktivierung erfolgt über Dephosphorylierung an Thr 308 durch PP2A (*protein phosphatase 2A*) und an Ser 473 durch PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) (Cazzoli et al., 2001; Gao et al., 2005) (Abb. 2).

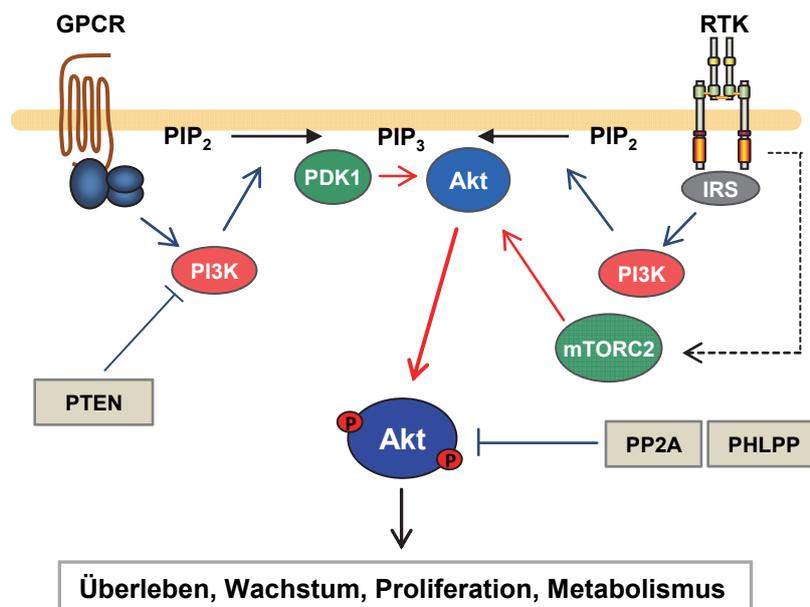


Abb. 2: Darstellung der Aktivierung von Akt über den PI3K-Signalweg. Nach Bindung entsprechender Liganden an Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wird die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) phosphoryliert und kann in Folge die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) katalysieren. Sowohl Akt als auch PDK1 werden über die PH-Domäne an PIP₃ rekrutiert, wodurch Akt nach einer Konformationsänderung von PDK1 an Thr 308 phosphoryliert wird. Die vollständige Aktivierung wird durch das *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) vermittelt, indem es Akt an Ser 473 phosphoryliert. Die Inaktivierung von Akt kann indirekt über PTEN erfolgen, welche PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert, sowie direkt über die Phosphatasen PP2A und PHLPP.

1.1.2 Isoformspezifische Funktionen von Akt

Trotz der hohen Sequenzhomologie und des gleichen Aktivierungsmechanismus der drei Akt-Isoformen zeigen insbesondere Experimente mit isoformspezifischen Akt-*knockout* Mäusen unterschiedliche Funktionen der Kinase. Der Phänotyp des Akt1 *knockouts* äußerte sich durch eine erhöhte Apoptoserate in verschiedenen Geweben wie u.a. Testis. Weiterhin war das Körperwachstum dieser Mäuse reduziert, was auf eine dominante Rolle von Akt1 hinsichtlich Zellproliferation, Wachstum und Überleben hindeutet (Cho et al., 2001b; Yang et al., 2003). Einen ganz anderen Phänotyp zeigten hingegen Akt2 *knockout* Mäuse, die eine Insulin-Resistenz ähnlich einem Diabetes Typ 2 aufwiesen (Cho et al., 2001a; Garofalo et al., 2003). Der Verlust von Akt3 deutet auf eine Rolle des Proteins bei der neuronalen Entwicklung hin, denn diese Tiere hatten eine deutlich kleinere Hirnmasse (Tschopp et al., 2005). Interessanterweise zeigte die Kombination der einzelnen *knockouts*, dass nur Tiere mit einem doppel-*knockout* von Akt2 und Akt3 lebensfähig sind, nicht aber Akt1/Akt2- bzw. Akt1/Akt3 doppel-*knockout* Tiere (Dummler et al., 2006; Peng et al., 2003; Yang et al., 2004). Der Phänotyp der Akt2/Akt3 *knockouts* äußerte sich in einer Insulinresistenz, sowie vermindertem Körpergewicht, kleineren Gehirnen und Testis. Durch diese Versuche zeigt sich, dass die Funktion von Akt1 hinsichtlich Wachstum und Entwicklung nicht von den beiden anderen Isoformen kompensiert werden kann.

Wodurch die isoformspezifischen Funktionen vermittelt werden, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Ein Ansatz zur Erklärung sind Expressionsunterschiede der Isoformen in den einzelnen Geweben. Akt1 findet sich vor allem in Herz, Lunge, Thymus, Gehirn, Pankreas, Testis, Milz und Fettgewebe (Yang et al., 2003). Akt2 ist vornehmlich in Pankreas, Leber, Skelettmuskulatur und Herz exprimiert, während Akt3 vor allem im Gehirn, Testis und Ovarien eine Rolle spielt (Cho et al., 2001a; Tschopp et al., 2005; Yang et al., 2005).

Eine weitere Erklärung für isoformspezifische Funktionen könnte die Lokalisation von Akt innerhalb der Zelle sein. Studien von Santi & Lee konnten zeigen, dass Akt1 in HEK293, bzw. HEK293T-Zellen vornehmlich in Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist, während Akt2 eher mit der Mitochondrienmembran assoziiert ist (Santi and Lee, 2010).

Darüber hinaus kann die Funktion von Akt auch über die Interaktion mit isoformspezifischen Substraten vermittelt werden. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die spezifisch an verschiedene Domänen der Kinase binden und so u.a. Aktivität und Lokalisation modulieren (Du and Tsichlis, 2005). Interessanterweise konnten auch schon einige Akt-

isoformenspezifische Interaktionspartner identifiziert werden. Beispielsweise scheint Akt2 bevorzugt mit Prohibitin2/REA zu interagieren (Heron-Milhavet et al., 2008).

1.2 Die Rolle von Akt im Herzen

Der PI3K/Akt Signalweg spielt eine entscheidende Schlüsselrolle bei Vermittlung und Aufrechterhaltung wichtiger myokardialer Prozesse, die relevant für Überleben, Metabolismus, Kontraktilität, Wachstum und Angiogenese der Zellen sind (Sussman et al., 2011). Da sich Kardiomyozyten im adulten Herzen nicht mehr erneuern können, ist es von essentieller Bedeutung, das Überleben und die Funktion dieser Zellen unter basalen und vor allem pathologischen Bedingungen zu sichern.

1.2.1 Zellüberleben

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Akt in Folge von Ischämie-Reperfusionsschäden oder durch Induktion von oxidativem Stress aktiviert wird und protektiv wirkt (Aikawa et al., 2000; Bae and Zhang, 2005). Seine anti-apoptotische Funktion übt Akt dabei u.a. durch Phosphorylierung pro-apoptotischer Proteine wie Bad aus (Jonassen et al., 2001). Darüber hinaus kann Akt die Expression pro-apoptotischer BH3-only Proteine negativ regulieren, indem es Transkriptionsfaktoren wie Foxo (*Forkhead box protein O*) phosphoryliert, welcher daraufhin aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird und nicht mehr an seine Zielgene binden kann (Caporali et al., 2008). Ein weiteres wichtiges Substrat von Akt im Kontext des Zellüberlebens ist Caspase-9. Die Initiator-Caspase kann nachgeschaltete Effektorcaspasen aktivieren und so die Apoptose einleiten. Die Phosphorylierung der Caspase an Ser 196 durch Akt verhindert hier die Umwandlung der inaktiven Pro-Caspase in die aktivierte Initiator-Caspase (Cardone et al., 1998).

1.2.2 Akt und kardialer Metabolismus

Das gesunde Herz deckt seinen Energiebedarf vornehmlich zu 60-70 % aus der β -Oxidation langkettiger Fettsäuren, zu ca. 30 % aus der Oxidation von Glukose und einem geringen Anteil aus Laktat (Lopaschuk et al., 2010). Weiterhin speichert das Herz Glykogen und Triglyzeride, die bei Bedarf ebenfalls metabolisiert werden können (Goodwin et al., 1995; Saddik and Lopaschuk, 1991).

Wie bereits erwähnt, entwickeln nur Akt2-*knockout* Mäuse einen diabetischen Phänotyp. In diesem Kontext wurde bereits gezeigt, dass besonders Akt2 eine Rolle bei der

Einleitung

insulinabhängigen Glukose-Aufnahme in die Zelle über den GLUT4-Transporter (Glukosetransporter Typ 4) spielt (Calera et al., 1998). Die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran wird hierbei u.a. durch Inaktivierung des Akt-Substrates AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*) vermittelt (Kane et al., 2002; Sano et al., 2003). Bei der Phosphorylierung von AS160 scheint ebenfalls die Akt2-Isoform eine dominierende Rolle zu spielen, wie siRNA (*small interfering RNA*)-vermittelte Akt-isoformspezifische *knockdown* Experimente in Adipozyten und Skelettmuskelzellen ergaben (Bouzakri et al., 2006; Gonzalez and McGraw, 2009). Ebenso wird Akt2 nach Insulinstimulation von Kardiomyozyten trotz des höheren Expressionsniveaus der Akt1-Isoform bevorzugt phosphoryliert (Raupach, 2010). Akt reguliert darüber hinaus die Speicherung der Glukose in Form von Glykogen, indem es GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) nach Insulinstimulation hemmt (Cross et al., 1995). Besonders unter ischämischen Bedingungen sind Kardiomyozyten zur Aufrechterhaltung des Membranpotenzials auf die Glykolyse mit dem Endprodukt Laktat zur ATP-Synthese angewiesen (Marshall et al., 1981). Wie wichtig der PI3K/Akt/GLUT4-Signalweg für das Herz ist, zeigen Versuche mit diabetischen Ratten, welche nach Ischämie/Reperfusion eine deutlich verminderte Akt/Glut4-Aktivität zeigten, was mit einer stark herabgesetzten Herzfunktion einherging (Huang et al., 2009).

1.2.3 Akt als Modulator der Kontraktilität

Die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten besteht aus dem geregelten Wechsel zwischen Kontraktion und Relaxation, was u.a. von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig ist. Dabei führt die Depolarisation der Zellmembran durch ein Aktionspotential zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ Ca²⁺-Kanäle, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt. Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bedingt wiederum die Öffnung Ca²⁺-abhängiger Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches Ca²⁺ in hohen Konzentrationen speichert. Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration induziert daraufhin an den Myofilamenten eine Kontraktion. Die Relaxation erfolgt vor allem durch die aktive Wiederaufnahme des Ca²⁺ in das SR. Der Transport erfolgt über die Ca²⁺-ATP-ase Serca (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) deren Aktivität durch das Regulatorprotein Phospholamban (PLN) gesteuert wird. Im unphosphorylierten Zustand ist PLN an Serca gebunden und hemmt deren Aktivität, was zu einer Abnahme der Kontraktionskraft und einer verlangsamten Relaxation führt. Wird PLN durch Effektoren wie beispielsweise die PKA (*Protein Kinase A*) nach β -

adrenerger Stimulation phosphoryliert, führt das zur Inaktivierung und seine Bindung an Serca löst sich. Das hat zur Folge, dass sich die Kraft und Geschwindigkeit der Kontraktion, sowie die Geschwindigkeit der Relaxation der Kardiomyozyten erhöht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass besonders Akt1 die Kontraktilität von Kardiomyozyten steigern kann. Beispielsweise steigerte IGF-1 die Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten, was mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einherging. Interessanterweise konnte dieser Effekt durch Gabe eines PI3K-Inhibitors vollständig blockiert werden (von Lewinski et al., 2003). Studien zeigen, dass Akt1 einen direkten Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel ausübt, denn die Überexpression von Akt1 führte zu einer erhöhten Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR, was auf eine vermehrte Proteinexpression der Serca zurückzuführen war (Kim et al., 2003). Neuere Ergebnisse belegen, dass Akt1 die Aktivität von PLN direkt über eine Phosphorylierung an Threonin 17 modulieren kann (Catalucci et al., 2009).

1.2.4 Akt und kardiale Hypertrophie

Als Hypertrophie bezeichnet man allgemein eine Vergrößerung der Zellen, was insgesamt zur Vergrößerung des Organs führt. Bei der kardialen Hypertrophie unterscheidet man zwischen drei Formen. Das Wachstum des Herzens nach der Geburt bezeichnet man als Entwicklungshypertrophie. Im adulten Organismus differenziert man zwischen der physiologischen oder adaptiven und pathologischen oder maladaptiven Hypertrophie. Eine physiologische Hypertrophie des Herzens ist in der Regel reversibel und mit einer erhaltenen oder verbesserten Pumpfunktion assoziiert. Sie wird durch Schwangerschaft oder Ausdauersport induziert. Strukturell ist die physiologische Hypertrophie durch eine gleichmäßige und symmetrische Verdickung des Septums, sowie der Ventrikelwände und der Vorhöfe charakterisiert. Auf zellulärer Ebene wird das Wachstum der Kardiomyozyten von einer Vermehrung der Mitochondrien sowie Sarkomere begleitet und geht mit einer vermehrten Kapillarisation einher. Folglich bleibt die systolische und diastolische Herzfunktion erhalten oder ist sogar verbessert (Heineke and Molkenin, 2006).

Im Gegensatz dazu steht die pathologische Hypertrophie, welche durch chronische Druck- und Volumenbelastung des Herzens, wie Hypertonie oder Erkrankungen der Herzklappen ausgelöst wird. Weitere Ursachen können erblich bedingte Gendefekte sein, Virusinfektionen oder metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus. Die adaptive Antwort der Herzmuskelzellen geht bei dieser Form der Hypertrophie einher mit einer Re-Induktion fetaler

Einleitung

Genexpressionsprogramme, welche u.a. kontraktile Proteine betrifft und einen Isoformen-Wechsel der Expression der adulten α -MHC (*alpha myosin heavy chain*) hin zur fetalen β -MHC Isoform beinhaltet (Thum and Borlak, 2002). Weiterhin kommt es zur vermehrten Expression der Hormone ANP (*atrial natriuretic peptide*) und BNP (*B-type natriuretic peptide*), sowie einer verminderten Expression der Ca^{2+} -ATPase Serca (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) (Molkentin and Dorn, 2001). Auch auf histologischer Ebene kommt es zu strukturellen Veränderungen wie einer Zunahme der interstitiellen Fibrosierung (Brower et al., 2006). Diese zum Teil irreversiblen strukturellen und molekularen Veränderungen gehen einher mit einem Verlust der Kontraktionskraft und einer erhöhten Wandsteifigkeit, welche in einer Dilatation des linken Ventrikels münden, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist, ein physiologisches Herzminutenvolumen aufrecht zu erhalten.

In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der PI3K/Akt-Signalweg maßgeblich sowohl an der Ausbildung einer physiologischen als auch pathologischen Hypertrophie beteiligt sein kann. Neben der Aktivierung von RTK durch Insulin oder IGF-1 über PI3K- α kann Akt auch mittels GPCR durch Liganden wie Adrenalin oder Angiotensin II über PI3K- γ aktiviert werden. Eine wichtige Determinante bei der Frage welche Hypertrophie-Form ausgebildet wird, spielt somit die Aktivierung von Klasse IA oder IB PI3K. Studien an transgenen Mäusen, mit einer konstitutiv-aktiven Form der katalytischen p110 α -Untereinheit in Kardiomyozyten entwickelten vergrößerte Herzen mit erhaltener Pumpfunktion. Umgekehrt führte die Induktion einer pathologischen Hypertrophie nach Konstriktion der Aorta zu einer selektiven Induktion der p110 γ -Expression (McMullen et al., 2003; Naga Prasad et al., 2000; Patrucco et al., 2004; Shioi et al., 2002). Folglich sind durch RTK aktivierte PI3K der Klasse IA an der Ausbildung einer physiologischen Hypertrophie beteiligt, während GPCR-induzierte Klasse IB-PI3K die Entstehung einer pathologischen Hypertrophie fördern. Interessanterweise münden jedoch beide Wege in der Aktivierung von Akt, was einen besonderen Fokus auf die Aktivität der Kinase selbst, sowie ihrer nachgeschalteten Zielmoleküle wirft (Abb. 3).

Ganz entscheidend für die Ausbildung einer Hypertrophie scheint das Expressionsniveau, sowie Dauer der Akt-Aktivierung und -Lokalisation zu sein. Der Einfluss von Akt auf das Zellwachstum wurde in zahlreichen Überexpressionsstudien nachgewiesen. So resultierte die Überexpression einer konstitutiv-aktiven, myristoylierten Form von Akt1 in einer Hypertrophie des Herzmuskels. Die Dauer der Akt-Aktivität hatte dabei einen ganz

Einleitung

entscheidenden Einfluss, ob sich ein adaptiver oder maladaptiver Phänotyp ausbildete. So zeigten transgene Mäuse mit induzierbarer konstitutiv-aktiver Akt1 im Herzen nach zwei Wochen eine kardiale Hypertrophie mit erhaltener Kontraktilität und Herzfunktion, während sich diese nach länger andauernder Aktivität der Kinase in eine maladaptive Form umwandelte, welche von interstitieller Fibrose, sowie der Expression fetaler Gene und linksventrikulärer Dilatation begleitet war (Shiojima et al., 2005). Die Überexpression von Akt im Nukleus mündete hingegen nicht in einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, sondern wirkte sich protektiv hinsichtlich der Folgen induzierter Ischämie/Reperfusionsschäden aus (Shiraishi et al., 2004; Tsujita et al., 2006).

Ein wichtiger Modulator des Zellwachstums ist der Rapamycin-sensitive mTOR Komplex 1 (mTORC1), welcher u.a. durch Akt aktiviert wird, und als Effektor der p70S6-Kinase (p70S6K) sowohl Translation als auch die Synthese von Ribosomen reguliert. Des Weiteren deaktiviert mTORC1 den translationalen Repressor 4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) was in einer gesteigerten Translationsrate resultiert (Dufner and Thomas, 1999; Fingar et al., 2002). Eine ebenso wichtige Rolle spielt mTORC1 bei der Angiogenese, da es die Translation von HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) fördert, und somit indirekt die Induktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) initiiert (Hudson et al., 2002). So mildert die Verabreichung von Rapamycin die Folgen einer durch Aorten-Konstriktion induzierten pathologischen Hypertrophie (McMullen et al., 2004). Ebenfalls konnte die durch Expression von konstitutiv-aktiver Akt hervorgerufene kardiale Hypertrophie durch Rapamycin antagonisiert werden. Das zeigt, dass Akt ihre hypertrophe Wirkung zumindest teilweise über mTORC1 vermittelt (Shioi et al., 2002).

Ein weiteres Substrat des PI3K/Akt-Signalwegs ist GSK3 β . Im Herzen ist GSK3 β ein negativer Regulator des kardialen Wachstums, denn die Expression einer konstitutiv-aktiven GSK3 β in den Herzen transgener Mäuse vermag die malignen Auswirkungen chronischer β -adrenerger Stimulation zu reduzieren (Antos et al., 2002). Die antihypertrophe Wirkung vermittelt GSK3 β über die Inhibition von Transkriptionsfaktoren, welche wachstumsfördernd sind. Beispielsweise phosphoryliert GSK3 β NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und verhindert so seine Translokation in den Zellkern. Ebenso vermittelt es den nukleären Export von GATA4, welcher die Transkription embryonaler Gene fördert. Weiterhin ist GSK3 β ein negativer Regulator der Translation, indem sie eIF2B (*eucaryotic translation initiation factor 2B*) phosphoryliert und damit inaktiviert (Beals et al., 1997; Morisco et al., 2001; Welsh et al., 1998). GSK3 β ist unter basalen Bedingungen konstitutiv aktiv und wird nach

Insulinstimulation durch Akt nach Phosphorylierung an Serin 9 inaktiviert. Wie wichtig der PI3K/Akt/GSK3 β -Signalweg für die Ausbildung einer Hypertrophie ist, zeigt eine Studie zur Überexpression einer konstitutiv-aktiven Akt Mutante in den Herzen transgener Mäuse, welche eine kardiale Hypertrophie entwickelten einhergehend mit vermehrter Phosphorylierung von GSK3 β und Hochregulation von GATA4 (Condorelli et al., 2002).

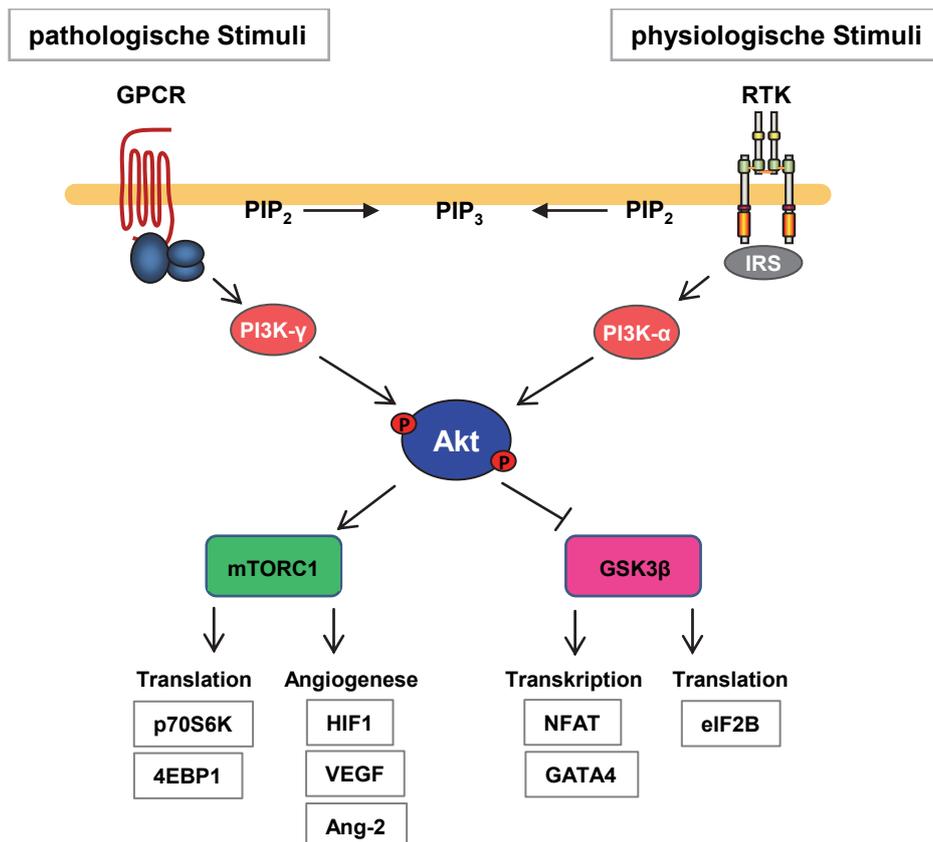


Abb. 3: Die Aktivierung von Akt als zentraler Mediator des kardialen Wachstums durch Regulation von Transkription, Translation und Angiogenese nach physiologischen oder pathologischen Stimuli. Akt wird sowohl nach pathologischen Stimuli wie beispielsweise β -adrenergem Stress, welcher durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt wird, sowie nach physiologischen Stimuli durch Bindung von Wachstumsfaktoren wie Insulin an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) PI3-Kinase (PI3K)-abhängig aktiviert. Akt kann nun u.a. mTORC1 (mTOR Komplex 1) aktivieren, welcher als positiver Modulator des Zellwachstums die Translation über Effektoren wie p70S6K (p70S6-Kinase) und 4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) steuert, sowie die Angiogenese über Induktion von HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und Ang-2 (Angiopoeitin-2) initiiert. Weiterhin deaktiviert Akt GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*), welche ein negativer Regulator des kardialen Wachstums ist. Dadurch kommt es zur Aktivierung proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren wie NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und GATA4, sowie der Förderung der Translation über eIF2B (*eukaryotic translation initiation factor 2B*).

1.2.5 Akt und koronare Angiogenese

Wie bereits erwähnt, korreliert das physiologische Wachstum des Herzens mit der Ausbildung neuer Kapillaren, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Myokards zu gewährleisten. In Endothelzellen werden angiogene Prozesse u.a. durch den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt. So induzieren beispielsweise VEGF und Ang-1 (*Angiopoietin-1*) über die PI3K die Aktivierung von Akt. Mäuse, welche eine induzierbare konstitutiv-aktive myristoylierte Form von Akt1 in Kardiomyozyten exprimierten, entwickelten über Aktivierung des Akt/mTORC1-Signalwegs eine physiologische Hypertrophie begleitet von einer um 33 % erhöhten Kapillardichte. Ebenso kam es zu einer erhöhten Expression von VEGF im Myokard, was darauf hindeutet, dass Kardiomyozyten den Prozess der Kapillarisation parakrin verstärken können. Wie bereits erwähnt, scheint auch hier die Dauer der Akt-Aktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen, denn eine länger anhaltende Aktivierung von Akt mündete in einer deutlichen Reduktion der Kapillardichte, begleitet von einer Herunterregulation der angiogenen Faktoren VEGF und Ang-2, trotz gleichbleibendem Hypertrophie-Stimulus. Eine abgeschwächte Phosphorylierung der p70S6K deutet darauf hin, dass eine länger andauernde Akt-Aktivierung u.a. zu einer verminderten mTORC1-Aktivität führt (Schiekofer et al., 2006; Shiojima et al., 2005).

1.3 Fragestellung

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich die drei bekannten Akt Kinasen durch eine hohe Sequenzhomologie aus. Dennoch belegen Untersuchungen zur phänotypischen Analyse von Akt-*knockout* Mäusen, dass die Akt-Isoformen sehr spezifische Funktionen in der Zelle ausüben, welche nicht oder nur teilweise von anderen Isoformen kompensiert werden können. Gerade im Herzen spielt Akt eine besondere Rolle bei der koordinierten Regulation des physiologischen kardialen Wachstums bezüglich Neoangiogenese, Kontraktilität, Zellüberleben und Metabolismus. Auch bei der Entwicklung maladaptiver kardialer Prozesse ist die Kinase in hohem Maße involviert.

Die molekularen Ziele, über welche die Akt-Isoformen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen die Herzfunktion modulieren sind bisher nur ansatzweise verstanden. Unterschiedliche gewebsspezifische Expression bzw. präferentielle Aktivierung einer Akt-Isoform durch GPCR bzw. RTK-aktivierende Liganden könnte dazu führen, dass die Funktion einer Isoform dominiert. Weiterhin könnte über die intrazelluläre Lokalisation

Einleitung

die räumliche Nähe zu unterschiedlichen Substraten geschaffen werden, welche mit den distinkten Funktionen einer Akt-Isoform einhergehen. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der isoformspezifischen Funktionen ist die Interaktion mit isoformspezifischen Substraten.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die Analyse der Protein-Protein-Interaktion von Akt1 in HEK293T Zellen mittels Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP) und Massenspektrometrie (MS). Da ein besonderer Fokus auf der funktionellen Untersuchung der Akt1 und Akt2-Isoformen im Herzen lag, wurden transgene Mausmodelle etabliert, mit dem Ziel der Identifizierung isoformspezifischer Akt-Bindungspartner mit der TAP/MS-Methode *in vivo*. Dazu wurde in dem jeweiligen Modellsystem zusätzlich zur endogenen Akt-Isoform rekombinante Akt mit einem N-terminalen HA/StrepII/Flag-TAG exprimiert, um Akt-assoziierte Substrate unter nativen Bedingungen aufzureinigen zu können.

Darüber hinaus wurde in einem weiteren Ansatz die Auswirkungen der Deletion der Akt1- bzw. Akt2-Isoform im Herzen unter Isoproterenol-induziertem β -adrenergem Stress im Hinblick auf Herzfunktion und Morphologie untersucht, was einen zusätzlichen Einblick hinsichtlich isoformspezifischer Funktionen der Kinase *in vivo* ermöglichen sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Laborgeräte

Tab. 1: verwendete Laborgeräte mit Herstellerangabe

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec
Analysewaage EMB 200-2	Kerner & Sohn
Bakterienschüttler	Ecotron
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresis Power Supply	Fisher Scientific
Feinwaage BP 121S	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop BZ 9000E	Keyence
Gefrierschrank, -20°C	Privileg
Gefrierschrank, -80°C	Revco
Infrarot-Bildgebungssystem, Odyssey	LI-COR Biosciences
Kühlschrank	Privileg
Laborschüttler	neoLab
Lichtmikroskop ID03	Zeiss
Luminometer Biolumat LB 9500T	Berthold
Magnetrührer, MR2002-MR3001	Heidolph
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
Mikrowelle	AEG
Mini-Zentrifuge	Roth
PCR Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter, MP 220	Mettler
Plattenphotometer, SpectraCount	Packard
Realtime PCR System, StepOne Plus	Applied Biosystems
Schüttler für Bakterienkulturen	Infors AG
SDS-PAGE Laufkammer, SE600-SE400	Hofer Instruments
Sorvall Superspeed Zentrifuge, RC-5B	Du Pont Instruments
Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab
Sterilbank, antair BSK	Kendro
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge, Centrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf
Tissue Ruptor	Qiagen
Vevo 2100 Imaging System	Visualsonics
Vortex	Heidolph
Zellkulturschrank, Function Line	Heraeus

2.2 verwendete Antikörper

2.2.1 Antikörper für die Western Blot Analyse

Tab. 2: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Produktnummer
Kaninchen- α -Akt (Pan)	1:1000	Cell Signaling	4691
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 -Akt2	1:1000	Cell Signaling	3063
Kaninchen- α -Phospho-Akt (Ser 473)	1:1000	Cell Signaling	9271
Kaninchen- α -Flag	1:2500	Sigma	F7425

Tab. 3: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Produktnummer
Ziege-AntiMouseIR Dye®680	1:10000	LI-COR	926-32220
Ziege-AntiMouseIR Dye®800	1:10000	LI-COR	926-32210
Ziege-AntiRabbitIR Dye®680	1:10000	LI-COR	926-32221
Ziege-AntiRabbitIR Dye®800	1:10000	LI-COR	926-32211

2.2.2 Antikörper für Histologie

Tab. 4: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Produktnummer
Ratte- α -CD 31	1:200	LI-COR	926-32210

Tab. 5: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma	Produktnummer
WGA-FITC	1:200	Sigma	L 4895
Ziege-Anti-Ratte Rhodamine Redx	1:400	Dianova	112-295-167

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide werden in der folgenden Tabelle angeführt und wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Alle Sequenzen sind jeweils in 5'- 3'- Richtung angegeben.

Tab. 6: Oligonukleotide für die RT-PCR Experimente (up = „upstream“, do = „downstream“)

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Annealing Temp.	Produktgröße
Akt1 endogen up	TGACACCAGGTATTTTCGATGAG	60°C	242 bp
Akt1 endogen do	ATCCGAGAAACAAAACATCAGG	60°C	242 bp
Akt2 endogen up	TCAAACCTCAGGTCAC TTCAGA	60°C	267 bp
Akt2 endogen do	AACACAAACCAAAAGGCCAAAAT	60°C	267 bp
Akt1 gesamt up	CAG TGG ACC ACA GTC ATT GAG CGC	65°C	400 bp
Akt1 gesamt do	GCC GTA AGG AAG GGA TGC CTA GA	65°C	400 bp
Akt2 gesamt up	GAG GGA AGA GTG GAT GCG GGC TAT C	65°C	400 bp
Akt2 gesamt do	TCA CAA AGC ATA GGC GGT CAT GG	65°C	400 bp
Hprt up	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCT	60°C	180 bp
Hprt do	CAACTTGCCTCATCTTAGGC	60°C	180 bp

Tab. 7: Oligonukleotide zur Genotypisierung der Akt N-TAG Mäuse

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Annealing Temp.	Produktgröße
Hgh up	GTC TGA CTA GGT GTC CTT CT	55°C	409 bp
Hgh do	CGT CCT CCT GCT GGT ATA G	55°C	409 bp

2.4 verwendete Plasmide

Tab. 8: Vektoren für die Erzeugung der transgenen HEK293T Zellen

Vektorname	interne Nummer	Restriktionsenzyme	Anmerkung
CAGGS-Akt1 N-TAG	P 466	BsrGI	Grundvektor
pSico Puro	P 433	BsrGI	Vektor zur Isolierung der PGK Puro Sequenz
CAGGS-Akt1 N-TAG Puro	P 506	AgeI/BsrGI	Endvektor

Tab. 9: Vektoren für die Erzeugung der transgenen Mäuse

Vektorname	interne Nummer	Restriktionsenzyme	Anmerkung
α-MHC PNCI	P 178	Sall/BamHI	Grundvektor
Akt1 N-TAG	P 466	NheI	Vektor zur Isolierung der Akt1 N-TAG Sequenz
Akt2 N-TAG	P 467	AgeI/BsrGI	Vektor zur Isolierung der Akt2 N-TAG Sequenz
α-MHC Akt1 N-TAG	P 495	AgeI/BamHI/NotI	Endvektor
α-MHC Akt2 N-TAG	P 496	Sall/NheI/BamHI/NotI	Endvektor

2.4.1 Vektoren für die stabile Expression von Akt1 N-TAG in HEK293T Zellen

Der Endvektor CAGGS-Akt1 N-TAG Puro beruht auf dem lentiviralen Grundvektor pGJ3-CAGGS (Naguib 2009). Das in diesen Vektor integrierte Gen wird unter der Kontrolle des CAGGS-Promotors exprimiert. Der Promotor besteht aus dem Hühner β-Aktin Promotor, dem Kaninchen β-Globin poly-A Signal und dem Cytomegalovirus-Enhancer (Niwa et al., 1991). Weitere Gene des Vektors regulieren die Produktion lentiviraler Partikel, welche Grundlage einer stabilen Integration in das Wirtsgenom und damit einer stabilen Expression

des Transgens sind. Hierzu dienen die Gene gag und RRE (*regulator of virion expression-responsive element*), sowie env (*envelope*) welche durch den CMV (*Cytomegalovirus*)-Promotor exprimiert werden. Der bakterielle Replikationsursprung pUCori dient der Herstellung doppelsträngiger Plasmidkopien in *E.coli* (*Escherichia coli*), wobei der F1 ori einzelstängige Plasmidkopien erstellt. Zur bakteriellen Selektion enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (AMP), welches unter der Kontrolle des β -Lactamase-Promotors (bla) steht. Die eukaryotische Selektion kann über eine Zeocin Resistenz erfolgen, welche durch das Gen Zeo gegeben ist und durch den EM7-Promotor reguliert wird. Der in dieser Arbeit benutzte Grundvektor enthielt bereits die Akt1 N-TAG cDNA (Abb.4 A). Zur Selektion der lentiviral infizierten Zellen wurde Puromycin anstatt Zeocin benutzt, daher musste in den Vektor noch eine Puromycin-Kassette (Puro) bestehend aus dem Puromycin-Resistenzgen und dem Phosphoglyceratkinase-Promotor (PGK) inkloniert werden (Ventura et al., 2004). Die zur Selektion benötigten Sequenzen entstammen dem Vektor pSico Puro (Addgene) (B).

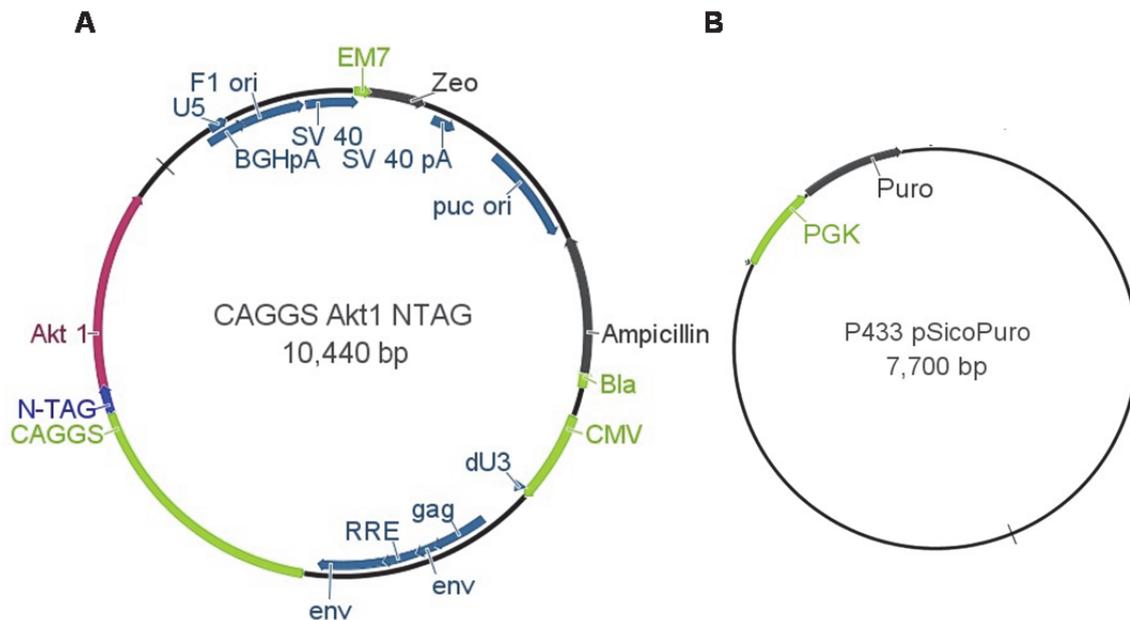


Abb. 4: Vektoren für die stabile Expression des rekombinanten Akt1 in HEK293T Zellen. A: Grundvektor CAGGS Akt1 N-TAG (BGHpA: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*, SV40: Simian Virus 40, SV 40pA: SV40 Polyadenylierungssignal, alle weiteren Abkürzungen zum Aufbau des Vektors sind im Text erläutert. B: Vektor pSicoPuro: dieser Vektor enthält das Puromycin-Resistenzgen (Puro) welches unter Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK) exprimiert wird.

2.4.2 Vektoren für die kardiomyozytenspezifische Expression von Akt1 und Akt2 N-TAG im Herzen

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Vektoren zur Generierung der transgenen Akt1- und Akt2 N-TAG Mäuse basieren auf dem α -MHC-PNCI Vektor (Abb. 5). Dieser Vektor trägt den α -MHC-Promotor (*α -myosine heavy chain*) für die kardiomyozytenspezifische Expression der unter seiner Kontrolle stehenden Gene. Die Promotorsequenz umfasst upstream der TATA-Box noch ca. 1 kb der α -MHC-Gensequenz, downstream die gesamte Region zwischen dem α - und β -MHC Genlocus, sowie noch ca. 100 bp der 3'-Region des β -MHC-Gens (Gulick et al., 1991). Das Polyadenylierungssignal für die m-RNA ist in der hgh-Region (*human growth hormone*) codiert und entstammt dem Gen des humanen Wachstumshormons. Die pBluescript sk+ Sequenz bildet das Rückrad des Vektors und enthält ein Ampicillin Resistenzgen zur bakteriellen Selektion. Die Akt1 N-TAG und Akt2 N-TAG cDNA Sequenzen entstammen aus den in Tab. 9 angegebenen Vektoren und waren eine freundliche Gabe von Katharina Bottermann (K. Kottermann, 2013) und Andreas Hiester (A. Hiester, 2013), Institut für Herz und Kreislaufphysiologie.

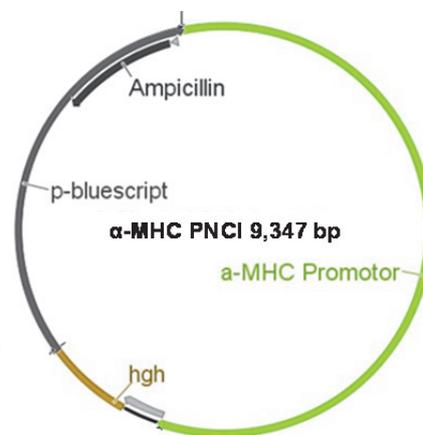


Abb. 5: Schematische Darstellung des α -MHC-PNCI Vektors zur Erzeugung der transgenen Akt N-TAG Mäuse. Der Aufbau des Vektors sowie die Abkürzungen sind im Text erklärt.

2.5 Methoden zur Bearbeitung von Nukleinsäuren

Die im Folgenden dargestellten Methoden sind, sofern nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook und Russel durchgeführt worden (Sambrook, 2001).

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifikation definierter Bereiche der DNA. Für die PCR wurde die *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Qiagen, Hilden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.2 Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1-1,5 % igen Agarosegelen, versetzt mit 5% (v/v) Ethidiumbromid. Als Laufpuffer diente 0,5 x TAE. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit DNA-Ladepuffer versetzt. Bei DNA-Fragmentlängen über 500 bp diente der Lambda/EcoRI/HindIII-Marker als Größenstandard, für Fragmentlängen unter 700 bp wurde der p-Bluescript/HpaII-Marker verwendet (Tab.10). Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 1h bei einer konstanten Spannung von 120 V. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Tisch belichtet und photographiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm QuantiOne 4.5.2 (BioRad).

Agarosegel (1 %):

1 % (w/v)	Agarose
100 % (v/v)	TAE-Puffer
0,005 % (v/v)	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

TAE-Puffer:

40 mM	Tris/Acetat
1 mM	EDTA

5-fach DNA-Gelladepuffer

100 mM	Tris/Borsäure (pH8,0)
50 % (v/v)	Glycerin
0,2 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

Tab. 10: DNA-Größenmarker:

DNA-Größenmarker	Fragmentgrößen (bp)
Lambda DNA (Invitrogen) geschnitten mit EcoRI/HindIII	560, 831, 947, 1375, 1584, 1900, 2027, 4950, 5150, 21000
p-Bluescript DNA (Stratagene) geschnitten mit HpaII	710, 489, 404, 325, 242, 190, 157, 147, 110, 67, 57, 34, 26

2.5.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente die der Weiterverwendung dienten, wurden mit Hilfe des QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dabei werden die DNA-Fragmente über eine Anionenaustauscher-Minisäule aufgereinigt.

2.5.4 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im Nanodrop (Peqlab) bestimmt. Die Reinheit der Probe wurde über den Quotienten OD260/OD280 ermittelt und diente der Bestimmung des relativen Proteingehaltes. Sowohl Reinheit als auch Konzentration der Nukleinsäureproben wurden mit Hilfe der Nanodrop-Software ND-1000 3.2.1 berechnet.

2.5.5 DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion

Die Reaktionsbedingungen für die verwendeten DNA-Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Zur Entfernung des Enzyms nach Restriktionsreaktion erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde das gleiche Reaktionsvolumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches zu dem Ansatz gegeben, vermischt und dann 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die in der oberen wässrigen Phase enthaltene DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit DNA-Ladepuffer versetzt und zur Analyse in einem Agarosegel aufgetrennt.

2.5.6 DNA-Ligation

Hierzu wurde ein fünffacher molarer Überschuss an Insert-DNA mit Vektor-DNA mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (NEB) ligiert. Es wurden jeweils 100-150 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte entweder bei Raumtemperatur für 4 h oder bei 16°C über Nacht.

2.5.7 Sonstige Modifikationen von DNA-Fragmenten

Weitere Modifikationen wurden je nach Klonierungsstrategie vorgenommen. Die Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation zu verhindern. Für die Ligation mit der Insert-DNA, mussten bei dieser Methode die Oligonukleotide zur Amplifikation der Insert-DNA, mit einer T4-Polynukleotidkinase (NEB) phosphoryliert werden.

2.5.8 Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Die Transformation der kompetenten XL-1-Blue E.coli-Bakterien (Stratagene) mit dem Ligationsansatz erfolgte über einen Hitzeschock von 30 s bei 42° C. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, dann je 500 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und die transformierten Bakterien für 1 h bei 37°C und 400 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden zum Animpfen von 2 ml Minikulturen verwendet und bei 37°C und 300 rpm über Nacht unter Schütteln inkubiert.

LB-Medium (1L):

10 g	Bactotrypton
5 g	Bacto-Hefe-Extrakt
10 g	Natriumchlorid (pH 7,5)

LB-Agarplatten: 15 g Agar/ 1L LB-Medium

2.5.9 Kultivierung der transformierten E. coli Bakterien

Zum Animpfen wurden 200 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt, und eine Bakterienkolonie von der Agarplatte oder der Minikultur verwendet. Die angeimpfte Kultur wurde anschließend bei 37°C und 300 rpm über Nacht geschüttelt.

2.5.10 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Plasmidpräparation wurde mit dem NucleoBond PC500 Maxi DNA Kit (Macherey & Nagel) durchgeführt. Die nach alkalischer Lyse und Neutralisation isolierte Plasmid-DNA wurde über Anionen-Austauscher-Säulen gereinigt. Anschließend erfolgte die Fällung bei 4°C mit Isopropanol. Die Plasmid-DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 1 x TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer pH 7,4

10 mM	Tris (pH 7,4)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

2.5.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde vom biologisch-medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Anschließend erfolgten mit dem Programm Chromas Lite die Sequenzanalyse, sowie der Sequenzvergleich mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.6 mRNA-Analyse

2.6.1 Isolierung und reverse Transkription

Zur Isolierung von mRNA aus Mauserherzen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die mRNA wurde gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet und mittels Nanodrop (Peqlab) auf ihre Konzentration und Qualität getestet. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen, Hilden). Zunächst wird hier durch Zugabe des gDNA wipeout Puffers für 10 min bei 42°C eine mögliche Kontamination der mRNA Proben durch genomische DNA verhindert. Anschließend wurden je 1 µg mRNA mit Quantiscript RT Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase und RT Primer Mix versetzt und für 20 min bei 42°C inkubiert. Der RT Primer-Mix enthält sowohl Oligo-dt als auch Random Primer und ermöglicht so im Idealfall eine Amplifikation aller in der Zelle befindlichen mRNA's. Im letzten Inkubationsschritt wurde für 5 min bei 95°C eine Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase vorgenommen. Die cDNA Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.6.2 Real Time-PCR (RT-PCR)

Um eine relative Aussage über die Quantität der mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene treffen zu können, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Invitrogen) interkaliert dabei in die neu synthetisierte doppelsträngige cDNA. Die Zunahme der cDNA-Menge korreliert mit einem Anstieg der Fluoreszenz in jedem Zyklus der PCR. In den ersten Zyklen der PCR ist die Fluoreszenzemission gering, da die Konzentration an cDNA nur langsam ansteigt. Nur in der logarithmischen Phase der PCR ist die Zunahme der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der DNA-Menge. Der Übergang der linearen in die logarithmische Phase der Reaktion wird durch den so genannten CT-Wert (*threshold cycle*; Schwellenwert) markiert. In dieser Phase sollten sich die PCR Produkte in jedem Zyklus verdoppeln. Der CT-Wert dient daher zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA-Menge. Als Matrize für die RT-PCR Reaktion diente cDNA, die für den Ansatz 1:4 verdünnt wurde. Die verwendeten Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Sequenzen und Annealingtemperatur können der Tab. 6 entnommen werden. Die Durchführung der RT-PCR Reaktionen erfolgte mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Ansatz einer 1 x RT-PCR Reaktion:

12,5 µl	Sybr Green
0,5 µM	Primer A
0,5 µM	Primer B
1 µl	cDNA
ad 25 µl dH ₂ O	

PCR Programm: Zeit:

95°C	10 min	} 37 Wdh.
95°C	30 sec	
Primerannealing	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	2 min	

Die Auswertung erfolgte nach dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell (Pfaffl et. al., 2001).

$$\text{rel. Transkriptmenge} = \frac{(\text{Expression Zielgen})^{\Delta\text{CT Zielgen}}}{(\text{Expression Referenzgen})^{\Delta\text{CT Referenzgen}}}$$

Hierfür wurden jeweils 3 biologische und 2 technische Replikate der Mausherzen analysiert. Als Referenzgen wurde Hprt1 (Hypoxanthin-Phosphorybosyl-Transferase 1) benutzt. Zunächst wurden aus den CT-Werten des Zielgens und des Referenzgens die Effizienz der PCR Reaktion für die technischen Replikate jedes Gens ermittelt und der Mittelwert gebildet. Die Effizienz der PCR Reaktion setzt eine Verdopplung der cDNA in der logarithmischen Phase voraus und sollte idealerweise einem Wert von 1 entsprechen.

2.7 Zellkultur und Zelllinien

Die Zelllinien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten und spätestens bei einer Konfluenz von etwa 90 % passagiert. Die Zellen wurden in Nährmedium im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert.

2.7.1 HEK293T Zellen

HEK293T (*human embryonic kidney*) ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche in DMEM-Medium kultiviert wurde.

DMEM-Medium (GIBCO) mit Zusätzen:

10%	FCS (<i>fetal calf serum</i> ; Biochrom)
2 mM	L-Glutamin (Invitrogen)
1%	NEAA (<i>non essential amino acids</i>) (Invitrogen)
100 U/ml	Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Stimulation und Inhibition von HEK293T Zellen

Zur Untersuchung der Akt-Phosphorylierung wurde der PI3-Kinase Signalweg entweder stimuliert oder inhibiert. Zunächst wurden die Zellen dafür über Nacht unter Serumentzug in Hungermedium kultiviert. Für eine Stimulation wurden die Zellen am folgenden Tag für 10 min mit 1,75 µg Insulin/ml Hungermedium inkubiert (Insuman Rapid: 40 I.E./ml; Sanofi Aventis). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen in Hungermedium.

DMEM-Hungermedium (GIBCO) mit Zusätzen:

2 mM	L-Glutamin (Invitrogen)
1%	NEAA (Invitrogen)
100 U/ml	Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Lysispuffer wie unter 2.9.1 beschrieben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay (2.9.2). Für die Analyse wurde ein Western Blot (2.9.5) durchgeführt.

2.7.2 Transgene Akt1 N-TAG HEK293T Zellen

Die transgenen HEK293T Zellen exprimierten zusätzlich zu der endogenen Akt1-Isoform eine Akt1 N-TAG Isoform. Hierfür wurde das Protein N-terminal mit einem HA/StrepII/Flag-TAG fusioniert. Das rekombinante Akt1 wurde mittels lentiviraler Infektion stabil in das Genom der Zelllinie integriert.

2.8 Lentivirale Infektion

Für die Virusproduktion mussten aus Gründen der Sicherheit drei verschiedene Plasmide verwendet werden, die jeweils verschiedene Gene tragen. Das Verpackungs-Plasmid pCZ-VSV-G enthält das env-Gen, welche für das Hüllprotein Glycoprotein G des vesikulären Stomatitis Virus codiert. Über dieses Protein wird der Eintritt in die Wirtszelle und die Knospung des Virus ermöglicht (Pietschmann et al., 1999). Das Helferplasmid enthält die Gene gag, rev, tat und pol, die für die Kapsidproteine, die Expressionsregulatoren und die Virion-assoziierten Proteine codieren (Mochizuki et al., 1998). Der Expressionsvektor mit dem Akt1 N-TAG-Konstrukt codiert zusätzlich für den Selektionsmarker Puromycin und trägt Gene für die Integration in das Wirtsgenom, die reverse Transkription und die Verpackung der Virus RNA. Zur Durchführung der Transfektion wurden je 6 µg Plasmid-DNA eingesetzt und mit je 1,5 ml Opti-Mem (Invitrogen) und 70 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) versetzt und sofort stark gevortext. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen auf eine 10 cm Zellkulturschale mit HEK293T Zellen gegeben und 24 h inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach insgesamt 48 h konnte das Medium, welches nun die Lentiviren enthielt abgenommen werden. Die Infektion der HEK293T Zellen erfolgte mit dem gewonnenen Virusüberstand, der über eine sterile Filtration mit einem 45 µm Sterilfilter von Zellresten gereinigt wurde. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit der Puromycinselektion begonnen. Für die Selektion der stabilen HEK293T Zellen wurde 9 µg/ml Puromycin eingesetzt. Die Dauer der Selektion richtete sich nach der nicht mit Virusüberstand infizierten Kontrolle. Zeigte diese keine überlebenden Zellen mehr, war die Selektion abgeschlossen, was in der Regel nach maximal fünf Tagen der Fall war.

2.9 Proteinanalyse

2.9.1 Proteinisolierung

Die Isolation der Proteine aus den HEK293T Zellen bzw. den Mauserzen erfolgte mittels nicht-denaturierendem NP-40 Proteinlysepuffer, welcher mit Proteaseinhibitoren (*Proteaseinhibitor Single Use Cocktail*; Thermo) und Phosphataseinhibitoren (*PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*; Roche) versetzt wurde. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde ein BCA-Assay durchgeführt.

NP-40 Proteinlysepuffer pH 7,5 :

10 mM	Tris pH 7,5
150 mM	NaCl
0,2%	NP-40 (Igepal)
ad. 100 ml	Millipore H2O

2.9.2 BCA-Assay

Der BCA-Assay ist eine Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, die von Smith et. al. 1985 etabliert wurde. Zur Kalibrierung wurde eine Eichgerade mit BSA (*bovine serum albumin*) in bekannter Konzentration (25-1000µg/ml) erstellt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 562 nm im ELISA-Reader (Spectra Count).

2.9.3 Coomassie-Färbung

Für die Färbung der Proteine wurde das Gel zunächst 2 x für je 10 min mit H₂O gewaschen, um eine Färbung des Hintergrunds durch SDS zu vermeiden. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung für 3 h gefärbt, danach kurz mit H₂O gewaschen und dann 1 h mit Entfärbelösung behandelt. Coomassie-gefärbte Gele konnten bis zur Analyse in H₂O gelagert werden.

Coomassie-Färbelösung:

0,4 g	0,02 % CBB-G250 (Coomassie-Brillant-Blau)
100 g	Aluminiumsulfat-18-Hydrat
200 ml	Ethanol (96 %)
40 ml	2 % ortho-Phosphorsäure
ad. 2 L	Millipore H2O

Entfärbelösung:

10 % (v/v)	Ethanol (96 %)
40 ml	2 % ortho-Phosphorsäure
ad. 2 L	Millipore H2O

2.9.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung des Proteingemisches wurde die diskontinuierliche Elektrophorese in Hoefer Elektrophoresekammern durchgeführt (Tulchin et al., 1976). Dazu wurde das Proteingemisch mit einem 4x-Lämmli-puffer versetzt, der das anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) enthielt, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt. Zur Aufbrechung der Tertiär- und Sekundärstrukturen wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Zum gleichmäßigen Einlaufen der Proteine diente ein 2,5 % -iges Sammelgel. Die Auftrennung der

Material und Methoden

Proteine erfolgte in einem 10 % -igen Trenngel nach Anlegen einer konstanten Spannung von 50 V über Nacht oder bei 170 V für ca. 3h. Zur Identifizierung der Proteingrößen wurde ein Proteingrößenstandard mit aufgetragen (*PageRuler Prestained Protein Ladder*; Thermo Scientific).

4 x Lämmli-Puffer:

0,25 M	Tris pH 6,8
8 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol
100 mM	DTT
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau

1 Sammelgel 2,5 %:

2,5 ml	1 M Tris (pH 6,8)
2,5 ml	40 % Acrylamid
200 µl	10 % SDS
60 µl	10 % APS
30 µl	TEMED
ad.	14,9 ml H ₂ O

1 Trenngel 10 %:

10 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
10 ml	40 % Acrylamid
400 µl	5 % SDS
100 µl	5 % APS
80 µl	TEMED
ad.	20 ml H ₂ O

Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris
250 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
ad.	2 L H ₂ O

2.9.5 Western Blot (WB)

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte für ca. 1,5 h in einer Semidry Blotkammer bei einer konstant angelegten Spannung, die sich aus der Größe der Nitrozellulosemembranfläche berechnete ($2,5 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche).

Semidry-Transferpuffer:

25 mM	Tris (pH 8,5)
190 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Ethanol

2.9.6 Immundetektion von Proteinen

Um unspezifische Wechselwirkungen der eingesetzten Antikörper zu verhindern, musste die Membran zunächst in TBS/Licorlösung (1:1; Licor Biosciences) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert werden. Der Primärantikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und bei 4°C über Nacht oder für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Abwaschen des Primärantikörpers mit TBST für je 10 min erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde nochmals je 3 x mit TBST gewaschen. Zuletzt wurde die Membran mit TBS gespült um das Tween zu entfernen. Im Odyssey Infrared Imaging System (Licor Biosciences) erfolgte die Erfassung der Signale der fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Der Scanner kann sowohl Wellenlängen bei 700 nm (rot) und bei 800 nm (grün) erkennen. So wird die Detektion zweier Proteine zur gleichen Zeit möglich. Darüber hinaus bietet das System die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung der Proteinbanden.

TBS

150 mM	NaCl
25 mM	Tris (pH 7,4)

TBST

150 mM	NaCl
25 mM	Tris (pH 7,4)
0,10%	Tween-20

2.10 Methoden zur Aufreinigung und Identifizierung von Akt-Interaktionspartnern

2.10.1 N-terminaler TAG zur Tandemaffinitätsaufreinigung

Für die Aufreinigung von Akt-Interaktionspartnern unter nativen Bedingungen wurde ein Tandem-Affinitätsaufreinigungs-TAG (TAP-TAG) verwendet (Rigaut et al., 1999). Der Mono-Flag-TAG (Flag) und der StrepII-TAG (Strep) erlauben eine Aufreinigung in zwei aufeinanderfolgenden Schritten über eine Flag- und anschließend eine StrepTactin-Säule. Über den Ha-TAG (HA) kann eine Detektion des Fusionsproteins im Western Blot erfolgen.

Der TAP-TAG hatte eine Größe von 8 kDa und wurde N-terminal mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert (Abb.6).

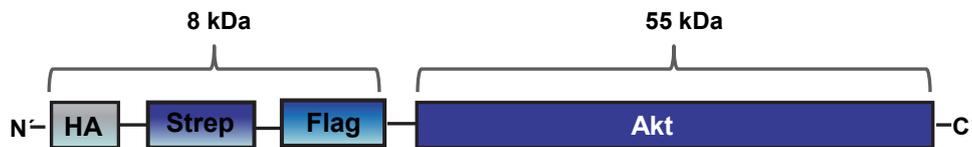


Abb.6: Schematische Darstellung des Akt N-TAG Fusionsproteins mit Größenangabe.

2.10.2 Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP)

Zur TAP unter nativen Bedingungen wurde ein verändertes Protokoll nach Naguib verwendet (Naguib, 2009). Für die Aufreinigung von Akt-Fusionsproteinen und ihrer Bindungspartner aus Zell- und Herzextrakten erfolgte zunächst eine Proteinisolierung wie unter 2.9.1 beschrieben. Im ersten Aufreinigungsschritt bindet der Flag-TAG spezifisch an einen monoklonalen α -Flag-Antikörper, welcher an eine Agarosegel Matrix gekoppelt ist (Anti-Flag M2 Affinity Gel; Sigma). Dazu wurde der Proteinextrakt mit 200 μ l α -Flag Agarose Beads für 1 h bei 4°C und 500 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit den Beads auf eine Säule (Micro-Bio Spin Chromatography Columns; Bio Rad) pipettiert, der Durchfluss verworfen und die Beads mit 2 ml TBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem 3x Flag-Peptid Elutionspuffer. Die Flag-Peptide kompetieren hierbei mit dem Flag-TAG um die Bindung an den α -Flag-Antikörper. Dazu wurde 1 ml des Elutionspuffers in 250 μ l Schritten auf die Beads gegeben. Das Flag-Eluat des ersten Aufreinigungsschrittes wurde nun langsam auf eine Strep-Tactin Säule mit 200 μ l Strep-Tactin Sepharose Beads (Iba) gegeben und anschließend mit insgesamt 2 ml Strep Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte über Strep Elutionspuffer, welcher in 250 μ l Schritten über die Säule gegeben wurde. Von jedem Aufreinigungsschritt (Proteinextrakt, Flag-Überstand, Flag-Waschschritt, Flag- Beads, Flag-Eluat, sowie Strep-Überstand, Strep-Waschschritt, Strep-Tactin-Eluat, und Strep-Beads) wurde jeweils ein Aliquot abgenommen. Diese dienen dazu, die Aufreinigung der Proteine im WB zu quantifizieren und mögliche Verluste zu erkennen. Die Konzentrierung der Proteine erfolgte über Centrifugal Filter Units; 10K Membrane (Millipore) für 45 min bei 3500 x g bei 4°C.

Material und Methoden

TBS, pH 7,4

3 mM	KCl
150 mM	NaCl
25 mM	Tris-Cl

Strep Puffer, pH 8,0

100 mM	Tris-Cl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA

3x Flag-Peptid Elutionspuffer: 300 µg Flag-Peptid/ml TBS

Strep Elutionspuffer: 2,5 mM Biotin/ml Strep Puffer

2.10.3 Silberfärbung von aufgetrennten Proteinen

Die Silberfärbung basiert auf einer Komplexbildung der Ag^+ - Ionen mit Asparagin-, Cystein- und Glutaminresten der Proteine. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd erfolgt die Reduktion der Ag^+ - Ionen zu metallischem Silber. Es wurde ein verändertes Protokoll nach Shevchenko verwendet, welches auf die Fixierung der Proteine mit Glutaraldehyd verzichtet, da modifizierte Peptide sonst nicht mehr bei der Datenbankanalyse identifiziert werden können (Shevchenko et al., 1996). Dazu wurde das Gel zunächst für 20 min mit Fixierlösung I unter schütteln inkubiert. Es folgte eine 2 x 10 minütige Inkubation mit Fixierlösung II. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten mit H_2O gewaschen und danach für 1 min mit Thiosulfatreagenz inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit H_2O für jeweils 20 s. Das Gel wurde nun für 20 min mit Silbernitratreagenz inkubiert, danach nochmals 3 x für je 20 s mit H_2O gewaschen und dann entwickelt. Die Entwicklung der Silberfärbung war abgeschlossen, wenn die Proteinbanden eine ausreichende Färbung erreicht hatten. Die Reaktion wurde dann mittels einer Essigsäure-haltigen Lösung beendet.

Fixierlösung I

50 % (v/v)	Methanol
5 % (v/v)	Essigsäure

Fixierlösung II

50 % (v/v)	Methanol
------------	----------

Thiosulfatreagenz

0,02 %	Natriumthiosulfat
--------	-------------------

Silbernitratreagenz

0,2 %	Silbernitrat
0,02 % (v/v)	Formaldehyd

Entwicklerlösung

3 %	Natriumcarbonat
0,05 % (v/v)	Formaldehyd
0,05 % (v/v)	Natriumthiosulfat

Stop-Lösung

5 % (v/v)	Essigsäure
-----------	------------

2.10.4 Trypsin-Verdau im Gel

Für die Aufarbeitung der Proteine wurde nach dem Protokoll von (Gharahdaghi et al., 1999) vorgegangen. Hierzu wurden die Proteinbanden ausgeschnitten, in ca. 1 mm² Stücke zerkleinert, in Eppendorfgeläße gegeben, und die Proben in der Vakuumzentrifuge für 45 min bei 60°C getrocknet. Das Entfärben erfolgte mittels einer 30 mM Kalium-Ferricyanid/100 mM Natriumthiosulfat Lösung für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Gelstücke 3 x mit je 80 µl einer 100 mM Ammoniumbicarbonat Lösung gewaschen und dann in der Vakuumzentrifuge für 45 min bei 60°C getrocknet. Das Reduzieren und Alkylieren der Proteine erfolgte mit 40 µl einer 10 mM DTT/100 mM Ammoniumbicarbonat Lösung bei 56°C für 15 min. Nach dem Abkühlen wurde der Überstand verworfen und die Proben mit 40 µl einer 55 mM Iodacetamid/100 mM Ammoniumbicarbonat Lösung versetzt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 40 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat Lösung zu den Proben gegeben, für 5 min inkubiert, um dann 40 µl Acetonitril hinzuzufügen und nochmals für 15 min zu inkubieren. Der Überstand wurde verworfen und die Proben in der Vakuumzentrifuge für 45 min bei 60°C getrocknet. Die Spaltung der Proteine durch eine Trypsin-Lösung wurde für 16 h bei 37°C durchgeführt. Die Extraktion der Peptide erfolgte schrittweise über 50 % Acetonitril und 5 % Ameisensäure unter Schütteln und Ultraschallbehandlung der Proben. Die Überstände der Extraktionsschritte wurden in Eppendorfgeläße überführt und in der Vakuumzentrifuge über Nacht getrocknet.

Trypsin-Lösung: 20 µg Trypsin, 5 mM Calciumchlorid in 1600 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat

2.10.5 Trypsin-Verdau in Lösung

Die Proteine im konzentrierten Strep-Tactin-Eluat des unter 2.10.2 beschriebenen, zweiten Aufreinigungsschrittes der TAP konnten auch direkt ohne SDS-PAGE in Lösung verdaut werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Sensitivität für niedrig abundante Bindungspartner von Akt, welche bei der Silberfärbung schlecht visualisiert und daher nicht detektiert werden können. Die Reduktion der Probe wurde in 8 M Harnstoff mittels 10 mM DTT für 1 h bei 30°C und 400 rpm durchgeführt. Direkt im Anschluss erfolgte die Alkylierung durch 40 mM Iodacetamid für eine weitere Stunde bei 30°C und 400 rpm. Um die Harnstoffkonzentration herabzusetzen, wurde die Probe 1:10 mit 150 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt. Durch Zugabe von 2,5 µg Trypsin-Lösung in 50 mM Ammoniumbicarbonat und 5 mM Calciumchlorid wurden die Proteine für 16 h bei 37°C verdaut.

2.10.6 Entsalzen

Das Entsalzen der Peptidproben erfolgte über Spec PT C18 Filterspitzen (Agilent Technologies). Dazu wurden die Filterspitzen zunächst mit 100 µl 100 % Acetonitril konditioniert, und danach 3 x mit je 100 µl 4 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure äquilibriert. Die Probe wurde ebenfalls mit 4 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren auf die Filterspitze geladen. Im Anschluss wurde 5x mit 4 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure in einem Volumen von 100 µl gewaschen. Die Elution erfolgte in zwei Schritten. Zunächst mit 100 µl 60 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure und dann mit 100 µl 100 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.11 Quantitative Proteomics

2.11.1 SILAC-Labeling

SILAC steht für *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* und beruht auf der Markierung des Proteoms mit schweren isotoopenmarkierten Aminosäuren (Ong et al., 2002). Diese Methode ermöglicht eine relative Quantifizierung von Proteinen aus unterschiedlich markierten Zelllinien im Massenspektrometer. Im SILAC-Ansatz wurden die rekombinanten Akt1 N-TAG HEK293T Zellen in einem Medium kultiviert, welches die stabilen schweren isotoopenmarkierten Aminosäuren [¹³C₆]-Lysin und [¹³C₆]-Arginin (*SILAC*TM Protein

Identification and Quantitation Media Kit; Invitrogen) enthielt. Die Kombination dieser beiden Aminosäuren erhöht die Sensitivität der Methode, da Trypsin C-Terminal von Lysin und Arginin spaltet und daher jedes Peptid mindestens einmal markiert wird. Schwer markierte Peptide aus diesem Ansatz konnten nun von unmarkierten Peptiden aus Wildtyp HEK293T Zellen unterschieden werden, da diese im Massenspektrometer eine Massendifferenz von 6 Da aufweisen. Für eine vollständige Markierung des Proteoms mit den isotopenmarkierten Aminosäuren wurden die Zelllinien zunächst über fünf Generationen in SILAC-Medium kultiviert. Mit den markierten und unmarkierten Zelllinien wurde eine TAP durchgeführt und anschließend die Strep-Tactin-Eluate beider Ansätze 1:1 vereinigt (Mixing After Purification; MAP). Der Vorteil des MAP zu einer Vereinigung der Proteinextrakte vor der TAP (Mixing Before Purification; MBP) liegt darin, dass man einen Austausch transienter Bindungspartner von Akt1 zwischen den beiden Ansätzen verhindert. Die Proteine im Strep-Tactin-Eluat wurden anschließend entweder über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt oder direkt in Lösung mit Trypsin geschnitten.

2.11.2 Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung der Peptide aus Mausherzen

Zur Identifizierung und relativen Quantifizierung der Peptide aus den Mausherzen wurden diese durch zweifache Methylierung der freien Aminogruppen mit unterschiedlich schwerem Formaldehyd markiert. Dazu wurde ein nach Boersema *et al.* modifiziertes Protokoll verwendet (Boersema et al., 2009). Die Peptid-Proben wurden mit 100 µl Natriumacetat auf einen pH von 5,4 angesäuert. Zur Markierung der Peptide aus den WT-Herzen wurde 4 % leichtes Formaldehyd (CH₂O) und 600 mM Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN) verwendet. Die Markierung der Peptide aus den Akt1 N-TAG-Herzen erfolgte mit schwerem ¹³C-markiertem, deuteriertem Formaldehyd (¹³CD₂O) und 600 mM deuteriertem Natriumcyanoborhydrid (NaBD₃CN). Die Markierungsreaktion erfolgte für 1 h bei 30°C unter Schütteln unter dem Abzug und wurde anschließend durch Zugabe von 4 % Ammoniak beendet. Danach wurden die Proben mit Ameisensäure auf pH 2 angesäuert, weitere 15 min inkubiert und nach Vereinigung wie unter 2.10.6 beschrieben für die Analyse im Massenspektrometer entsalzt.

2.11.3 Messung und Analyse der isolierten Proteine im Massenspektrometer

Die Analyse der Peptide erfolgte mit einer automatisierten nano-LC-MS/MS (UltiMate 3000 LC System, Dionex; LTQ-Orbitrap XL, Thermo Scientific). Zur automatisierten Steuerung des UltiMate 3000 LC Systems wurde die Chromeleon-Software (Version 6.80, SP2c) verwendet. Das Massenspektrometer (MS) wurde über die Software XCalibur 2.0.7 gesteuert. Die Peptid-Proben wurden zunächst zum Entsalzen auf eine mit C18-Umkehrphasenmaterial (Reprosil-Pur C18 AQ, 3 μm , Dr. Maisch) gefüllte Fused-Silica Säule (100 μm x 2 cm) aufgetragen. Auftrennung und Elution der Peptide erfolgte mittels einer 15-18 cm langen Fused-Silica Trennsäule mit anschließender Elektronensprayionisation über einen SilicaTip Emitter (New Objectiv, Woburn, USA) ins Massenspektrometer. Die Transferkapillare wurde auf eine Temperatur von 140°C geheizt, die angelegte Spannung betrug 2 kV. Die Flussrate des linearen Lösungsmittelgradienten lag konstant bei 230 nl/min. Die Elution der Peptide erfolgte über einen Gradienten von 4-60 % des Lösungsmittels B für insgesamt 60 min, gefolgt von einem Anstieg auf 99 % Lösungsmittel B für 5 min. Die Säule wurde anschließend wieder mit Lösungsmittel A äquilibriert.

Lösungsmittel A: 4 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure

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

Für Proteine, die in Lösung verdaut wurden, musste die Komplexität der Proben zunächst über eine SCX (*strong cation exchange*) -Fraktionierung verringert werden. Dazu wurden die Peptide über einen Gradienten von 0-60 % Puffer B2 für 30 min über eine Polysulfoethyl-Aspartamid-Säule (1 mm x 15 cm, Dionex) bei einer Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ getrennt und die Fraktionen gesammelt. Die weitere Analyse erfolgte wie bereits beschreiben über nano-LC-MS.

Puffer A2: 5mM NaH_2PO_4 ; pH 2,7

Gradientenpuffer B2: 5 mM NaH_2PO_4 , 15 % Acetonitril, 500 mM NaCl; pH 2,7

Die automatisierte MS-Analyse erfolgte mit Hilfe der *dynamic-exclusion* Funktion der XCalibur-Software (Thermo Scientific). Auf jedes Übersichtsspektrum (MS-Scan) (Masse/Ladungsverhältnis m/z 300-2000, Ionenfüllwert 1000000 Ionen, Auflösung $r = 60000$ bei $m/z = 400$) folgte jeweils ein Fragmentierungsspektrum (MS/MS-Scan) der 10 intensivsten Ionen. Hierfür lag die normalisierte Kollisionsenergie der CID

(Kollisionsinduzierte Dissoziation) bei 35 U. Bereits fragmentierte Ionen konnten innerhalb von 20 s bei einer maximalen Massenabweichung von 10 ppm ein weiteres Mal fragmentiert werden und kamen dann auf eine Ausschlussliste. Die Fragmentspektren der Peptide wurden anschließend mit der *Uniprot human Taxonomy 9609*-Datenbank (83695 Einträge), sowie der *Uniprot mouse Taxonomy 10090*-Datenbank (60591 Einträge) über den *SEQUEST*-Algorithmus mit der Bioworks-Software (Thermo Scientific) oder mittels der MaxQuant-Software Version 1.3.0.5 (Cox and Mann, 2008) analysiert. Die gewählten Einstellungen sind in Tab. 11 und Tab. 12 dargestellt. Alle massenspektrometrischen Messungen und Analysen wurden von Dr. Michael Reinartz (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie) durchgeführt.

Tab. 11: Gewählte Einstellungen zur Analyse der Fragmentierungsspektren (*SEQUEST*-Analyse)

Enzym	Trypsin
Massengenauigkeit der Vorläuferionen	10 ppm
Modifikationen	Methionin-Oxidation (variabel); Cystein-Carbamidomethylierung; Phosphorylierung von Serin, Threonin, Tyrosin (variabel), bei SILAC-Experimenten: Lysin/Arginin
Delta CN	0,1
<i>Cross-correlation-Score vs. Charge state</i>	1,5; 2,0; 2,5; 3,0 für einfach, zweifach, dreifach, vierfach geladene Ionen
Peptidwahrscheinlichkeit	0,05
Nummer der Haupttreffer	1

Tab. 12: Gewählte Einstellungen zur Analyse mit MaxQuant

Enzym	Trypsin
Modifizierte Aminosäure	Methionin-Oxidation (variabel); Cystein-Carbamidomethylierung; Lysin (N-Terminal; siehe 2.10.2)
MS/MS (Orbitrap) erste Suche	20 ppm
MS/MS (Orbitrap) zweite Suche	6 ppm
MS/MS (Iontrap)	0,5 Da
<i>peptide false discovery rate</i>	0,01
<i>protein false discovery rate</i>	0,01
min Peptidlänge	6 As
min Score	60 (DML-Herzen)

2.12 verwendete Mausstämme

In dieser Arbeit wurden Mäuse des Stammes FVB/N sowie C57Bl/6 verwendet und in den Tierställen der Tierversuchseinrichtung der Universität Düsseldorf gehalten. Die Tiere hatten offenen Zugang zu Futter und Wasser. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt.

2.12.1 Herstellung der transgenen Akt N-TAG Mäuse

Zur Untersuchung der Akt-isoformenspezifischen Proteininteraktion in Kardiomyozyten wurden transgene Akt1 N-Tag bzw. Akt2 N-Tag Mauslinien (Stamm FVB/N) hergestellt, welche die jeweilige getaggte Akt-Isoform zusätzlich zur endogenen Akt-Isoform spezifisch im Herzen exprimierten. Die transgenen Mäuse wurden basierend auf den in dieser Arbeit hergestellten α -MHC Akt-N-TAG Konstrukten mittels Pronukleusinjektion erzeugt (Tab. 9). Bei der Pronukleusinjektion wird freie cDNA zur Erzeugung des Transgens in den Vorkern befruchteter Eizellen injiziert. Diese Eizellen werden anschließend pseudoträchtigen Ammenweibchen implantiert. Nach erfolgreicher Integration der cDNA in das Genom entwickeln sich transgene hemizygot F0-Tiere. Pronukleusinjektion, Oocytentransfer sowie Genotypisierung der F0 wurde von der PolyGene Transgenetics AG in der Schweiz durchgeführt.

2.12.2 Genotypisierung der transgenen Akt N-TAG Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien. Diese wurden über Nacht bei 55°C in Proteinase K Puffer inkubiert und die Proteine mittels Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol gefällt und bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 10mM Tris (pH 7,8), 1 mM EDTA und 10 µg/ml RNase gelöst. Die Identifizierung positiver Tiere erfolgte über Primer, welche spezifisch in der Polyadenylierungsregion (hgh-Region) der genomischen Akt N-TAG Sequenz binden (Tab.7).

2.12.3 Ubiquitäre und konditionale Akt Knock Out (KO) Mäuse

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit sich das Fehlen einer Akt-Isoform auf die Herzfunktion auswirkt. Dazu wurden ubiquitäre Akt1 und Akt2 KO Mäuse genutzt, denen jeweils eine Isoform vollständig fehlte. Im weiteren Verlauf der Arbeit kamen konditionale Akt1-KO Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischen Hintergrund (induzierbare kardiomyozytenspezifische Akt1-KO's: ICM KO1) hinzu. Zur Erzeugung dieser Tiere wurden zwei unterschiedliche Rekombinasesysteme genutzt. Das FRT/Flp-System stammt aus der Hefe, wobei die Rekombinase Flp FRT-Elemente (*Flp recognition target*) erkennt und diese gezielt deletiert (Broach and Hicks, 1980). Im Cre/loxP-

Material und Methoden

Rekombinasesystem katalysiert das Enzym Cre (*causes recombination*) die Rekombination zwischen zwei loxP-Elementen (*locus of crossing over*) (Sauer and Henderson, 1988). Die Erzeugung der KO Mäuse basiert auf Akt1- und Akt2-Austauschvektoren. Im Akt1-Austauschvektor werden die Exons 6 und 7; im Akt2-Austauschvektor die Exons 5 und 6, welche jeweils für die ATP-Bindestelle des Proteins kodieren, von jeweils zwei loxP Elementen flankiert. Für die Selektion positiver ES- (embryonale Stammzellen) Zellen befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft ein Neomycin Resistenzgen, welches von zwei FRT-Elementen flankiert wird. Die Herstellung der Austauschvektoren basiert auf der Arbeit von Annika Raupach (Raupach, 2010). Positive ES Zellen wurden mittels Mikroinjektion in Blastozysten des Stammes C57Bl/6 injiziert und scheinchwangeren Leihmüttern implantiert. Chimäre Nachkommen konnten anhand der Fellfarbe identifiziert werden. Die Chimären wurden mit Tieren des Stammes C57Bl/6 verpaart. Bei erfolgreicher Keimbahntransmission konnten transgene F1-Nachkommen über eine agouti-Färbung des Fells identifiziert werden. Diese wurden mit FLP-Rekombinase Mäusen verpaart, um das Neomycin Resistenzgen zu deletieren. Die Entstehung der ubiquitären Akt-KO Mäuse gründete sich nun auf eine weitere Verpaarung mit Cre/loxP-Rekombinase Mäusen, um die mit loxP flankierten Exons im Akt-Genlocus zu deletieren.

Für Herstellung der induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt1-KO Mäuse (ICM KO1) wurde ebenfalls das Cre/loxP Rekombinase System genutzt. Hierfür wurden homozygote „geflochte“ Nachkommen mit einer α -MHC mer-Cre-mer Mauslinie verpaart, in denen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen α -MHC-Promotors exprimiert wird. Die Rekombinase ist mit einer mutierten Ligandenbindungs-Domäne (mer: *mutated estrogen receptor*) des Östrogenrezeptors fusioniert und verbleibt daher inaktiv im Zytoplasma. Erst durch Applikation des Östrogen-Antagonisten 4OH-Tamoxifen (OHTX), welcher ein Ligand der mer ist, kann die Cre-Rekombinase in den Kern translozieren, was eine zeitlich kontrollierbare Induktion des KO durch OHTX erlaubt. Zur Induktion des ICM wurde den Tieren im Alter von drei Monaten über einen Zeitraum von fünf Tagen je 50 μ g OHTX gelöst in 100 μ l Erdnussöl i.p. gespritzt.

4OH-Tamoxifen (OHTX): 0,5 mg/ml Erdnussöl

2.13 Phänotypisierung der transgenen Mäuse

2.13.1 Maus-Echokardiographie

Die Echokardiographie ist eine nichtinvasive Methode zur Untersuchung der Herzfunktion und -anatomie in vivo. Der Methode basiert auf der Tatsache, dass Ultraschallwellen in biologischen Geweben mit verschiedener akustischer Impedanz unterschiedlich stark reflektiert werden. Der Ultraschallkopf enthält piezoelektrische Kristalle, welche sich über das Anlegen einer elektrischen Wechselfspannung verformen und Schallwellen generieren. Er dient gleichzeitig als Sender und Empfänger. Die reflektierten Schallwellen werden wiederum in elektrische Signale umgewandelt und in unterschiedlichen Graustufen dargestellt. Deren Helligkeit ist dabei abhängig von der Amplitude der reflektierten Schallwellen. So erscheinen Gewebe mit hoher akustischer Impedanz hell, echoarme Gewebe bzw. Flüssigkeiten dunkel. Die Untersuchungen wurden mit einem hochauflösenden Ultraschall Gerät (Vevo2100; VisualSonics) und einem 18-38 MHz Schallkopf (MS 400; VisualSonics) durchgeführt. Vor jeder echokardiographischen Untersuchung wurden die Mäuse gewogen. Dies diente zum einen dazu, die Narkosestärke für das jeweilige Tier besser abschätzen zu können, sowie für die Berechnung des Herz-Körpergewicht Indexes. Zur Durchführung der Untersuchung wurden die Mäuse mit 3 % Isofluran (Actavis) in einer Narkosebox narkotisiert. Die Einleitung der Narkose dauerte ca. 2 Minuten. Die Narkoseerhaltung erfolgte bei etwa 1,5-2 % Isofluran und 0,5 L/min reinem Sauerstoff über eine spezielle Atemmaske. Während der Untersuchung wurde die Maus in Rückenlage auf einem speziellen Multifunktionstisch (*Vevo Mouse Handling Table*, VisualSonics) gelagert. Der Multifunktionstisch enthielt eine Wärmeplatte zur Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C und verfügte außerdem über Elektroden für die Ableitung eines Elektrokardiogramms, sowie für die Erfassung der Atemfrequenz. Die Vitalfunktionen der Maus wurden während der Untersuchung ständig überwacht und konstant gehalten. Um reproduzierbare Messparameter zu garantieren, wurde eine Herzfrequenz bei 400 ± 50 Schlägen/min, sowie eine Atemfrequenz von ca. 100-120 Atemzüge/min aufrechterhalten. Der Thorax der Maus wurde mit einem Rasierer (Wella) enthaart, um das auf 37°C vorgewärmte Ultraschallgel (Eco Gel 100, Canada) auftragen zu können. Danach wurde mit der Untersuchung begonnen und folgende Einstellungen zur späteren Auswertung gespeichert: parasternale lange Achse (PSLA) des linken Ventrikels (LV) in B-Mode und M-Mode sowie parasternale kurze Achse (SAX) des LV in B- und M-Mode. Dabei dienten die B-Mode Aufnahmen der Bestimmung

der enddiastolischen (EDV) und endsystolischen (ESV) Volumina und M-Mode Aufnahmen der Bestimmung der linksventrikulären Masse (LV Masse).

PSLA B-Mode:

Der B-Mode (Brightness Mode) zeigt ein zweidimensionales Bild der im Ultraschallstrahl liegenden Strukturen und ermöglicht die Darstellung der Herzfunktion in Echtzeit. Dabei wird dem von der Gewebestruktur reflektiertem Echo ein Helligkeitswert zugeordnet, der die akustische Impedanz (Schalleitfähigkeit eines Mediums) der Struktur wiedergibt. Für diese Einstellung wurde der Tisch mit der Maus leicht nach rechts unten abgekippt und der Schallkopf parallel zur langen Herzachse links parasternal positioniert. Der LV sollte so angeschnitten werden, dass der Apex links im Bild und die Aorta am rechten Bildrand zu sehen war. Sichtbare Strukturen waren das Lumen des LV, die Aorta, das interventrikuläre Septum (IVS) sowie die linksventrikuläre posteriore Wand (LVPW). Außerdem erkennt man den linken und rechten Vorhof. (Abb. 7).

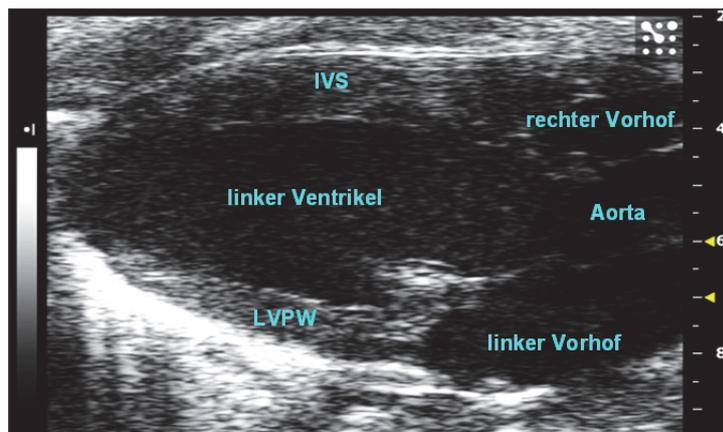


Abb. 7: Darstellung der PSLA des LV im B-Mode. Sichtbare Strukturen sind das Lumen des LV, interventrikuläres Septum (IVS), linksventrikuläre posteriore Wand (LVPW), linker und rechter Vorhof, Aorta.

SAX B-Mode:

Für die Darstellung der kurzen Achse wurde der Schallkopf aus der PSLA-Position midventrikulär um 90° im Uhrzeigersinn gedreht, so dass die Papillarmuskeln der hinteren und vorderen Wand am rechten Bildrand lagen und das IVS, und ein Teil des rechten Ventrikels links im Bild erschienen. Weiterhin erkennt man in dieser Einstellung die linksventrikuläre anteriore Wand (LVAW) (Abb. 8).

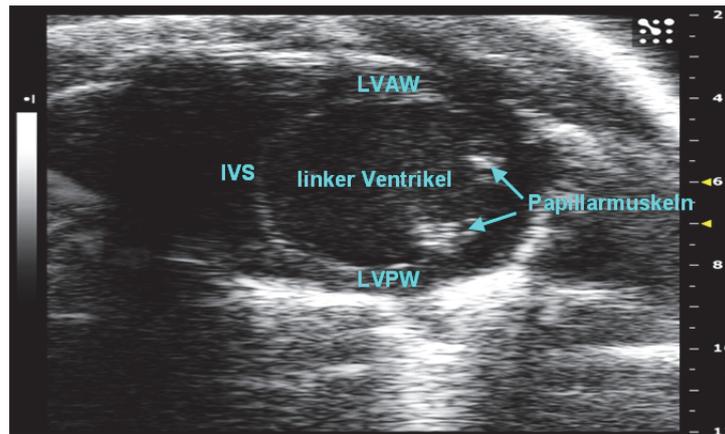


Abb. 8: Darstellung der SAX (midventrikulär): Zu sehen sind die beiden Papillarmuskeln, die linksventrikuläre anteriore Wand (LVAW), IVS und LVPW.

Die B-Mode Aufnahmen der kurzen Achse dienen dazu, die Volumenberechnung mittels der Simpson-Methode, auch Scheibchensummationsmethode genannt, zu berechnen. Diese Art der Volumenbestimmung bietet den Vorteil, die Geometrie des Ventrikels genau zu erfassen (Parisi et al., 1979). Das Volumen des LV wird bei dieser Methode aus der Summe von Zylindern berechnet. Dafür wurde zunächst die Länge des LV bestimmt und von der Mitte ausgehend Übersichtsaufnahmen in Systole und Diastole im Abstand von je 1/3 Länge in Richtung Apex und Basis angefertigt. Die endokardialen Grenzen wurden mit dem Trace Tool der Vevo Auswerte Software (VisualSonics) markiert und die Querschnittsflächen über die Vevo Software berechnet.

Formeln zur Berechnung des EDV und ESV mittels der Simpson Methode:

$$\text{LV EDV } (\mu\text{l}) = (A;d \text{ basal} * L/3) + (A;d \text{ mitte} * L/3) + (A;d \text{ apical} * L/3)$$

$$\text{LV ESV } (\mu\text{l}) = (A;s \text{ basal} * L/3) + (A;s \text{ mitte} * L/3) + (A;s \text{ apical} * L/3)$$

A;d = Flächeninhalt Diastole

A;s = Flächeninhalt Systole

L = Ventrikellänge

EDV und ESV wurden zur Berechnung folgender systolischen Funktionsparameter des LV benötigt:

- Schlagvolumen (SV) (μl) = EDV - ESV
- Ejektionsfraktion (EF) (%) = $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} * 100$
- Herzzeitvolumen (HZV) (ml/min) = SV * Herzfrequenz

M-Mode:

Der M-Mode (Motion Mode) ist eine eindimensionale Messung. Der Schallkopf erzeugt hier einen einzigen Ultraschallstrahl mit hoher Pulsrepetitionsfrequenz und somit einer hohen zeitlichen Auflösung. Dies ermöglicht eine Darstellung der kardialen Wandbewegung

Material und Methoden

während Systole und Diastole in Echtzeit. Der M-Mode in PSLA erfasst die Wandbewegungen des IVS sowie der LVPW, der M-Mode in SAX erfasst die Wandbewegungen der LVAW und LVPW. Für den M-Mode wird der Positionsmarker mittig auf dem Lumen des LV plziert. Für eine korrekte Messung der Wanddicke musste vor allem darauf geachtet werden, dass der Ultraschallstrahl senkrecht auf den Wänden steht, da dies sonst zu einer Überschätzung der Wanddicken führt. Der M-Mode wurde für die Bestimmung der LV Masse durchgeführt, wobei die Werte aus PSLA und SAX eines Herzens gemittelt wurden. Für die Berechnung der LV Masse durch die Vevo Software wurden die Wände mit dem Trace Tool über mehrere Herzzyklen markiert (Abb. 9).

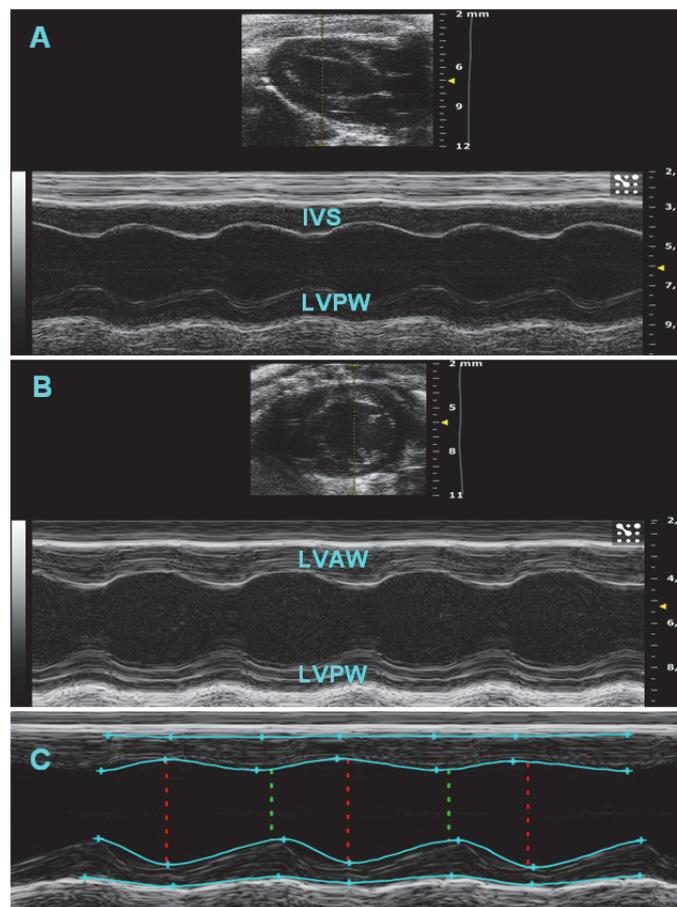


Abb. 9: PSLA und SAX im M-Mode. A: Der M-Mode in der PSLA detektiert die Wandbewegung des IVS und der LVPW. B: Im M-Mode der SAX werden die Wandbewegungen der LVAW und der LVPW gemessen. C: Beispielhafte Darstellung eines Trace der Wandbewegung des IVS und der LVPW zur Berechnung der LV-Masse mit Hilfe der Vevo Auswerte-Software.

Formel zur Berechnung der LV Masse:

$$\text{LV Masse (mg)} = 1.053 \times 0,8 \left(\text{Durchmesser Ventrikelwand in Diastole} \right)^3 - \left(\text{Durchmesser Ventrikellumen in Diastole} \right)^3$$

Alle angegebenen Formeln sind der Formelsammlung des Vevo 2100 Imaging System Operator Manuals entnommen und werden international verwendet.

2.13.2 Vevo Strain

Die in 2.13.1 beschriebene konventionelle echokardiographische Untersuchung ermöglicht die Analyse der globalen kontraktiven Funktion des LV u.a. mittels Bestimmung der EF und des HZV. Eine Limitation dieser Methode liegt darin, dass lokale Störungen der Wandbewegung nicht zwangsläufig detektiert werden, da sie von anderen Segmenten der Wand kompensiert werden können. Bei Vevo Strain handelt es sich um eine Auswertesoftware der Firma VisualSonics (VisualSonics Inc.), die es ermöglicht u.a. die myokardiale Wandbewegung und Deformation des LV zu quantifizieren. Die Methode basiert auf der Verfolgung von Mustern einzelner Bildpunkte während des Herzzyklus in zweidimensionalen B-Mode Echobildern (Perk et al., 2007). Für die Analyse wurden die endo- und epikardialen Grenzen des LV in der langen Achse in drei aufeinander folgenden Herzzyklen markiert. Der LV wird dann von der Software automatisch in sechs Segmente unterteilt (Abb. 10). Hierauf basierend erlaubt die Software u.a. die Messung und Quantifizierung der Deformation (Strain) des Myokards während des Herzzyklus in den einzelnen definierten Wandsegmenten. Strain beschreibt dabei den Grad der lokalen Deformation der einzelnen Wandsegmente in Prozent der Ursprungslänge:

$$\text{Strain} = (L - L_0) / L_0$$

L = Endlänge, L_0 = Ausgangslänge

Hierdurch kann eine aktive Verformung sowie deren Ausmaß in einem einzelnen Segment bestimmt werden und von einer passiven Bewegung durch Kontraktion in anderen Segmenten unterschieden werden (Dandel et al., 2009). In der radialen Ebene wird die Zunahme der Wanddicke des Segments in Systole gemessen, somit sind die ermittelten Parameter positiv. In der longitudinalen Ebene wird die Verkürzung des Segments ermittelt, daher sind die errechneten Werte negativ (Ram et al., 2011).

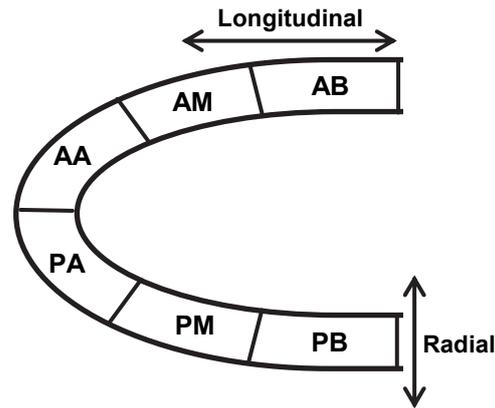


Abb. 10: Schematische Darstellung des LV in der langen Achse. Zur Beurteilung der regionalen Deformation wird der LV von der Vevo Software in sechs Segmente unterteilt: Anterior Basis (AB), Anterior Mitte (AM), Anterior Apex (AA), sowie Posterior Apex (PA), Posterior Mitte (PM) und Posterior Basis (PB). In dieser Darstellung können die longitudinale und radiale Deformation des Gewebes erfasst werden (Abb. verändert nach Rashmi et al. 2011).

2.13.3 Isoproterenol-induzierte kardiale Hypertrophie

Isoproterenol ist ein synthetischer β -Adrenorezeptor-Agonist. An den Zellen des Vorhof- und Kammermyokards vermittelt es seine Wirkung vornehmlich über die Stimulation von β_1 -Adrenorezeptoren. Die damit verbundene Aktivierung der Adenylatzyklase führt zur Steigerung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Hierdurch wird u.a. die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche über eine Phosphorylierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Membran deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht. Der vermehrte Ca^{2+} -Einstrom nach Depolarisation bewirkt eine Steigerung der Kontraktionskraft und -geschwindigkeit der Herzmuskelzellen und wird als positive Inotropie bezeichnet. Die PKA phosphoryliert ebenfalls das Regulatorprotein Phospholamban der Ca^{2+} -ATPase (Serca) im sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dies führt zu einer Steigerung der Serca-Aktivität und einer damit verbundenen Erhöhung der Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen, was als positive Lusitropie bezeichnet wird. An den Zellen des Sinusknotens und des AV-Knotens des Erregungsbildungs und -leitungssystems wirkt Isoproterenol positiv chronotrop und dromotrop und erhöht somit Herzfrequenz und AV-Knoten Überleitungszeit. Eine chronische Applikation von Isoproterenol ist eine etablierte Methode zur Induktion kardialer Stressmodelle, da es Hypertrophie und Herzinsuffizienz induzieren kann (Rockman et al., 2002). Die konstante Applikation von Isoproterenol (Sigma) wurde über osmotische Minipumpen (alzet, Modell 1002) gewährleistet. Die Minipumpen bestehen aus einer äußeren semipermeablen Membran, einem darunterliegenden Salzmantel,

sowie einem Füllreservoir welches von einer impermeablen Membran umschlossen ist. Durch Osmose kann Körperflüssigkeit über die semipermeable Membran zum Salzmantel gelangen. Die damit verbundene Druckzunahme auf das Füllreservoir gewährleistet einen kontinuierlichen Ausfluss von Isoproterenol über einen Flussregulator nach außen. Für die Induktion der kardialen Hypertrophie wurden Dosierungen von 6,6 und 14 µg Isoproterenol in 0,9 % NaCl mit 5 mM Ascorbinsäure /g Mausgewicht /Tag gewählt. Die Pumprate betrug 0,25 µl/h. Damit wurden pro Tag 6 µl der entsprechenden Konzentration an Isoproterenol über einen Zeitraum von 14 Tagen kontinuierlich abgegeben. Vor Implantation der Pumpen wurden die Mäuse gewogen und die Pumpen entsprechend befüllt. Die Narkose erfolgte mittels Isofluran. Die ca. 1 cm großen Pumpen wurden durch einen kleinen Hautschnitt am oberen Rücken subkutan eingesetzt und der Hautschnitt anschließend vernäht.

2.13.4 Präparation von Herz und Lunge

Im Anschluss an die Echountersuchungen wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und das Herz sowie der rechte und linke Lungenflügel entnommen. Beim Herz wurden die Vorhöfe abgetrennt und sowohl Herz als auch Lunge gewogen. Die Lunge wurde über Nacht bei ca. 60°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend nochmals gewogen, was zur Ermittlung der Ratio des Feucht/Trockengewichts der Lunge diente. Die Herzen wurden für histologische Untersuchungen in wasserlöslichem Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue Tek, Leica) eingebettet und bei – 80°C weggefroren.

2.14 Histologische Methoden

2.14.1 Anfertigung histologischer Gewebeschnitte der Herzen

Zum Anfertigen der 10 µm dicken Schnitte mussten die Proben bei einer Temperatur von minus 20°C mit Hilfe eines Mikrotoms angetrimmt werden. Die Schnittebene lag horizontal bzw. vertikal zur langen Herzachse und erfolgte möglichst mittig, so dass linker und rechter Ventrikel sichtbar waren. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel auf Objektträger aufgebracht, mit einem Fön getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C auf Trockenperlen (Merck) gelagert.

2.14.2 DAPI Kernfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6 - Diamidin - 2 - phenylindol) markiert Doppelstrang-DNA durch Interkalation in die kleine Furche. Die Anregungswellenlänge liegt im Bereich von 350 – 370 nm und die Emission im sichtbaren blauen Bereich bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Kernfärbung erfolgte mittels des gebrauchsfertigen Eindeckmediums *ProLongGold Antifade Reagent* (Invitrogen), welches den Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthielt.

2.14.3 Siriusrot-Färbung

Die Färbung diente der Darstellung des interstitiellen Kollagengehaltes im Myokard. Der Farbstoff Picro-Siriusrot verstärkt die natürliche Doppelbrechung von kollagenen Bindegewebsfasern indem er in diese interkaliert (Puchtler et al., 1973). Nach der Färbung erscheinen kollagene Fasern rot, das Myokard hingegen gelblich. Die histologischen Schnitte wurden hierzu zunächst mit einer 3 % igen Formaldehydlösung für 10 min fixiert. Hiernach konnte die Formaldehydlösung verworfen und die Schnitte je 3 x für 10 min mit aqua dest. gewaschen werden. Die Siriusrot - Färbelösung enthielt 0,1 g Direct Red 80 (Sigma) welches in 100 ml 1,3 % Pikrinsäure (Sigma) gelöst wurde. Die Schnitte wurden für 1 min bei Raumtemperatur mit der Färbelösung inkubiert um eine optimale Färbung zu erhalten. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs diente ein kurzer Waschschriff mit 0,5 % iger Essigsäure. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Hier wurde zunächst für je 1 min mit 80 % igem und dann mit 90 % igem Ethanol inkubiert und die Schnitte anschließend für je 10 min in 100 % Ethanol eingetaucht. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte für 1 min in Xylol eingelegt, mit speziellem Einbettmedium (Eukitt; Kindler) versehen.

2.14.4 Weizenkeimagglutinin und CD 31 - Färbung

Für die Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche musste die Zellmembran spezifisch angefärbt werden. Weizenkeimagglutinin (WGA) ist ein Lektin-Dimer mit der Eigenschaft an N-Acetylglucosamin-Reste zu binden. In dieser Arbeit wurde FITC - gekoppeltes WGA (Sigma) verwendet. Die Darstellung der Kapillaren zur Bestimmung der Kapillarisdichte des Myokards erfolgte über einen endothelspezifischen CD 31 - Antikörper (Pharmingen). Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Zamboni-Fixativ (4% Paraformaldehyd + 15% Pikrinsäure in PBS pH 7,4) inkubiert und anschließend je 3 x 10

min mit PBS gewaschen. Blockiert wurde mit 10 % Ziegen Serum in PBS und 0,2 % Saponin für 1 h bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper CD-31 wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 0,2 % Saponin und 2 % Ziegen Serum angesetzt und bei 4° über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff für je 3 x 10 min mit 0,2 % Saponin in PBS. Der Sekundärantikörper gegen CD 31 (Dianova) wurde in einer Verdünnung von 1:400 in PBS mit 0,2 % Saponin und 2 % Ziegen Serum eingesetzt und zusammen mit WGA-FITC (Sigma) für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde je 3 x 10 min mit PBS und 0,2 % Saponin gewaschen, wobei der letzte Waschschriff ohne das Detergenz Saponin erfolgte. Im Anschluss konnten die Schnitte mit *ProLongGold Antifade Reagent* (Invitrogen) eingedeckt und die Ränder mit Nagelack versiegelt werden.

2.14.5 Fluoreszenzmikroskopie

Detektion und Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Keyence). Für die Auswertung wurde pro Schnitt jeweils eine Übersichtsaufnahme angefertigt und Areale im linken Ventrikel sowie im Septum gewählt, in denen die Kardiomyozyten quer angeschnitten waren. Für die Bestimmung der Zellquerschnittsfläche sowie der Kapillarisdichte wurden jeweils fünf geeignete Areale mit einer Größe von je 0,1 mm² markiert und im roten bzw. grünen Kanal mit dem 20 x Objektiv aufgenommen. Die Analyse erfolgte innerhalb der gewählten Areale mit Hilfe der BZ-II-Analyzer Software (Keyence).

2.14.6 Enzymatische Isolierung adulter Maus-Kardiomyozyten

Zur Präparation wurden männliche, 10 Wochen alte C57Bl6 Mäuse verwendet. Alle verwendeten Puffer wurden steril filtriert, vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt und mit O₂ begast. 10 min nach Heparinisierung mit 250 µl 378 I.E. Heparin i.p. (300 µl Heparin in 1 ml NaCl) wurde das Herz entnommen, in Perfusionspuffer von Lunge und Geweberesten frei präpariert und sofort an die Langendorffapparatur gehängt. Die Perfusion erfolgte bei einem konstanten Druck von 3 ml/min retrograd durch die Aorta. Zunächst wurde das Herz für 4 min mit Perfusionspuffer gespült um verbliebenes Blut aus den Koronarien zu spülen. Der enzymatische Verdau erfolgte mit Kollagenase-Verdaupuffer für ca. 8 min bis das Gewebe eine blasse Farbe annahm. Anschließend konnte das Herz von der Langendorffapparatur abgenommen werden. Die Vorhöfe wurden entfernt, das Herz in 2,5 ml Kollagenase-

Material und Methoden

Verdaupuffer mit einem Skalpell (Feather) zerkleinert und das Lysat durch vorsichtiges auf- und ab-pipettieren weiter homogenisiert. Das Homogenat konnte nun in ein 15 ml Falcon überführt werden. Der Kollagenase-Verdau wurde durch Zugabe von 2.5 ml Stop-Puffer 1 beendet und die Kardiomyozyten für weitere 3 min durch auf- und ab-pipettieren weiter vereinzelt. Im Anschluss daran erfolgte eine Qualitätskontrolle der isolierten Kardiomyozyten. Dazu wurde das prozentuale Verhältnis vitaler stäbchenförmiger Kardiomyozyten im Gesamthomogenat bestimmt, welches bei über 60 % liegen sollte. Nach Sedimentation der Zellen für 8 min wurde der Überstand für 2 min bei 180 x g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Stop-Puffer 2 resuspendiert und wieder mit dem Sediment vereinigt. Danach wurde mit dem Calcium-Wiedereinstieg begonnen, der den zuvor ausgewaschenen Ca^{2+} -Spiegel der Zellen schrittweise erhöht. Hierfür wurden die Kardiomyozyten für je 4 min mit 50 μl 10 mM, 100 μl 10 mM, 30 μl 100 mM und 50 μl 100mM CaCl_2 inkubiert. Nach erneutem Sedimentieren der Zellen erfolgte ein Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt, auf mit Laminin beschichtete 8x Chamberslides (Sigma) ausgesät und zum Absetzen für 1 h in den Brutschrank gestellt.

1x Stock Perfusionspuffer

135 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
0,6 mM	KH_2PO_4
0,6 mM	NaH_2PO_4
1,2 mM	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
10 ml	Hepes
ad 1L Millipore H ₂ O; Lösung sterilfiltrieren	

Perfusionspuffer; pH 7,4

490 ml	1x Stock Perfusionspuffer
10 mM	2,3-Butanedionemonoxime
5,5 mM	Glukose

Kollagenase-Verdaupuffer

50 ml	1x Stock Perfusionspuffer
50 mg	Collagenase (Biochrom)
6,25 μl	CaCl_2

Stop-Puffer 1

9 ml	1x Stock Perfusionspuffer
1 ml	FCS
12,5 µl	CaCl ₂

Stop-Puffer 2

28,5 ml	1x Stock Perfusionspuffer
1,5 ml	FCS
37,5 µl	CaCl ₂

Kulturmedium Kardiomyozyten

490 ml	Minimum essential medium (MEM, Gibco)
500 µl	BSA
5 ml	Penicillin
5 ml	Glutamaxx (Sigma)

2.15 PLA (Proximity Ligation Assay)

Die PLA-Methode erlaubt die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in situ* (Soderberg et al., 2006). Der Assay basiert auf spezifischen Antikörpern, welche eine Detektion der Komplexbildung von Proteinen erlaubt, die im Mikroskop analysiert und quantifiziert werden kann. Hierbei binden spezifische, aus verschiedenen Spezies stammende Primärantikörper die potentiellen Interaktionspartner. An diese können wiederum spezielle Oligonukleotid-gekoppelte sekundäre Antikörper (PLA-Proben) binden. Durch Zugabe von zwei spezifischen Oligonukleotiden können die DNA-Sequenzen der sekundären Antikörper miteinander verbunden werden, vorausgesetzt die untersuchten Proteine befinden sich in direkter Nähe zueinander (< 40 nm, Angabe des Herstellers). Die Oligonukleotide werden ligiert, dienen im nächsten Schritt der DNA-Polymerase als Matrize und können nun nach dem Rolling Circle Prinzip amplifiziert werden. Nach der Amplifikation können fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide an das Amplifikat binden und erlauben so eine Detektion des Proteinkomplexes im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 11). Der PLA-Assay (Olink Bioscience) wurde nach Herstellerangaben auf HEK293T Zellen und isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden $1,5 \times 10^4$ HEK293T Zellen auf eine mit Fettstift (*Liquid Blocker*, Sigma) gezeichnete $0,25 \text{ cm}^2$ große Kreisfläche auf einem Objektträger ausplattiert und über Nacht im Brutschrank gehalten, um eine Adhäsion an den Objektträger zu gewährleisten. Die adulten Maus-Kardiomyozyten wurden für den Ansatz in einer Dichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen pro well auf 8 x Chamberslides ausgesät. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Die Fixierung der

Zellen erfolgte für 10 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd in PBS. Danach erfolgten drei weitere Waschschrte mit PBS für 10 min bei RT. Die fixierten Zellen wurden mit 0,2 % Saponin in PBS 10 min inkubiert um sie zu permeabilisieren. Die verwendeten Primärantikörper wurden mit dem *Antibody Diluent* des Duolink-Systems verdünnt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Der weitere Ablauf des Protokolls erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

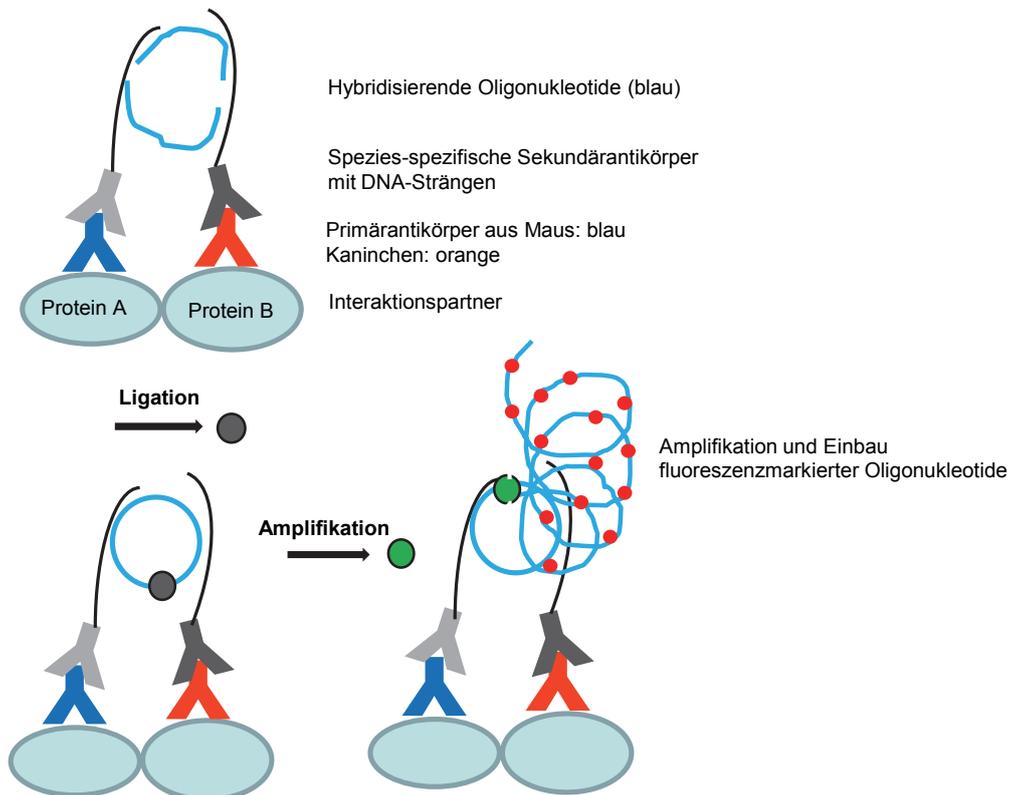


Abb. 11: Prinzip des PLA

Verdünnungen und Spezies der verwendeten Antikörper:

HEK293T: Phgdh (Rabbit; Thermo #PA5-27578) 1:100, ATP5A1 (Rabbit; proteintech #14676) 1:300, Akt1 (Maus; Cell Signaling #2967) 1:200.

Maus-Kardiomyozyten: Phgdh (Rabbit; Thermo # PA5-27578) 1:100, ATP5A1 (Rabbit; proteintech # 14676) 1:200, Akt1 (Maus; Cell Signaling #2967) 1:300.

PLA Proben: Duolink II PLA-Probe α -Kaninchen PLUS, Duolink II PLA-Probe α -Maus MINUS

Detektionsreagenz: Duolink II Rot (λ_{exc} 594 nm, λ_{em} 624 nm)

2.16 verwendete Computerprogramme und Software

Microsoft Office 2010, Vevo2100 Auswerte-Software (VisualSonics), Geneious (Geneious Pro 5.4.2), GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.), Odyssey 3.0 (Licor Biosciences), BZ-II-Analyzer Software (Keyence), MaxQuant 1.3.0.5, Bioworks (Thermo Scientific).

2.17 Statistik

Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test (mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche) oder 2-Wege-Varianzanalyse (2-Wege ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni Post-hoc-Test bestimmt. Die Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP) von Akt1 Interaktionspartnern in HEK293T Zellen

Zur Untersuchung der Akt-spezifischen Signaltransduktion sollten Akt assoziierte Proteinkomplexe über die TAP isoliert werden, um diese anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) zu analysieren. Da dies in unserem Institut bereits für die getaggte Akt2-Isoform gelungen war, wurde nun auch gezielt nach Interaktionspartnern für Akt1 gesucht (Bottermann et al., 2013). Die Methode wurde zunächst in HEK293T Zellen etabliert. Dafür wurde die murine Akt1 cDNA N-terminal mit einem 8 kDa großen HA/StrepII/Flag-TAG (N-TAG) versehen und mittels lentiviraler Transfektion stabil exprimiert. Der StrepII/Flag-TAG erlaubte hierbei eine Aufreinigung der rekombinanten Akt-Isoformen in zwei Schritten unter nativen Bedingungen zunächst über eine α -Flag und dann eine Strep-Tactin Sepharose-Säule. Das Strep-Tactin-Eluat wurde durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und die Proteine durch eine Silberfärbung visualisiert. Die gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und die Proteine isoliert. Durch eine anschließende Trypsinspaltung wurden Peptide gewonnen, die im Massenspektrometer (MS) analysiert und nach einer Datenbankrecherche identifiziert werden konnten (Abb. 12).

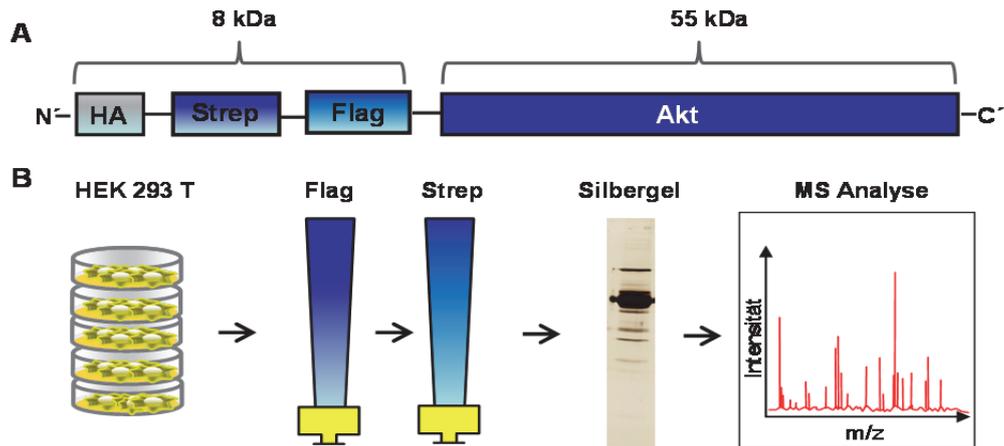


Abb. 12: Schematische Darstellung des TAP-Protokolls. Am N-Terminus getaggetes Akt1 Fusionsprotein (Akt1 N-TAG). Der 8 kDa umfassende TAP-TAG enthält HA-, StrepII-, sowie einen Flag-TAG. Für die Affinitätsreinigung wurden StrepII- und Flag-TAG benötigt (A). Im ersten Aufreinigungsschritt wurde das Zelllysate auf eine Flag-Säule geladen. Das rekombinante Akt1 N-TAG Protein bindet an die Säule und kann über kompetierendes Flag-Peptid eluiert werden. Das Flag-Eluat kann nun im zweiten Aufreinigungsschritt an die Strep-Tactin Säule (Strep) binden. Die Elution erfolgte mit Biotin. Anschließend wurde das Strep-Tactin-Eluat über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung Akt1 N-TAG sowie die koeluierten Proteine visualisiert. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel isoliert, für die MS-Analyse aufgearbeitet und mittels Datenbankrecherche identifiziert (B). (m/z: Masse/Ladung).

3.1.1 Akt1 N-TAG Konstrukt für HEK293T Zellen

Als Grundvektor für die stabile Expression diente, wie unter 2.4.1 beschrieben, das Plasmid CAGGS-Akt1 N-TAG. Zur Selektion lentiviral infizierter Zellen wurde dem Grundvektor der Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor mit Puromycin-Resistenzgen (Puro) hinzugefügt. Die PGK-Puro-Kassette entstammte dem Vektor pSico PGK-Puro und wurde durch Restriktion mit BsrGI isoliert (Abb. 13 A), um anschließend in den Grundvektor integriert zu werden, wozu dieser ebenfalls mit BsrGI geöffnet wurde (nicht gezeigt). Der entstandene Expressionsvektor wurde CAGGS-Akt1N-TAG-Puro genannt (Abb 13 B). Die diagnostische Restriktionsanalyse des Expressionsvektors erfolgte mit AgeI und BsrGI und zeigte den Einbau des Fragmentes in der richtigen Orientierung. In der linken Spur des Agarosegels ist der ungeschnittene, 11794 bp große Expressionsvektor dargestellt. Bei Einbau der PGK-Puro-Kassette in richtiger Orientierung entsteht nach AgeI-Restriktion ein 559 bp großes Fragment. Die Restriktion mit BsrGI zeigt die Fragmentgröße der PGK-Puro-Kassette von 1357 bp (C). Abschließend erfolgte die Überprüfung der Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung (nicht gezeigt).

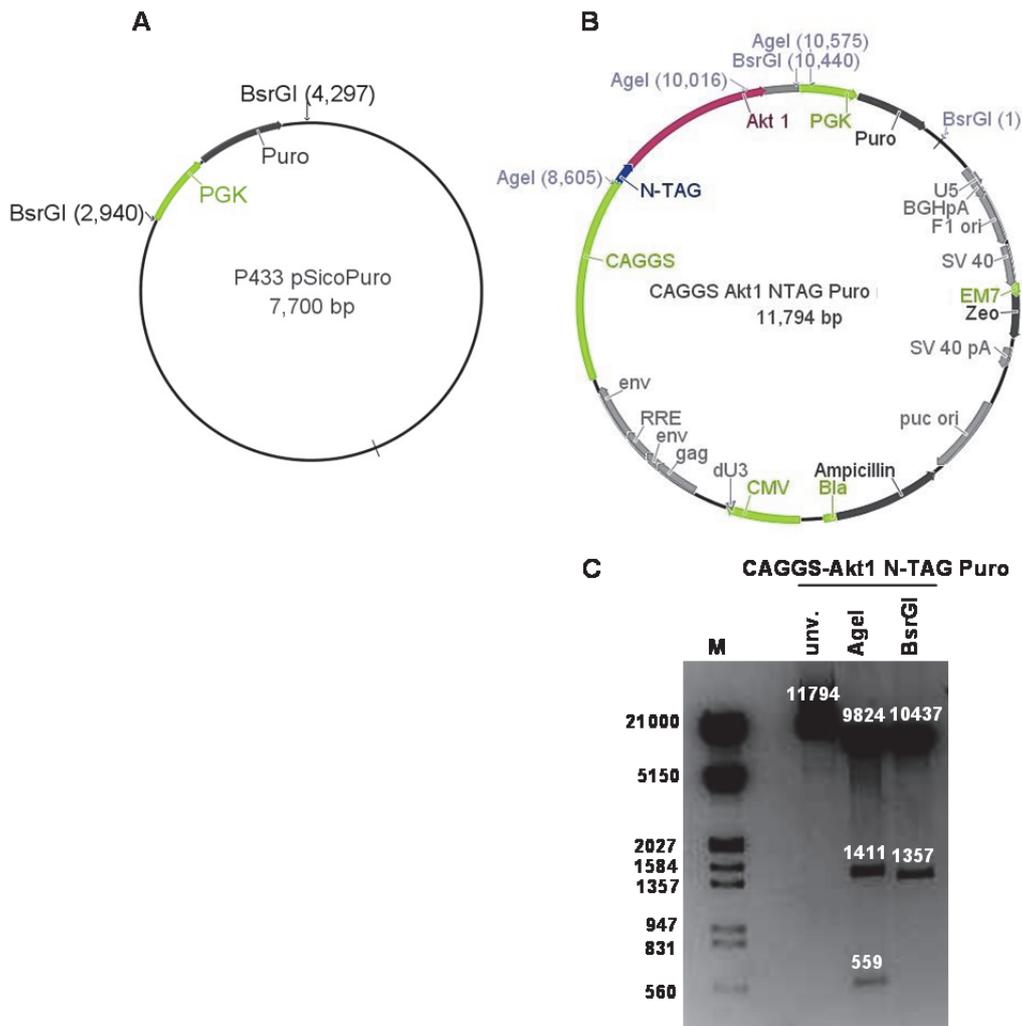


Abb. 13: Schematische Darstellung des pSico PGK-Puro Plasmids (A) und des Expressionsvektors CAGGS-Akt1 N-TAG-Puro (B) mit diagnostischer Restriktionsanalyse des Expressionsvektors (C). Die PGK-Puro-Kassette wurde über die BsrGI Schnittstellen isoliert (A) und in den Endvektor hineinligiert, wozu dieser ebenfalls über BsrGI-Restriktion geöffnet wurde (B). Restriktionsanalyse des Endvektors mit Agel und BsrGI (C). M: DNA-Größenstandard λ -EcoRI/HindIII. Unv.: ungeschnittener Endvektor.

Mittels lentiviraler Infektion wurde der Expressionsvektor CAGGS-Akt1 N-TAG-Puro stabil in das Genom der HEK293T Zellen integriert. Um das rekombinante Protein auf Niveau der Expressionsstärke der endogenen Akt1-Isoform zu exprimieren, wurden zunächst serielle Verdünnungen des Virusüberstandes zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde das Expressionsniveau der endogenen Isoformen und des rekombinanten Proteins mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 14). Für die Analyse wurden Antikörper gegen Akt1 (grün) und Akt2 (rot) verwendet. Dabei zeigte sich in den transfizierten Zellen ein zusätzliches Signal für das Akt1 N-TAG Protein, welches durch den 8 kDa großen TAG bei ca. 70 kDa zu detektieren war. Die Quantifizierung der Signalintensitäten der endogenen (endo) und getaggt (TAG) Akt1-Banden wurde zur Berechnung der Mengenverhältnisse von

Ergebnisse

getaggetem zu endogenem Akt1 (TAG/endo) genutzt. Dabei sieht man deutlich, dass sich die Expression des getaggeten Akt1 durch entsprechende Verdünnung des Virusüberstandes einstellen ließ. Inkubation mit Medium, welches 50 % Virusüberstand enthielt, führte zu einer sieben-fach stärkeren Expression der getaggeten Isoform im Vergleich zur endogenen. Diese ließ sich durch weitere Verdünnung des Virus auf 25 % bzw. 12,5 % im entsprechenden Verhältnis reduzieren. Weitere Virusverdünnungen auf 5 % und 2,5 % führten kaum mehr zu einer Reduktion der Expression der Akt1 N-TAG Isoform. Da die Expressionsstärke der getaggeten Isoform bei einer Viruskonzentration von 5 % im Bereich der endogenen Isoform lag, wurden keine weiteren Verdünnungen angefertigt. Alle in dieser Arbeit stabil transfizierten HEK293T Zellen wurden mit dieser Viruskonzentration behandelt. Die Expressionsstärke der endogenen Akt2-Isoform wurde durch die zusätzliche Expression der Akt1 N-TAG Isoform nicht beeinflusst.

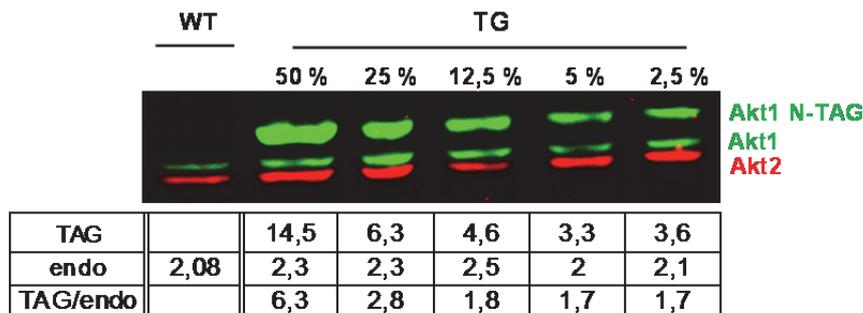


Abb. 14: WB-Analyse der Expressionsintensitäten von endogenem und getaggetem Akt1 in HEK293T Zellen nach serieller Verdünnung des Virusüberstandes. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern gegen Akt1 (grün) und Akt2 (rot). Die Virusverdünnungen sind in % angegeben und erfolgten jeweils in 1ml HEK293T Medium. Die Tabelle zeigt die Quantifizierung der Signalintensitäten der endogenen (endo) und getaggeten (TAG) Akt1-Isoform zur Berechnung der Mengenverhältnisse (TAG/endo) für diesen WB. WT: Wildtyp, TG: transgene HEK293T Zellen, die zusätzlich zur endogenen Akt1 Isoform rekombinantes Akt1 N-TAG Protein exprimieren. Werte der Signalintensitäten sind in arbiträren Einheiten (a.E.) angegeben.

3.1.2 Funktionale Analyse des Akt1 N-TAG Proteins

Für die vollständige Aktivierung und Funktionalität als Proteinkinase muss Akt1 an Serin (Ser) 473 sowie Threonin (Thr) 308 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung wird über den PI3-Kinase Signalweg vermittelt, welcher z.B. durch Insulin nach Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert wird. Für die Analyse der Aktivierung wurden wildtypische (WT) und transgene (TG) HEK293T Zellen zunächst über Nacht unter Serumentzug kultiviert und anschließend der PI3K-Signalweg mit Insulin stimuliert. Die Aktivierung bzw. Hemmung von Akt wurde über die Stärke der Phosphorylierung an Serin 473 mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Abb. 15 zeigt eine WB-Analyse nach Serumentzug bzw.

Ergebnisse

Insulinstimulation. Bei den TG-Zellen war nach Inkubation in serumfreiem Medium eine deutliche Dephosphorylierung von endogener und rekombinanter Akt im Vergleich zum WT zu erkennen. Nach Stimulation des PI3K-Signalwegs war eine starke Zunahme der Akt Phosphorylierung an Ser 473 sowohl für endogenes als auch das Akt1 N-TAG Protein zu verzeichnen. Die Steigerung der Phosphorylierung der endogenen Akt betrug das 6,5-fache und erreichte damit das gleiche Niveau wie die endogene Akt in den Insulinstimulierten WT-Zellen. Die Zunahme der Akt1 N-TAG Phosphorylierung ließ sich in gleichem Maße um das 7,5-fache steigern. Im Vergleich dazu zeigte sich zwischen den WT-Zellen nach Serumentzug bzw. nach Insulingabe eine leichte Zunahme der Ser 473 Phosphorylierung um den Faktor 1,4, was auf eine weniger starke Dephosphorylierung der endogenen Akt nach Serumentzug zurückzuführen war. Insgesamt belegen die Ergebnisse die Regulierbarkeit des Akt1 N-TAG Proteins nach Stimulation bzw. Inhibition des PI3K-Signalwegs.

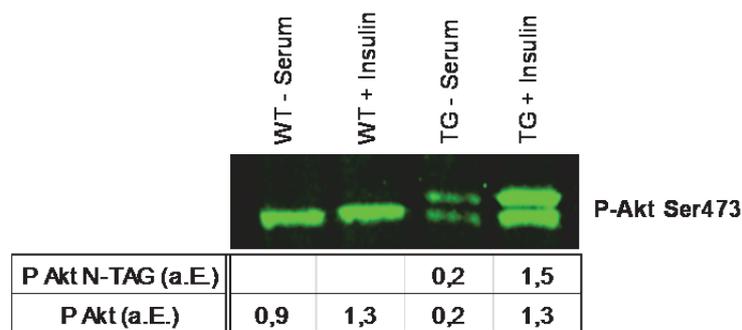


Abb. 15: WB-Analyse zur Untersuchung der Akt-Phosphorylierung an Ser 473 in transgenen (TG) und WT HEK293T Zellen. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mittels eines α -Phospho-Akt-Serin 473 Antikörpers. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

3.1.3 TAP/MS-Analyse der stabil transfizierten Akt1 N-TAG HEK293T Zellen

Mit den zuvor etablierten Akt1 N-TAG Zelllinien wurde nun überprüft, ob das Akt1-Fusionsprotein über die TAP aufgereinigt werden konnte. Dafür wurden von allen TAP's Proben genommen, um die Reinigung des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen bestimmen zu können. Die Analyse erfolgte mit einem Akt1-spezifischen Antikörper (grün). In Abb. 16 ist ein Beispiel einer WB-Analyse der einzelnen TAP-Schritte abgebildet. Dazu wurden von den einzelnen Fraktionen gleiche Volumenanteile aufgetragen. Lediglich vom Zellextrakt (P) und Flag-Überstand (Ü1) der Flag-Aufreinigung wurde jeweils nur die Hälfte für den WB eingesetzt, um eine Überladung des Gels mit Protein zu vermeiden. Weiterhin sieht man in diesen beiden Fraktionen eine Doppelbande, wobei die untere die endogene Akt1

Ergebnisse

darstellt. Im Flag-Überstand (Ü1) erkennt man einen Verlust von etwa 40 % des getaggtten Proteins, welcher auch durch eine Erhöhung der Menge der eingesetzten Flag-Beads nicht zu reduzieren war. Die Waschfraktion (W1) zeigte kaum Proteinverluste, so dass im Flag-Eluat (E1) 40 % des Akt1 N-TAG Proteins aufgereinigt werden konnten. Weiterhin sieht man, daß Akt1 N-TAG nahezu vollständig von den Flag-Beads (B1) eluiert wird. Während der Strep-Tactin-Aufreinigung zeigen sich weitere Proteinverluste in Überstand (Ü2) und Waschfraktion (W2), so dass sich im Strep-Tactin-Eluat (E2) noch 10 % der Ausgangsmenge an getaggttem Akt1 befanden.

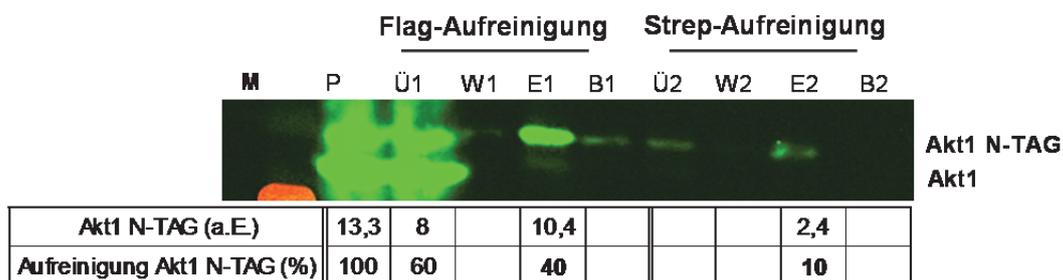


Abb. 16: WB-Analyse zur Quantifizierung der TAP von Akt1 N-TAG. Die WB-Proben aller Reinigungsschritte wurden in gleichen Volumenanteilen aufgetragen. Nur von Zellextrakt und Flag-Überstand, wurde die Hälfte des Gesamtvolumens eingesetzt. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der Akt1 N-TAG Banden zur Berechnung der Effizienz der Aufreinigung, welche in % angegeben ist. P: Zellextrakt, Ü1: Flag-Überstand, W1: Flag-Waschfraktion, E1: Flag-Eluat, B1: Flag-Beads, Ü2: Strep-Überstand, W2: Strep-Waschfraktion, E2: Strep-Tactin-Eluat, B2: Strep-Beads. M: Proteingrößenstandard, a.E. arbiträre Einheiten.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich das Akt1 N-TAG Protein mittels TAP aufreinigen ließ. Für eine erfolgreiche Aufreinigung potentieller Akt1 Bindungspartner ist besonders die Stabilität der Komplexbildung entscheidend, denn die Interaktion muss während der TAP erhalten bleiben. Für die Akt2-Isoform konnte durch relative Quantifizierung der identifizierten Peptide aus WT und TG Strep-Tactin-Eluaten mittels der SILAC-Methode bereits gezeigt werden, dass Akt2 vornehmlich transiente Bindungen mit seinen Interaktionspartnern eingeht und einzig mit stabilitätsgebenden Chaperonen wie Hsp90 (*Heat shock protein 90*) in stabilen Komplexen vorliegt (Bottermann et. al., 2013). Daher wurde nun im nächsten Schritt ebenfalls die Stabilität der Akt1-Komplexe untersucht.

3.1.4 Relative Quantifizierung der Akt1 Bindungspartner mittels SILAC

Zur Untersuchung der Stabilität der Akt1-Interaktion wurden die stabil transfizierten Akt1 N-TAG HEK293T Zellen in einem Medium kultiviert, welches stabile, mit schweren Isotopen markierte Aminosäuren $^{13}\text{C}_6$ -Lysin und $^{13}\text{C}_6$ -Arginin enthielt. Die untransfizierten WT-Zellen erhielten hingegen Medium, das mit den entsprechenden leichten $^{12}\text{C}_6$ -markierten Aminosäuren versetzt war. Schwer markierte Peptide aus Akt1 N-TAG Zellen können so von unmarkierten Peptiden aus WT Zellen im MS unterschieden werden, da sie sich durch eine Massendifferenz von 6 Da voneinander unterscheiden und so relativ zueinander quantifiziert werden können.

Um die Stabilität der Akt1-Komplexe zu überprüfen, wurden die Proteinextrakte der Akt1 N-TAG und WT-Zellen im gleichen Verhältnis vor der TAP gemischt (*MBP mixing before purification*). In einem weiteren Ansatz wurden die Proteinextrakte unabhängig voneinander mittels TAP aufgearbeitet, und erst danach die Strep-Tactin-Eluat vereint (*MAP mixing after purification*). Anschließend wurden die eluierten Proteine direkt in Lösung mit Trypsin verdaut und die Komplexität der Probe im Vorfeld der massenspektrometrischen Analyse mittels SCX-Fraktionierung reduziert. Stabile, $^{13}\text{C}_6$ -markierte Akt1 N-TAG assoziierte Proteinkomplexe sollten während des MBP-Protokolls erhalten bleiben und deren Peptide folglich in der MS-Analyse vor allem als schwer markiert erscheinen. Transiente Interaktionen hingegen können sich während der Aufreinigung gegen $^{12}\text{C}_6$ -markierte Peptide austauschen, was sich in einem 1:1 Verhältnis markierter zu unmarkierter Peptide widerspiegeln würde. Während des MAP-Protokolls kann kein Austausch transient bindender Proteine stattfinden. Hier sollte sich ebenfalls ein verschobenes Verhältnis zugunsten schwer markierter Peptide zeigen. Einzig unspezifisch an die Säulenmatrix bindende Proteine würden noch in einem Verhältnis von 1:1 zu detektieren sein. In Tab. 13 sind beispielhaft Ergebnisse der SILAC-Verhältnisse eines MBP und eines MAP-Experimentes mit der Anzahl der gefundenen Peptide für das jeweilige identifizierte Protein dargestellt. Deutlich ist ein stark verschobenes Verhältnis (dunkelgrau unterlegt) zugunsten $^{13}\text{C}_6$ -markierter Peptide für HSP90 sowohl in MBP als auch MAP zu sehen, was einen stabilen Komplex mit Akt1 voraussetzt. Die Proteine im mittleren Teil der Tabelle (grau unterlegt) zeigen kein oder nur ein leicht verschobenes Verhältnis in MBP, was auf einen Austausch des schwer markierten Proteins gegen das leicht markierte wildtypische Protein hindeutet. Nach MAP verschiebt sich deren SILAC-Verhältnis jedoch zugunsten schwer

Ergebnisse

markierter Peptide in einem Bereich von 3:1 für die α -Untereinheit der ATP-Synthase (ATP5A1), bis 13,6:1 für HSC70. Diese Proteine sind somit als transiente Bindungspartner von Akt1 einzuordnen. Im unteren Abschnitt der Tabelle (hellgrau unterlegt) finden sich hingegen nur solche Proteine, die auch nach MAP kein oder nur ein gering verschobenes Verhältnis zwischen 1,2:1 bis 2,4:1 aufweisen und somit als unspezifische Verunreinigungen anzusehen sind.

identifiziertes Protein	MBP		MAP		MW	
	ID.Nr	Peptide	$^{13}\text{C}_6 : ^{12}\text{C}_6$	Peptide		$^{13}\text{C}_6 : ^{12}\text{C}_6$
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90 β)	P08238	9	38,1	10	41,2	83,3
Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90 α)	P07900	10	32,4	7	37,5	98,2
Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70)	P11142	9	1,5	11	13,6	70,9
Tubulin alpha	F5H5D3	3	1,3	3	13,0	57,7
Tubulin beta chain	B4DY90	4	0,9	5	12,8	52,0
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSP70)	Q59EJ3	4	1,6	5	11,2	77,5
Tubulin beta-4B chain	P68371	4	1,6	4	9,3	49,8
78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)	P11021	5	0,9	5	7,2	72,3
RING finger protein 219 (RNF 219)	Q5W0B1	3	0,7	1	3,9	81,1
ATP synthase subunit alpha (ATP5A1)	P25705	1	0,5	1	3,0	59,8
Nucleolin	P19338	2	0,6	3	2,4	76,6
C-Myc-binding protein	Q6IB68	1	1,3	2	2,2	12,0
Enhancer of rudimentary homolog	P84090	3	0,9	2	1,9	12,3
Nuclease-sensitive element-binding protein	H0Y449	1	0,6	2	1,9	41,9
RuvB-like 2	Q9Y230	1	1,1	1	1,8	51,2
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	1	0,9	1	1,8	11,7
40S ribosomal protein S19	Q8WVX7	2	0,9	1	1,2	17,3

Tab. 13: SILAC-Verhältnisse gefundener Peptide aus MBP und MAP. Dargestellt sind die Anzahl der gefundenen Peptide der jeweiligen TAP und das Verhältnis schwer zu leicht markierter Peptide. Gezeigt sind nur solche Proteine, die in beiden Experimenten mit mindestens einem Peptid identifiziert wurden. In dunkelgrau unterlegt sind stabile Bindungspartner von Akt1. Grau markiert sind als transient charakterisierte Interaktionspartner, sowie in hellgrau unspezifisch aufgereinigte Kontaminanten. ID.Nr: Identifizierungsnummer. MW: Molekulargewicht in kDa.

In Abb. 17 sind zur Erläuterung beispielhaft MS-Spektren für Peptidsequenzen von HSP90 und Tubulin nach MBP bzw. MAP abgebildet. Die stabile Interaktion von HSP90 mit Akt1 zeigt sich deutlich daran, dass sowohl nach MBP als auch MAP nur schwer markierte Peptide des Proteins identifizieren ließen (A). Bei Tubulin wird nur nach MAP ein verschobenes Verhältnis zugunsten markierter Peptide detektiert. Der transiente Bindungscharakter des Proteins zeigt sich daran, dass während des MBP-Protokolls ein Austausch schwer gegen leicht markierte Peptide stattgefunden hat (B).

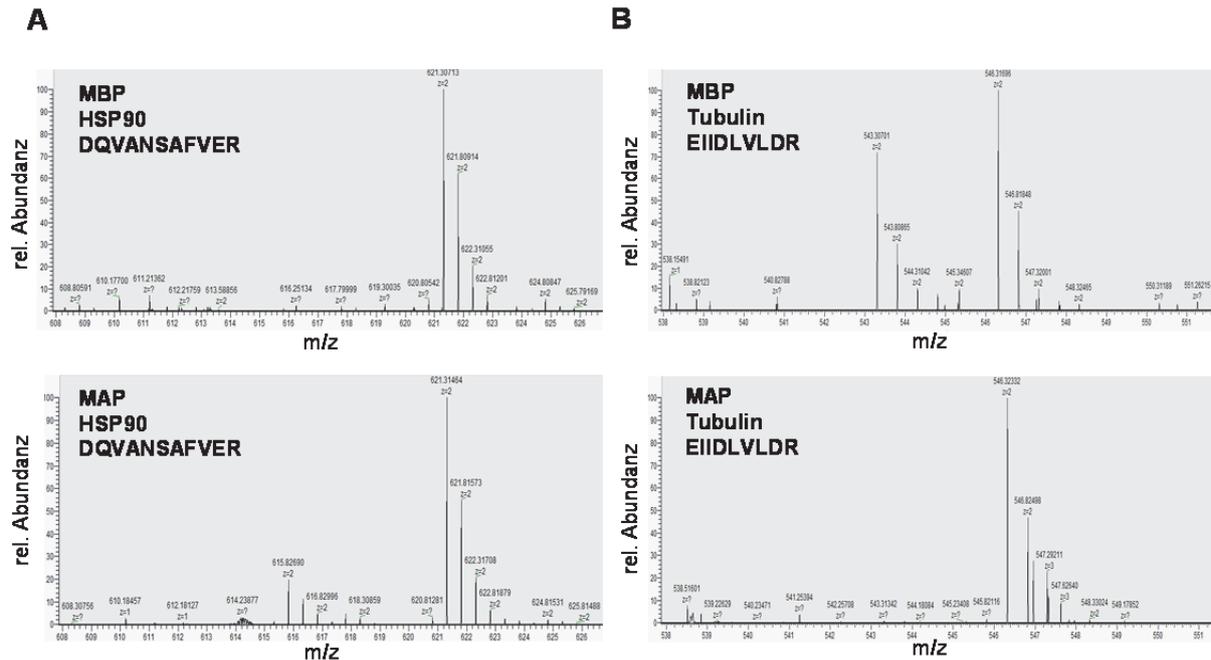


Abb. 17: Exemplarische MS-Spektren der Peptide DQVANSAFVER von HSP90 und EIIDLVLDR von Tubulin nach MBP und MAP. Für HSP90 konnte sowohl nach MBP und MAP nur die schwere Form des Peptids identifiziert werden (A). Bei Tubulin wurde nach MBP ein nahezu gleiches Verhältnis leichter und schwer markierter Peptide gefunden. Nach MAP-TAP wurde nur noch die schwer markierte Form des Peptids identifiziert (B). m/z: Verhältnis Masse zu Ladung.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung mittels der SILAC-Methode belegen, dass Akt1 ähnlich wie Akt2 vornehmlich transiente Proteinbindungen eingeht. Das wird auch in der Silberfärbung deutlich. In Abb.18 ist exemplarisch ein Silbergel einer MAP-TAP dargestellt. Als prominenteste Banden erscheinen u.a. die stabilitätsgebenden Chaperone HSP90, HSP70 und Cdc37, sowie als transientser Bindungspartner Tubulin.

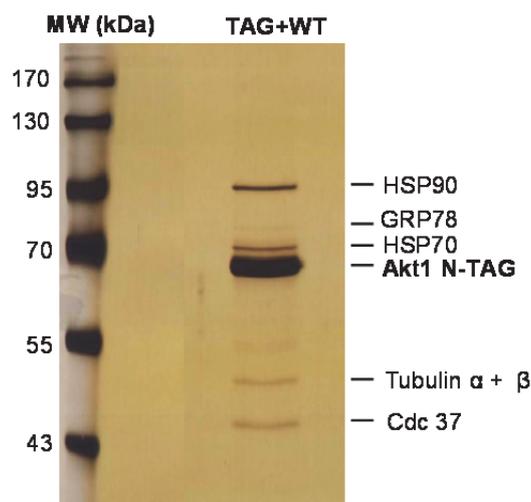


Abb. 18: Silberfärbung einer SDS-Page nach MAP-TAP mit identifizierten Akt1-Bindungspartnern. TAG+WT: Strep-Tactin-Eluat der unmarkierten WT-Probe und der schwer markierten TG-Probe wurden 1:1 vereinigt und gemeinsam auf das Gel geladen. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel aufgearbeitet und massenspektrometrisch analysiert. MW: Molekulargewicht.

Ergebnisse

Um weitere niedrig abundante Bindungspartner von Akt1 identifizieren zu können, musste die Aufarbeitung der Proteine nach TAP weiter verfeinert werden. Daher wurden aus dem Silbergel nicht nur die Proteinbanden ausgeschnitten, sondern auch die Bereiche zwischen den Banden aufgearbeitet, da sich in diesen womöglich ebenfalls Proteine befanden, die aber in der Silberfärbung unter die Nachweisgrenze fielen. In einem zusätzlichen Ansatz wurde das Strep-Tactin-Eluat wie unter 2.10.5 beschrieben direkt in Lösung verdaut und die Ansätze miteinander verglichen. Tab. 14 zeigt die Ergebnisse der MS-Analyse von drei unabhängig durchgeführten MAP-TAP's nach Trypsinspaltung der Strep-Tactin-Eluate in Lösung. Als Kriterien für die Auswahl wurden nur solche Peptide aufgeführt, die in einer TAP-Analyse mit mehr als zwei Peptiden, sowie in mehr als einer TAP-Analyse mit mindestens einem Peptid und einem SILAC-Verhältnis $^{13}\text{C}_6 : ^{12}\text{C}_6$ größer 3:1 identifiziert wurden.

Neben den bereits beschriebenen Proteinen wurden weitere Proteine wie ANKRD18B (*Ankyrin-repeat-domain-containing protein*), Importin-8, TKTL1 (*Transketolase-like protein 1*), TCP1 (*T-complex protein 1*), RuvB-like1, Phgdh (D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase), sowie EIF3 (eukaryotischer Initiationsfaktor 3) gefunden (grau unterlegt). Bis auf ANKRD18B, welches mit einer SILAC-Ratio von 78,3:1 identifiziert wurde, waren die SILAC-Verhältnisse der übrigen gefundenen Proteine mit 3,2:1 für EIF3, bzw. 5,8:1 für Importin-8 deutlich geringer, was wiederum auf eine transiente Bindung mit Akt1 hindeutet.

Identifiziertes Protein	ID.Nr	Anzahl Peptide/TAP			S.A. (%)	¹³ C ₆ : ¹² C ₆	MW
		TAP 1	TAP 2	TAP 3			
Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5	5	0	0	13,5	∞	50
Ankyrin repeat domain-containing protein (ANKRD)	A2A2Z9	1	2	0	2	78,3	118
Heat shock protein HSP90-beta (HSP90 _β)	P08238	16	27	10	37,8	72,8	83
Heat shock protein HSP90-alpha (HSP90 _α)	P07900	15	20	7	24,8	42,6	98
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B (HSP70)	Q59EJ3	13	13	5	28,2	27,3	77
Tubulin beta chain	P07437	10	1	5	32,9	18,8	50
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	16	19	11	39,3	17,8	71
Tubulin beta-4B chain	P68371	8	2	3	25,4	15,7	50
Tubulin alpha-1B chain	A8JZY9	5	4	2	19,7	13,7	50
78kDa glucose-regulated protein (GRP78)	P11021	11	3	5	25,8	8,4	72
Heat shock 70 kDa protein 6	B2R6X5	5	7	3	10,7	7,3	71
RING finger protein 219 (RNF 219)	Q5W0B1	3	0	1	6,3	6,0	81
Importin-8	O15397	2	0	0	2,4	5,8	120
Transketolase-like protein 1 (TKTL1)	P51854	1	1	0	2,2	5,6	68,0
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP1)	Q59H77	3	1	0	5,9	5,2	64
RuvB-like 1	B5BUB1	5	0	0	13,8	5,0	50
ATP synthase subunit alpha (ATP5A1)	P25705	1	0	1	4,9	4,3	60
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh)	O43175	2	0	1	6	4,0	57
T-complex protein 1 subunit zeta (TCP1)	B2R9K8	2	0	0	5,6	3,5	58
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (EIF3)	Q13347	1	1	1	2,8	3,2	36

Tab. 14: Zusammenfassung der MS-Analyse von drei unabhängigen MAP-TAP's. Gelistet sind Proteine, welche in einer TAP mit mehr als zwei Peptiden, sowie in einer oder mehr TAP-Analysen mit mindestens einem Peptid und einem SILAC-Verhältnis von mehr als 3:1 identifiziert wurden. Grau unterlegt sind Proteine, die zusätzlich zu den in Tab. 13 identifiziert wurden. S.A. (%): Median der Peptidsequenzabdeckung in %. SILAC-Verhältnis ¹³C₆ : ¹²C₆; Median der Verhältnisse schwer zu leicht markierter Peptide aus den drei angegebenen TAP's. ID.Nr: Identifizierungsnummer. MW: Molekulargewicht. TAP 1+2: Silbergel, TAP 3: in Lösung.

Im Hinblick auf die Proteinausbeute scheint die zusätzliche Methode der Aufarbeitung des gesamten Silbergels (TAP1 und TAP2) einen klaren Vorteil hinsichtlich der Identifizierung transienter Proteine zu bieten. Zusammenfassend konnten bereits gefundene Kandidaten bestätigt werden und darüber hinaus potentielle neue Akt1-Bindungspartner identifiziert werden.

Transiente Bindungspartner stellen zugleich potentielle Substrate von Akt1 dar. Daher wurde überprüft, ob einige der identifizierten Proteine Akt-Konsensus-Sites enthielten. Als Kandidaten wurden die ATP5A1, RuvB-like1 (RuvB1) und Phgdh ausgewählt. Für Akt wurde die Konsensus-Sequenz R-X-R-X-X-S/T-Hyd definiert, wobei X eine beliebige Aminosäure definiert und Hyd eine hydrophobe Aminosäure (Alessi et al., 1996). Die ausgewählten Proteine wurden mit Hilfe der humanen Datenbank PhosphoNet (Kinexus Bioinformatics Cooperation) auf mögliche Akt1 Phosphorylierungsstellen untersucht. Dabei

wurde für ATP5A1 jeweils eine an Serin (Ser) 325 bzw. Ser 76, für Phgdh an Ser 166 bzw. Threonin (Thr) 78 und für RuvB1 an Ser 17 vorhergesagt (Tab. 15).

Phospho-Site					
Human Protein:	ATP5A1	ATP5A1	Phgdh	Phgdh	RuvB1
Human P-Site:	S325	S76	S166	T78	S17
P-Site Sequence:	AVAYRQMSLLRRPP	EETGRVLSIGDGIAR	EVATRMQSFQMKTIG	QVVGRAGTGVDNVDL	TKTQRIASHSHVKGL
UniProt:	P25705	P25705	O43175	O43175	B5BUB1
Intern. Prot. ID:	IPI00440493	IPI00440493	IPI00011200	IPI00011200	IPI00021187

Tab. 15.: Vorhergesagte Akt1-Phosphorylierungsstellen in ATP5A1, Phgdh und RuvB1. Quelle: Kinexus Bioinformatics Cooperation.

3.2 Verifizierung von ausgewählten Akt1-Interaktionspartnern mittels *Proximity Ligation Assay (PLA)*

Die vorhergesagten Akt-Phosphorylierungsstellen unterstützen die experimentellen Daten hinsichtlich einer Interaktion der ATP-Synthase, Phgdh und RuvB1 mit Akt1. Daher sollte nun in einem weiteren Ansatz die Interaktion validiert werden. Zur Bestätigung der identifizierten Interaktionspartner diente ein Antikörper-basierter Nachweis der Protein-Protein Interaktion *in situ*. Die PLA's wurden auf untransfizierten WT-HEK293T Zellen durchgeführt. Als Kontrollen dienten Ansätze, in denen jeweils nur ein Primärantikörper mit beiden Sekundärantikörpern eingesetzt wurde, um mögliche unspezifische Antikörperbindungen zu detektieren.

3.2.1 Verifizierung von Phgdh und ATP-Synthase als Bindungspartner von Akt1

Die Ansätze wurden mit Antikörpern gegen Akt1 (α -Akt1; Maus), Phgdh (α -Phgdh, Kaninchen) und der α -Untereinheit der ATP-Synthase; ATP5A1 (α -ATP5A1, Kaninchen) durchgeführt und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Komplexe zwischen Akt1 und den jeweiligen Bindungspartnern zeigen sich an den rot fluoreszierenden Signalen. Pro PLA wurden sieben unterschiedliche Areale in 60 x Vergrößerung fotografiert und mindestens 20 Zellkerne pro Areal mit den dazugehörigen roten Signalen ausgezählt, um den Mittelwert der Signale pro Zellkern bestimmen zu können. In Abb. 19 sind exemplarische Mikroskopaufnahmen der PLA-Proben von Akt1 und Phgdh sowie in Abb. 20 von Akt1 und ATP5A1 dargestellt. Mit den jeweils zugehörigen Kontrollen (B und C), sowie der statistischen Auswertung roter Signale/Zellkern von drei unabhängig durchgeführten PLA's

Ergebnisse

(D). Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der PLA-Proben auf 100 % gesetzt und die zugehörigen Kontrollen darauf normiert. In den beiden PLA-Ansätzen sind deutlich mehr rote Signale als in den parallel laufenden Kontrollexperimenten zu erkennen. Somit konnten Phgdh und ATP5A1 als Interaktionspartner von Akt1 bestätigt werden.

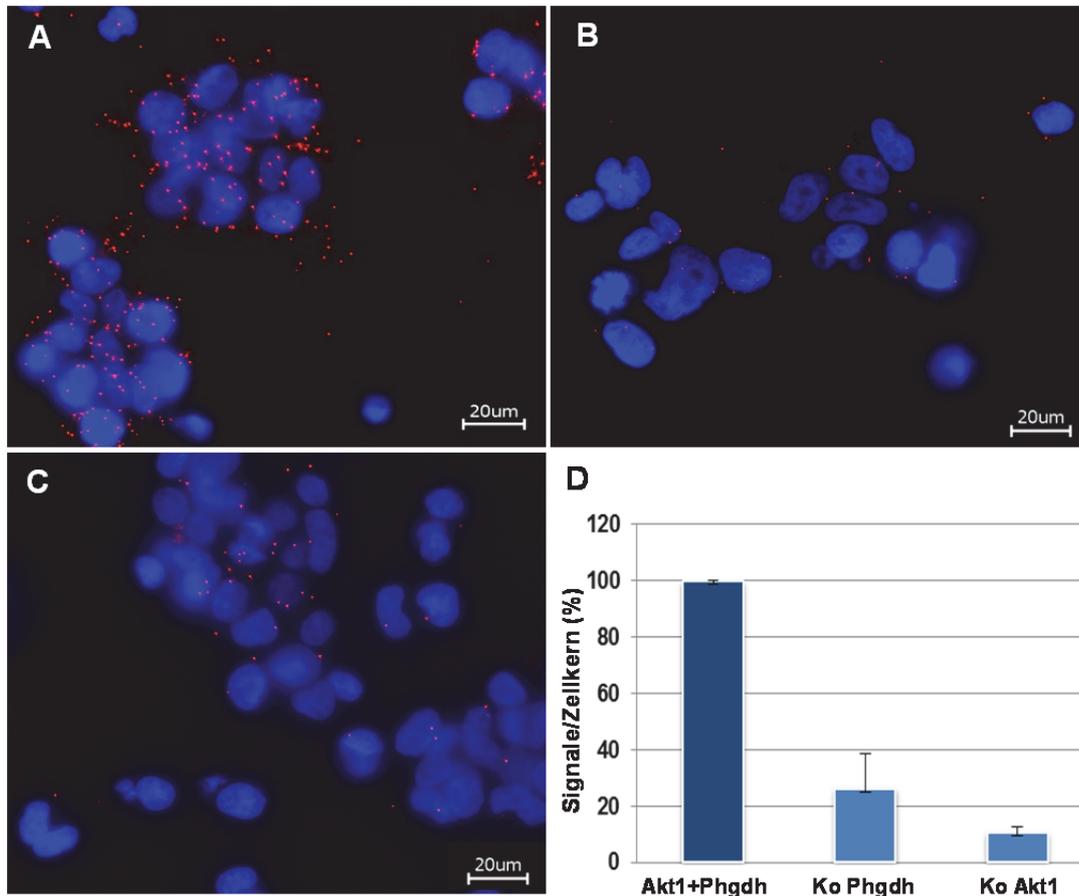


Abb. 19: PLA-Ansatz mit α -Akt1 und α -Phgdh. Exemplarische Mikroskopaufnahmen der PLA-Probe mit beiden Primärantikörpern (A), sowie Kontrolle des Phgdh-Primärantikörpers (B) und Kontrolle des Akt1-Primärantikörpers (C). Statistische Auswertung der roten Signale/Zellkern für drei unabhängig durchgeführte PLA's (D). Die Signalstärke der PLA-Probe wurde auf 100 % gesetzt und die Kontrollen (Ko) darauf normiert.

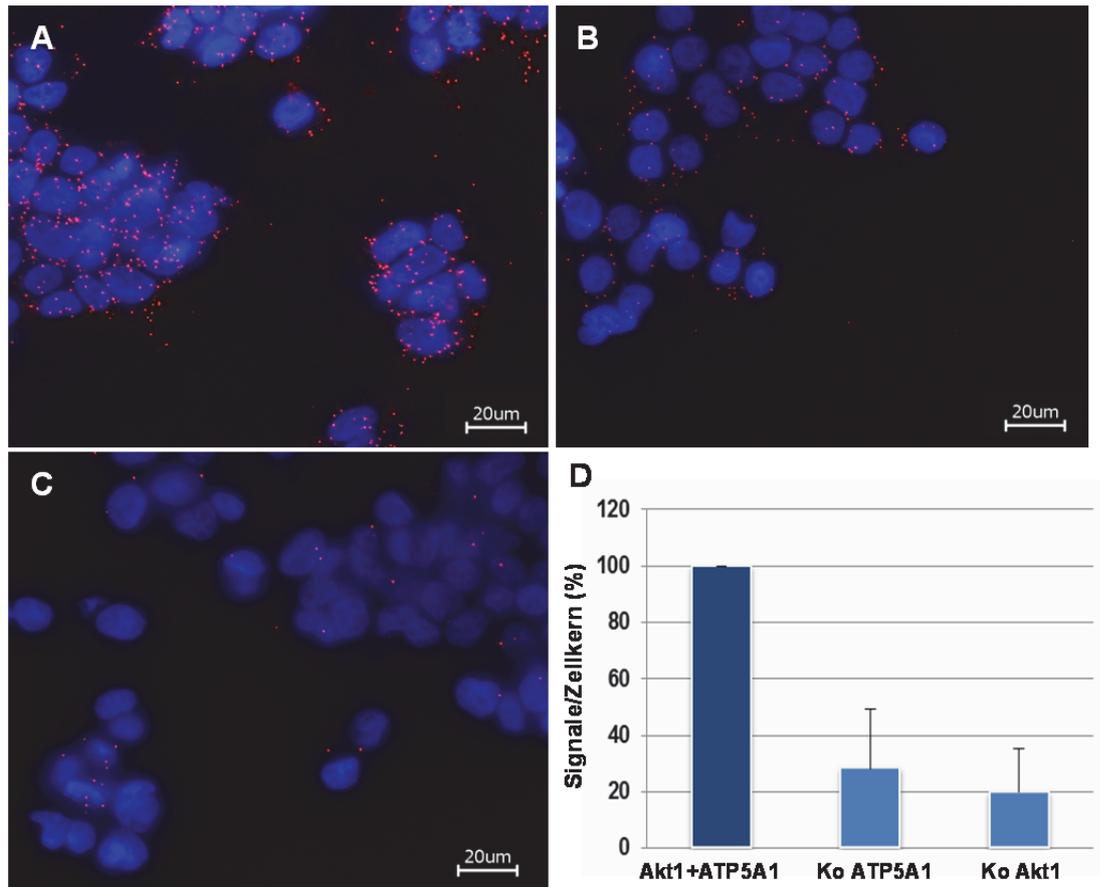


Abb. 20: PLA-Ansatz mit α -Akt1 und α -ATP5A1. Exemplarische Mikroskopaufnahmen der PLA-Probe mit beiden Primärantikörpern (A). Kontrolle des ATP5A1-Primärantikörpers (B) und des Akt1-Primärantikörpers (C). Statistische Auszählung roter Signale/Zellkern von drei unabhängig durchgeführten PLA's (D). Die Signalstärke der PLA-Probe wurde auf 100 % gesetzt und die Kontrollen (Ko) darauf normiert.

Der Nachweis einer Interaktion zwischen RuvB11 und Akt1 konnte nicht erbracht werden, da der benutzte RuvB11-Antikörper zu unspezifisch war und sich die PLA-Probe nicht ausreichend vom Hintergrund abhob (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.3 Generierung transgener Akt N-TAG Mäuselinien

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Akt1-Bindungspartnern in kultivierten HEK293T Zellen wurde in weiteren Untersuchungen die Anwendung dieser Methode auf die *in vivo* Situation übertragen. Zu diesem Zweck wurden transgene Mauslinien etabliert, die entweder das für die TAP benötigte Akt1 N-TAG bzw. Akt2 N-TAG Fusionsprotein zusätzlich zur jeweils endogenen Isoform im Herzen exprimierten. Hierfür wurden die cDNA's zur Expression der rekombinanten Proteine unter Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen murinen α -MHC-Promotors exprimiert. Der dafür verwendete Ausgangsvektor α -MHC PNCI wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe J. Robbins, *Molecular Cardiovascular*

Ergebnisse

Biology, Cincinnati Childrens Hospital zur Verfügung gestellt. In Abb. 21 ist der Ausgangsvektor α -MHC PNCI mit der α -MHC Promotorregion (grün) dargestellt. Das Rückgrat des Vektors bildet die pBluescript sk+ Sequenz, welche von den Restriktionsschnittstellen BamHI flankiert wird. Zum Einfügen der Akt2 N-TAG cDNA wurde der Vektor über die Restriktionsschnittstelle Sall geöffnet, welche sich am 3'Ende des α -MHC-Promotors befindet (A). Die 1836 bp umfassende Akt2-Sequenz entstammt dem Vektor Akt2 N-TAG (B) und wurde mittels AgeI und BsrGI isoliert, um anschließend in α -MHC PNCI eingesetzt zu werden. Nur wenn sich diese Sequenz in richtiger Orientierung eingefügt hat, stellt sich nach Behandlung mit Klenow-Polymerase die Sall Schnittstelle wieder her (C). Dies wurde über eine diagnostische Restriktionsanalyse mit den Enzymen Sall und BamHI überprüft. Durch das Einsetzen der Akt2 N-TAG cDNA vergrößert sich das 953 bp Fragment auf 2789 bp (C). Das neue Plasmid wurde als α -MHC Akt2 N-TAG bezeichnet.

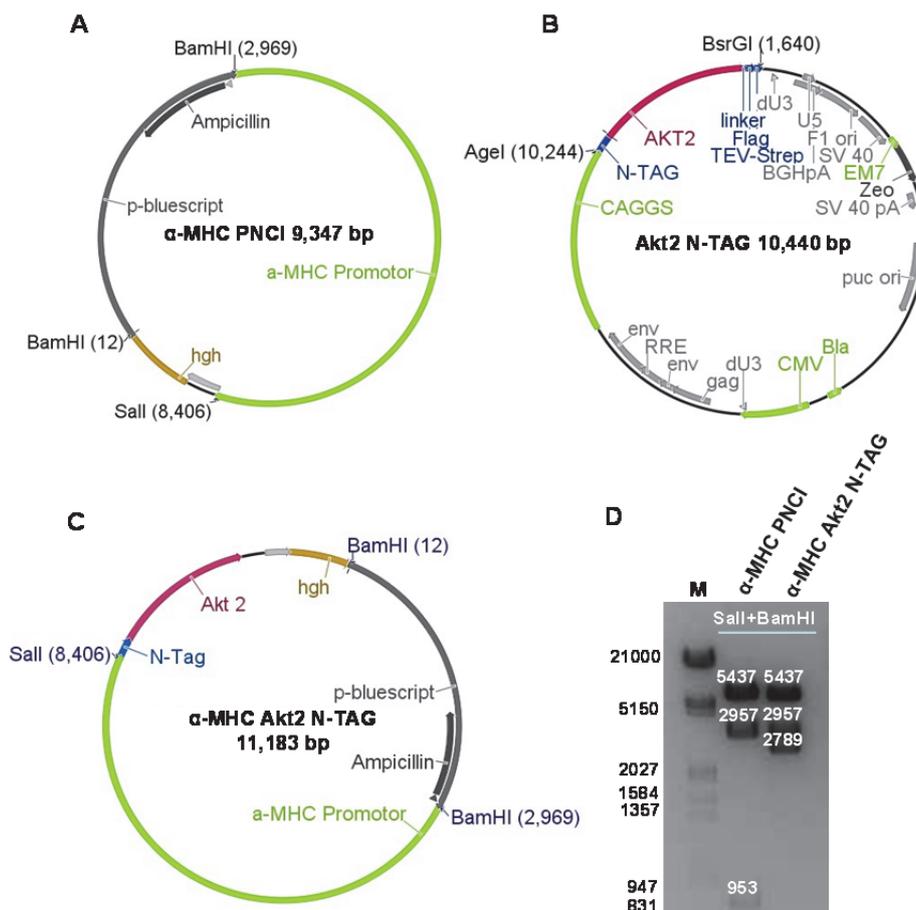


Abb. 21: Schematische Darstellung der Erzeugung des α -MHC Akt2 N-TAG Vektors mit diagnostischer Restriktionsanalyse. Zum Einfügen der Akt2 N-TAG cDNA wurde der Ausgangsvektor α -MHC PNCI über Restriktion mit Sall geöffnet (A). Die 1836 bp umfassende Akt2 N-TAG Sequenz wurde über AgeI und BsrGI aus dem Vektor Akt2 N-TAG isoliert (B). Der Endvektor wurde α -MHC Akt2 N-TAG genannt (C). Restriktionsanalyse des Ausgangs- und des Endvektors mit BamHI und Sall (D).

Ergebnisse

Abb. 22 zeigt die Klonierung des α -MHC Akt1 N-TAG Plasmids. Dazu wurde die Akt2 cDNA aus dem Plasmid α -MHC Akt2 N-TAG über Restriktion mit NheI entfernt (A). Die Akt1 N-TAG cDNA wurde ebenfalls über NheI aus dem Vektor Akt1 N-TAG isoliert (nicht gezeigt) und in den geöffneten Ausgangsvektor eingefügt. Da NheI im N-TAG und der Linker-Region schneidet, stellen sich diese Sequenzen nach Einsetzen der Akt1 cDNA wieder her. Der neu generierte Vektor α -MHC Akt N-TAG (B) wurde mittels Restriktionsanalyse mit AgeI und BamHI auf korrekte Integration der Akt1 cDNA überprüft. In der Akt1 cDNA befindet sich im Gegensatz zur Akt2 cDNA eine zusätzliche AgeI Schnittstelle, welche bei korrekter Orientierung der eingefügten Akt1 Sequenz zwei zusätzliche Banden von 1411 bp und 1000 bp ergeben (C und D). Abschließend wurde die Sequenz der codierenden Regionen beider Endvektoren mittels Sequenzierung überprüft (nicht gezeigt).

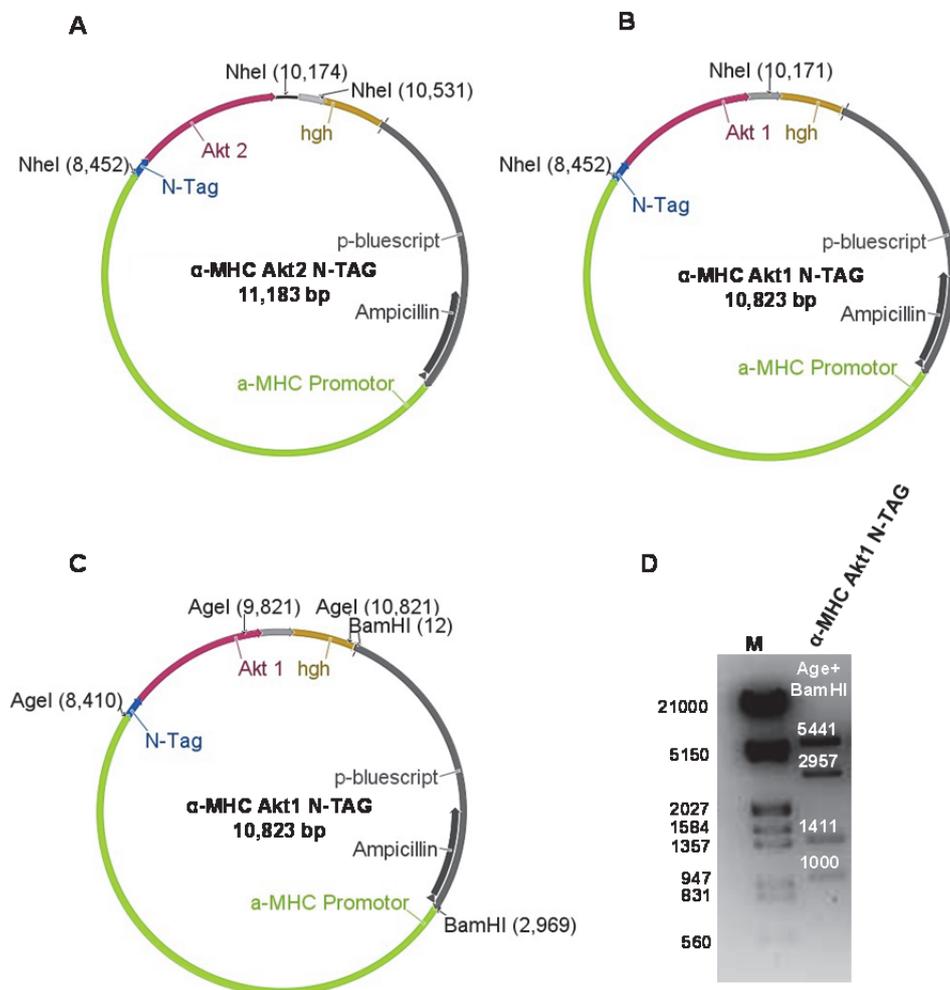


Abb. 22: Schematische Darstellung der Erzeugung des α -MHC Akt1 N-TAG Vektors mit diagnostischer Restriktionsanalyse. Zum Einfügen der Akt1 N-TAG cDNA wurde die Akt2 Sequenz aus dem α -MHC Akt2 N-TAG Vektor über eine Restriktion mit NheI entfernt (A) und die Akt1 cDNA eingefügt. Der neue Vektor wurde als α -MHC Akt1 N-TAG bezeichnet (B). Die Restriktionsanalyse des neuen Vektors erfolgte mit AgeI sowie BamHI (C und D).

Ergebnisse

Um das Injektionskonstrukt für die Pronukleusinjektion zu erhalten, wurden die Plasmide in *E. coli* transformiert, amplifiziert, gereinigt und die pBluescript sk⁺-Sequenz durch Restriktion mit NotI entfernt. In Abb. 23 ist dies beispielhaft für den α -MHC Akt2 N-TAG Vektor dargestellt (A). Die Restriktion mit NotI ergibt das 8280 bp große linearisierte Injektionskonstrukt (B). Die Injektionskonstrukte wurden für die Pronukleusinjektion über ein Agarosegel aufgereinigt, die Konzentration über den Vergleich zum Auftrag einer definierten Menge des DNA-Größenstandards λ -EcoRI/HindIII abgeschätzt und auf 1 μ g/ μ l eingestellt. Pronukleusinjektion, Oocytentransfer sowie Genotypisierung der F₀-Generation wurde von der PolyGene Transgenetics AG in der Schweiz durchgeführt.

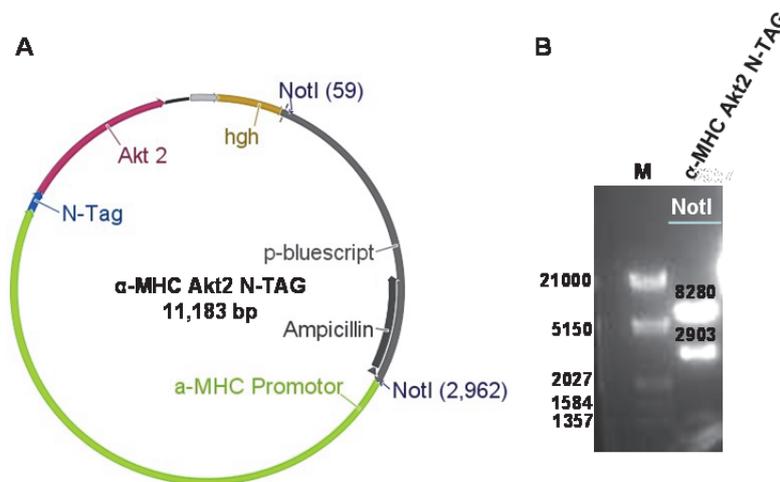


Abb. 23: Isolierung des Akt2 N-TAG Injektionskonstrukts mittels NotI-Restriktion. Beispielhaft ist hier der α -MHC Akt2 N-TAG Vektor mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen dargestellt (A). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktion mit NotI (B). Das 8280 bp Fragment entspricht dem Injektionskonstrukt, bestehend aus a-MHC-Promotor, N-TAG, Akt2 cDNA, Linker und hgh-Region.

3.4 Genotypisierung und Zucht der transgenen Akt N-TAG Mäuse

Zur Genotypisierung der Mauslinien wurden Primer gewählt, die spezifisch für die hgh-Region der Akt cDNA waren. Die hgh Region beinhaltet das Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons und ist für die Expression des Transkripts von Bedeutung. Folglich sollte dieses Primerpaar nur in transgenen Tieren ein PCR-Produkt ergeben. Abb. 24 zeigt schematisch die Lokalisation der verwendeten Primer (A), sowie ein Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung, bei der fünf Tiere die erwartete Bande bei 409 bp zeigen und somit als transgen identifiziert werden konnten (B).

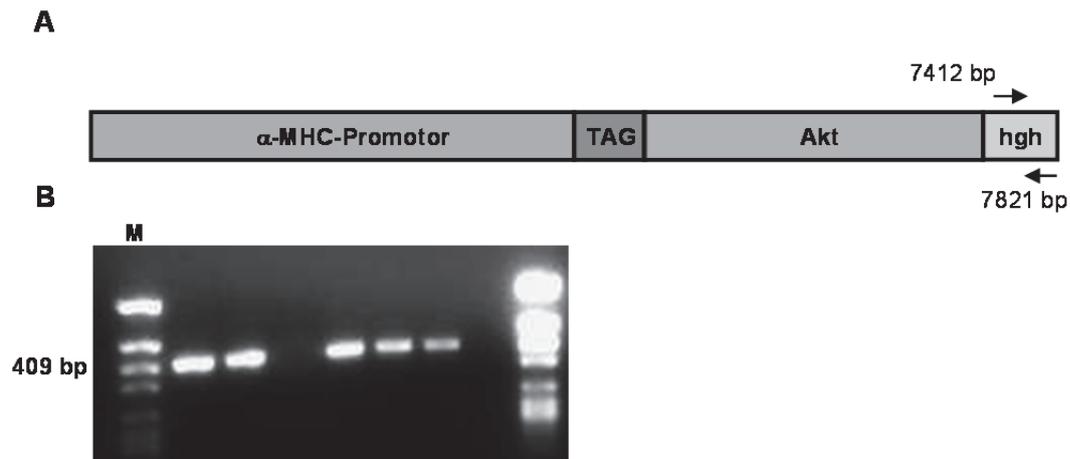


Abb. 24: PCR-Analyse zur Genotypisierung. Schematische Darstellung zur Lokalisation der verwendeten Primer (A). Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten, bei der 5 Tiere als transgen identifiziert wurden, da sie die erwartete Bande bei 409 bp zeigten (B). M: DNA-Größenmarker HpaII.

Insgesamt konnten vier transgene Akt2 N-TAG- (TG2) sowie fünf transgene Akt1 N-TAG-Tiere (TG1) mittels PCR identifiziert werden. Diese wurden in die Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf verbracht und dort mit Wildtyptieren des Stamms FVB/N verpaart. Eine erfolgreiche Keimbahnintegration zeigte sich in der F1-Generation bei einem TG2-Tier, sowie bei insgesamt drei TG1-Tieren, im Folgenden TG1 A, D, E genannt. Diese Tiere wurden für die Etablierung der Zucht der transgenen Akt1- und Akt2 N-TAG-Mauslinien eingesetzt. Für die weitere basale Charakterisierung wurden gleichaltrige und gleichgeschlechtliche Nachkommen dieser Tiere verwendet.

3.5 Charakterisierung des Akt N-TAG Proteins

3.5.1 Nachweis der herzspezifischen Expression der Akt N-TAG Isoformen

Zur Analyse der herzspezifischen Expression sowie der Expressionsstärke der Akt N-TAG-Isoformen wurde je einem vier Monate alten Wildtyp (WT), einem (TG2), sowie einem (TG1) Tier der Linie D Herz, Skelettmuskel, Lunge, Milz, Leber, und Gehirn für die WB-Analyse entnommen und mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1 und Akt2 untersucht (Abb. 25). Nur in den Herzextrakten der TG1 Mäuse zeigte sich deutlich eine zusätzliche Proteinbande höheren Molekulargewichts. Durch den N-terminalen TAG ist das Fusionsprotein 8 kDa größer als die endogene Isoform und wird auf einer Höhe von ca. 70 kDa detektiert. In den übrigen untersuchten Organen zeigte sich keine entsprechende Proteinbande. Auffallend war, dass das Akt1 N-TAG Protein deutlich stärker als das endogene Protein im WT exprimiert

Ergebnisse

wurde. Ebenfalls war die Proteinmenge der endogenen Akt1-Isoform im Vergleich zum WT deutlich erhöht. Zur besseren Darstellung sind die Banden des TG1 Herzextraktes in geringerer Signalintensität rechts neben dem Blot noch einmal abgebildet. Weiterhin erkennt man in den TG1 Herzextrakten eine Bande geringeren Molekulargewichts bei ca. 50 kDa, bei der es sich vermutlich um ein Akt1-Abbauprodukt handelte (A).

Die Analyse der Expression des Akt2 N-TAG Proteins der TG2-Tiere ergab, dass zusätzlich zur Bande der endogenen Akt2 nur im Herzen ein zusätzliches Signal bei etwa 70 kDa nachgewiesen wurde. Die Menge des Akt2-Fusionsproteins lag hier deutlich unter der der endogenen Akt2 (B).

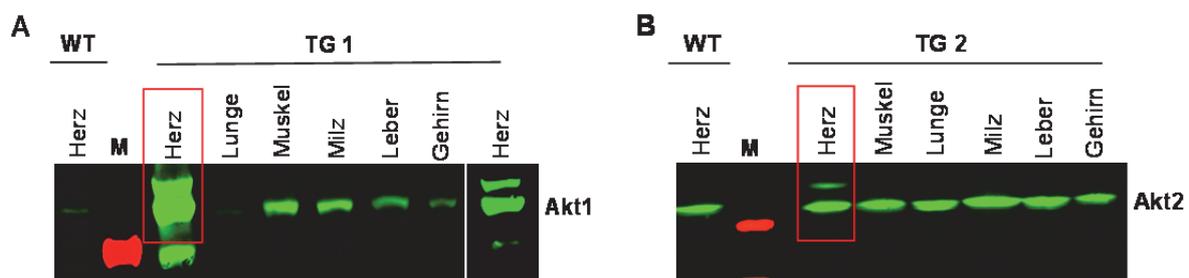


Abb. 25: WB-Analyse der Expression der Akt1 und Akt2 N-TAG Isoformen. Aufgetragen sind Proteinextrakte aus Herz, Muskel, Lunge, Milz, Leber und Gehirn transgener Akt1 N-TAG (TG1) (A) und Akt2 N-TAG (TG2) Mäuse (B), sowie im Vergleich dazu Proteinextrakt aus den Herzen von WT-Tieren. Die Proteinbanden des Herzextraktes von TG1 sind zur besseren Ansicht rechts neben dem Blot noch einmal in einer geringeren Signalintensität abgebildet (A). Der Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1 und Akt2. Die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben wurde über einen BCA-Assay sowie Coomassie-Färbung des Proteingels bestätigt. M: Proteingrößenstandard.

Die WB-Analysen belegen die spezifische Expression der Akt N-TAG Isoformen in den Herzen der transgenen Mäuse. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich ihrer Expressionsstärke. Während in TG2 die Akt2 N-TAG Isoform eher schwach exprimiert wurde, zeigte sich bei der Akt1 N-TAG Isoform der TG1-Linie D eine deutliche Überexpression. Ebenso erschien in diesen Tieren das endogene Akt1 deutlich hochreguliert zu sein.

3.5.2 Analyse der Proteinmenge der Akt Isoformen im Herzen

Da das Akt1-Expressionsniveau in den Herzen der TG1-Tiere auffällig hoch war, wurde überprüft, ob in den übrigen TG1-Linien moderatere Proteinmengen für Akt1 detektiert werden konnten. Zu diesem Zweck wurden Herzextrakte aller TG1-Linien A, D und E, sowie von TG2 und WT hinsichtlich des Akt-Expressionsniveaus untersucht. Die WB-Analyse in Abb. 26 ergab, dass sich in allen TG1-Linien deutlich erhöhte Proteinmengen sowohl der

Ergebnisse

getaggt, als auch der endogenen Akt1 detektieren ließen. Die Proteinmenge an endogener Akt2 war in den TG1-Linien hingegen nicht verändert. Im Gegensatz dazu zeigte TG2 eine im Vergleich zum WT unauffällige Expression von endogener Akt1 und Akt2. Das Expressionsniveau des getaggtten Akt2-Proteins lag wie auch schon in 3.5.1 gezeigt unter dem der endogenen Isoform (A).

Zur Quantifizierung wurde die Akt-Proteinmenge des WT auf 100 % gesetzt und die Signalstärken der Akt-Proteine in den Herzen der TG-Tiere darauf normiert. Dargestellt sind Quantifizierungen dreier unabhängiger WB-Analysen der Akt1- (B) bzw. Akt2-Expression (C). Diese belegen, dass die Proteinmenge der endogenen (endo) Akt1-Isoform in allen TG1-Linien 30- bis 60-fach über der des WT liegt. Ebenso ist die Expression des getaggtten (TAG) Akt1-Proteins im Vergleich zur endogenen wildtypischen Isoform in allen TG1-Linien erhöht. Bei TG1 A und D beträgt diese mehr als 10-fache. Bei TG1 E ist die Expression der getaggtten Isoform etwas moderater, aber immerhin noch viermal stärker als die von wildtypischer Akt1. Dagegen zeigen die TG2-Tiere keine Veränderungen hinsichtlich der Akt1-Proteinmenge (B). Die Analyse der Akt2-Proteinmenge ergab keine Expressionsunterschiede der TG1-Linien im Vergleich zum WT. Auch in den TG2-Tieren war die Expression der endogenen Akt2 unauffällig. Die Akt2 N-TAG Proteinmenge betrug im Mittel nur 1/7 bezogen auf die wildtypische Isoform (C).

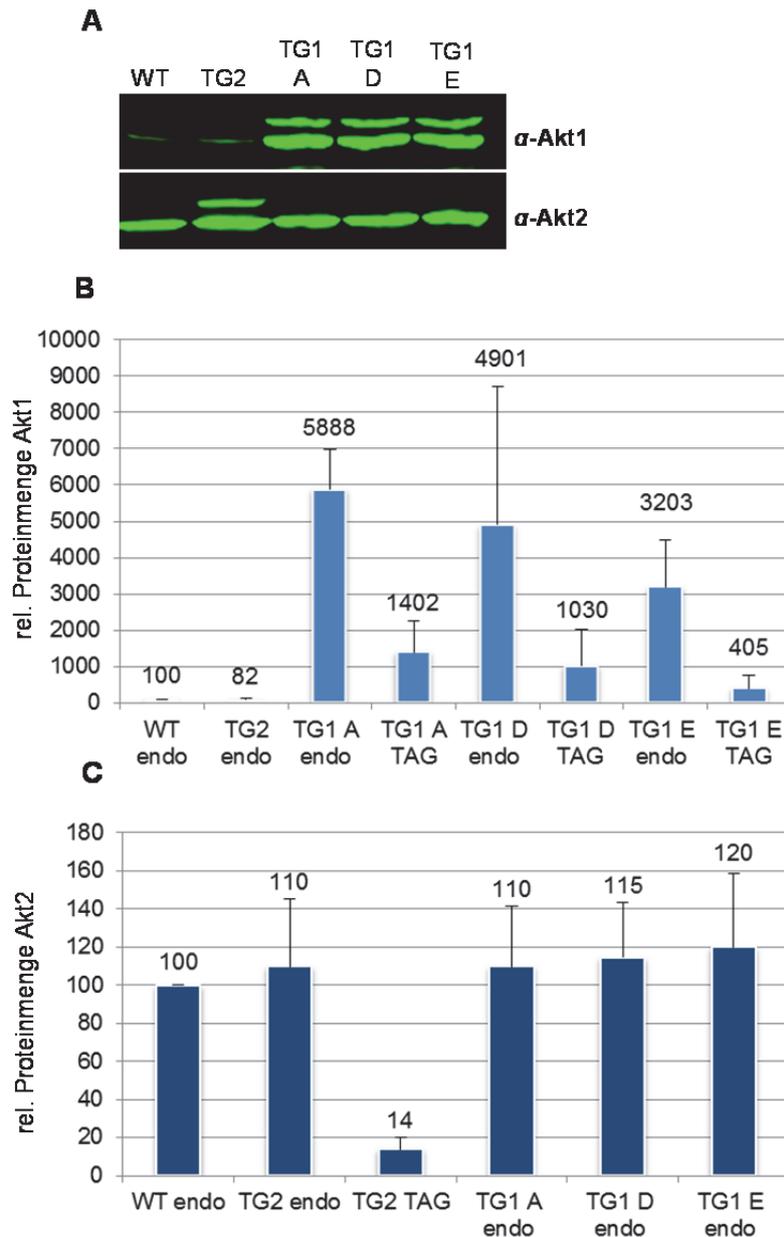


Abb. 26: Expressionsniveaus der Akt Isoformen im Herzen. WB-Analyse von Herzextrakten aus WT und TG mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1 und Akt2 (A). Die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben wurde über einen BCA-Assay sowie Coomassiefärbung des Proteingels bestätigt. Darunter ist die quantitative Auswertung der Signalstärken von drei unabhängigen WB-Analysen dargestellt: rel. Expression von Akt1 in TG1 A-D und TG2 im Vergleich zum WT (B). Sowie die rel. Expression von Akt2 in TG1 A-D und TG2 im Vergleich zum WT (C). endo: endogene Isoform, TAG: getaggte Isoform.

Zusammenfassend ergab die Quantifizierung der Signalintensitäten völlig unterschiedliche Expressionsstärken hinsichtlich getaggtter sowie endogener Akt-Isoformen. Weiterhin zeigten alle TG1-Linien eine massive Verstärkung der endogenen Akt1 Menge, während eine entsprechende Veränderung bei TG2 nicht beobachtet werden konnte.

In einem weiteren Experiment wurde nun untersucht, ob die Überexpression des Akt1 N-TAG Proteins eine vermehrte Expression von endogener Akt1 im Sinne einer positiven Verstärkung

bewirkte. Daher wurde die Expressionsstärke endogener Akt- sowie der Akt N-TAG-Transkripte in den transgenen Mauslinien untersucht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die endogene Akt1-Isoform auf m-RNA Ebene hochreguliert war.

3.5.3 Analyse des mRNA-Gehaltes der Akt Transkripte mittels RT-PCR

Für die Bestimmung der endogenen Akt-Transkripte im Herzen wurden Primer gewählt, die jeweils in der 3'UTR-Region der cDNA binden (Abb. 27). Dies erlaubte eine gezielte Amplifikation der endogenen Akt-Transkripte. Weiterhin wurde die Lokalisation der upstream (up) gelegenen Primer so gewählt, dass ein isoformenspezifischer Nachweis möglich war. Dabei bindet Akt1 endogen up in Exon 13 (A) und Akt2 endogen up in Exon 12 (B). In einer weiteren Untersuchung wurde die Gesamtmenge an endogener und getaggtter Akt im Herzen bestimmt. Dazu wurden isoformenspezifische Primerpaare gewählt, welche sowohl die endogene als auch die getaggte Isoform erkennen.

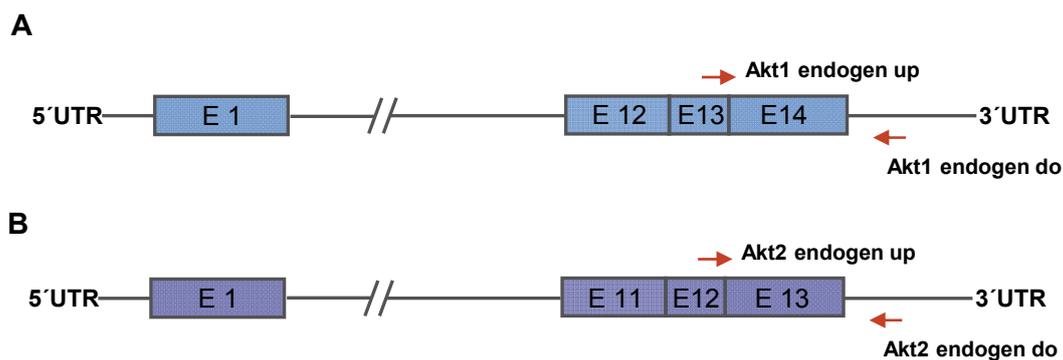


Abb. 27: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primer zum Nachweis der endogenen Akt-Transkriptmenge. Für die Bestimmung der Akt1-Transkriptmenge wurde der Akt1 endogen up Primer in Exon 13 gelegt (A) und der Akt2 endogen up Primer in Exon 12 (B). Die downstream (do) gelegenen Primer binden jeweils im 3'UTR der cDNA und bedingen die gezielte Amplifikation der endogenen Isoformen.

Für die Analysen wurde mRNA aus Herzen vier Monate alter WT und TG Tiere isoliert und die Akt-Transkriptmengen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Normalisierung der Akt mRNA-Menge erfolgte auf HPRT (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase). Analysiert wurden drei biologische Replikate in Doppelbestimmung. In Abb. 28 ist die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse dargestellt.

Die Analyse der endogenen Akt-Transkriptmengen (A) zeigte, dass die endogene Akt1-Expression (hellblaue Balken) in den TG1-Linien A, D und E im Vergleich zum WT nicht verändert war. Ebenso war die endogene Akt2-Expression (dunkelblaue Balken) in diesen Tieren unauffällig. Bei TG2 waren wie erwartet keine Veränderungen der endogenen Akt1-

Ergebnisse

und Akt2-Transkriptmengen detektierbar. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die deutliche Erhöhung der Proteinmengen der endogenen Akt1-Isoform in TG1 durch eine verstärkte Genexpression bedingt war.

Die Analyse der Gesamtmenge der Akt-Transkripte (B) ergab hingegen ein völlig unerwartetes Ergebnis. In allen transgenen Tieren wurden deutlich erhöhte Transkriptmengen jeweils einer Isoform detektiert. Da in TG2 die Akt2- und in TG1 die Akt1-Isoform betroffen war, konnte dies nur auf das getaggte Akt zurückzuführen sein. Dabei zeigte TG2 eine rund 100-fach erhöhte Genexpression an getaggten Akt2-Transkripten verglichen mit der endogenen wildtypischen Isoform. Die getaggten Akt1-Transkripte wurden in der Linie TG1 A rund 60 x stärker exprimiert. Bei den Linien TG1 D und E war die Akt1 N-TAG Genexpression um 35 x höher.

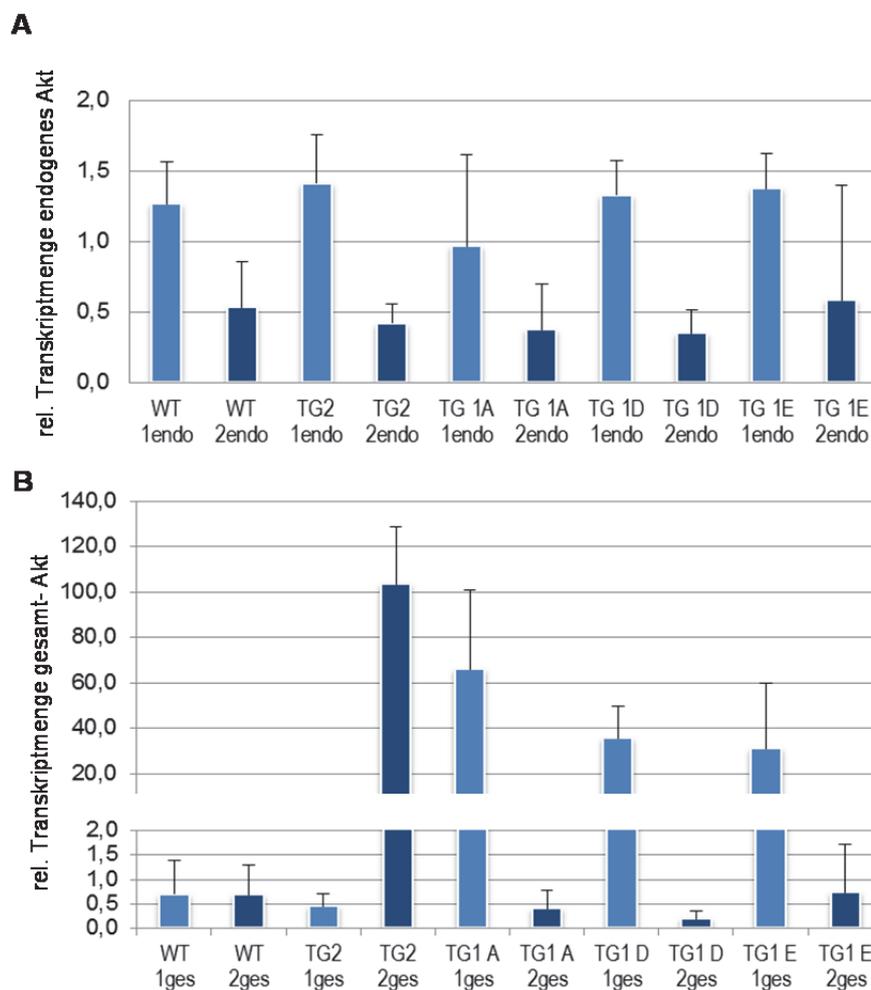


Abb. 28: Analyse der kardialen Akt mRNA-Mengen in TG1 und TG2. Rel. Transkriptmengen der endogenen Akt-Isoformen. Primer 1endo: spezifisch für endogenes Akt1 (hellblau), Primer 2endo: spezifisch für endogenes Akt2 (dunkelblau) (A). Analyse der gesamt-mRNA Konzentration an Akt1 und Akt2. Primer 1gesamt (1ges) ist spezifisch für endogenes und getaggttes Akt1 (hellblau), Primer 2gesamt (2ges) erkennt spezifisch endogenes und getaggttes Akt2 (dunkelblau) (B). Die Menge an Akt mRNA wurde auf HPRT normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen und zwei technischen Replikaten.

Insgesamt belegen diese Ergebnisse eine massive Überexpression von Akt N-TAG-Transkripten im Herzen. Dadurch wurde vor allem die Frage aufgeworfen, wo diese Mengen auf Proteinebene zu finden waren. Besonders auffällig war diese Diskrepanz bei dem Akt2 N-TAG Protein. Dieses wurde wie bereits unter 3.5.2 gezeigt, nur sehr schwach auf Proteinebene exprimiert, allerdings wurden hierfür die insgesamt höchsten Transkriptmengen detektiert. Somit wurde in weiteren Analysen die Hypothese verfolgt, dass die Akt N-TAG-Transkripte durchaus zu Protein translatiert wurden, aber auf Proteinebene einem schnellen proteolytischen Abbau unterlagen.

3.5.4 Nachweis des proteolytischen Abbaus des Akt N-TAG Proteins

Um zu überprüfen, ob sich in den Herzen der transgenen Tiere verkürzte Akt-Fragmente nachweisen ließen, die auf einen proteolytischen Abbau schließen ließen, wurden die bereits verwendeten Akt1- und Akt2-spezifischen Antikörper, sowie ein Pan-Akt-Antikörper und ein Antikörper gegen den Flag-TAG des Fusionsproteins eingesetzt.

In Abb. 29 A ist eine schematische Abbildung des Akt N-TAG Proteins zusammen mit den ungefähren Antikörperbindestellen (Herstellerangaben) dargestellt. Laut diesen bindet α -Akt2 in der Nähe von Aminosäure (AS) 40 innerhalb der PH-Domäne. Der α -Akt1 Antikörper bindet um AS 110 an die Linker-Region, sowie α -Pan-Akt am C-Terminus des Proteins hinter AS 330. Abb. 29 B zeigt exemplarische WB-Analysen mit allen vier Antikörpern. Dabei bindet α -Akt1 getaggetes sowie endogenes Akt1 und erkennt in allen TG1-Linien ein Akt1-Abbauprodukt, welches wie bereits in 3.5.1 erwähnt, in etwa auf einer Höhe von 50 kDa zu detektieren war. Mit α -Akt2 ließen sich keine Abbauprodukte nachweisen. Durch den Gebrauch von α -Pan-Akt wurden hingegen Akt-Abbauprodukte in allen transgenen Mauslinien detektiert. Dieser Antikörper erkannte ebenfalls das schon durch α -Akt1 nachgewiesene Abbauprodukt bei 50 kDa. Zusätzlich zeigten sich bei allen transgenen Linien Doppelbanden, welche bei TG2 auf einer Höhe von ca. 45-50 kDa und bei den TG1-Linien in etwa auf Höhe von 40-45 kDa im Gel lagen. Durch den α -Flag-TAG-Antikörper ließen sich in TG1 und TG2 nur die getaggeten Akt Proteine nachweisen, welche in etwa bei einem Molekulargewicht von 70 kDa detektiert wurden.

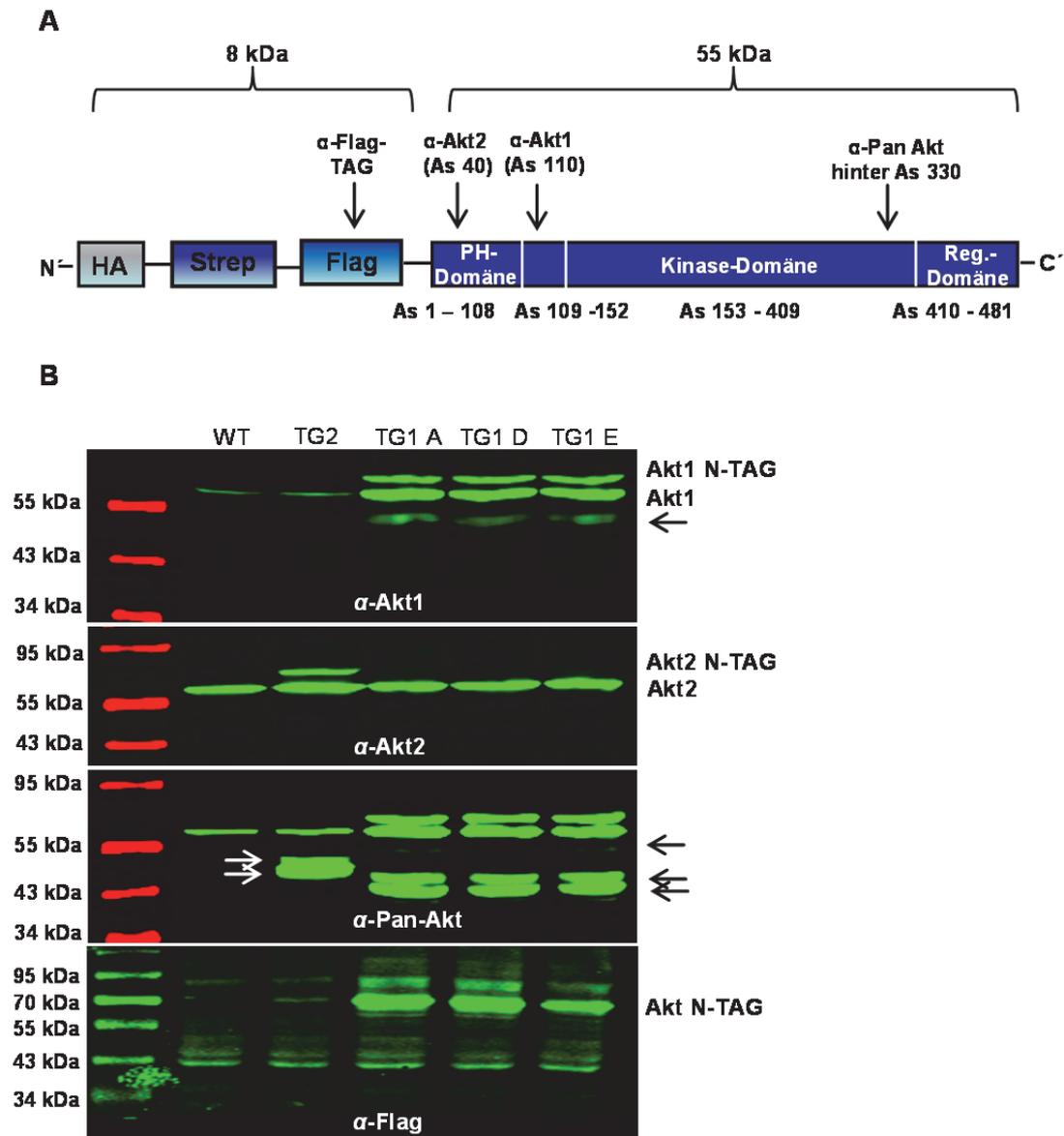


Abb. 29: Nachweis und Analyse des Akt N-TAG-Abbaus. (A): Schematische Darstellung des Akt N-TAG Proteins mit den ungefähren Bindestellen der eingesetzten Antikörper. (B): WB-Analyse von Herzextrakten aller TG Mauslinien im Vergleich zum WT. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern spezifisch für Akt1 (α -Akt1), spezifisch für Akt2 (α -Akt2), einem Pan-Akt Antikörper (α -Pan-Akt), sowie einem Antikörper spezifisch für den Flag-TAG (α -Flag-TAG). Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. As: Aminosäure. Anmerkung: α -Pan erkennt auch Akt2 N-TAG, allerdings wurde zur besseren Übersicht die Scanintensität stark herunterreguliert, so dass das getaggte Akt2 nicht sichtbar ist. Die Akt-Abbaubanden sind durch Pfeile markiert.

Ergebnisse

Insgesamt wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass ein großer Teil der Akt N-TAG Proteine proteolytisch gespalten wurde. Die unterschiedlichen Größen der Abbauprodukte, sowie die Tatsache, dass mehrere Abbauprodukte für eine Isoform detektiert wurden, zeigten einerseits, dass das getaggte Protein an mehreren Stellen gespalten wurde. Zum anderen werden Akt1 und Akt2 N-TAG an verschiedenen Stellen angegriffen, was besonders durch den Nachweis mit α -Pan-Akt gezeigt werden konnte.

Eine ungefähre Kartierung der Akt1-Spaltung ist in Abb. 30 A dargestellt. Der nachgewiesene proteolytische Abbau erklärt vermutlich auch den scheinbaren Anstieg der endogenen Akt1-Expression in den TG1 Herzen. Vermutlich erfolgt hier eine Spaltung (*1) in der Nähe des N-terminalen Endes des Akt1-Fusionsproteins, so dass das Abbauprodukt in der SDS-Page auf Höhe der endogenen Akt1-Isoform läuft. In jedem Fall findet die Prozessierung C-terminal oder innerhalb der Flag-TAG-Sequenz statt, da mittels α -Flag-TAG kein Protein der Größe von endogener Akt1 nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich erfolgte die Bildung von zwei weiteren prominenten Akt1-Abbaubanden, die jedoch nur vom C-terminal bindenden den α -Pan-Akt-Antikörper detektiert wurden. Aufgrund ihrer Größe kann hier von einer Spaltung im Bereich des Linkers (*3+*4) des Fusionsproteins ausgegangen werden. Des Weiteren befindet sich eine Prozessierungsstelle (*2) innerhalb der PH-Domäne N-terminal der Bindestelle des α -Akt1-Antikörpers, welche das ca. 50 kDa große Produkt ergibt, das sowohl von α -Akt1 als auch von α -Pan-Akt erkannt wird (A).

Ein etwas anderes Muster zeigte sich bei Akt2 N-TAG. Hier wurden nur durch α -Pan-Akt zwei deutliche Abbauprodukte nachgewiesen, die in etwa 5-10 kDa größer waren, als die durch diesen Antikörper für Akt1 detektierten Abbauprodukte. Somit erfolgte die Spaltung des Akt2-Fusionsproteins in etwa am C-terminalen Ende der PH-Domäne (*5+*6) (Abb. 30 B).

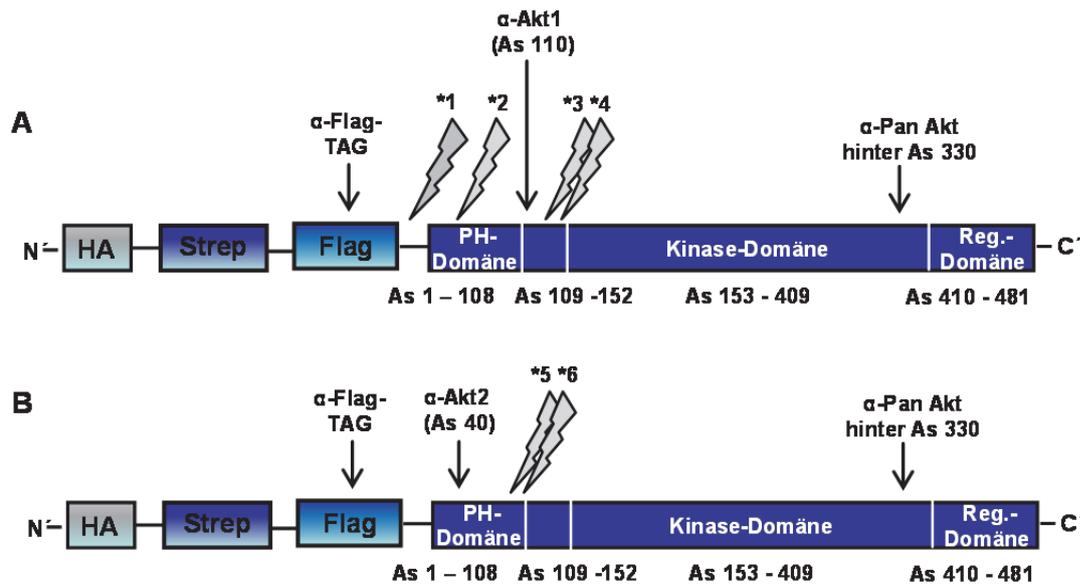


Abb. 30: Kartierung der Akt-Spaltung. Die ungefähre Lage der Prozessierungsstellen ist durch den grauen Pfeil gekennzeichnet und erfolgte anhand der Bindestellen der benutzten Antikörper, sowie der Größe der Akt-Banden im WB. Eine ausführliche Erläuterung der Abbildung ist dem Text zu entnehmen. (A): Kartierung der Akt1-Spaltung. (B): Kartierung der Akt2-Spaltung. As: Aminosäure.

3.5.5 Phosphorylierung der Akt N-TAG Isoformen

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob die Akt N-TAG Proteine die typische Phosphorylierung nach Induktion des PI3K-Signalwegs zeigten und ob auch die Akt N-TAG-Abbauprodukte insulinabhängig phosphoryliert werden konnten. Dazu wurden WT, TG2 und TG1 Mäuse nach Futterentzug über Nacht mit Insulin behandelt. Insulin aktiviert den PI3K-Signalweg und führt zu einer Phosphorylierung an Ser 473, welches für die vollständige Aktivierung des Proteins benötigt wird. Fünf Minuten nach Insulinstimulation wurden die Herzen entnommen und für die WB-Analyse aufgearbeitet. Als Kontrollen dienten Tiere, welchen eine entsprechende Menge NaCl appliziert wurde. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mittels eines α -Phospho-Akt Ser 473-Antikörpers im WB. Abb. 31 zeigt, dass die Stimulation mit Insulin zu einer deutlichen Zunahme der Ser473-Phosphorylierung sowohl des Akt1 N-TAG als auch des Akt2 N-TAG Proteins führte. Die Quantifizierung der Signalintensitäten ergab eine Zunahme der Phosphorylierung um den Faktor 22 für das Akt2 N-TAG Protein. Für Akt1 N-TAG ließ sich eine Steigerung der Phosphorylierung um den Faktor 10 berechnen.

Unter Hungerbedingungen weisen die endogenen Isoformen im WT und TG2 ein ähnlich schwaches Phosphosignal auf, während bei TG1 eine verstärkte Kinase-Aktivität um den Faktor 2,8 bezogen auf den WT detektierbar war. Dies deutet darauf hin, dass die Akt1-

Ergebnisse

Abbauprodukte, welche auf Höhe der endogenen Akt1-Isoform im WB detektiert werden, zu einer leicht erhöhten Menge von basal phosphoryliertem Akt1 führen.

Die Insulinstimulation führte im WT zu einer Zunahme der endogenen Akt-Phosphorylierung um den Faktor 8. In den TG2-Herzen war eine ähnlich starke Zunahme nach Insulingabe feststellbar. Im Gegensatz dazu wiesen die TG1-Herzen auch unter Insulinstimulation ein deutlich höheres Phosphorylierungssignal auf. Daraus kann man vermuten, dass auch die Akt1-Abbauprodukte endogener Länge phosphoryliert werden können. Allerdings lag der Anstieg der Phosphorylierung weit unter dem der Akt1-Proteinmenge, so dass ein großer Teil von Akt1 im nicht-phosphorylierten Zustand vorliegen musste.

Die kürzeren Abbauprodukte von Akt1-, bzw. Akt2 N-TAG wurden hingegen nicht insulinabhängig phosphoryliert (nicht gezeigt).

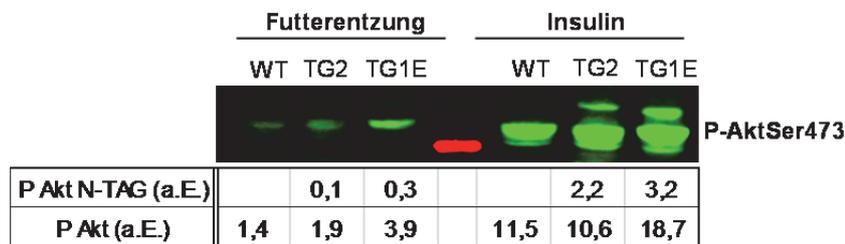


Abb. 31: Phosphorylierung an Ser473 der endogenen und getaggen Akt-Isoformen nach Futterentzuegung, bzw. nach Insulingabe. Der Nachweis erfolgte über einen spezifischen Antikörper, welcher die Phosphorylierungsstelle an Ser473 erkennt. Die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben wurde über einen BCA-Assay sowie Coomassiefärbung des Proteingels bestätigt. a.E.: arbiträre Einheiten.

3.6 Phänotypisierung der Herzfunktion und Morphologie der Akt N-TAG Mauslinien

Da sich herausgestellt hatte, dass das Niveau aktivierter Akt1 sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Insulinstimulation höher war als im WT, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die funktionellen Konsequenzen dieser erhöhten Akt1-Aktivität untersucht.

3.6.1 Echokardiographische Untersuchungen

Ein besonderer Fokus lag auf der Frage, inwieweit sich die Überexpression der Akt1 N-TAG Isoform auf Herzfunktion und -Wachstum auswirkte. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden echokardiographische Untersuchungen zur Beurteilung der Herzfunktion vorgenommen, sowie über den M-Mode die LV Masse bestimmt. Um die langfristigen Auswirkungen der rekombinanten Akt-Expression zu analysieren, wurde eine longitudinale

Ergebnisse

Untersuchung initiiert. Dazu wurden Gruppen von je 10 männlichen WT, TG1 und TG2-Tieren jeweils im Alter von drei, sechs und neun Monaten echokardiographisch untersucht. In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Echokardiographie dargestellt. Interessanterweise zeigten die TG1-Tiere bereits im Alter von 3 und 6 Monaten eine signifikant höhere LV Masse als die WT-Gruppe. Mit 9 Monaten war die LV Masse dieser Tiere im Vergleich zu allen Gruppen signifikant höher (A). Das Körpergewicht nahm während des Untersuchungszeitraums bei allen Gruppen in gleichem Maße zu und unterlag keinen besonderen Schwankungen (B). Ebenso verhielt es sich mit der Herzfrequenz der Tiere, welche während aller Untersuchungen konstant blieb (C). Bei der Bestimmung des enddiastolischen Volumens (EDV) fiel wiederum TG1 mit durchgängig erhöhten Volumina auf, der Unterschied war im Vergleich zu TG2 signifikant (D). Ebenso war das endsystolische Volumen (ESV) in dieser Gruppe im Alter von 3 Monaten signifikant höher als bei TG2, und mit 9 Monaten sowohl zu TG2 als auch zum WT signifikant erhöht (E). Dementsprechend unterschieden sich TG1 und TG2 signifikant hinsichtlich des Schlagvolumens (SV) im Alter von 6 und 9 Monaten (F). Die Ejektionsfraktion, welche sich aus dem Anteil des SV am EDV berechnet, war zu Beginn der Untersuchungen mit 3 Monaten sowie im Alter von 9 Monaten in den TG1-Tieren signifikant niedriger (G). Die Bestimmung des HZV, welche das Produkt aus Herzfrequenz und SV darstellt, zeigte keine Unterschiede zwischen TG1 und WT-Tieren, war aber aufgrund des geringeren SV bei TG2 für diese Gruppe insgesamt verringert (H). (Die Messwerte der echokardiographischen Untersuchungen sind der Tab. 17 im Anhang zu entnehmen.)

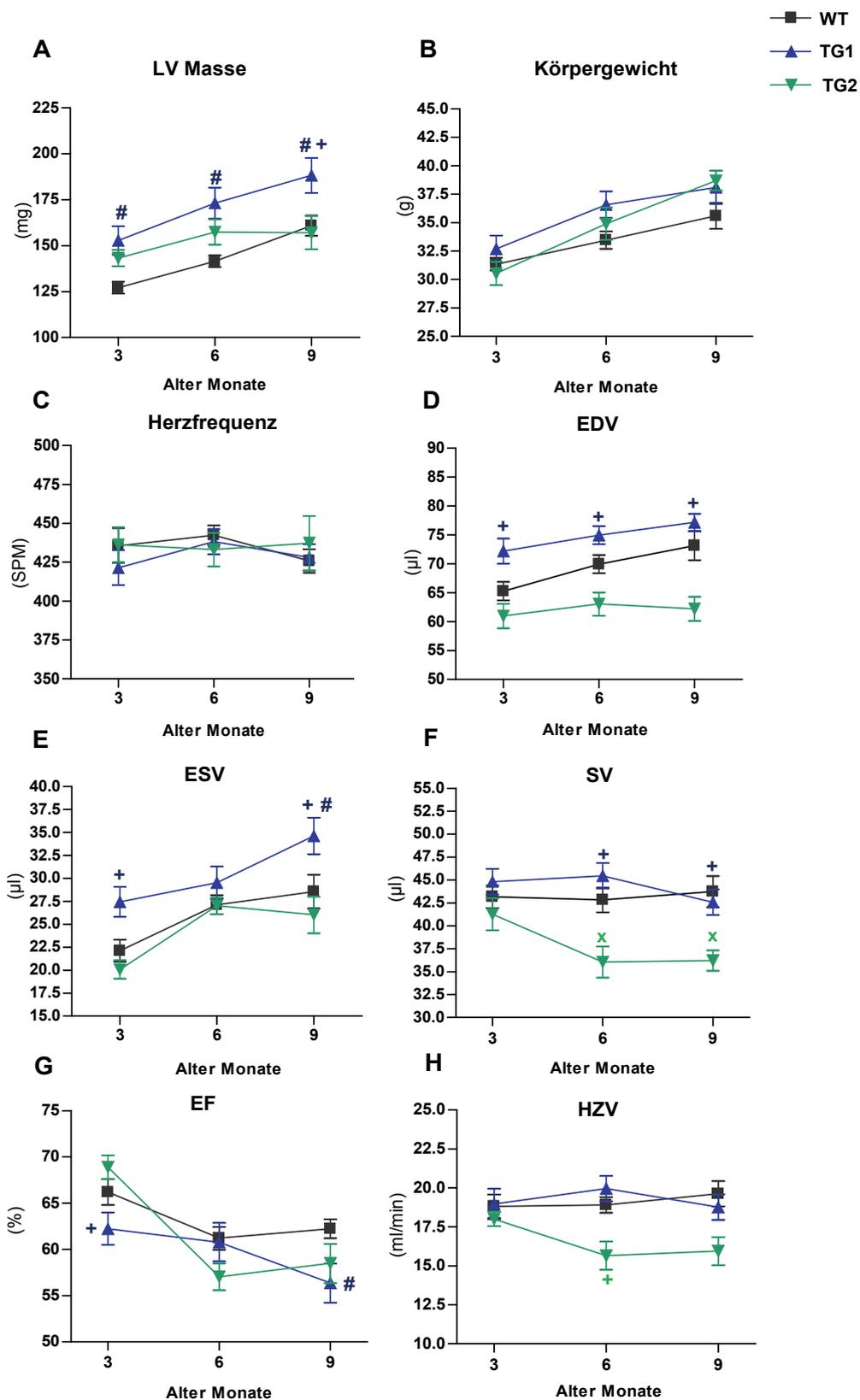


Abb. 32: Echokardiographische Untersuchungen der Akt N-TAG Mauslinien im Alter von 3, 6 und 9 Monaten. A: LV Masse, B: Körpergewicht, C: Herzfrequenz, D: EDV (enddiastolisches Volumen), E: ESV (endsystolisches Volumen), F: SV (Schlagvolumen), G: EF (Ejektionsfraktion), H: HZV (Herzzeitvolumen). n=10 WT, n=10 TG1, n=10 TG2. # WT vs. TG1, x WT vs. TG2; + TG1 vs. TG2; p < 0,05.

3.6.2 Vermessung der Herzgeometrie

Insgesamt fielen die TG1-Tiere durch eine signifikant erhöhte LV Masse sowie größere EDV und ESV auf. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Fragestellung, ob das Lumen des LV bei diesen Tieren insgesamt vergrößert war. Daher wurden zunächst bei allen untersuchten Gruppen die Länge des LV, sowie Durchmesser des LV (LVID) systolisch und diastolisch mittels Echokardiographie bestimmt um eventuelle Größenunterschiede identifizieren zu können.

Die Ergebnisse, welche in Abb. 33 dargestellt sind zeigen, dass die Ventrikel der TG1 Gruppe in Diastole und Systole deutlich, wenn auch nicht signifikant länger waren als bei der WT-Gruppe (A + B). Auch die Durchmesser der LV (LVID) waren bei den TG1-Tieren etwas vergrößert (C + D). Somit war das Lumen der LV der TG1-Tiere insgesamt größer im Vergleich zur WT-Gruppe, was die erhöhten EDV und ESV dieser Tiere erklärte. (Die einzelnen Messwerte sind der Tab. 18 im Anhang zu entnehmen.)

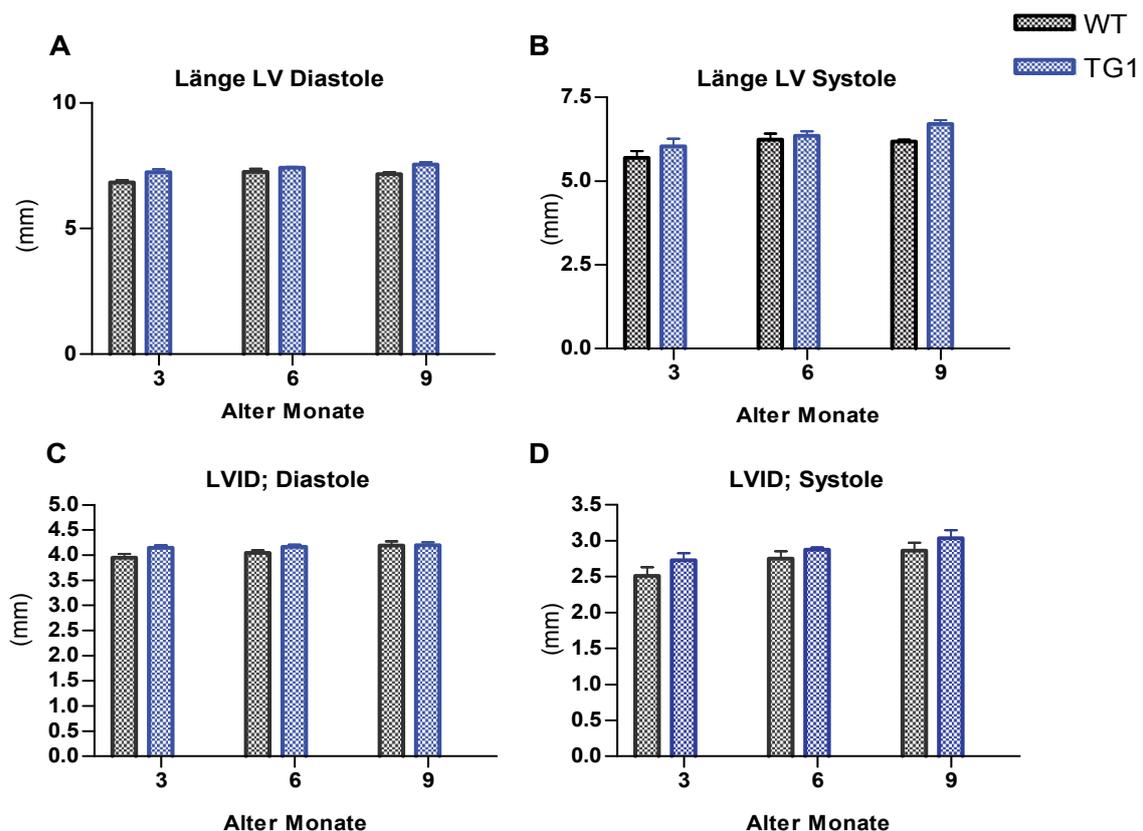


Abb. 33: Vermessung der Herzgeometrie im Alter von 3, 6 und 9 Monaten bei TG1 und WT. Länge des LV in Diastole (A) und Systole (B), sowie LV Durchmesser (LVID) in Diastole (C) und Systole (D). Untersucht wurden n=6 WT und n=6 TG1.

3.6.3 Histologische Untersuchungen

Aufgrund der erhöhten LV Masse der TG1-Gruppe, wurde im Folgenden untersucht, ob der Größenzuwachs auf einer Hypertrophie der Kardiomyozyten beruhte. Da auch die Ejektionsfraktion in diesen Tieren zum Teil signifikant verringert war, wurden weitere Untersuchungen angeschlossen, um Kardiomyozytengröße, Kapillarisation und Kollagenisierung der Herzen zu bestimmen. Dazu wurden die Herzen im Anschluss an die echokardiographischen Untersuchungen im Alter von 9 Monaten entnommen und histologische Analysen durchgeführt.

3.6.4 Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche sowie der Kapillardichte

Hierfür wurden pro Herz jeweils fünf geeignete Areale möglichst quergetroffener Kardiomyozyten in Septum, anteriorer und posteriorer Wand in 20 x Vergrößerung aufgenommen. In diesen Arealen wurde ein $0,1 \text{ mm}^2$ großer Abschnitt markiert, in dem die Anzahl der Kapillaren ausgezählt wurde. Zur Bestimmung der Zellquerschnittsfläche wurden die Zellgrenzen im gleichen Abschnitt automatisch von der BZ-II-Analyser Software markiert und die Oberfläche automatisch berechnet. In Abb. 34 sind beispielhaft Aufnahmen querschnittener Kardiomyozyten aus dem LV einer WT-Maus mit CD 31-Färbung zur Bestimmung der Kapillardichte (A), sowie eine WGA-FITC Färbung zur Markierung der Zellwände abgebildet (B).

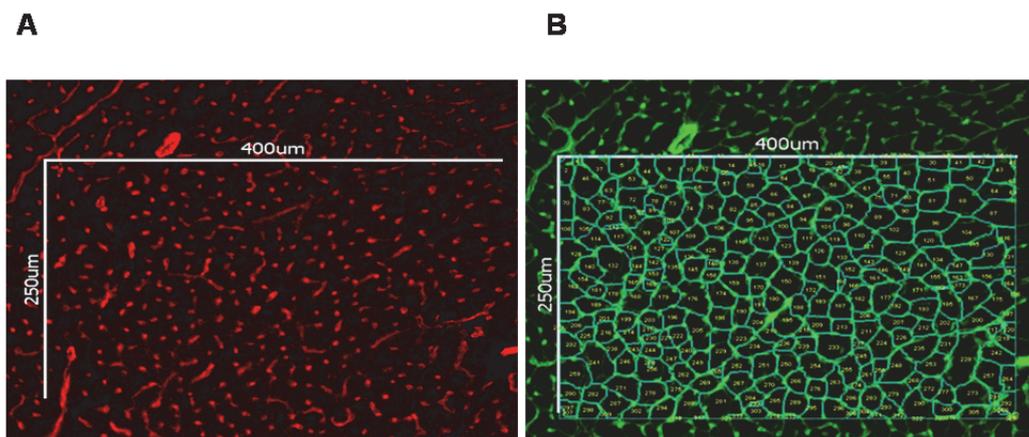


Abb. 34: Beispiele mikroskopischer Aufnahmen des LV einer WT-Maus, in denen jeweils ein $0,1 \text{ mm}^2$ -großer Abschnitt markiert wurde. Zur Bestimmung der Kapillardichte wurde eine CD 31-Färbung durchgeführt (A). Zur Berechnung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche wurden die Zellwände mit WGA-FITC markiert (B).

Ergebnisse

Abb. 35 zeigt die quantitative Auswertung von jeweils sechs Tieren. Die Bestimmung der Zellquerschnittsflächen der Kardiomyozyten (A) ergaben, dass diese in TG1 signifikant um 12 % größer waren als in WT und TG2 (WT: $502,2 \pm 45,7 \mu\text{m}^2$; TG1: $571,2 \pm 57,9 \mu\text{m}^2$; TG2: $471,1 \pm 37,2 \mu\text{m}^2$). Das Ergebnis korreliert mit der echokardiographischen Untersuchung in 3.6.1, die ergab, dass die LV Masse der 9 Monate alten TG1 Gruppe um rund 15 % erhöht war. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die erhöhte LV Masse der TG1-Linie auf einer Hypertrophie der Kardiomyozyten beruhte.

Die Berechnung der Kapillardichte / $0,1\text{mm}^2$ (B) ergab eine signifikante Verringerung um fast 30 % bei TG1, während sich diese zwischen WT und TG2 kaum unterschied (WT: $295,0 \pm 21,2$; TG1: $215,0 \pm 34,8$; TG2: $312,4 \pm 21,6$). Berechnet man die Anzahl der Kapillaren/Zelle, so zeigte sich, dass diese bei TG1 im Vergleich zum WT um 17 % geringer war (WT: $1,4 \pm 0,34$; TG1: $1,17 \pm 0,29$; TG2: $1,45 \pm 0,15$) (C).

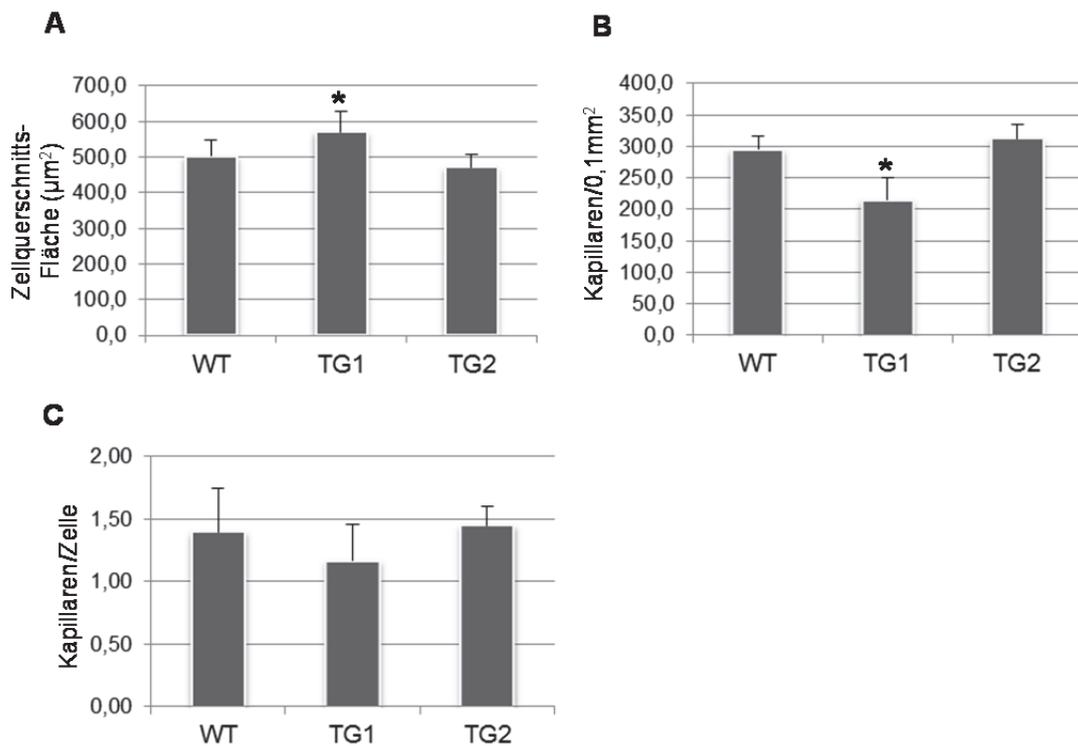


Abb. 35: Quantitative Auswertung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche sowie der Kapillardichte von WT, TG1 und TG2 im Alter von 9 Monaten. A: Zellquerschnittsfläche, B: Kapillaren/ $0,1\text{mm}^2$, C: Kapillaren/Zelle. WT n=9, TG1 n=6, TG2 n=4. $p < 0,05$.

3.6.5 Beurteilung des interstitiellen Kollagengehaltes

Die Pumpfunktion des Herzens beruht auf dem Zusammenspiel der kardiomyozytären Kontraktilität sowie der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix. Eine Bindegewebsvermehrung führt dabei immer zu Veränderungen der Herzmechanik. Die Analyse der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix durch Färbung kollagenhaltiger Strukturen mit Siriusrot sollte daher Aufschluss darüber geben, ob diese in den TG1-Tieren verstärkt kollagenisiert war, was ebenfalls eine Ursache der verringerten Ejektionsfraktion sein konnte. Für die Analyse wurden Querschnitte des LV angefertigt und mit Siriusrot gefärbt. Für die Auswertung wurden Übersichtsaufnahmen in 40 x Vergrößerung von Septum, sowie der linksventrikulären anterioren und posterioren Wand angefertigt. Insgesamt wurden von jeder Gruppe n=6 Tiere analysiert. Abb. 36 zeigt exemplarische Aufnahmen des Septums. Nach Auswertung der Siriusrotfärbungen aller aufgenommenen Areale war keine Zunahme einer Kollageneinlagerung im Interstitium der transgenen Tiere zu erkennen, so dass auf eine Quantifizierung verzichtet wurde.

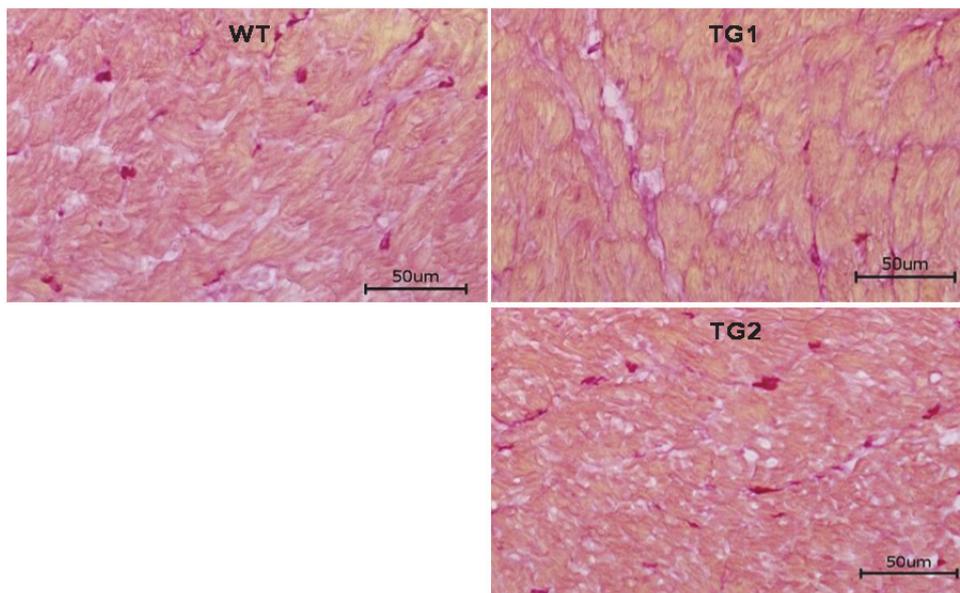


Abb. 36: Mikroskopische Aufnahmen des Septums einer WT-, TG1-, sowie TG2-Maus nach Siriusrotfärbung zur Bestimmung des Kollagengehaltes im Myokard.

Die Ergebnisse der echokardiographischen und morphologischen Untersuchungen zeigten, dass die Zunahme der LV Masse zusammen mit den erhöhten LV-Volumina insgesamt auf eine mild ausgeprägte exzentrische Hypertrophie dieser Tiere hindeutete, welche jedoch nicht mit fibrotischen Veränderungen des Gewebes einherging.

3.7 Identifikation von Akt1 Interaktionspartnern im Mausherzen mittels der TAP/MS-Methode

Die Ergebnisse der basalen Charakterisierung der Akt N-TAG Mäuse ergab, dass die rekombinanten Proteine zu einem großen Teil abgebaut wurden. Da die Proteinmenge der Akt2 N-TAG Isoform im Mittel nur 14 % der endogenen Akt2 Menge betrug, wurden für die TAP/MS- Experimente nur Akt1 N-TAG Tiere verwendet. Voraussetzung für eine valide Identifizierung Akt1-assoziiierter Interaktionspartner war eine saubere Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Wie bereits unter 3.5.4 gezeigt, wurde davon ausgegangen, dass der TAP-TAG aller Akt-Abbauprodukte durch Proteolyse entfernt wurde. Daher wurde zunächst die Aufreinigung im Silbergel überprüft. Für den Ansatz wurden Proteinextrakte aus jeweils fünf WT- und fünf TG1- Herzen gewonnen und die Strep-Tactin-Eluate nach TAP über eine SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Silberfärbung visualisiert und massenspektrometrisch analysiert.

Abb. 37 A zeigt das Silbergel einer solchen TAP, die mittels MS identifizierte Proteine sind in der Tabelle gelistet (B). Dabei erscheint in der Gelspur des Akt1 N-TAG Strep-Tactin-Eluates als prominenteste Bande auf Höhe von 70 kDa die rekombinante Akt1 (Bande 4). Als koeluierte Proteine konnten wie bereits bei den Akt1 N-TAG - exprimierenden HEK293T Zellen die Chaperone HSP90 (Bande 1) und HSP70 (Bande 3), sowie die β -Untereinheit der ATP-Synthase (Bande 8) identifiziert werden. Des Weiteren wurde in Bande 2, sowie 6 und 7 die α - und β -Untereinheit der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCC1, bzw. MCC2), sowie in Bande 5 ein Abbauprodukt von Desmoglein-1 gefunden.

Im Strep-Tactin-Eluat der WT Herzen befanden sich ebenfalls Proteine, die aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit den Affinitätsmatrizes isoliert wurden. So wurde in den Banden 10 und 11 Abbauprodukte der Matrix-Metalloprotease ADAM12 (*Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12*) gefunden. Weiterhin befand sich, wie auch schon im Akt1 N-TAG Strep-Tactin-Eluat mit 11 Peptiden in Bande 9 die MCC1, sowie in Bande 12 die MCC2 mit einem Peptid. Allerdings waren die Intensitäten der MCC1 und MCC2 im Akt1 N-TAG Strep-Tactin-Eluat mit 22, bzw. 17 und 16 identifizierten Peptiden deutlich stärker. Die MCC gehört zur Gruppe der biotinabhängigen Carboxylasen, und könnte daher unspezifisch an die Säulenmatrix der Strep-Tactin Säule binden. Da aber gleiche Mengen von Proteinextrakt für die TAP eingesetzt wurden, war die erhöhte Menge der MCC

Ergebnisse

im Akt1 N-TAG Strep-Tactin-Eluat ein Hinweis auf eine mögliche spezifische Interaktion des Enzyms mit Akt1.

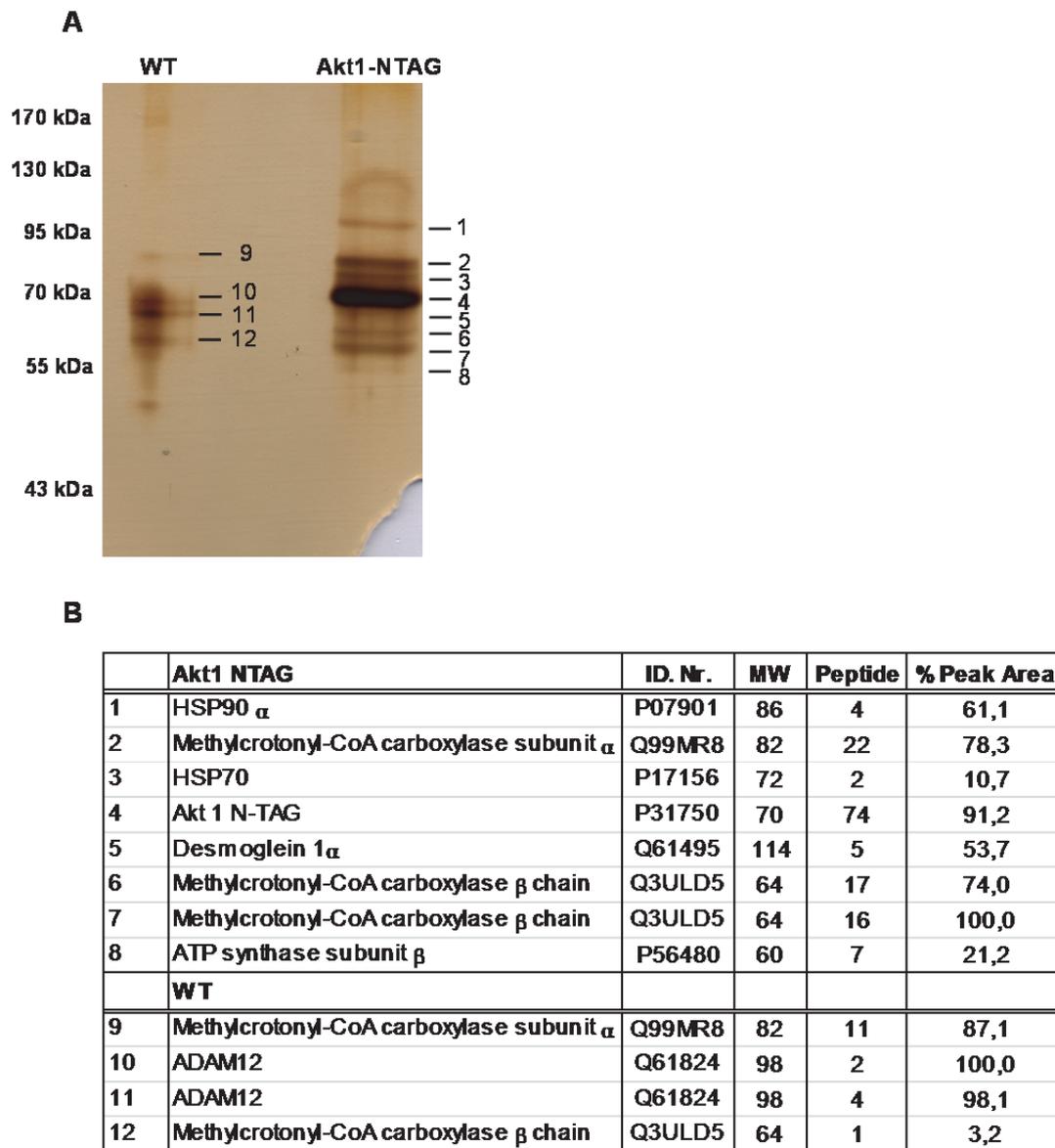


Abb. 37: Silberfärbung einer SDS-Page nach TAP mit Akt1 N-TAG und WT Mausherzen (A), sowie eine Tabelle mit identifizierten Peptiden nach MS-Analyse (B). ID.Nr.: Identifizierungsnummer. MW: Molekulargewicht. % Peak Area: Flächen-Integral der eluierten Peptide bezogen auf Gesamtintensität der gemessenen MS-Spektren.

Die Ergebnisse belegen, dass eine präzise Aufreinigung des rekombinanten Akt1 Proteins aus den Herzen ohne Akt1 N-TAG Abbauprodukte mittels der TAP-Methode möglich war. Wie bereits bei den Akt1 N-TAG-exprimierenden HEK293T Zellen zeigte sich auch im Herzen ein ähnliches Muster koeluerter Proteine. Als interagierende Proteine konnten auch hier die Chaperone HSP90 und HSP70, sowie die ATP-Synthase identifiziert werden. Im Gegensatz zur TAP/MS-Analyse von Akt1-Interaktionspartnern in kultivierten Zelllinien ist die Suche

nach Bindungspartnern der Kinase im Herzgewebe aufgrund größerer Proteinmengen und komplexer Strukturen wie des kontraktilen Apparates anspruchsvoller. Da sich in der WT-Probe einige Proteine identifizieren ließen, die ebenfalls in der Akt1 N-TAG Probe vorhanden waren, wurde auch für den *in-vivo* Ansatz im Herzen eine relative Quantifizierung der Bindungspartner durchgeführt, um spezifische Interaktionspartner von unspezifisch an die Säulenmatrix gebundenen Proteinen zu unterscheiden.

3.7.1 Stabile Isotopen Dimethyl-Markierung (DML) zur relativen Quantifizierung von Akt1 Bindungspartnern

Der experimentelle Ablauf der DML zur relativen Quantifizierung der Herzproben ist in Abb. 38 schematisch dargestellt. Die Proteinextrakte aus WT und TG1 Herzen wurden hierfür auf die gleiche Konzentration eingestellt, mittels TAP aufgearbeitet, die Strep-Tactin-Eluate anschließend direkt in Lösung mit Trypsin verdaut und Dimethyl-markiert. Anschließend wurden die markierten Strep-Tactin-Eluate 1:1 vermischt und massenspektrometrisch analysiert (A).

Die zweifache Methylierung der freien Aminogruppen der Peptide erfolgte mit unterschiedlich schwerem Formaldehyd. Dafür wurden Peptide der WT-Probe mit leichtem Formaldehyd und leichtem Natriumcyanoborhydrid versehen, was zu einer Massenzunahme von 28 Da führte. Die Peptide der TG1-Probe wurden hingegen mit schwerem ¹³C-markiertem, deuteriertem Formaldehyd und deuteriertem Natriumcyanoborhydrid markiert, wodurch eine Massenzunahme von 36 Da erreicht wurde. Insgesamt ergab sich dadurch eine Massendifferenz von 8 Da zwischen leicht und schwer markierten Peptiden, wodurch sich diese relativ zueinander quantifizieren ließen (B).

Da die TAP und die anschließende Dimethyl-Markierung unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, konnte man nach MS-Analyse bei einem verschobenen Verhältnis schwer zu leicht markierter Peptide ableiten, dass eine Bindung an Akt1 vorlag.

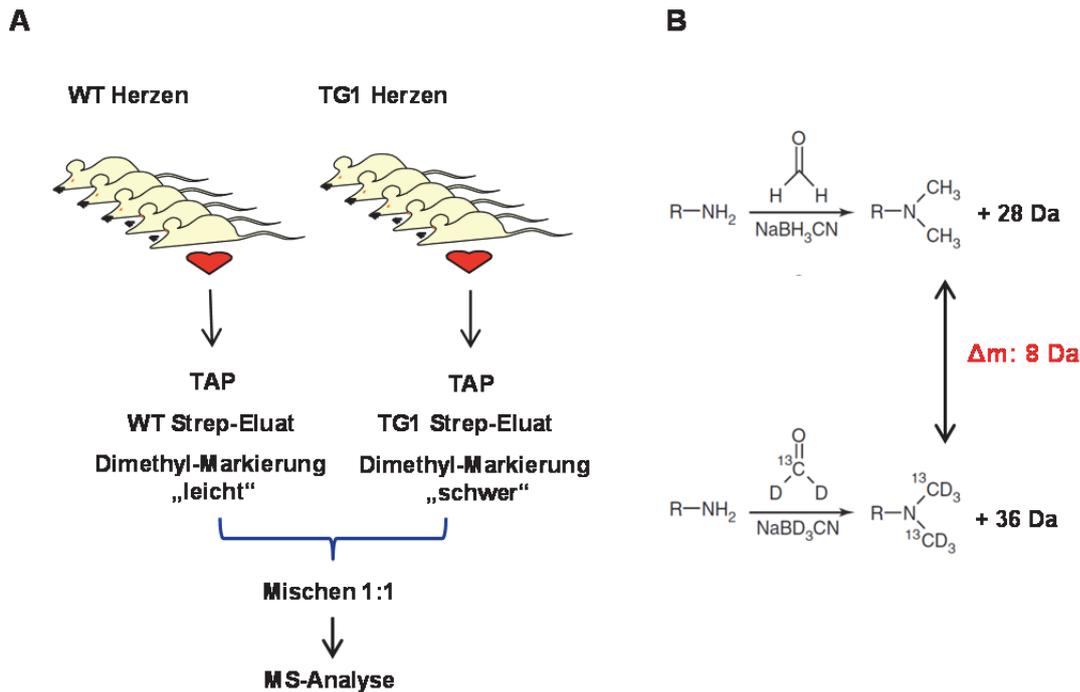


Abb. 38: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs des DML (A). Prinzip der zweifachen Methylierung freier Aminogruppen der Peptide mit leichtem oder schwerem ^{13}C -markiertem, deuteriertem Formaldehyd (B). Δm : Differenz des Massengewichts.

In Tab. 16 sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen TAP/MS-Analysen zusammengefasst. Es wurden nur Proteine aufgelistet, die in einer TAP-Analyse mit mehr als zwei Peptiden, sowie in mehr als einer TAP-Analyse mit mindestens einem Peptid und einem Verhältnis schwer zu leicht markierten Peptiden größer 3:1 identifiziert werden konnten. Es sind deutliche Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen schwer markierter Peptide aus der Akt1 N-TAG Probe und leicht markierter Peptide aus der WT-Probe zu erkennen. Die identifizierten Proteine im oberen Abschnitt der Tabelle konnten nur in der Akt1 N-TAG Probe, nicht aber im WT identifiziert werden, daher ist das Verhältnis als ∞ angegeben. Dies zeugt von einer stabilen Bindung an Akt1. Weiterhin konnte mit einem Verhältnis von 26,9:1 HSP90 als stabilitäts-gebendes Chaperon von Akt1 identifiziert werden. Die übrigen Proteine zeigten ein deutlich geringeres Verhältnis schwer zu leicht markierter Peptide in einem Bereich zwischen 3,7 - 10,8:1. Der Bindungscharakter dieser Proteine an Akt1 ist somit von transienter Natur. Auch in diesem Ansatz ließ sich die ATP-Synthase reproduzierbar aufreinigen und das mit ähnlichem Verhältnis schwer zu leicht markierter Peptide wie bereits bei den HEK293T Zellen unter 3.1.4.

Identifiziertes Protein	ID. Nr	Anzahl Peptide/TAP			S.A. (%)	Ratio S/L	MW
		TAP 1	TAP 2	TAP 3			
Formin-binding protein 4	Q6ZQ03	0	1	1	0,7	∞	118
Myosin-binding protein C, cardiac-type	Q3UIK0	4	0	1	4,4	∞	146
HSP90 β	P11499	4	0	2	7	26,9	84
Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	6	1	5	12,8	10,8	74
Actin, alpha cardiac muscle	P62737	2	0	2	7,7	5,3	42
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit α	Q99MR8	12	0	10	21,3	4,3	82
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase β chain	B2RUK5	12	0	9	30	4,3	64
ATP synthase subunit α , mitochondrial	Q03265	4	0	0	9	4,2	63
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Q5DTI2	2	0	0	2,6	4,1	122
ATP synthase subunit β , mitochondrial	P56480	2	0	0	4,5	3,9	60
Glutathione peroxidase 1	P11352	3	0	0	16,9	3,7	23

Tab. 16: Zusammenfassung der MS-Ergebnisse von drei unabhängigen TAP's aus Mausherzen nach in-Lösungs-Verdau mit Trypsin und DML. S.A. (%): Median der Peptidsequenzabdeckung in %. Ratio S/L: Median der Verhältnisse schwer zu leicht markierter Peptide aus den drei angegebenen TAP's. ID.Nr: Identifizierungsnummer. MW: Molekulargewicht.

3.8 Verifizierung der Akt1-Bindungspartner in Kardiomyozyten

Im ersten Teil der Arbeit konnten bereits ATP-Synthase und Phgdh als Interaktionspartner von Akt1 in HEK293T Zellen verifiziert werden. Interessanterweise wurde die ATP-Synthase auch im Herzen als potentieller Bindungspartner von Akt1 identifiziert. Dies unterstützt die Ergebnisse der TAP-Experimente mit HEK293T Zellen und wurde nachfolgend mittels PLA auf isolierten adulten Kardiomyozyten aus WT-Mäusen untersucht. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Frage, ob sich Akt1 Bindungspartner, die in HEK293T Zellen identifiziert wurden, nicht jedoch bei der TAP/MS-Analyse der Herzen, mit dem PLA auf Maus-Kardiomyozyten bestätigen ließen. Exemplarisch wurde dies für Phgdh durchgeführt.

3.8.1 PLA zur Bestätigung des Akt1-ATP5A1-Komplexes

Für die Verifizierung der Interaktion zwischen Akt1 und der ATP-Synthase wurden Antikörper gegen Akt1 (Maus) und die α -Untereinheit der ATP-Synthase ATP5A1 (Kaninchen) verwendet, sowie die Zellkerne mit Dapi angefärbt. Die Komplexe zwischen Akt1 und den jeweiligen Bindungspartnern sind an den rot fluoreszierenden Signalen zu erkennen. Pro PLA wurden sieben unterschiedliche Areale in 60 x Vergrößerung fotografiert und für jeden Kardiomyozyten die dazugehörigen roten Signalen ausgezählt, um den Mittelwert der Signale pro Zellkern bestimmen zu können. In Abb. 39 sind exemplarisch Mikroskopaufnahmen der PLA-Proben von Akt1 und ATP5A1 (A) und den Kontrollen (B

Ergebnisse

und C) dargestellt. Die PLA-Probe (A) weist im Vergleich zur ATP5A1- (B) und Akt1-Kontrolle (C) deutlich mehr rote Signale auf. Die statistische Auswertung roter Signale/Zellkern von drei unabhängig durchgeführten PLA's bestätigt diesen Befund (D). Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der PLA-Proben auf 100 % gesetzt und die zugehörigen Kontrollen darauf normiert. Die Ergebnisse zeigen somit eine Komplexbildung zwischen Akt1 und ATP-Synthase in Kardiomyozyten.

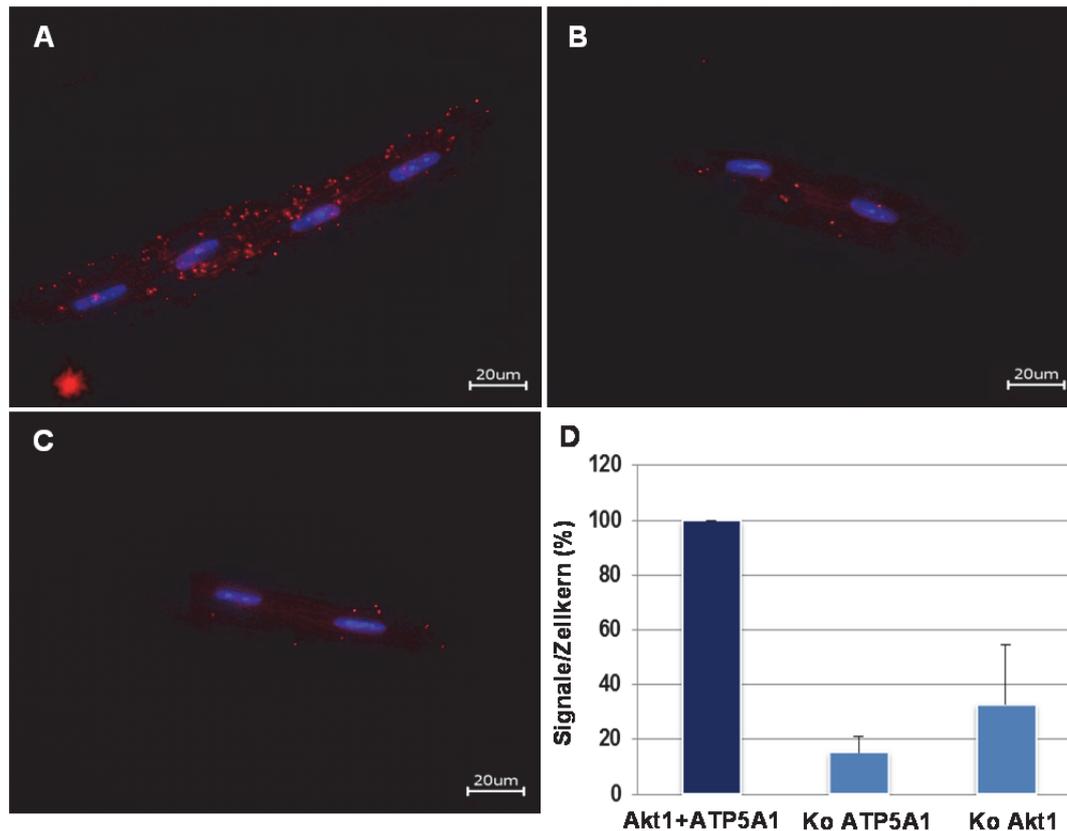


Abb. 39: : PLA-Ansatz mit α -Akt1 und α -ATP5A1 auf isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten. PLA-Probe mit beiden Primärantikörpern (A). Kontrolle des ATP5A1-Primärantikörpers (B). Kontrolle des Akt1-Primärantikörpers (C). Statistische Auswertung roter Signale/Zellkern von drei unabhängig durchgeführten PLA's (D). Die Signalstärke der PLA-Probe wurde auf 100 % gesetzt und die zugehörigen Kontrollen (Ko) darauf normiert.

3.8.2 Verifizierung des Akt1-Phgdh-Komplexes

Da sich das Screening nach Akt Bindungspartnern im Herzen aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken und Abbauraten der getaggtten Proteine als schwierig erwies, war es von großem Interesse zu untersuchen, ob potentielle Interaktionspartner aus dem HEK293T-Zell-Ansatz direkt mittels PLA in Kardiomyozyten verifiziert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde versucht, eine Interaktion zwischen Akt1 und Phgdh nachzuweisen. Die exemplarischen Mikroskopaufnahmen der adulten Maus-Kardiomyozyten in Abb. 40 weisen

Ergebnisse

sichtlich mehr rote Signale der PLA-Probe von Akt1 und Phgdh auf (A), als die zugehörigen Kontrollen (B und C). Die statistische Auswertung der roten Punkte/Zellkern dreier unabhängig durchgeführter PLA's bestätigte dieses Ergebnis und belegt somit eine Komplexbildung zwischen Akt1 und Phgdh auch in Kardiomyozyten.

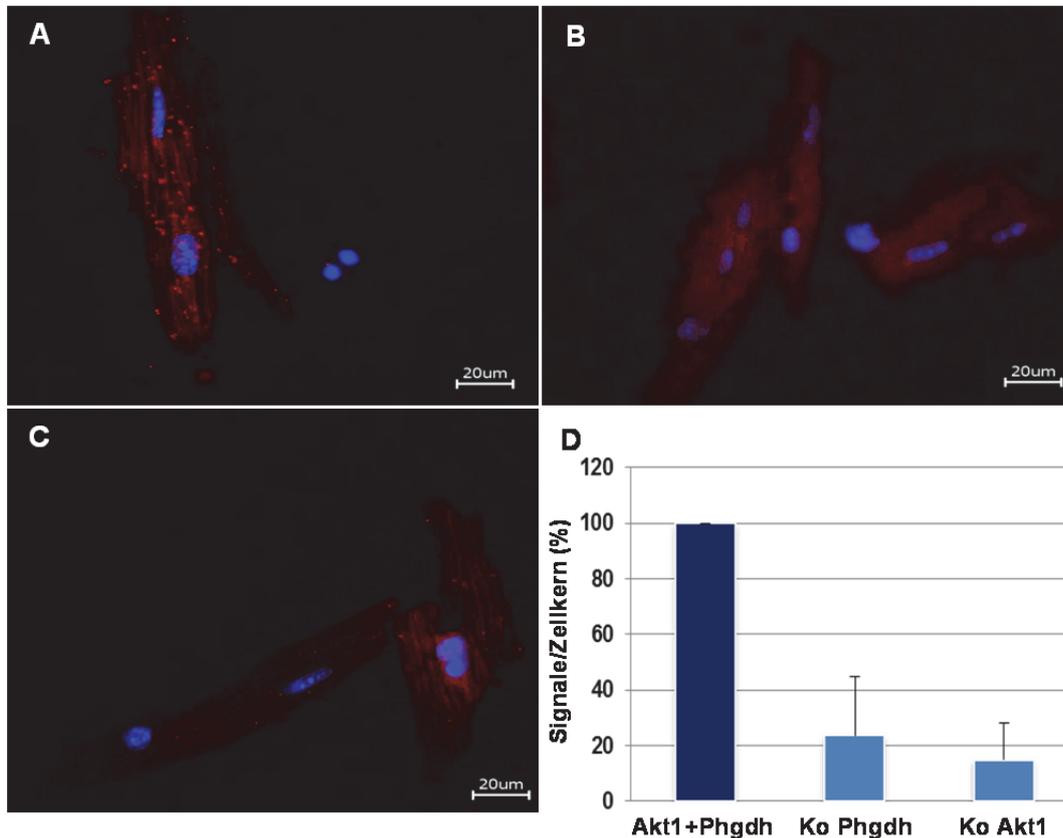


Abb. 40: PLA-Ansatz mit α -Akt1 und α -Phgdh auf isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten. PLA-Probe mit beiden Primärantikörpern (A). Kontrolle des Phgdh-Primärantikörpers (B), sowie des Akt1-Primärantikörpers (C). Statistische Auswertung roter Signale/Zellkern von drei unabhängig durchgeführten PLA's (D). Die Signalstärke der PLA-Probe wurde auf 100 % gesetzt und die Kontrollen (Ko) darauf normiert.

3.9 Akt KO Mäuse

Die Überexpression von Akt1 N-TAG führte zu einer Vergrößerung des LV durch eine Zunahme des Kardiomyozyten-Durchmessers. Zusätzlich war die Ejektionsfraktion in diesen Herzen zum Teil signifikant verringert. Das impliziert, dass Akt1 im Herzen ein Wachstumssignal vermittelt und zum anderen die Kontraktion beeinflusst. In weiteren Untersuchungen wurde nun analysiert, wie sich die Deletion von Akt1 bzw. Akt2 auf das kardiale Wachstum und die Herzfunktion auswirkt. Zu diesem Zweck wurde ein kardiales Stressmodell mittels chronischer β -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol gewählt. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden zwei unterschiedliche *Akt-knockout* (KO) Mausmodelle genutzt. Zunächst wurde mit ubiquitären Akt-KO Mäusen gearbeitet, denen jeweils eine Isoform vollständig fehlte. Im weiteren Verlauf der Arbeit kamen induzierbare kardiomyozytenspezifische Akt1-KO Mäuse (ICM KO1) hinzu.

3.9.1 Charakterisierung der KO Mäuse mittels WB

Hierzu wurden drei Monate alten WT, Akt1- (KO1) und Akt2 (KO2) -KO, sowie ICM KO1 Tieren zwei Wochen nach Tamoxifen-Behandlung die Herzen entnommen. Anschließend wurden diese für die WB-Analyse aufgearbeitet, um die Expression von Akt mittels Akt1 und Akt2-spezifischen Antikörpern zu untersuchen (Abb. 41). Wie erwartet zeigte sich kein Akt1- bzw. Akt2-Signal in den KO1 bzw. KO2 Herzextrakten. Ebenfalls war die Expression der jeweils verbleibenden Akt Isoform unauffällig und wurde nicht kompensatorisch hochreguliert. Die Akt1-Expression im ICM KO1-Herzextrakt war im Vergleich zum WT um $\frac{3}{4}$ reduziert. Das verbleibende Akt1-Signal stammt u.a. von Endothelzellen und Fibroblasten, was mittels histologischer Untersuchungen der ICM KO1 Herzen gezeigt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

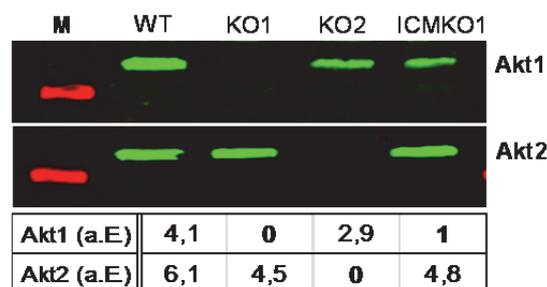


Abb. 41: WB-Analyse zur Expression von Akt in den Herzen der Akt1- (KO1) und Akt2-knockout Mäuse (KO2), sowie der kardiomyozytenspezifischen Akt1-knockouts (ICM KO1) mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1 und Akt2. Die Tabelle zeigt die Quantifizierung der Signalintensitäten in arbiträren Einheiten (a.E.). M: Proteingrößenstandard. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

3.10 Untersuchung von Herzfunktion und Morphologie der KO1- und KO2-Tiere nach chronischer β -adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol

Die Induktion der Hypertrophie wurde über eine chronische Applikation von Isoproterenol für insgesamt 14 Tage in einer Konzentration von 6,6 $\mu\text{g/g/Tag}$ mittels Implantation osmotischer Minipumpen unter die Haut erreicht. Zur Bestimmung der Morphologie des Herzens sowie der funktionellen Analyse wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Die Charakterisierung der basalen Herzfunktion erfolgte vor Implantation der Isoproterenol Pumpen (Tag 0). Ferner wurden Messungen an Tag 7 und an Tag 14 durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden vier Monate alte männliche Tiere verwendet. Die Anzahl der behandelten Tiere belief sich auf $n = 12$ WT, sowie 10 KO1 und 7 KO2.

3.10.1 Analyse der Hypertrophie mittels Echokardiographie

Die Ergebnisse in Abb. 42 zeigen, dass die chronische β -adrenerge Stimulation bereits nach 7 Tagen zu einer signifikanten Zunahme der LV Masse aller Mausgruppen führte. Dieser Effekt war auch nach 14-tägiger Applikation nicht weiter steigerbar (A). Das Körpergewicht der Mäuse blieb während des untersuchten Zeitraums konstant. Auffällig war, dass beide KO-Mausgruppen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die Kontrollgruppe aufwiesen (B). Die Normalisierung der LV Masse auf das Körpergewicht (Herzindex) zeigte jedoch keine Auffälligkeiten zwischen den Gruppen. Insgesamt induzierte die Applikation von Isoproterenol nach 7 Tagen eine deutliche Hypertrophie aller behandelten Gruppen, was sich an der signifikanten Zunahme des Herzindex äußerte (C).

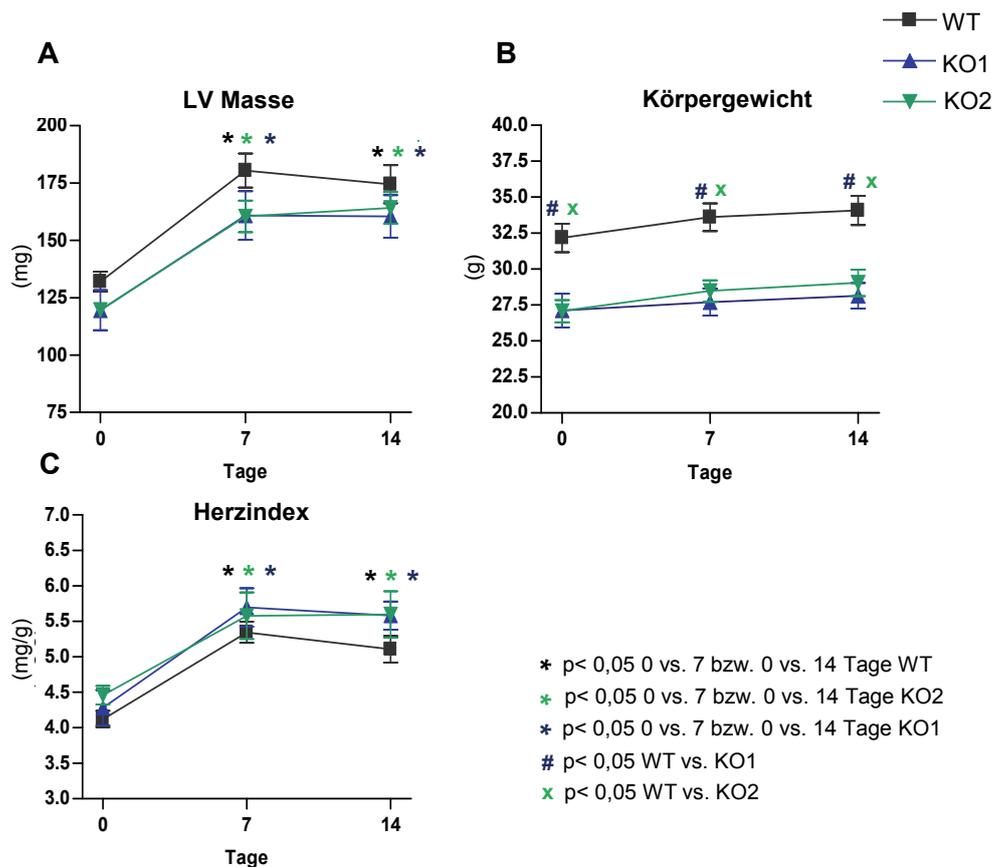


Abb. 42: Beurteilung der Hypertrophie von KO1, KO2 und WT. A: LV Masse, B: Körpergewicht, C: Herzindex. Die LV Masse wurde mittels M-Mode bestimmt. Vor jeder echokardiographischen Untersuchung wurden die Mäuse gewogen, was zur Ermittlung des Herzindex diente. Untersucht wurden n=12 WT, n=10 KO1, n=7 KO2.

3.10.2 Analyse der Herzfunktion mittels Echokardiographie

Die β -adrenerge Stimulation führte zu einer signifikanten Steigerung der Herzfrequenz in allen behandelten Gruppen nach 7 und 14 Tagen (Abb. 43 A). Die Zunahme der enddiastolischen (EDV) und endsystolischen Volumina (ESV) wies bereits nach 7 Tagen in allen Gruppen auf eine Dilatation des Ventrikels hin. Bei KO1 ließ sich nur eine geringe Zunahme im EDV messen, allerdings entwickelten sie im Vergleich zu den übrigen Gruppen auch eine deutliche Erhöhung des ESV. Das daraus resultierende Schlagvolumen war demnach in den KO1- Mäusen nach 7 Tagen deutlich geringer als bei KO2 und WT. Dieser Unterschied stellte sich 14 Tage nach Behandlungsbeginn als signifikant gegenüber der WT-Gruppe heraus (D). Während die EF bei WT und KO2 unter der Isoproterenol-Behandlung gleich blieb, bzw. noch leicht zunahm, wiesen die KO1-Tiere eine deutliche Abnahme auf (E). Das HZV als Produkt aus SV und HF zeigte nur bei WT und KO2 nach 7 und 14 Tagen

Ergebnisse

eine signifikante Zunahme. Bei KO1-Gruppe konnte dies aufgrund des deutlich geringeren Schlagvolumens nicht beobachtet werden. Hier ergab sich an Tag 14 ein signifikant niedrigeres HZV der KO1-Tiere verglichen mit der WT-Gruppe (F). (Die einzelnen Werte der echokardiographischen Untersuchungen zu Hypertrophie und Herzfunktion der KO-Mäuse sind der Tab. 19 im Anhang zu entnehmen.)

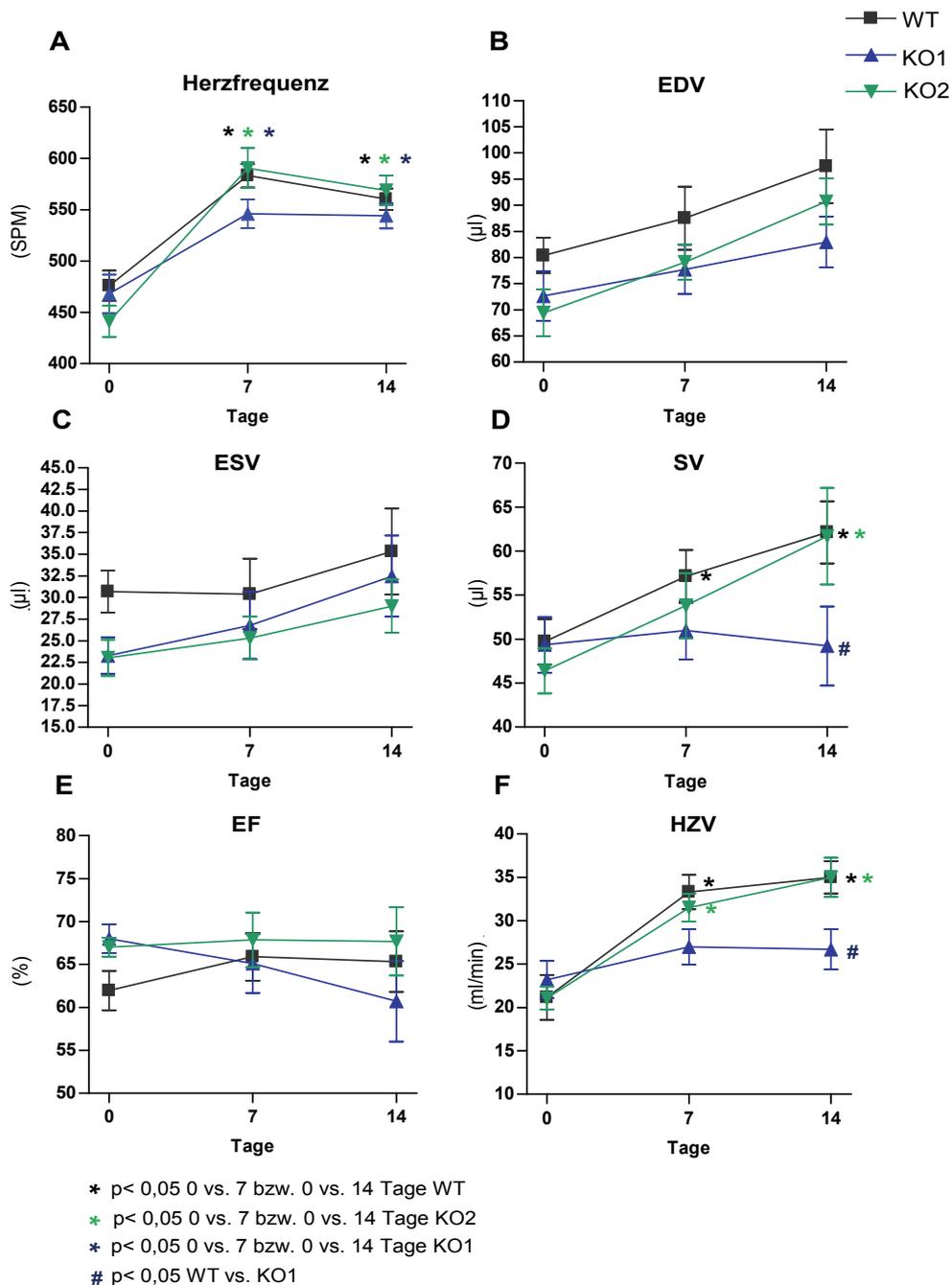


Abb. 43: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen zur Analyse der Herzfunktion von KO1, KO2 und WT. A: Herzfrequenz, B: EDV (enddiastolisches Volumen), C: ESV (endsystolisches Volumen), D: SV (Schlagvolumen), E: EF (Ejektionsfraktion), F: HZV (Herzzeitvolumen). Untersucht wurden n=12 WT, n=10 KO1, n=7 KO2.

Ergebnisse

Insgesamt belegten die Untersuchungen, dass das Fehlen der Akt1 Isoform eine deutliche Einschränkung der Herzfunktion nach Isoproterenol-induziertem Stress auslöste. Besonders auffällig war, dass sich während der echokardiographischen Untersuchungen bei den KO1-Tieren zwischen Tag 7 und Tag 14 bei 40 % der untersuchten Tiere eine Veränderung im Bereich des Apex zeigte. In Abb. 44 sind beispielhaft B-Mode Aufnahmen in der Systole dargestellt. Diese zeigen den LV eines WT (A+B) und eines KO1-Tieres (C+D) sowohl basal als auch 14 Tage nach Beginn der Isoproterenol-Behandlung. Bei KO1 war nach 14-tägiger Behandlung eine deutliche Ausdünnung im Bereich des Apex zu erkennen, während sich beim WT keine Veränderung der kardialen Wand in diesem Bereich herausbildete.

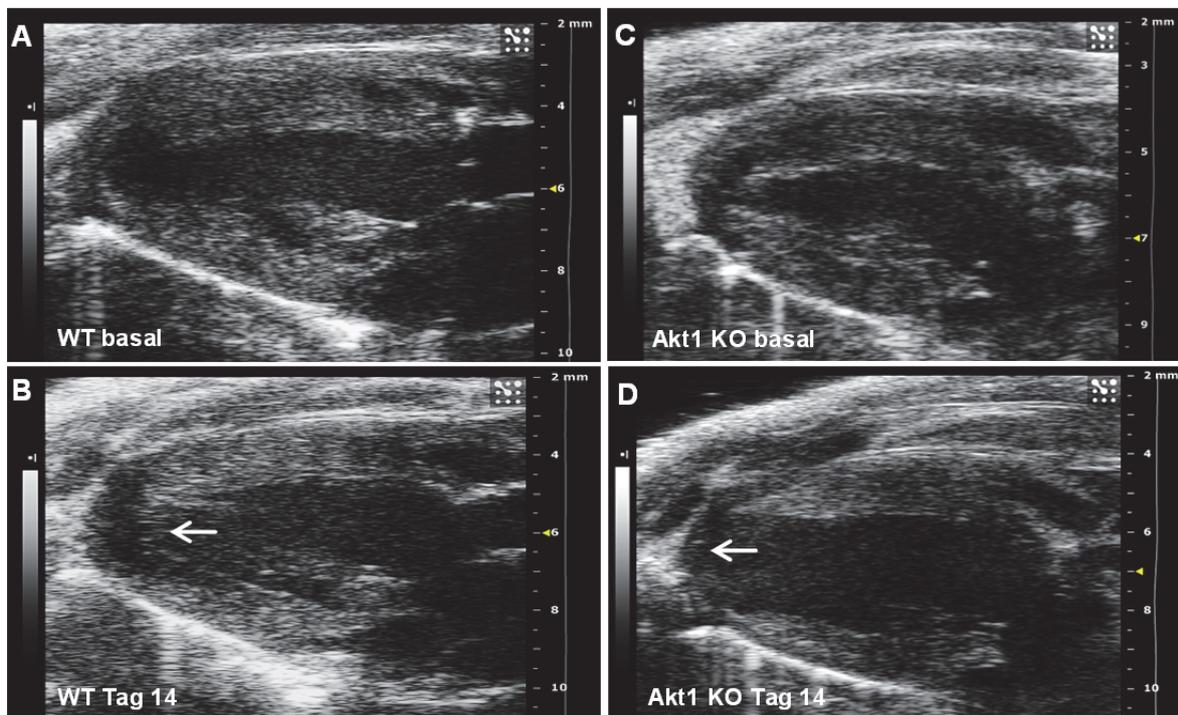


Abb. 44: B-Mode Aufnahmen des LV in der langen Achse in Systole von einem WT (A+B), sowie einem KO1 (C+D) basal und an Tag 14 der Isoproterenol-Behandlung. An Tag 14 erkennt man bei KO1 deutlich eine Ausdünnung des Apex (gekennzeichnet durch den Pfeil), während dies beim WT nicht festgestellt werden konnte.

3.10.3 Analyse der kardialen Wandbewegung mittels Strain

Durch eine Strain-Analyse lassen sich regionale Wandbewegungsstörungen analysieren, sowie der Grad der lokalen Deformation des LV quantifizieren. Daher wurden die erhobenen Echo-Daten mit der Vevo Strain Software ausgewertet, um die Wandbewegungsstörung des Apex bei den KO1-Tieren quantifizieren zu können. Darüber hinaus wurde untersucht, ob in diesen Tieren auch weitere Teile der linksventrikulären Wand betroffen waren. Für die

Ergebnisse

Analyse wurden echokardiographische Aufnahmen des LV in der langen Achse im B-Mode genutzt.

Die Vevo Strain Software unterteilt den LV nach semi-manueller Markierung der endo- und epikardialen Grenzen in drei anteriore Segmente: Anterior Basis (AB), Anterior Mitte (AM), Anterior Apex (AA), sowie drei posteriore Segmente: Posterior Basis (PB), Posterior Mitte (PM), Posterior Apex (PA). Die sechs Segmente sind farblich markiert: AB (blau), AM (gelb), AA (pink), PA (türkis), PM (weiß), PB (grün). Der radiale Strain misst die prozentuale Zunahme der Wanddicke pro Segment in der Systole, während in der longitudinalen Ebene die Verkürzung jedes Segments gemessen wird (Abb. 45).

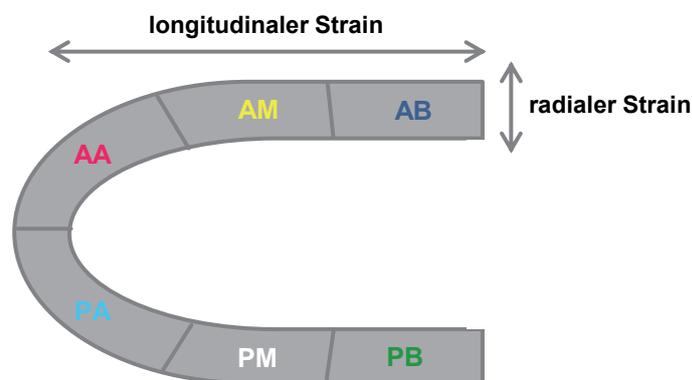


Abb. 45: Schematische Darstellung der Unterteilung des LV in der langen Achse in sechs gleich große Segmente zur Berechnung des longitudinalen und radialen Strain durch die Vevo Strain Software. Die sechs Segmente werden von der Software farblich markiert: AB (Anterior Basis; blau), AM (Anterior Mitte; gelb), AA (Anterior Apex; pink), PA (Posterior Apex; türkis), PM (Posterior Mitte; weiß), PB (Posterior Basis; grün).

In Abb. 46 sind beispielhaft parametrische Darstellungen einer longitudinalen und radialen Strain-Analyse eines WT und eines KO1 basal und an Tag 14 der Behandlung mit Isoproterenol dargestellt. Unter basalen Bedingungen zeigten beide Gruppen sowohl radial als auch longitudinal eine synchrone Deformation aller Wandsegmente. 14 Tage nach Isoproterenol-Behandlung fiel bei dem WT die durchschnittliche Deformation der Segmente bedingt durch die Hypertrophie radial von 41,4 % auf 27,4 % und longitudinal von -22,7 % auf -13%. Der KO1 zeigte eine Abnahme der radialen Wandbewegung von 28,1 % auf 16,8 % und longitudinal von -16,1 % auf -9,6 %. Während beim WT auch 14 Tage nach Induktion chronischer β -adrenerger Stimulation weiterhin eine synchrone Arbeit aller Wandsegmente detektiert wurde, zeigte der KO1 ganz deutlich eine stark ausgeprägte Wandbewegungsstörung der anterioren und posterioren apikalen Segmente (Pfeil), was die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen untermauerte.

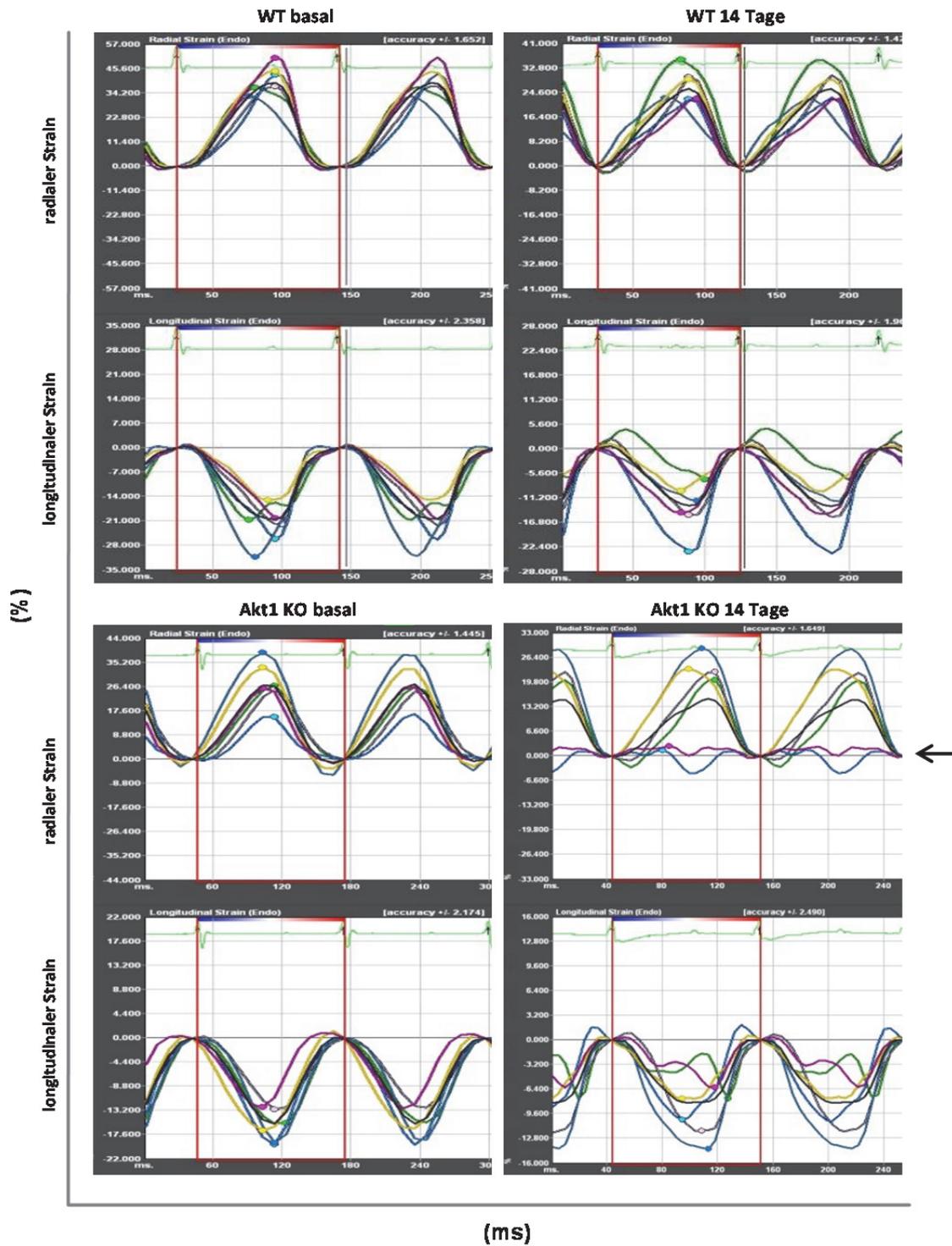


Abb. 46: Parametrische Darstellungen einer longitudinalen und radialen Strain-Analyse basal und an Tag 14 der Isoproterenol-Behandlung von einem WT und einem KO1. Die sechs Wandsegmente sind farblich markiert: Anterior Basis: blau, Anterior Mitte: gelb, Anterior Apex: pink, Posterior Apex: türkis, Posterior Mitte: weiß, Posterior Basis: grün. Der Pfeil markiert die Wandbewegungsstörung der apikalen Segmente bei KO1 an Tag 14.

Ergebnisse

Im Folgenden wurde die Strain-Analyse für $n = 5$ WT- und $n = 6$ KO1-Tiere durchgeführt und die Ergebnisse quantifiziert. In Abb. 47 sind die Ergebnisse des radialen und longitudinalen Strain basal und an Tag 14 nach Beginn der Isoproterenol-Behandlung graphisch dargestellt. In der Analyse des radialen Strains fiel auf, dass besonders die Gruppe der KO1 an Tag 14 eine deutlich verringerte Deformierung des PA- und AA-Segmentes, sowie der AB und AM im Vergleich zum Basalwert aufwies, während sich bei der WT-Gruppe der radiale Strain der posterioren Segmente kaum veränderte, bzw. bei den AB- und AM-Segmenten 14 Tage nach Isoproterenol zunahm (A). In der Analyse des longitudinalen Strain war der Unterschied noch deutlicher, denn hier zeigten die KO1-Tiere für fast alle Segmente an Tag 14 eine deutlich verringerte Verkürzung im Vergleich zum Basalwert. Dieser Unterschied war bei dem PB- und PM-Segment signifikant. Die WT-Gruppe zeigte hingegen bis auf das PB-Segment, welches sich an Tag 14 weniger stark verkürzte keine Veränderungen des longitudinalen Strain an Tag 14 der Isoproterenol-Behandlung im Vergleich zu den basal gemessenen Werten (B). Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der Strain-Analyse, dass bei den KO1 besonders die apikalen Segmente nach chronischem β -adrenergem Stress versagen. Interessanterweise zeigen auch weitere Wandsegmente eine verminderte Kontraktion, was besonders die longitudinale Achse betraf. (Die Werte der Strain-Analyse sind den Tab. 20 und 21 im Anhang zu entnehmen.)

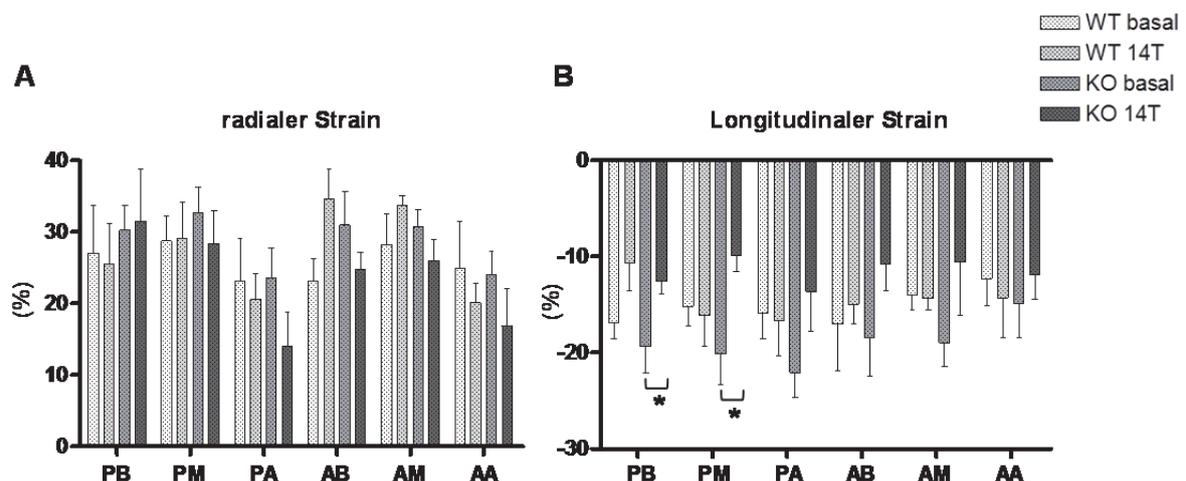


Abb. 47: Quantitative Auswertung des radialen und longitudinalen Strain bei WT und KO1-Mäusen an Tag 0 und an Tag 14 der Isoproterenol-Behandlung. Analysiert wurden die Herzen von $n=5$ WT und $n=6$ KO1. * = $p < 0,05$.

3.10.4 Beurteilung der Morphologie des Myokards

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, inwieweit die echokardiographisch nachweisbaren Veränderungen der KO1-Herzen morphologisch nachweisbar waren. Dazu wurden die Herzen am Ende der 14-tägigen Isoproterenol-Behandlung an Tag 15 entnommen und histologisch auf interstitielle Fibrose mittels Siriusrot-Färbung untersucht.

In Abb. 48 sind exemplarische Gewebeschnitte eines WT (A+B) sowie eines Akt1 KO's (C+D) dargestellt. Man erkennt eine deutliche Vermehrung des interstitiellen Kollagens bei KO1, welche besonders im Bereich des Apex die gesamte Wand bis zum Epikard durchzieht. Weiterhin sind auch die Innenschichten des Myokards der anterioren und posterioren Wand des LV betroffen (C). Außerdem fiel die stark aufgelockerte Struktur des Myokards, sowie Bereiche mit deutlicher Bindegewebsvermehrung auf (D). Im Vergleich dazu war bei dem Kontrolltier nur eine punktuelle Fibrosierung zu verzeichnen (A und B).

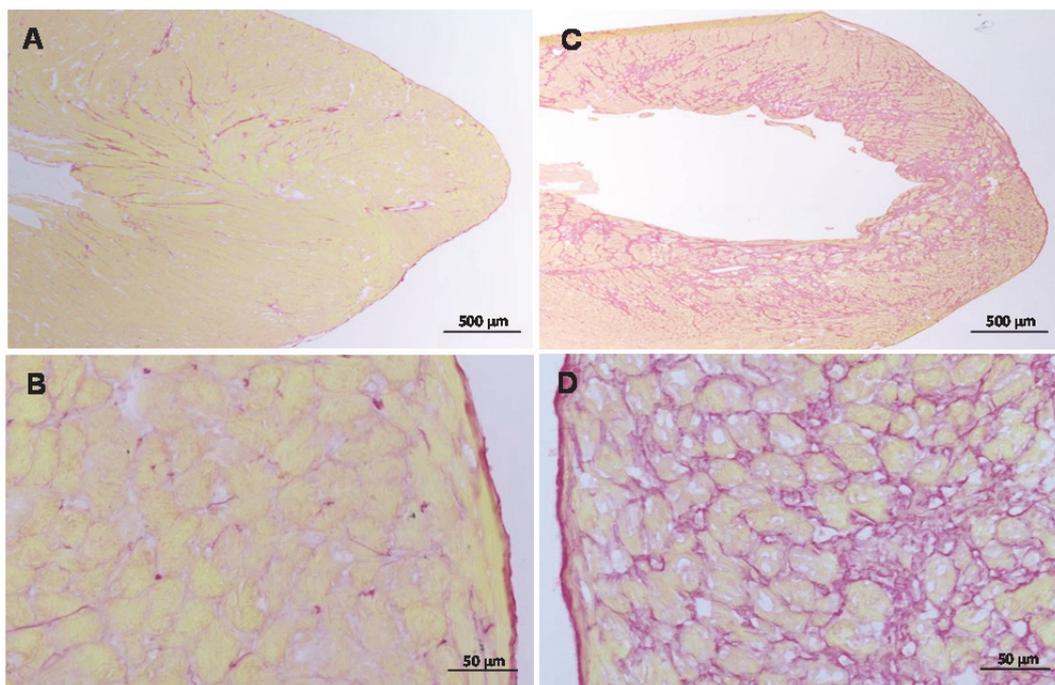


Abb. 48: Exemplarische Mikroskopaufnahmen von Gewebeschnitten eines WT-Herzens (A+B), sowie eines KO1-Herzens (C+D) in der langen Achse nach Siriusrotfärbung. A+B: Übersichtsaufnahmen (Multiimage). B+D: Detailaufnahmen eines Bereichs aus dem Apex in 40x-Vergrößerung.

3.10.5 Beurteilung der Lunge

Da echokardiographisch eine deutliche Funktionseinschränkung des linksventrikulären Myokards der KO1-Tiere nach chronischem β -adrenergem Stress nachweisbar war, wurde untersucht, ob diese Funktionseinschränkung bereits als Insuffizienz eingestuft werden

konnte. Daher wurde der Quotient aus Feucht- und Trockengewicht der Lunge ermittelt, um zu überprüfen, ob sich bei den KO1-Mäusen ein Lungenödem als Folge einer bereits fortgeschrittenen Linksherzinsuffizienz identifizieren ließ. Wie Abb. 49 zeigt, sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Somit hatten die KO1-Tiere trotz eingeschränkter kardialer Funktionsparameter noch kein Lungenödem entwickelt.

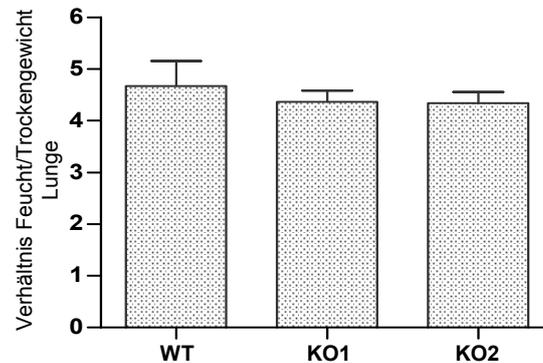


Abb. 49: Quotient aus Feucht- und Trockengewicht der Lunge von KO1, KO2 und WT. WT: n=7, KO1: n=9, KO2: n=6.

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich für den weiteren Verlauf der Untersuchungen die Frage, ob die funktionalen Folgen der Deletion der Akt1 Isoform im Wesentlichen ein kardiomyozytärer Effekt war. Daher wurden im Folgenden die Auswirkungen β -adrenerger Stimulation des Herzens an induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt1 KO-Mäusen (ICM KO1) untersucht.

3.11 Untersuchung von Herzfunktion und Morphologie der ICM KO1 nach chronischer β -adrenerger Stimulation mittels Isoproterenol

Für den Ansatz wurden vier Monate alten männlichen Tieren osmotische Minipumpen unter die Haut implantiert. Die Isoproterenol-Konzentration betrug anders als bei den KO1-Mäusen 14 $\mu\text{g/g/Tag}$, um stärkere Effekte zu erzielen. Die echokardiographischen Untersuchungen erfolgten vor Pumpenimplantation zur Bestimmung der basalen Herzfunktion, sowie an Tag 7 und 14. Für die Untersuchungen wurden insgesamt n = 7 WT und n = 7 ICM KO1 herangezogen.

3.11.1 Analyse der Hypertrophie mittels Echokardiographie

Wie in Abb. 50 zu sehen ist, nahm die LV Masse innerhalb von 7 Tagen durch die chronische Applikation von Isoproterenol in beiden untersuchten Gruppen signifikant zu. Wie auch schon

Ergebnisse

bei den KO1 Tieren unter 3.10.1 gezeigt, war nach 14 Tagen trotz höherer Isoproterenol-Konzentration keine weitere Zunahme der LV Masse zu verzeichnen (A). Das Körpergewicht der Tiere unterlag während des Versuchs keinen auffälligen Schwankungen (B). Der Herzindex zeigte demnach eine signifikante Zunahme beider Gruppen nach 7 und 14 Tagen (C).

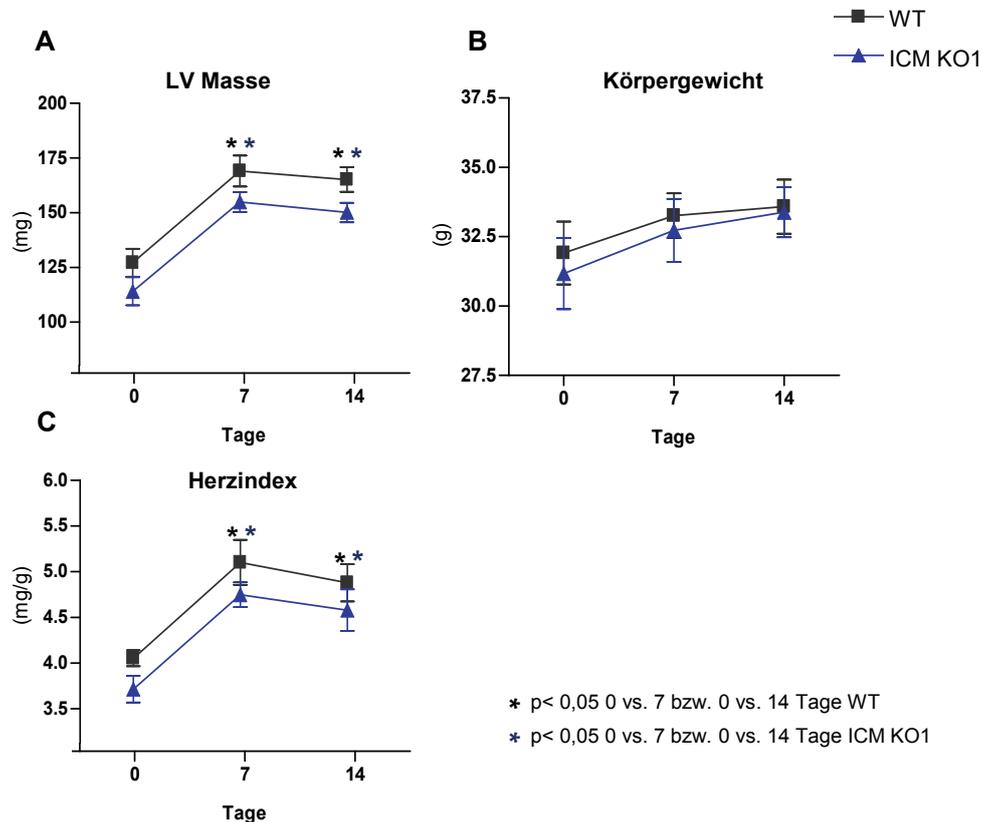


Abb. 50: Beurteilung der Hypertrophie von ICM KO1 und WT. A: LV Masse, B: Körpergewicht, C: Herzindex. Die Bestimmung der LV Masse erfolgte mittels M-Mode. Zur Ermittlung des Herzindex wurden die Mäuse vor den echokardiographischen Untersuchungen gewogen. Untersucht wurden n=7 WT, sowie n=7 KO1.

3.11.2 Analyse der Herzfunktion mittels Echokardiographie

Durch die chronische β -adrenerge Stimulation war bei beiden untersuchten Gruppen eine signifikante Zunahme der Herzfrequenz an Tag 7 und 14 messbar (Abb. 51 A). Das EDV erhöhte sich nur im WT signifikant an Tag 7. Bei den ICM KO1 war ebenfalls eine deutliche Zunahme von messbar, jedoch war diese nicht signifikant (B). Sehr deutliche Unterschiede waren jedoch im ESV zu verzeichnen. Während dieses bei den ICM KO1 nach 7 Tagen deutlich zunahm und an Tag 14 signifikant im Vergleich zum WT erhöht war, zeigte die WT-Gruppe insgesamt keine auffälligen Veränderungen (C). Folglich war das SV der ICM KO1 deutlich geringer als das der WT-Gruppe (D). Am deutlichsten wurde der Unterschied

Ergebnisse

zwischen beiden Gruppen bei Berechnung der EF, welche bei den ICM KO1 an Tag 7 und 14 signifikant im Vergleich zur WT-Gruppe verringert war (E). Das HZV nahm in beiden Gruppen an Tag 7 und 14 signifikant zu, allerdings war dieses an Tag 7 bei den ICM KO1 signifikant niedriger als bei der WT-Gruppe (F). (Die Messwerte der echokardiographischen Untersuchungen zur Analyse der Hypertrophie und Herzfunktion sind der Tab. 22 im Anhang zu entnehmen.)

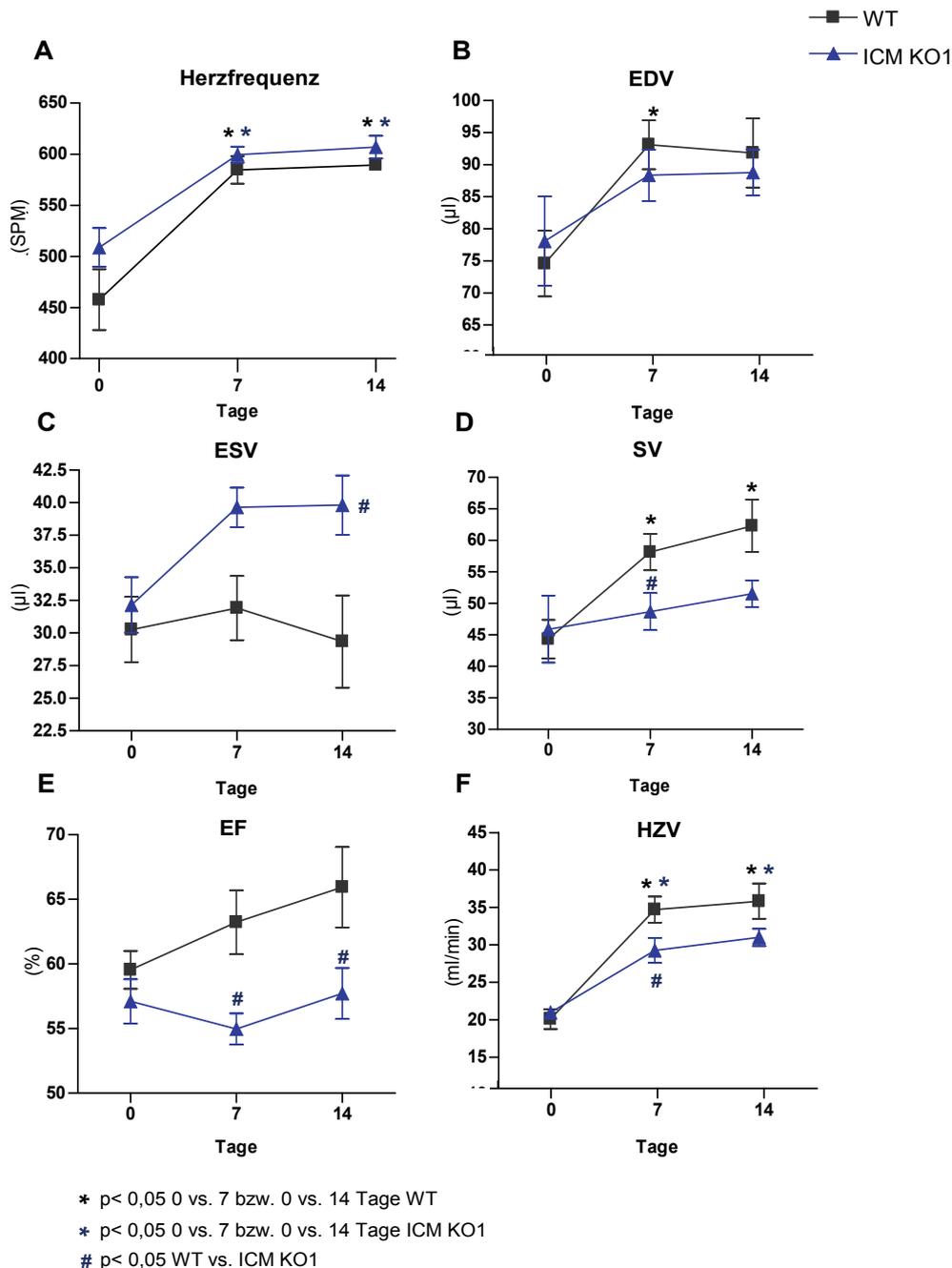


Abb. 51: Ergebnisse der Echokardiographie zur Analyse der Herzfunktion von ICM KO1 und WT. A: Herzfrequenz, B: EDV (enddiastolisches Volumen), C: ESV (endsystolisches Volumen), D: SV (Schlagvolumen), E: EF (Ejektionsfraktion), F: HZV (Herzzeitvolumen). Untersucht wurden n=7 WT und n=7 ICM KO1.

Anhand dieser Ergebnisse konnte demnach auch in den induzierbaren kardiomyozytären Akt1 KO Mäusen eine deutlich eingeschränkte kardiale Pumpfunktion als Folge chronischer β -adrenerger Stimulation ermittelt werden. Wie schon bei den KO1-Tieren beobachtet werden konnte, zeigten auch die ICM KO1 bereits nach 7 Tagen deutlich verringerte Funktionsparameter. Allerdings wurden bei diesen Tieren im Unterschied zum ubiquitären KO1 während der echokardiographischen Untersuchungen keine sichtbaren Veränderungen des Apex detektiert. Daher wurden histologische Untersuchungen zur weiteren Analyse angeschlossen.

3.11.3 Beurteilung der Morphologie des Myokards

Auch hier wurden die Herzen nach Beendigung der Isoproterenol-Behandlung an Tag 15 entnommen und mittels Siriusrot-Färbung histologisch untersucht. In Abb. 52 sind exemplarische Gewebeschnitte eines WT (A+B) sowie eines ICM KO1 (C+D) abgebildet. Man erkennt deutlich, dass in den Übersichtsaufnahmen der Herzen keine Unterschiede hinsichtlich vermehrter Kollageneinlagerungen oder einer Ausdünnung des Apex zwischen WT und ICM KO1 auftraten (A+C). Auch nach einer Vergrößerung des Apex zeigten sich keine Unterschiede (B+D). Somit waren die verminderten kardialen Funktionsparameter der ICM KO1 nicht mit vermehrten Kollageneinlagerungen zu erklären.

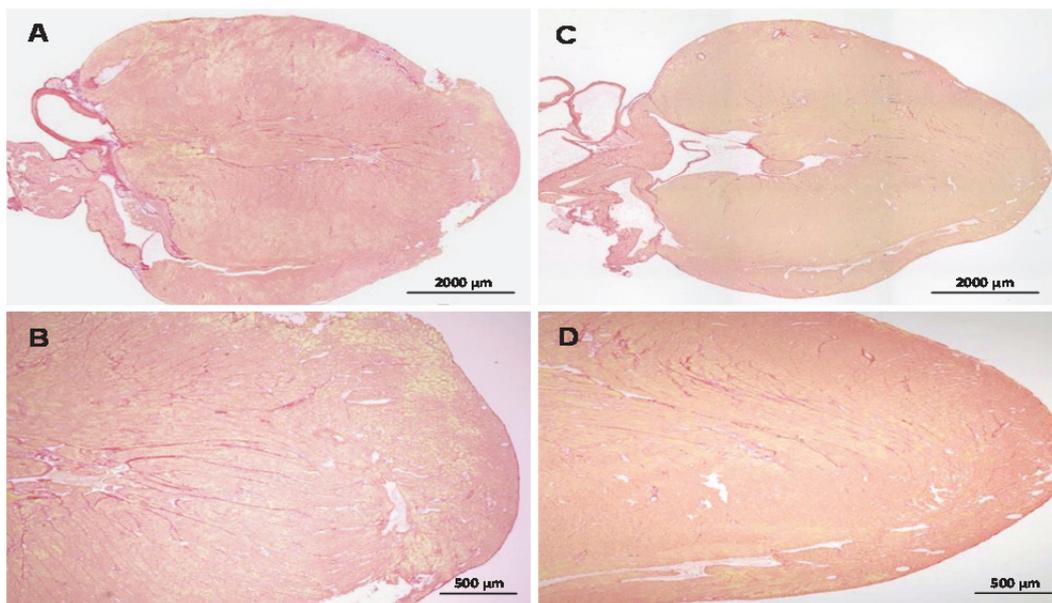


Abb. 52: Mikroskopaufnahmen eines WT- (A+B), sowie eines KO1-Herzens (C+D) in der langen Achse nach Siriusrotfärbung. A+C: Übersichtsaufnahmen des LV (Multiimage). B+D: Detailaufnahmen eines Bereichs aus dem Apex in 4x-Vergrößerung.

4 Diskussion

Für die funktionelle Integrität des Herzens müssen komplexe zelluläre Prozesse, wie Wachstum, Kontraktilität, Zellüberleben, sowie die Bildung von Gefäßen koordiniert ablaufen. Die Serin-Threonin Kinase Akt ist bei einer Vielzahl dieser Abläufe sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch bei pathologischen Veränderungen ein zentraler Modulator. Besonders Proliferation und Wachstum unterliegen der Kontrolle durch Akt, aber auch Zellüberleben und Glukosemetabolismus werden durch die Kinase gesteuert. Insgesamt sind drei Akt-Isoformen bekannt, welche sich trotz der hohen Sequenzhomologie durch unterschiedliche Funktionen auszeichnen. Bei der Signaltransduktion im Herzen spielen dabei besonders Akt1 und Akt2 eine zentrale Rolle. Wodurch die spezifischen Funktionen von Akt1 und Akt2 im Herzen vermittelt werden, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Diskutiert wird hierbei unter anderem die Bildung isoformspezifischer Proteinkomplexe (Brazil et al., 2002).

Ein besseres Verständnis des Signaltransduktionsweges der Akt-Isoformen im Herzen stellt somit eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung neuer bzw. der Verbesserung bestehender therapeutischer Ansätze im Rahmen pathologischer Veränderungen dar, wie beispielsweise der maladaptiven Hypertrophie. Ziel dieser Arbeit war daher, insbesondere die Funktion von Akt1 auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen. Zunächst wurden Akt1-assoziierte Proteinkomplexe mittels einer Kombination aus Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP) und quantitativer Massenspektrometrie (MS) in HEK293T Zellen untersucht und nach Etablierung der Methode darüber hinaus *in vivo* im Mausherzen. Weiterhin wurden die strukturellen und funktionellen Konsequenzen einer herzspezifischen Akt1-Überexpression, sowie einer Akt1-Deletion untersucht.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

- Mit der TAP/MS-Methode konnten sowohl in HEK293T Zellen als auch im Mausherzen ATP-Synthase und Phgdh als neue Akt1-Interaktionspartner identifiziert und mittels PLA verifiziert werden.
- Die rekombinanten Akt1- bzw. Akt2 N-TAG Proteine unterlagen im Herzen aufgrund des hohen Expressionsniveaus einem proteolytischen Abbau.

- Die Interaktion von Akt1 mit dem Chaperon HSP90 ist stabil, während Akt1 mit weiteren mittels TAP/MS-Analyse gefundener Proteine überwiegend transiente Interaktionen eingeht.
- Trotz einer massiven Überexpression von Akt1 N-TAG im Herzen entwickelte sich nur eine milde exzentrische Hypertrophie, welche allerdings nicht mit einer vermehrten Kapillarisation einherging.
- Die Deletion der Akt1- nicht aber der Akt2-Isoform führte sowohl in den Herzen der ubiquitären Akt1 KO-Mäuse (KO1) als auch der induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt1 KO-Mäuse (ICM KO1) unter chronischem β -adrenergem Stress zu einer signifikant eingeschränkten kardialen Pumpfunktion.
- In diesem Kontext entwickelten einzig die KO1-Mäuse unter chronischer Applikation von Isoproterenol ein maladaptives kardiales Remodeling, so dass sich hier ein interessanter, bisher nicht bekannter Einfluss von Akt1 auf die Proliferation von Fibroblasten andeutet.

4.1 Identifizierung von Proteinkomplexen mittels der TAP/MS-Methode

Die vorliegende Arbeit bedient sich der TAP/MS-Analyse zur Untersuchung von Akt-assoziierten Proteinkomplexen. Konzeptionell stellt diese Methode einen interessanten Ansatz zur Identifizierung von Proteinkomplexen dar, da das zu untersuchende Protein mit einem TAP-TAG versehen wird und so im optimalen Fall dieselbe Regulation und intrazelluläre Lokalisation wie das endogene Protein aufweisen sollte. Dies ist ein Vorteil gegenüber dem häufig verwendeten Yeast Two-Hybrid (YTH)-Ansatz, bei dem in der Regel Proteinfragmente als Fusionsproteine exprimiert werden und im Zellkern mit ihren Bindungspartnern interagieren. Bei der TAP erfolgt die Aufreinigung des zu untersuchenden Proteins hingegen aus dem physiologischen Zellkompartiment. Weiterhin erlaubt die TAP die Identifizierung von Multiproteinkomplexen, während bei YTH nur die Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht werden kann (Fields and Song, 1989). Durch zwei aufeinander folgende

Diskussion

Reinigungsschritte bei der TAP wird das Risiko der Aufreinigung falsch positiver Bindungspartner minimiert, was allerdings mit Proteinverlust einhergeht. Aus der Literatur sind hohe Proteinverluste zugunsten einer spezifischen und sauberen Aufreinigung getaggtter Fusionsproteine bereits bekannt (Li, 2011).

Ganz entscheidend für valide TAP-Ergebnisse ist der Erhalt der Proteinfunktion durch Wahl einer C- oder N-terminalen Lokalisation des TAP-TAG's am Fusionsprotein. Auch wenn der in dieser Arbeit verwendete HA/StrepII/Flag-TAG im Vergleich zu dem erstmalig von Rigaut und Mitarbeitern beschriebenen ProtA/CBP (*ProteinA/Calmodulin-binding-protein*)-TAG wesentlich kleiner ist (8 kDa vs. 21 kDa), konnte nicht davon ausgegangen werden, dass der TAG keinen Einfluss auf die Proteinfunktion besitzt (Rigaut et al., 1999). Im Rahmen der experimentellen Etablierung wurden daher sowohl für das Akt1- als auch das Akt2-Fusionsprotein in unserem Labor sowohl C- als auch N-terminal getaggte Fusionsproteine hinsichtlich einer physiologischen Regulation der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung in HEK293T Zellen getestet. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass rekombinante wie endogene Akt1 nach Induktion des PI3K-Signalwegs durch Insulin vermehrt phosphoryliert, bzw. nach Serumentzug dephosphoryliert wurden. Ebenso wurde untersucht, ob die Lokalisation des TAP-TAG's mit einer vermehrten Abbaurate korrelierte, oder ob die Interaktion der getaggtten Akt mit ihren potentiellen Bindungspartnern interferierte. Dabei zeigte die Fusion des N-terminalen Endes von Akt mit dem TAP-TAG weder im WB noch nach TAP im Silbergel Akt-Abbauprodukte. Darüber hinaus ließen sich für N-terminal getaggte Proteine reproduzierbar koeluierte Proteine identifizieren, während bei C-terminaler Fusion des TAP-TAG's an Akt selbst bekannte Bindungsproteine wie HSP90 nicht aufgereinigt werden konnten (Bottermann 2013; Hiester 2013).

Des Weiteren sollte das Expressionsniveau des rekombinanten Proteins in etwa dem des endogen exprimierten Proteins entsprechen. Besonders eine Überexpression ist als problematisch anzusehen, da diese zu einer vermehrten Bindung unspezifischer Proteine führen kann (Gingras et al., 2005). Werden hingegen nur geringe Mengen exprimiert, kompetieren das endogene und das rekombinante Protein um Interaktionspartner, was möglicherweise auf Kosten einer effizienten Aufreinigung bindender Proteine geht. Um diesen Effekt zu minimieren, kann mit der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) die Expression des endogenen Pendants unterdrückt werden (Forler et al., 2003). In dieser Arbeit wurde daher das Expressionsniveau des rekombinanten Akt1 Fusionsproteins in HEK293T Zellen mittels lentiviraler Infektion dem des endogenen Proteins in etwa angeglichen.

4.2 Expression und proteolytischer Abbau der Akt N-TAG Proteine im Mausherzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals rekombinante Akt1- bzw. Akt2 N-TAG-Fusionsproteine im Mausherzen zur Untersuchung der Akt-isoformspezifischen Proteininteraktion *in vivo* exprimiert. Aus der Literatur sind bisher nur wenige Arbeiten zur TAP rekombinanter Proteine aus transgenen Mäusen bekannt. So konnten Angrand und Mitarbeiter erstmals mittels der TAP/MS-Methode neue Interaktionspartner des 14-3-3 Proteins identifizieren (Angrand et al., 2006). Ein klarer Vorteil der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* ist die gewebespezifische Analyse des Interaktoms. Darüber hinaus bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, dass dynamische Veränderungen der Signaltransduktion in pathologischen Situationen untersucht werden können.

Das Expressionsniveau der rekombinanten Akt1- und Akt2 Proteine im Mausherzen war nicht so einfach steuerbar wie im zellulären Ansatz. Bei der Charakterisierung der transgenen Akt1- und Akt2 N-TAG Mäuse zeigten beide Stämme eine bis zu 100-fach erhöhte Transkriptmenge der getaggtten im Vergleich zur endogenen Isoform, was auf Proteinebene zu hohen Abbauraten führte. Zur Generierung der transgenen Tiere muss das zu untersuchende Transgen stabil durch Insertion in das Genom integriert werden, wozu verschiedene Methoden etabliert worden sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden durch Injektion der rekombinanten cDNA in den Pronukleus hergestellt. Allerdings hat man keine Kontrolle über den Integrationsort oder der Anzahl der integrierten cDNA-Kopien. Da diese Faktoren von Injektion zu Injektion variieren, kann jedes Gründertier ein anderes Expressionsniveau aufweisen (Krestel et al., 2001).

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Expressionsstärke hat, ist die Wahl des Promotors. Für die zielgerichtete, kardiomyozytenspezifische Expression der Akt N-TAG Proteine wurde der murine α -MHC-Promotor gewählt, der auf den Arbeiten von Gulick und Robbins basiert und heute vielfältig genutzt wird (Gulick et al., 1991). Dieser Promotor bietet den Vorteil einer hoch-spezifischen und stabilen postnatalen Expression in Kardiomyozyten, welche vermutlich auf Insulator-Elementen beruht, denen die hohe Gewebespezifität zugeschrieben wird. Allerdings existieren für diesen Promotor Daten, dass die Anzahl der integrierten cDNA-Kopien direkt mit dem Expressionsniveau zu korrelieren scheint (Subramaniam et al., 1991). Da in allen Nachkommen dieser Mauslinien eine ähnlich starke Überexpression auf

Diskussion

Transkriptebene detektiert wurde, war ein Positionseffekt eher unwahrscheinlich und deutet darauf hin, dass die Ursache in der Wahl des Promotors liegen könnte.

Eine Alternative zur ungerichteten Integration wäre, das Konstrukt gezielt über homologe Rekombination in das Genom zu integrieren. Ein Vorteil dieser TAP-*knockin* Mäuse ist es, eine Kontrolle über das Expressionsniveau auf physiologischem Niveau zu erhalten, da das Konstrukt unter Kontrolle des endogenen Promotors steht (Fernandez et al., 2009; Zhou et al., 2004).

Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass die Akt N-TAG Transkripte zwar zu Protein translatiert wurden, aber aufgrund der Überexpression in hohem Maße proteolytisch abgebaut wurden. Trotz der proteolytischen Spaltung der getaggten Akt Proteine im Mausherzen war die Regulierbarkeit der verbleibenden Akt N-TAG Proteine über den PI3-Kinase Signalweg nachweisbar. Die Kartierung der Akt-Spaltung zeigte, dass die Prozessierung hauptsächlich im Bereich des N-terminalen Endes, sowie der Linker-Region und der PH-Domäne des Akt-Fusionsproteins stattfinden musste und somit Akt-Abbauprodukte unterschiedlicher Größe entstanden. Bei all diesen Fragmenten konnte kein TAP-TAG nachgewiesen werden. Das hatte den Vorteil, dass bei der TAP nur die rekombinante Akt der vollen Länge aufgereinigt wurde. Die Analyse von Strep-Tactin-Eluaten aus TG1-Herzen im Silbergel stützten die Ergebnisse der Kartierung der Akt-Spaltung, da weder Akt1-Abbaubanden visualisiert, noch mittels MS-Analyse identifiziert wurden. Anhand dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass eine valide Aufreinigung potentieller Akt-Interaktionspartner aus den Mausherzen möglich war. Nachteilig war jedoch die große Menge nicht getaggtter Akt-Fragmente, die potentiell um Bindungspartner kompetieren und daher die Ausbeute an Interaktionspartnern reduzieren konnten.

Weiterhin wurde aufgrund des geringen Expressionsniveaus an verbleibendem Akt2 N-TAG Protein auf TAP/MS-Experimente mit der TG2-Mauslinie verzichtet, da als Ausgangsmaterial im Mittel eine Menge von 20 Herzen pro TAP-Ansatz benötigt wurde, was aufgrund der langen Präparationsdauer im Hinblick auf die Qualität der Proteinextrakte als nicht praktikabel angesehen wurde. Die Analyse einer isoformspezifischen Proteininteraktion von Akt1 und Akt2 *in vivo* konnte daher im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

4.3 Identifizierung Akt1-assoziiierter Proteine

4.3.1 Akt1 und Hitzeschockproteine

Die TAP/MS-Analyse führte sowohl in HEK293T Zellen als auch im Mausherzen zur Identifizierung Akt1-assoziiierter Proteine. Dabei wurden im Zellkultur-basierten Ansatz reproduzierbar die Chaperone HSP90, HSP70 und GRP78 gefunden. Auch im *in vivo*-Ansatz konnten wiederholt HSP90, HSP70 sowie HSC70 aufgereinigt werden. Die Assoziation von Proteinen mit HSP's dient unter anderem der Ausbildung und Aufrechterhaltung einer korrekten Proteinfaltung sowie dem Transport in die unterschiedlichen Zellkompartimente. Allerdings können Chaperone während der TAP aufgrund der hohen Abundanz in der Zelle auch als unspezifische Kontaminanten mit aufgereinigt werden.

Zahlreiche Publikationen belegen allerdings, dass HSP90 ein spezifischer Interaktionspartner von Akt ist (Georgakis et al., 2006; Powers and Workman, 2006; Theodoraki et al., 2007). HSP90 stabilisiert Akt und ist damit essentiell für ihre Funktion als Kinase. Eine direkte Interaktion zwischen Akt und HSP90 konnte bereits in Immunpräzipitations-Experimenten nachgewiesen werden, wobei eine Zerstörung des Komplexes mit einer vermehrten Dephosphorylierung von Akt durch PP2A einherging. Der Rückgang der Akt-Aktivität äußerte sich in einer vermehrten Apoptoserate (Sato et al., 2000). Ebenso reduzierten HSP90-Inhibitoren die Halbwertszeit von Akt dramatisch und führten zu einem Rückgang der Akt-Proteinexpression um 80 % (Basso et al., 2002). Des Weiteren scheint HSP90 eine übergeordnete stabilisierende Funktion während der Ausbildung der Interaktion von Akt mit seinen Substraten auszuüben, wie unter anderem für die eNOS gezeigt werden konnte (Fontana et al., 2002). Wie spezifisch die Akt1/HSP90 Interaktion ist zeigt, dass in dieser Arbeit mittels quantitativer MS-Analyse eine stabile Komplexbildung sowohl in HEK293T Zellen als auch im Mausherzen nachgewiesen wurde.

Die Proteine der HSP70 Familie sind ebenfalls essentiell für Proteinfaltung und Aktivierung. So scheint HSP70 ähnlich wie HSP90 die Aktivität vieler Proteine, darunter auch die vieler Kinasen, direkt zu modulieren. So konnten Gao und Newton 2002 zeigen, dass HSP70 u.a. PKA und Akt über ihr konserviertes Turn-Motiv binden kann (Gao and Newton, 2002). Wie auch schon für HSP90 beschrieben, könnte durch diese Bindung aktivierte Akt vor einer schnellen Inaktivierung durch Phosphatasen geschützt werden, denn in diesem Bereich befindet sich die für eine vollständige Aktivierung der Kinase benötigte Ser473-Phosphorylierungsstelle. Somit könnte die Interaktion zwischen Akt1 und HSP70 ebenfalls für

die Aufrechterhaltung der Akt-Aktivität benötigt werden. Nach den in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen MS-Analysen ist die Bindung zwischen Akt1 und HSP70 transient. Dennoch handelt es sich um eine spezifische Komplexbildung, da sowohl in HEK293T Zellen mittels der SILAC-Methode, als auch *in vivo* nach stabiler Isotopen Dimethyl-Markierung hohe verschobene Verhältnisse schwer zu leicht markierter Peptide gemessen wurden.

Als weiterer transientser Interaktionspartner wurde das ER-Chaperon GRP78 identifiziert. Eine direkte Interaktion zwischen Akt1 und GRP78 konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings gibt es Arbeiten, die zeigen, dass GRP78 wie auch schon HSP90 und HSP70 in die Regulation der Akt-Aktivität eingebunden zu sein scheint. So konnte durch einen RNAi-induzierten *knockdown* von GRP78 in Prostatakarzinom-Zelllinien die Phosphorylierung von Akt blockiert und somit seine antiapoptotische Wirkung unterbunden werden (Misra et al., 2006). Insgesamt spielen also alle in dieser Arbeit mittels TAP/MS-Analyse identifizierten Chaperone eine wichtige Rolle zum einen für die Akt-Stabilität, die Ausbildung von Akt-Protein-Protein-Interaktionen sowie der Stabilisierung der Akt-Phosphorylierung und damit in der Regulation der Aktivität der Kinase in der Zelle.

4.3.2 Akt1 und ATP-Synthase

In den TAP/MS-Analysen dieser Arbeit wurden darüber hinaus noch weitere potentielle Interaktionspartner von Akt1 in HEK293T Zellen und Mausherzen identifiziert. Sowohl in den kultivierten Zelllinien als auch *in vivo* wurde wiederholt die α - bzw. β -Untereinheit der ATP-Synthase gefunden. Dieses Ergebnis wurde mittels PLA sowohl in HEK293T Zellen als auch in isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten bestätigt. Die Verifizierung erfolgte mit wildtypischen Zellen, um zu überprüfen, ob die Interaktion auch mit endogen exprimierter Akt1 nachgewiesen werden konnte. Die ATP-Synthase ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, und besteht aus einem hydrophoben membrangängigen F_0 -Teil, welcher dem Transport der Protonen dient, sowie einem hydrophilen F_1 -Teil, der in die Matrix reicht. Das Köpfchen des F_1 -Teils wird von insgesamt je drei α - und drei β -Untereinheiten gebildet, wodurch drei Reaktionszentren entstehen, auch $F_1(\alpha\beta)_3$ -Komplex genannt, an dem die ATP-Synthese stattfindet.

Besonders neuere Arbeiten im Bereich der kardialen Forschung zeigen eine funktionelle Verbindung der Akt und ATP-Synthase. Nach Insulinstimulation transloziert Akt in Mitochondrien, was mit einer gleichzeitigen Steigerung der ATP-Produktion einhergeht.

Diskussion

Dieser Effekt konnte mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 inhibiert werden, wodurch die Hypothese aufgeworfen wurde, dass Akt die Aktivität der ATP-Synthase direkt modulieren kann (Yang et al., 2009). Weiterführende Experimente zeigten, dass nach Insulinstimulation vornehmlich Akt1, nicht aber Akt2, in myokardiale Mitochondrien translozierte, wodurch die Aktivität der ATP-Synthase um 24 % gesteigert wurde. Die basale Aktivität der ATP-Synthase war darüber hinaus in den Herzen von Akt1 *knockout* Mäusen um 22 % geringer als im WT. Nach Insulinstimulation konnte diese allerdings kompensatorisch durch die Translokation von Akt2 auf das Niveau der Kontrolltiere gesteigert werden (Yang et al., 2013). Diese Daten deuten klar auf eine funktionelle Verbindung von Akt1 und der ATP-Synthase hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings erstmals, dass die beiden Enzyme direkt miteinander interagieren. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion könnte somit darin begründet sein, dass die insulininduzierte Translokation von Akt1 in Mitochondrien einen direkten Link herstellt, der die Verfügbarkeit von Glukose als Energielieferant mit der Energieproduktion der Zelle koordiniert. Ein geregelter Energiehaushalt ist für das streng aerob arbeitende Herz essentiell, denn im gesunden Herzen ist der Grad der ATP-Synthase direkt mit dem der ATP-Hydrolyse verbunden, so dass der ATP-Gehalt des Herzmuskels selbst bei einer Steigerung der Herzarbeit relativ konstant bleibt (Balaban et al., 1986; Heineman and Balaban, 1990).

4.3.3 Akt1 und Phgdh

Das Enzym D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase (Phgdh) wurde ebenfalls als transienter Bindungspartner von Akt1 in HEK293T Zellen identifiziert. Eine Interaktion von Phgdh mit Akt1 ist bisher nicht bekannt, so dass die TAP-Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig eine funktionale Verbindung der beiden Enzyme andeuten.

Phgdh katalysiert den ersten Schritt der Serin-Biosynthese durch Umwandlung von 3-Phosphoglycerat, einem Intermediat der Glykolyse, in 3-Phosphohydroxypyruvat. Die Entdeckung einer Interaktion von Akt1 mit Phgdh stellt einen besonders interessanten Befund dieser Arbeit dar, da sich hier eine direkte Verbindung der durch Akt kontrollierten Glukoseaufnahme mit einer Regulation der Aminosäuresynthese andeutet.

Die Aktivität der Phgdh wird durch ihr Endprodukt Serin im Sinne einer negativen Rückkopplung durch eine allosterische Hemmung über Modulation der V_{\max} kontrolliert (Stryer; Biochemie 7. Auflage). Unter einer ausreichenden Glukoseverfügbarkeit könnte Akt1

Diskussion

diese Endprodukthemmung aufheben und so die Menge der Serin-Synthese an die Wachstumsbedingungen der Zelle anpassen. Das Zellwachstum scheint eng an die Aktivität der Phgdh geknüpft zu sein. Das zeigen Analysen von Tumoren in denen eine stark erhöhte Expression des Enzyms gefunden wurde (Locasale et al., 2011; Possemato et al., 2011). Umgekehrt entwickeln Mäuse mit einem Serin-Mangel hervorgerufen durch eine Deletion von Phgdh schwere Entwicklungsstörungen des ZNS, wie Mikrozephalie (Yang et al., 2010). Microarray-Analysen des Gehirns von Phgdh *knockout* Mäusen zeigten, dass unter anderem die Genexpression des translationalen Repressors 4EBP1 signifikant erhöht war (Sayano et al., 2013). 4EBP1 wird auf Proteinebene durch mTORC1 deaktiviert, dessen Aktivität wiederum von Akt aber besonders von der Verfügbarkeit von Aminosäuren anhängig ist, denn ein Aminosäuremangel führte trotz Insulinstimulation zur Inaktivierung von mTORC1 und damit zur Repression der Translation (Hara et al., 1998). Hier bestünde somit ein bisher unbekannter Mechanismus über den Akt1 das Zellwachstum *upstream* von mTORC über eine direkte Modulation der Phgdh-Aktivität kontrollieren kann.

In den TAP/MS-Experimenten dieser Arbeit wurde die Phgdh allerdings nur in HEK293T Zellen, nicht aber im Mauserzen als Bindungspartner von Akt1 identifiziert. Das war überraschend, da in Säugern Phgdh außer in Gehirn, Niere, Leber Skelettmuskel auch im Herzen exprimiert wird (Klomp et al., 2000; Takasaki et al., 2007; Yamasaki et al., 2001). Eine Ursache, weshalb das Enzym *in vivo* nicht gefunden wurde, lag möglicherweise darin, dass der Herzextrakt eine wesentlich komplexere Probe darstellt. Ebenso können Akt1-Abbauprodukte mit den verbleibenden funktionalen Akt1 N-TAG Proteinen um potentielle Interaktionspartner kompetieren, so dass diese daher nicht oder nicht in ausreichender Menge aufgereinigt werden konnten. Dennoch bestätigten die PLA-Experimente auf isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten die Interaktion von Akt1 und Phgdh *in vivo*. Das zeigt, dass sich das TAP/MS-Screening nach Akt1-Bindungspartnern in kultivierten Zelllinien auf den *in vivo*-Ansatz übertragen lässt.

Als weiterer, bisher nicht bekannter Bindungspartner von Akt1 im Mauserzen wurde interessanterweise die Glutathionperoxidase-1 identifiziert. Auch hier ergibt sich eine interessante Verbindung, denn Serin bildet die Vorstufe zur Synthese von Glycin und Cystein. Diese beiden AS bilden zusammen mit γ -Glutamat das wichtige Antioxidans Glutathion, dem Substrat der Glutathionperoxidase. So ergeben sich hier Hinweise auf eine Funktion von Akt1 bei der Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies.

Die Verifizierung dieses neuen interessanten Interaktionspartners und dessen funktionelle Relevanz konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erbracht werden.

Die humane ATP5A1 sowie Phgdh wurden zusätzlich wie in Kap.3.1.4 gezeigt, auf Akt-Substrat-Konsensus-Sequenzen überprüft. Für Akt wurde von Alessi und Mitarbeitern die Konsensus-Sequenz R-X-R-X-X-S/T definiert (Alessi et al., 1996). Dabei zeigte sich, dass die gewählten Akt1-Bindungspartner zwar ein Arginin an Position -3 enthielten, aber nicht das darüber hinaus benötigte Arginin an Position -5. Somit enthalten ATP5A1 und Phgdh nicht die klassische, als minimal postulierte Akt-Konsensus-Sequenz. Allerdings zeigen neuere Arbeiten, dass eine Vielzahl bekannter Akt-Substrate diese optimale Konsensus-Sequenz ebenfalls nicht enthalten (Manning and Cantley, 2007). Beispielsweise konnte die Arbeitsgruppe von Berwick zeigen, dass das Enzym ACL (*ATP citrat lyase*), trotz des Fehlens der Aminosäure Arginin an Position -5, insulinabhängig durch Akt an Ser 454 phosphoryliert wird (Berwick et al., 2002).

4.4 Auswirkungen der Akt1 N-TAG Überexpression auf Herzfunktion und Morphologie

Die Untersuchungen zum Proteinspiegel von Akt1 in den Herzen der transgenen Mäuse in Kapitel 3.5.2 offenbarten eine bis zu 14-fach erhöhte Menge an getaggtter Akt1 im Vergleich zur endogenen wildtypischen Isoform. Weiterhin führte das Akt1 N-TAG Abbauprodukt, welches aufgrund der proteolytischen Prozessierung eine ähnliche Größe wie die endogene Isoform aufwies, zu einer fast 60-fach gesteigerten Proteinmenge. Weiterführende Untersuchungen zum Phosphorylierungsniveau zeigten, dass sowohl das nicht prozessierte Akt1 N-TAG, als auch ein Teil der Abbauprodukte endogener Größe insulinabhängig phosphoryliert wurden. Um zu überprüfen, welcher Art die Folgen einer solchen Überexpression waren, wurden Herzfunktion und Morphologie der transgenen Mäuse charakterisiert.

Die Ejektionsfraktion (EF) der TG1 Mäuse war zwar im Vergleich zu den übrigen Mausgruppen teilweise signifikant geringer, aber mit Werten von $62,2 \pm 5,4$ % im Alter von drei Monaten im Vergleich zu TG2 ($68,8 \pm 4,0$ %), bzw. $56,3 \pm 6,6$ % im Alter von 9 Monaten verglichen mit den WT ($62,2 \pm 3,2$ %) im physiologischen Bereich. Darüber hinaus zeigten die Herzen keine strukturellen Veränderungen hinsichtlich einer interstitiellen

Diskussion

Fibrosierung. Einzig die verringerte Kapillardichte der TG1 Herzen war auffällig. Somit scheint die Akt1 N-TAG Überexpression in den Kardiomyozyten die koronare Angiogenese an Endothelzellen parakrin nicht beeinflussen zu können. Dadurch könnte die für den Größenzuwachs der Kardiomyozyten benötigte Sauerstoffmenge fehlen, was möglicherweise den Verlust der Kontraktionskraft und damit die verringerte EF der TG1-Tiere erklärt.

Darüber hinaus waren die LV der TG1 Tiere länger und hatten größere Durchmesser des LV-Lumens, was im Alter von neun Monaten zu einer Erhöhung der LV Masse von etwa 15 % im Vergleich zur WT-Gruppe führte. Es entwickelte sich also eine leichte, exzentrische Form der Hypertrophie. Somit war der kardiale Phänotyp der TG1 Tiere trotz der massiven Akt1 N-TAG-Überexpression relativ mild ausgeprägt, was überraschend war, da bisherige Arbeiten zur Akt1-Überexpression anderes erwarten ließen. Bekannt ist, dass die Auswirkungen einer Akt-Überexpression im Herzen besonders an den Grad, bzw. die Dauer der Akt-Aktivierung gebunden sind (Shiojima et al., 2005). So bedienen sich zahlreiche Akt-Überexpressionsstudien der Expression konstitutiv-aktiver Akt, wie myristoyliertem (myr) oder E40K Akt-Mutanten, welchen eine höhere Affinität für Lipide der Plasmamembran gemein ist. Diese artifiziellen Mutationen unterscheiden sich dabei in ihrer Aktivität: so führt eine Myristoylierung zu einer stärkeren Akt-Aktivität als die E40K-Mutation der PH-Domäne (Sussman et al., 2011). Somit induzierte die Expression konstitutiv aktiver Akt1-E40K in den Herzen transgener Mäuse eine signifikante Zunahme des Herzindex um 30 % zusammen mit einer Verbesserung der Kontraktilität (Condorelli et al., 2002). Dagegen resultierte die kardiale Expression von myr-Akt1 in teilweise mehr als einer Verdopplung des Herzgewichts begleitet von interstitieller Fibrosierung sowie Verschlechterung der Pumpfunktion (Matsui et al., 2002). In diesem Kontext entwickeln transgene Mäuse nach kurzzeitiger Aktivierung von induzierbarer konstitutiv-aktiver myr-Akt1 eine physiologische Hypertrophie, welche sich aber bei fortdauernder Aktivität zu einer pathologischen Form wandelte (Shiojima et al., 2005).

Das rekombinante Akt1-Fusionsprotein, welches in dieser Arbeit in Kardiomyozyten exprimiert wurde, unterliegt im Gegensatz zu den beschriebenen Modellen einer physiologischen Regulation seiner Aktivität, was durch Experimente zur Stimulation bzw. Inhibition des PI3K-Signalwegs gezeigt werden konnte. Somit scheinen die Auswirkungen der Akt1 N-TAG Überexpression auf Herzfunktion und Morphologie streng an die Aktivität dieser Kinase gebunden zu sein. So konnte bisher kein signifikanter Effekt einer

Überexpression von wildtypischem Akt in der Literatur berichtet werden (Sussman et al., 2011).

4.5 Das Fehlen der Akt1-Isoform im Herzen führte unter chronischem β -adrenergem Stress zu einem maladaptiven kardialen Remodeling und einem Verlust der systolischen Pumpfunktion

Die chronische Applikation von Isoproterenol als synthetischer β -Adrenorezeptor-Agonist stellt ein etabliertes Modell zur Induktion pathologischer kardialer Stressmodelle dar, da es zu einer signifikanten Zunahme des Herzindex durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten führt, eine Re-Induktion embryonaler Gene induziert und darüber hinaus ein strukturelles Remodeling bedingt, was mit einer vermehrten interstitiellen Kollageneinlagerung einhergeht (Bishopric and Kedes, 1991; Boluyt et al., 1995; Jalil et al., 1989; Kudej et al., 1997). So zeigte die Charakterisierung der Herzfunktion der ubiquitären Akt1 KO- (KO1), und induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt1 KO-Mäuse (ICM KO1) nach Induktion von β -adrenergem Stress eine signifikante Zunahme des Herzindex, zusammen mit einer stark herabgesetzten systolischen Pumpfunktion.

Im Rahmen dieser Arbeit waren allerdings deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung des kardialen Remodelings zu beobachten. Der ubiquitäre KO von Akt1 ging bei 40 % der Tiere mit massiven strukturellen Veränderungen des Myokards im Bereich des Apex einher, welche bei den echokardiographischen Untersuchungen deutlich als Ausdünnung der Herzwand in diesem Bereich detektierbar war. Die Strain-Analyse der myokardialen Wandbewegung zeigte, dass besonders die Bewegung der apikalen Segmente herabgesetzt war, sich aber bereits auch in anderen Segmenten des LV Wandbewegungsstörungen zu manifestieren schienen. Die histologische Analyse offenbarte eine massive Kollageneinlagerung im gesamten Apex sowie den epikardialen Schichten der anterioren und posterioren Wand als Folge kardialen Remodelings. Der induzierbare kardiomyozytäre KO der Akt1-Isoform führte in diesem Modell hingegen nicht zu vermehrter interstitieller Fibrosierung trotz einer doppelt so hohen Konzentration an Isoproterenol. Somit scheint sich die ubiquitäre Deletion der Akt1-Isoform in dem gewählten kardialen Stressmodell interessanterweise besonders auf die Kollagensynthese auszuwirken.

Kollagen bildet den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) des Herzens und wird vornehmlich von Fibroblasten synthetisiert. Das Kollagen-Netzwerk ist unentbehrlich für die

Diskussion

Übersetzung der individuellen Verkürzung und Wiederausdehnung der Kardiomyozyten in die Pumpfunktion des Herzmuskels (Manabe et al., 2002). Die Kollagensynthese kann von verschiedenen Faktoren induziert werden, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren wie TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), Angiotensin II, IGF-1, sowie mechanischem Stress (Pauschinger et al., 2002). Bekannt ist, dass chronische β -adrenerge Stimulation zu einer vermehrten Induktion dieser Faktoren führt (Molodtsov et al., 2010; Nagano et al., 1992; Suzuki et al., 1999; Takahashi et al., 1994). Dadurch kommt es u.a. zu einer vermehrten Induktion von MAP-Kinasen (*Mitogen-activated protein kinases*), welche über Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren u.a. die Expression von Komponenten der EZM steuern und dabei maßgeblich an einer Proliferation der Fibroblasten beteiligt sind (Bogoyevitch et al., 1996; Zou et al., 2001). So konnte durch Inhibition der MAP-Kinase p38 α sowohl die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie-Entwicklung als auch die Expression fibrotischer Gene wie Kollagen I, II und Fibronectin signifikant reduziert werden (Li et al., 2004).

Interessanterweise wird Ask1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), eine MAPKKK upstream von p38 und JNK durch Akt gehemmt (Ichijo et al., 1997; Kim et al., 2001). Weiterhin ist Akt an der Regulation des RAF-MEK-ERK-Signalwegs beteiligt, indem es RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) direkt an Ser 259 phosphoryliert, wodurch es zur Bindung des Proteins 14-3-3 kommt, einem negativen Regulator der RAF-Aktivität (Zimmermann and Moelling, 1999).

In diesem Kontext könnte sich das Fehlen der Akt1-Isoform in Fibroblasten hinsichtlich einer negativen Regulation der MAP-Kinase-Aktivität und damit der Expression profibrotischer Gene unter chronischer β -adrenerger Stimulation bemerkbar machen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Akt1 eine entscheidende Rolle in der Ausprägung eines stress-induzierten kardialen Remodelings durch Fibroblasten spielt, was in dieser Form bisher nicht bekannt war. Eine interessante Option, diese Erkenntnisse zu vertiefen, wäre die Analyse eines Fibroblasten-spezifischen Akt1 *knockouts* im Herzen unter basalen Bedingungen und chronischer β -adrenerger Stimulation.

Ein weiterer interessanter Effekt war, dass bei den ICM KO1-Mäusen die systolische Pumpfunktion nach 14-tägiger Applikation von Isoproterenol ähnlich stark abnahm wie bei den ubiquitären Akt1 KO's. Das impliziert, dass sich die Akt1-Deletion in Kardiomyozyten wesentlich auf die Kontraktilität auswirkt. Besonders die in dieser Arbeit mittels TAP/MS-Analyse identifizierte ATP-Synthase als Akt1- Interaktionspartner könnte einen Ansatzpunkt

Diskussion

liefern, welcher die verminderte Kontraktionskraft als Folge einer ATP-Schuld erklären könnte.

Ein weiterer sehr interessanter potentieller Bindungspartner von Akt1 der im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde war Myosin-bindendes Protein C (MyBP-C). Dieses Protein ist an der Bildung der Querbrücken zwischen Actin und Myosin des kontraktilen Apparates beteiligt und hat somit einen Einfluss auf die Kraftentwicklung der Kontraktion (Stelzer et al., 2006). Die MyBP-C Aktivität wird durch zahlreiche Kinasen wie GSK3 β , PKA und PKC reguliert. Der Grad der Phosphorylierung scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von MyBP-C zu haben, denn eine verminderte Phosphorylierung korreliert mit einem Verlust der Pumpfunktion des Herzmuskels und Ausbildung einer Herzinsuffizienz (El-Armouche et al., 2007; Kuster et al., 2013; Mohamed et al., 1998). Phosphoproteom-Analysen von (*heart like*) HL -1 Zellen in unserem Institut haben gezeigt, dass MyBP-C Akt-abhängig phosphoryliert wird. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Regulation der MyBP-C-Aktivität durch Akt (Reinartz et al., 2014; Paper in Revision).

Im Hinblick auf das Modell des ubiquitären Akt *knockouts* können Effekte einer entwicklungspezifischen Akt-Deletion in diesem Versuchsansatz nicht außer Acht gelassen werden. So spielt der PI3K/Akt-Signalweg eine wichtige Rolle bei der geregelten Entwicklung des Herzens. Beispielsweise wurden bei Akt1 KO-Mäusen Defekte des interventrikulären Septums gefunden (Chang et al., 2010). In den echokardiographischen Untersuchungen der in dieser Arbeit genutzten KO-Mäuse, konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. Um entwicklungspezifische Auswirkungen der Akt-Deletion auszuschließen, müssten induzierbare ubiquitäre Akt1-KO Mausmodelle etabliert und unter gleichen Bedingungen untersucht werden wie die ubiquitären Akt1 KO Mäuse.

Weiterhin ist die Isoproterenol-induzierte β -adrenerge Stimulation nicht nur isoliert auf das Herz anzusehen, sondern muss im Kontext des gesamten Organsystems betrachtet werden. So bewirkt Isoproterenol ebenfalls in Lunge, glatter Gefäßmuskulatur und Niere über Stimulation von β_2 -Adrenorezeptoren die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II, welche wiederum parakrin die Herzfunktion beeinflussen können.

5 Zusammenfassung

Die Serin/Threonin Kinase Akt oder Proteinkinase B (PKB) ist ein zentraler Mediator von Proliferation, Wachstum, Überleben und Metabolismus der Zelle. Die Aktivierung der Kinase erfolgt über den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg nach Bindung entsprechender Liganden an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren. In Säugern existieren drei Isoformen der Akt, welche trotz einer hohen Sequenzhomologie unterschiedliche Funktionen besitzen. Im Herzen werden vornehmlich Akt1 und Akt2 exprimiert. Allerdings existieren bisher kaum Daten darüber, wie die Akt-Isoformen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen die Signaltransduktion des Herzens modulieren. Diskutiert wird hier unter anderem die Interaktion mit isoformspezifischen Substraten.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, Akt-assoziierte Proteinkomplexe mittels einer Kombination aus Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP) und quantitativer Massenspektrometrie (qMS) zunächst in HEK293T Zellen und nach Etablierung der Methode *in vivo* im Mausherzen zu untersuchen. Dazu wurden zwei transgene Mauslinien etabliert, welche zusätzlich zur endogenen Akt-Isoform ein Akt1- bzw. Akt2 N-TAG Fusionsprotein für die TAP spezifisch in Kardiomyozyten exprimierten. Da nur geringe Proteinspiegel von Akt2 N-TAG im Herzen vorlagen, erfolgte die TAP nur an Akt1 N-TAG Mäusen. So wurden mittels der TAP/qMS-Methode neben bereits bekannten (HSP90), auch neue Akt1-Interaktionspartner wie ATP-Synthase, Phgdh (D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase), Myosin-bindendes Protein C, Serca und Glutathionperoxidase 1 identifiziert. Unter diesen wurden ATP-Synthase und Phgdh mit PLA (*Proximity Ligation Assay*) verifiziert. Die quantitative MS-Analyse zeigte, dass Akt1 überwiegend transiente Interaktionen eingeht.

In weiteren Untersuchungen wurden die Folgen der Akt1 N-TAG Überexpression echokardiographisch und histologisch in Mäusen unterschiedlicher Altersstufen untersucht. Dabei zeigte sich bei den transgenen Akt1 N-TAG Mäusen im Alter von neun Monaten eine milde Hypertrophie ohne interstitielle Fibrosierung, welche allerdings nicht mit einer vermehrten Kapillarbildung einherging, was womöglich Ursache einer eingeschränkten Pumpfunktion dieser Herzen war.

In einem weiteren Ansatz wurden die funktionellen Konsequenzen einer Deletion der Akt1- bzw. der Akt2-Isoform im Herzen unter Isoproterenol-induziertem β -adrenergem Stress in ubiquitären Akt1 *knockout* (KO1) bzw. Akt2 (KO2)-Mäusen, sowie in induzierbaren kardiomyozytenspezifischen Akt1 KO-Mäusen (ICM KO1) mittels Echokardiographie, Strain-Analyse und Histologie untersucht. Dabei führte in beiden KO-Modellen nur das Fehlen der Akt1-Isoform zu einer signifikanten Einschränkung der kardialen Pumpfunktion. Allerdings entwickelten nur KO1-Mäuse in diesem Kontext ein maladaptives kardiales Remodeling.

Schlussfolgerung: Mittels TAP/qMS können Akt1-assoziierte Proteine sowohl im Zellkultur-basierten Ansatz, als auch *in vivo* im Herzen identifiziert werden. Die Überexpression von Akt1 N-TAG induziert auch nach langfristiger Expression nur einen milden kardialen Phänotyp, weiterhin führt die Deletion von Akt1, nicht aber Akt2 unter β -adrenergem Stress zu maladaptiven Folgen für das Herz hinsichtlich systolischer Pumpfunktion und Remodeling. Inwieweit die hier erstmalig identifizierten Interaktionspartner von Akt1 an der kardialen Dysfunktion beteiligt sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6 Summary

The serine/threonine kinase Akt or protein kinase B (PKB) is a central mediator of proliferation, growth, survival and metabolism of the cell. Akt is activated via the phosphatidylinositol-3-kinase pathway after binding of specific ligands to receptor tyrosine kinases or G protein-coupled receptors. In mammals, three distinct isoforms have been described which share a high degree of sequence homology but exert specific functions. In the heart, Akt1 and Akt2 are the predominantly expressed isoforms. So far, less is known about how these two isoforms modulate cardiac signal transduction pathways under physiological or pathological conditions. Possible mechanisms discussed are interactions of Akt with isoform specific substrates.

Thus, one aim of this work was to analyze Akt-associated proteins by combining tandem affinity purification (TAP) and quantitative mass spectrometry (qMS) in HEK293T cells and after establishment of the method *in vivo* in transgenic mouse hearts. Therefore, two transgenic mouse lines were established, that express recombinant Akt1- or Akt2 N-TAG proteins in cardiomyocytes in addition to the endogenous Akt isoform. Due to low protein levels of Akt2 N-TAG in the heart, TAP experiments were only performed with Akt1 N-TAG mice. TAP/qMS-analysis revealed besides already known interaction partners (HSP90), also new Akt1 interacting proteins like ATP-Synthase, Phgdh (d-3-phosphoglycerate dehydrogenase), myosin-binding protein C, Serca and glutathione peroxidase 1. Among these ATP synthase and Phgdh were verified successfully by PLA (*Proximity Ligation Assay*). Quantitative MS-analysis showed that Akt1 predominantly forms transient interactions with its substrates.

In further experiments the consequences of Akt1 N-TAG overexpression were analyzed by echocardiography and histology in mice of different age. Transgenic mice at nine month of age developed a mild hypertrophy without fibrosis. However, myocardial capillary density was decreased, which may explain reduced contraction in the hearts of Akt N-TAG mice.

Furthermore, functional consequences for the heart due to Akt1 or Akt2 deletion were investigated in an isoproterenol induced β -adrenergic cardiac stress model in constitutive Akt1 *knockout* (KO1) and Akt2 (KO2) mice, respectively. In addition inducible cardiomyocyte specific Akt1 KO mice (ICM KO1) were used. Deletion of Akt1 caused a significant reduction in cardiac systolic function both in KO1 and ICM KO1 mice. Akt2 KO mice were not affected. However, only KO1 mice developed a maladaptive cardiac remodeling.

Conclusion: TAP/qMS is a potent tool to identify Akt1 associated proteins in cell culture as well as *in vivo* in mouse hearts. Even long term overexpression of Akt1 N-TAG in the heart induced only a mild cardiac phenotype, whereas deletion of Akt1 but not Akt2 in the heart had maladaptive consequences during induced β -adrenergic stress concerning systolic function and cardiac remodeling. To what extend the novel Akt1 interaction partners may contribute to that phenotype remains to be elucidated.

7 Literaturverzeichnis

- Aikawa, R., Nawano, M., Gu, Y., Katagiri, H., Asano, T., Zhu, W., Nagai, R., and Komuro, I. (2000). Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102, 2873-2879.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* 399, 333-338.
- Angrand, P.O., Segura, I., Volkel, P., Ghidelli, S., Terry, R., Brajenovic, M., Vintersten, K., Klein, R., Superti-Furga, G., Drewes, G., *et al.* (2006). Transgenic mouse proteomics identifies new 14-3-3-associated proteins involved in cytoskeletal rearrangements and cell signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 2211-2227.
- Antos, C.L., McKinsey, T.A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002). Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 907-912.
- Bae, S., and Zhang, L. (2005). Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 1125-1135.
- Balaban, R.S., Kantor, H.L., Katz, L.A., and Briggs, R.W. (1986). Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science* 232, 1121-1123.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tsihchlis, P., and Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *The Journal of biological chemistry* 277, 39858-39866.
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsihchlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313-325.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsihchlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- Berwick, D.C., Hers, I., Heesom, K.J., Moule, S.K., and Tavare, J.M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 277, 33895-33900.

- Bishopric, N.H., and Kedes, L. (1991). Adrenergic regulation of the skeletal alpha-actin gene promoter during myocardial cell hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 2132-2136.
- Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature protocols* 4, 484-494.
- Bogoyevitch, M.A., Andersson, M.B., Gillespie-Brown, J., Clerk, A., Glennon, P.E., Fuller, S.J., and Sugden, P.H. (1996). Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *The Biochemical journal* 314 (Pt 1), 115-121.
- Boluyt, M.O., Long, X., Eschenhagen, T., Mende, U., Schmitz, W., Crow, M.T., and Lakatta, E.G. (1995). Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *The American journal of physiology* 269, H638-647.
- Bottermann K. (2013); Identifizierung von α -Enolase und Elongationsfaktor 2 als neue Akt2 Bindungspartner, Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
- Bottermann, K., Reinartz, M., Barsoum, M., Kotter, S., and Godecke, A. (2013). Systematic Analysis Reveals Elongation Factor 2 and alpha-Enolase as Novel Interaction Partners of AKT2. *PloS one* 8, e66045.
- Bouzakri, K., Zachrisson, A., Al-Khalili, L., Zhang, B.B., Koistinen, H.A., Krook, A., and Zierath, J.R. (2006). siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell metabolism* 4, 89-96.
- Brazil, D.P., Park, J., and Hemmings, B.A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111, 293-303.
- Broach, J.R., and Hicks, J.B. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* 21, 501-508.
- Brower, G.L., Gardner, J.D., Forman, M.F., Murray, D.B., Voloshenyuk, T., Levick, S.P., and Janicki, J.S. (2006). The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 30, 604-610.
- Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J., and Pilch, P.F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry* 273, 7201-7204.
- Caporali, A., Sala-Newby, G.B., Meloni, M., Graiani, G., Pani, E., Cristofaro, B., Newby, A.C., Madeddu, P., and Emanuelli, C. (2008). Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell death and differentiation* 15, 299-311.

- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Catalucci, D., Latronico, M.V., Ceci, M., Rusconi, F., Young, H.S., Gallo, P., Santonastasi, M., Bellacosa, A., Brown, J.H., and Condorelli, G. (2009). Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17. *The Journal of biological chemistry* 284, 28180-28187.
- Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J., and Schmitz-Peiffer, C. (2001). A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50, 2210-2218.
- Chang, Z., Zhang, Q., Feng, Q., Xu, J., Teng, T., Luan, Q., Shan, C., Hu, Y., Hemmings, B.A., Gao, X., *et al.* (2010). Deletion of Akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation. *Developmental biology* 347, 384-391.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and 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., and Birnbaum, M.J. (2001b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276, 38349-38352.
- Coffer, P.J., and 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. *European journal of biochemistry / FEBS* 201, 475-481.
- Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M.A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C., *et al.* (2002). Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12333-12338.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* 26, 1367-1372.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Dandel, M., Lehmkuhl, H., Knosalla, C., Suram lashvili, N., and Hetzer, R. (2009). Strain and strain rate imaging by echocardiography - basic concepts and clinical applicability. *Current cardiology reviews* 5, 133-148.
- Du, K., and Tsichlis, P.N. (2005). Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* 24, 7401-7409.

- Dufner, A., and Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental cell research* 253, 100-109.
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S., and Hemmings, B.A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* 26, 8042-8051.
- El-Armouche, A., Pohlmann, L., Schlossarek, S., Starbatty, J., Yeh, Y.H., Nattel, S., Dobrev, D., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2007). Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43, 223-229.
- Fernandez, E., Collins, M.O., Uren, R.T., Kopanitsa, M.V., Komiyama, N.H., Croning, M.D., Zografos, L., Armstrong, J.D., Choudhary, J.S., and Grant, S.G. (2009). Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins. *Molecular systems biology* 5, 269.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* 16, 1472-1487.
- Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circulation research* 90, 866-873.
- Forler, D., Kocher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E., and Wilm, M. (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature biotechnology* 21, 89-92.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* 18, 13-24.
- Gao, T., and Newton, A.C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 277, 31585-31592.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* 112, 197-208.
- Georgakis, G.V., Li, Y., and Younes, A. (2006). The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting

- cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. *British journal of haematology* 135, 68-71.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., and Mische, S.M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605.
- Gingras, A.C., Aebersold, R., and Raught, B. (2005). Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *The Journal of physiology* 563, 11-21.
- Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle* 8, 2502-2508.
- Goodwin, G.W., Arteaga, J.R., and Taegtmeier, H. (1995). Glycogen turnover in the isolated working rat heart. *The Journal of biological chemistry* 270, 9234-9240.
- Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J., and Robbins, J. (1991). Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *The Journal of biological chemistry* 266, 9180-9185.
- Hanada, M., Feng, J., and Hemmings, B.A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et biophysica acta* 1697, 3-16.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 576-596.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* 273, 14484-14494.
- Heineke, J., and Molkenin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 589-600.
- Heineman, F.W., and Balaban, R.S. (1990). Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Annual review of physiology* 52, 523-542.
- Heron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *Journal of cellular physiology* 214, 158-165.
- Hiestler, A. (2013), Proteininteraktionen der Proteinkinase AKT1, Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,
- Huang, J.P., Huang, S.S., Deng, J.Y., and Hung, L.M. (2009). Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic rats. *Journal of biomedical science* 16, 77.

- Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J., and Abraham, R.T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and cellular biology* 22, 7004-7014.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Jalil, J.E., Janicki, J.S., Pick, R., Abrahams, C., and Weber, K.T. (1989). Fibrosis-induced reduction of endomyocardium in the rat after isoproterenol treatment. *Circulation research* 65, 258-264.
- Jonassen, A.K., Sack, M.N., Mjos, O.D., and Yellon, D.M. (2001). Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circulation research* 89, 1191-1198.
- Kane, S., Sano, H., Liu, S.C., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., and 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. *The Journal of biological chemistry* 277, 22115-22118.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M.D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 615-675.
- Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., and Chao, M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology* 21, 893-901.
- Kim, Y.K., Kim, S.J., Yatani, A., Huang, Y., Castelli, G., Vatner, D.E., Liu, J., Zhang, Q., Diaz, G., Zieba, R., *et al.* (2003). Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt. *The Journal of biological chemistry* 278, 47622-47628.
- Klomp, L.W., de Koning, T.J., Malingre, H.E., van Beurden, E.A., Brink, M., Opdam, F.L., Duran, M., Jaeken, J., Pineda, M., Van Maldergem, L., *et al.* (2000). Molecular characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency--a neurometabolic disorder associated with reduced L-serine biosynthesis. *American journal of human genetics* 67, 1389-1399.
- Krestel, H.E., Mayford, M., Seeburg, P.H., and Sprengel, R. (2001). A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic acids research* 29, E39.

Literaturverzeichnis

- Kudej, R.K., Iwase, M., Uechi, M., Vatner, D.E., Oka, N., Ishikawa, Y., Shannon, R.P., Bishop, S.P., and Vatner, S.F. (1997). Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 2735-2746.
- Kuster, D.W., Sequeira, V., Najafi, A., Boontje, N.M., Wijnker, P.J., Witjas-Paalberends, E.R., Marston, S.B., Dos Remedios, C.G., Carrier, L., Demmers, J.A., *et al.* (2013). GSK3beta phosphorylates newly identified site in the proline-alanine-rich region of cardiac myosin-binding protein C and alters cross-bridge cycling kinetics in human: short communication. *Circulation research* 112, 633-639.
- Li, Y. (2011). The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnology letters* 33, 1487-1499.
- Li, Z., Tran, T.T., Ma, J.Y., O'Young, G., Kapoun, A.M., Chakravarty, S., Dugar, S., Schreiner, G., and Protter, A.A. (2004). p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and reduces myocardial damage in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 44, 486-492.
- Liao, Y., and Hung, M.C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American journal of translational research* 2, 19-42.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., *et al.* (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature genetics* 43, 869-874.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews* 90, 207-258.
- Manabe, I., Shindo, T., and Nagai, R. (2002). Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circulation research* 91, 1103-1113.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marshall, R.C., Nash, W.W., Shine, K.I., Phelps, M.E., and Ricchiuti, N. (1981). Glucose metabolism during ischemia due to excessive oxygen demand or altered coronary flow in the isolated arterially perfused rabbit septum. *Circulation research* 49, 640-648.
- Matsui, T., Li, L., Wu, J.C., Cook, S.A., Nagoshi, T., Picard, M.H., Liao, R., and Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *The Journal of biological chemistry* 277, 22896-22901.
- McMullen, J.R., Sherwood, M.C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A.L., Shioi, T., and Izumo, S. (2004). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* 109, 3050-3055.

- McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., and Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 12355-12360.
- Misra, U.K., Deedwania, R., and Pizzo, S.V. (2006). Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *The Journal of biological chemistry* *281*, 13694-13707.
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *Journal of virology* *72*, 8873-8883.
- Mohamed, A.S., Dignam, J.D., and Schlender, K.K. (1998). Cardiac myosin-binding protein C (MyBP-C): identification of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *Archives of biochemistry and biophysics* *358*, 313-319.
- Molkentin, J.D., and Dorn, G.W., 2nd (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology* *63*, 391-426.
- Molожavyi, A., Lindecke, A., Raupach, A., Moellendorf, S., Kohrer, K., and Godecke, A. (2010). Myoglobin-deficient mice activate a distinct cardiac gene expression program in response to isoproterenol-induced hypertrophy. *Physiological genomics* *41*, 137-145.
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S.E., Lee, Y., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2001). Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* *276*, 28586-28597.
- Naga Prasad, S.V., Esposito, G., Mao, L., Koch, W.J., and Rockman, H.A. (2000). Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* *275*, 4693-4698.
- Nagano, M., Higaki, J., Nakamura, F., Higashimori, K., Nagano, N., Mikami, H., and Ogihara, T. (1992). Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* *19*, 708-712.
- Naguib, M. Protein-Protein-Interaktion des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, mit dem zytoplasmatischen β -Aktin. (2009) Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* *108*, 193-199.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics* : *MCP* *1*, 376-386.

- Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 9, 667-676.
- Parisi, A.F., Moynihan, P.F., Feldman, C.L., and Folland, E.D. (1979). Approaches to determination of left ventricular volume and ejection fraction by real-time two-dimensional echocardiography. *Clinical cardiology* 2, 257-263.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., *et al.* (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387.
- Pauschinger, M., Chandrasekharan, K., Li, J., Schwimbeck, P.L., Noutsias, M., and Schultheiss, H.P. (2002). [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 27, 677-682.
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., *et al.* (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development* 17, 1352-1365.
- Perk, G., Tunick, P.A., and Kronzon, I. (2007). Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography--from technical considerations to clinical applications. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 20, 234-243.
- Peterson, R.T., and Schreiber, S.L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Current biology : CB* 9, R521-524.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *Journal of virology* 73, 2613-2621.
- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., *et al.* (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346-350.
- Powers, M.V., and Workman, P. (2006). Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrine-related cancer* 13 Suppl 1, S125-135.
- Puchtler, H., Waldrop, F.S., and Valentine, L.S. (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitrage zur Pathologie* 150, 174-187.

- Ram, R., Mickelsen, D.M., Theodoropoulos, C., and Blaxall, B.C. (2011). New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301, H1765-1780.
- Raupach, A. (2010). Isoform-Spezifische Funktionen Der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Reinartz M., Raupach A., Kaisers W., Gödecke A., (2014). Akt1 and Akt2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes. Paper in Revision
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030-1032.
- Rockman, H.A., Koch, W.J., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415, 206-212.
- Saddik, M., and Lopaschuk, G.D. (1991). Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *The Journal of biological chemistry* 266, 8162-8170.
- Sambrook, J. u. D. R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. Auflage, Bde. 1-3. New York, USA [Coldspring Harbor Laboratory Press]. 2001.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 278, 14599-14602.
- Santi, S.A., and Lee, H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American journal of physiology Cell physiology* 298, C580-591.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10832-10837.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5166-5170.
- Sayano, T., Kawakami, Y., Kusada, W., Suzuki, T., Kawano, Y., Watanabe, A., Takashima, K., Arimoto, Y., Esaki, K., Wada, A., *et al.* (2013). L-serine deficiency caused by genetic Phgdh deletion leads to robust induction of 4E-BP1 and subsequent repression of translation initiation in the developing central nervous system. *The FEBS journal* 280, 1502-1517.

- Schiekofer, S., Shiojima, I., Sato, K., Galasso, G., Oshima, Y., and Walsh, K. (2006). Microarray analysis of Akt1 activation in transgenic mouse hearts reveals transcript expression profiles associated with compensatory hypertrophy and failure. *Physiological genomics* 27, 156-170.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68, 850-858.
- Shioi, T., McMullen, J.R., Kang, P.M., Douglas, P.S., Obata, T., Franke, T.F., Cantley, L.C., and Izumo, S. (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 22, 2799-2809.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., and Walsh, K. (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation* 115, 2108-2118.
- Shiraishi, I., Melendez, J., Ahn, Y., Skavdahl, M., Murphy, E., Welch, S., Schaefer, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Torella, D., *et al.* (2004). Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circulation research* 94, 884-891.
- Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G., *et al.* (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature methods* 3, 995-1000.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
- Stelzer, J.E., Fitzsimons, D.P., and Moss, R.L. (2006). Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium. *Biophysical journal* 90, 4119-4127.
- Stryer Biochemie; Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 7. Auflage; Springer Spektrum Verlag Berlin Heidelberg 2013
- Subramaniam, A., Jones, W.K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., and Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 266, 24613-24620.
- Sussman, M.A., Volkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C.T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., *et al.* (2011). Myocardial AKT: the omnipresent nexus. In *Physiological reviews*, pp. 1023-1070.
- Suzuki, J., Ohno, I., Nawata, J., Miura, S., Ikeda, J., and Shirato, K. (1999). Overexpression of insulin-like growth factor-I in hearts of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Journal of cardiovascular pharmacology* 34, 635-644.

- Takahashi, N., Calderone, A., Izzo, N.J., Jr., Maki, T.M., Marsh, J.D., and Colucci, W.S. (1994). Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *The Journal of clinical investigation* *94*, 1470-1476.
- Takasaki, C., Miura, E., and Watanabe, M. (2007). Segmental and complementary expression of L-serine biosynthetic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase and neutral amino acid transporter ASCT1 in the mouse kidney. *Biomedical research* *28*, 61-69.
- Theodoraki, M.A., Kunjappu, M., Sternberg, D.W., and Caplan, A.J. (2007). Akt shows variable sensitivity to an Hsp90 inhibitor depending on cell context. *Experimental cell research* *313*, 3851-3858.
- Thum, T., and Borlak, J. (2002). Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *16*, 1537-1549.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and 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.
- Tsujita, Y., Muraski, J., Shiraishi, I., Kato, T., Kajstura, J., Anversa, P., and Sussman, M.A. (2006). Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11946-11951.
- Tulchin, N., Ornstein, L., and Davis, B.J. (1976). A microgel system for disc electrophoresis. *Analytical biochemistry* *72*, 485-490.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C.P., McManus, M., Sharp, P.A., Van Parijs, L., Jaenisch, R., and Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 10380-10385.
- von Lewinski, D., Voss, K., Hulsmann, S., Kogler, H., and Pieske, B. (2003). Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation research* *92*, 169-176.
- Welsh, G.I., Miller, C.M., Loughlin, A.J., Price, N.T., and Proud, C.G. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS letters* *421*, 125-130.
- Yamasaki, M., Yamada, K., Furuya, S., Mitoma, J., Hirabayashi, Y., and Watanabe, M. (2001). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *21*, 7691-7704.

- Yang, J.H., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, M.O., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., *et al.* (2010). Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *The Journal of biological chemistry* 285, 41380-41390.
- Yang, J.Y., Deng, W., Chen, Y., Fan, W., Baldwin, K.M., Jope, R.S., Wallace, D.C., and Wang, P.H. (2013). Impaired translocation and activation of mitochondrial Akt1 mitigated mitochondrial oxidative phosphorylation Complex V activity in diabetic myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 59, 167-175.
- Yang, J.Y., Yeh, H.Y., Lin, K., and Wang, P.H. (2009). Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 919-926.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dummler, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society transactions* 32, 350-354.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dummler, B., Wahli, W., and Hemmings, B.A. (2005). Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* 25, 10407-10418.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., and Hemmings, B.A. (2003). Protein kinase B α /Akt1 regulates placental development and fetal growth. *The Journal of biological chemistry* 278, 32124-32131.
- Zhou, D., Ren, J.X., Ryan, T.M., Higgins, N.P., and Townes, T.M. (2004). Rapid tagging of endogenous mouse genes by recombineering and ES cell complementation of tetraploid blastocysts. *Nucleic acids research* 32, e128.
- Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741-1744.
- Zou, Y., Yao, A., Zhu, W., Kudoh, S., Hiroi, Y., Shimoyama, M., Uozumi, H., Kohmoto, O., Takahashi, T., Shibasaki, F., *et al.* (2001). Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 104, 102-108.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
a.E.	arbiträre Einheiten
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
B-Mode	<i>Brightness Mode</i>
BGH pA	Polyadenylierungssignal des <i>bovine growth hormone</i>
bla	β -Lactamase Promotor
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Serumalbumin vom Rind
bzw.	beziehungsweise
env	<i>envelope</i> (Hüllprotein)
c	centi-
CT	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwert Zyklus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
13CD2O	¹³ C markiertes deuteriertes Formaldehyd
CH2O	Formaldehyd
CMV	Cytomegalovirus-Promotor
Cre	<i>causes recombination</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EDV	enddiastolisches Volumen
ESV	endsystolisches Volumen
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FBS	(<i>fetal bovine serum</i>); fötales Rinderserum

Abkürzungsverzeichnis

FRT	<i>Flp recognition target</i>
g	Gramm
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogensynthase Kinase
h	<i>hour</i> , Stunde
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HL-1	<i>heart like</i> Zelllinie
HM	hydrophobes Motiv
Hprt 1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSP	<i>heat shock protein</i>
HZV	Herzzeitvolumen
ICM KO	induzierbarer kardiomyozytenspezifischer <i>knockout</i>
IGF-1	insulin-like growth factor
i.p.	Intraperitoneal
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
k	kilo-
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
loxP	locus of crossing over
LV	linker Ventrikel, linksventrikulär
LVAW	linksventrikuläre anteriore Wand
LVPW	linksventrikuläre posteriore Wand
μ	micro-
m	milli-, Meter
M	molar
mer	mutagenisierter Östrogenrezeptor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosin
M-Mode	<i>Motion Mode</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

Abkürzungsverzeichnis

mTORC	mTOR Komplex
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n	nano-
NaBH ₃ CN	Cyanoborhydrid
NaBD ₃ CN	deutერიertes Cyanoborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
OHTX	4-OH-Tamoxifen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
Phgdh	D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PSLA	parasternale lange Achse
RT-PCR	<i>real-time</i> PCR
REV	<i>regulator of virion expression</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	REV-responsive Element
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SAX	parasternale kurze Achse
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin

Abkürzungsverzeichnis

SV40	Simian virus 40
TBS (TBST)	<i>Tris buffered Saline</i> (mit 0,1 % Tween)
TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
TG	transgen
Thr	Threonin
U	Unit
WB	Western Blot
Zeo	Zeocin

9 Anhang

Tab. 17: Echokardiographische Untersuchungen der Akt N-TAG Mauslinien im Alter von 3, 6 und 9 Monaten.

	3 Monate
LV Masse (mg)	WT 127,0 ± 10,1 mg; TG1 152,8 ± 24,5 mg; TG2 143,1 ± 14,1 mg
Körpergewicht (g)	WT 31,3 ± 1,7 g; TG1 32,7 ± 3,6 g; TG2 30,5 ± 3,2 g
Herzfrequenz (SPM)	WT 435,6 ± 35,3 SPM; TG1 421,5 ± 35,3 SPM; TG2 436 ± 29,8 SPM
EDV (µl)	WT 65,2 ± 5,0 µl; TG1 72,2 ± 6,7 µl; TG2 60,9 ± 5,1 µl
ESV (µl)	WT 22,1 ± 3,7 µl; TG1 27,4 ± 5,1 µl; TG2 20,0 ± 2,9 µl
SV (µl)	WT 43,1 ± 3,9 µl; TG1 44,8 ± 4,4 µl; TG2 41,2 ± 4,2 µl
EF (%)	WT 66,2 ± 4,4 %; TG1 62,2 ± 5,4 %; TG2 68,8 ± 4,0 %
HZV (ml/min)	WT 18,8 ± 2,3 ml/min; TG1 18,9 ± 3,0 ml/min; TG2 18,0 ± 1,1 ml/min
	6 Monate
LV Masse (mg)	WT 141,4 ± 10,1 mg; TG1 173,1 ± 26,6 mg; TG2 157,3 ± 19,4 mg
Körpergewicht (g)	WT 33,4 ± 2,4 g; TG1 36,5 ± 3,6 g; TG2 34,9 ± 3,9 g
Herzfrequenz (SPM)	WT 442,4 ± 20,2 SPM; TG1 438,2 ± 25,5 SPM; TG2 433,1 ± 30,6 SPM
EDV (µl)	WT 69,9 ± 5,0 µl; TG1 74,9 ± 4,9 µl; TG2 63,0 ± 5,7 µl
ESV (µl)	WT 27,1 ± 3,3 µl; TG1 29,5 ± 5,5 µl; TG2 27,0 ± 2,5 µl
SV (µl)	WT 42,8 ± 4,2 µl; TG1 45,4 ± 4,4 µl; TG2 36,0 ± 4,8 µl
EF (%)	WT 61,2 ± 3,8 %; TG1 60,7 ± 6,6 %; TG2 57,0 ± 4,1 %
HZV (ml/min)	WT 18,9 ± 1,5 ml/min; TG1 19,9 ± 2,5 ml/min; TG2 15,6 ± 2,5 ml/min
	9 Monate
LV Masse (mg)	WT 160,8 ± 15,7 mg; TG1: 188,2 ± 30,0 mg TG2 157,0 ± 23,5 mg
Körpergewicht (g)	WT 35,6 ± 3,6 g; TG1 38,1 ± 4,6 g; TG2 38,7 ± 2,1 g
Herzfrequenz (SPM)	WT 425,8 ± 23,9 SPM; TG1 428,1 ± 26,5 SPM; TG2 437,2 ± 46,1 SPM
EDV (µl)	WT 73,1 ± 7,8 µl; TG1 77,1 ± 4,4 µl; TG2 62,2 ± 5,9 µl
ESV (µl)	WT 28,5 ± 5,8 µl; TG1 34,6 ± 5,9; TG2 26,0 ± 5,6 µl
SV (µl)	WT 43,7 ± 5,3 µl; TG1 42,5 ± 4,2 µl; TG2 36,2 ± 3,1 µl
EF (%)	WT 62,2 ± 3,2 %; TG1 56,3 ± 6,6 %; TG2 58,4 ± 5,9 %
HZV (ml/min)	WT 19,6 ± 2,5 ml/min; TG1 18,7 ± 2,5 ml/min; TG2 15,9 ± 2,3 ml/min

Tab. 18: Vermessung der Herzgeometrie TG1 vs. WT

	3 Monate
Länge LV Diastole	WT $6,8 \pm 0,2$ mm; TG1 $7,2 \pm 0,2$ mm
Länge LV Systole	WT $5,7 \pm 0,4$ mm; TG1 $6,0 \pm 0,5$ mm
LVID Diastole	WT $3,9 \pm 0,17$ mm; TG1 $4,1 \pm 0,1$ mm
LVID Systole	WT $2,5 \pm 0,27$ mm; TG1 $2,7 \pm 0,2$ mm
IVS Diastole	WT $1,05 \pm 0,01$ mm; TG1 $1,08 \pm 0,08$ mm
IVS Systole	WT $1,54 \pm 0,11$ mm; TG1 $1,54 \pm 0,08$ mm
	6 Monate
Länge LV Diastole	WT $7,2 \pm 0,3$ mm; TG1 $7,4 \pm 0,1$ mm
Länge LV Systole	WT $6,2 \pm 0,4$ mm; TG1 $6,3 \pm 0,3$ mm;
LVID Diastole	WT $4,0 \pm 0,13$ mm; TG1 $4,2 \pm 0,1$ mm
LVID Systole	WT $2,7 \pm 0,2$ mm; TG1 $2,9 \pm 0,07$ mm
IVS Diastole	WT $1,1 \pm 0,08$ mm; TG1 $1,15 \pm 0,08$ mm
IVS Systole	WT $1,55 \pm 0,15$ mm; TG1 $1,67 \pm 0,16$ mm
	9 Monate
Länge LV Diastole	WT $7,2 \pm 0,1$ mm; TG1 $7,5 \pm 0,2$ mm
Länge LV Systole	WT $6,1 \pm 0,1$ mm; TG1 $6,7 \pm 0,2$ mm
LVID Diastole	WT $4,2 \pm 0,2$ mm; TG1 $4,2 \pm 0,14$ mm
LVID Systole	WT $2,8 \pm 0,3$ mm; TG1 $3,0 \pm 0,3$ mm
IVS Diastole	WT $1,15 \pm 0,09$ mm; TG1 $1,23 \pm 0,15$ mm
IVS Systole	WT $1,57 \pm 0,15$ mm; TG1 $1,71 \pm 0,10$ mm

Tab. 19: Echokardiographische Untersuchungen der ubiquitären Akt KO-Mäuse

	Tag 0
LV Masse (mg)	WT: 132,0 ± 14,2 mg; KO1: 119,6 ± 27,6 mg; KO2: 119,6 ± 6,2 mg
Körpergewicht (g)	WT 32,1 ± 3,2 g; KO1 27,1 ± 3,7 g; KO2 27,0 ± 1,9 g
Herzindex	WT: 4,1 ± 0,4; KO1: 4,3 ± 0,7; KO2: 4,5 ± 0,3
Herzfrequenz (SPM)	WT 476,0 ± 49,1 SPM; KO1 468,1 ± 61,8 SPM; KO2 441,1 ± 36,9 SPM
EDV (µl)	WT 80,3 ± 11,2 µl; KO1 72,6 ± 15,8 µl; KO2 69,4 ± 9,9 µl
ESV (µl)	WT 30,6 ± 8,0 µl; KO1 23,2 ± 6,9 µl; KO2 23,0 ± 4,6 µl
SV (µl)	WT 49,7 ± 8,6 µl; KO1 49,4 ± 10,4 µl; KO2 46,4 ± 5,7 µl
EF (%)	WT 61,9 ± 7,5 %; KO1 67,9 ± 5,3 %; KO2 67,0 ± 2,4 %
HZV (ml/min)	WT 21,1 ± 8,5 ml/min; KO1 23,2 ± 6,7 ml/min; KO2 21,0 ± 2,9 ml/min
	Tag 7
LV Masse (mg)	WT: 180,5 ± 25,5 mg; KO1: 160,9 ± 33,6 mg; KO2: 160,5 ± 16,7 mg
Körpergewicht (g)	WT 33,6 ± 3,3 g; KO1 27,7 ± 2,9 g; KO2 28,4 ± 1,8 g
Herzindex	WT: 5,3 ± 0,5; KO1: 5,7 ± 0,9; KO2: 5,6 ± 0,8
Herzfrequenz (SPM)	WT 583,3 ± 39,7 SPM; KO1 546,0 ± 46,2 SPM; KO2 590,6 ± 47,8 SPM
EDV (µl)	WT 87,5 ± 20,8 µl; KO1 77,7 ± 15,6 µl; KO2 79,1 ± 8,3 µl
ESV (µl)	WT 30,4 ± 14,1 µl; KO1 26,7 ± 12,8 µl; KO2 25,3 ± 6,0 µl
SV (µl)	WT 57,1 ± 10,3 µl; KO1 51,0 ± 10,9 µl; KO2 53,8 ± 9,0 µl
EF (%)	WT 65,8 ± 9,2 %; KO1 65,1 ± 10,8 %; KO2 67,8 ± 7,7 %
HZV (ml/min)	WT 33,3 ± 6,5 ml/min; KO1 26,9 ± 6,4 ml/min; KO2 31,4 ± 3,8 ml/min
	Tag 14
LV Masse (mg)	WT: 174,5 ± 28,9 mg; KO1: 160,5 ± 29,3 mg; KO2: 164,2 ± 16,9 mg
Körpergewicht (g)	WT 34,0 ± 3,5 g; KO1 28,1 ± 2,8 g; KO2 29,0 ± 2,2 g
Herzindex	WT: 5,1 ± 0,6; KO1: 5,9 ± 0,6; KO2: 5,6 ± 0,8
Herzfrequenz (SPM)	WT 560,2 ± 34,3 SPM; KO1 544,0 ± 40,8 SPM; KO2 568,8 ± 35,6 SPM
EDV (µl)	WT 97,3 ± 23,2 µl; KO1 82,9 ± 15,4 µl; KO2 90,7 ± 9,8 µl
ESV (µl)	WT 35,3 ± 16,4 µl; KO1 32,4 ± 14,8 µl; KO2 29,0 ± 6,8 µl
SV (µl)	WT 62,0 ± 11,1 µl; KO1 50,5 ± 13,4 µl; KO2 61,7 ± 12,2 µl
EF (%)	WT 65,3 ± 11,1 %; KO1 60,7 ± 14,0 %; KO2 67,9 ± 8,9 %
HZV (ml/min)	WT 35,0 ± 5,9 ml/min; KO1 26,7 ± 6,9 ml/min; KO2 34,9 ± 35,0 ml/min

Tab. 20: radiale Strain-Analyse von WT und KO1; basal und an Tag 14

	Tag 0	Tag 14
PB	WT 27,06 ± 15,1 %; KO1 30,2 ± 7,6 %	WT 25,2 ± 12,5 %; KO1 31,5 ± 17,9 %
PM	WT 28,7 ± 7,9 %; KO1 32,7 ± 7,8 %	WT 29,1 ± 11,1 %; KO1 28,4 ± 11,3 %
PA	WT 23,1 ± 13,1 %; KO1 23,6 ± 9,2 %	WT 20,5 ± 8,2 %; KO1 14,0 ± 11,9 %;
AB	WT 23,1 ± 7,0 %; KO1 30,9 ± 10,5 %	WT 34,6 ± 9,5 %; KO1 24,8 ± 15,7 %;
AM	WT 28,2 ± 9,4 %; KO1 30,7 ± 5,3 %	WT 33,7 ± 3,0 %; KO1 26,0 ± 17,1 %;
AA	WT 24,9 ± 14,6 %; KO1 24,1 ± 7,1 %	WT 20,1 ± 6,2 %; KO1: 16,9 ± 12,6 %.

Tab. 21: longitudinale Strain-Analyse von WT und KO1; basal und an Tag 14

	Tag 0	Tag 14
PB	WT -16,8 ± 3,8 %; KO1 -19,3 ± 6,1 %	WT -10,6 ± 6,3 %; KO1 -12,6 ± 3,0 %
PM	WT -15,1 ± 4,4 %; KO1 -20,1 ± 7,1 %	WT -16,1 ± 7,0 %; KO1 -9,9 ± 4,0 %
PA	WT -15,8 ± 5,9 %; KO1 -22,1 ± 5,7 %	WT -16,8 ± 8,0 %; KO1 -13,6 ± 10,0 %
AB	WT -17,0 ± 10,7 %; KO1 -18,4 ± 5,8 %	WT -15,0 ± 4,3 %; KO1 -10,7 ± 6,7 %
AM	WT -13,9 ± 3,6 %; KO1 -18,9 ± 5,5 %	WT -14,3 ± 2,7 %; KO1 -10,6 ± 13,4 %
AA	WT -12,3 ± 6,1 %; KO1 -14,8 ± 8,1 %	WT -14,2 ± 9,2 %; KO1 -11,8 ± 6,2 %

Tab. 22: Echokardiographische Untersuchungen der ICM KO1-Mäuse

	Tag 0
LV Masse (mg)	WT: 127,1 ± 15,6 mg; ICM KO1: 114,0 ± 15,6 mg
Körpergewicht (g)	WT 31,9 ± 2,9 g; ICM KO1 31,1 ± 3,6 g
Herzindex	WT: 4,0 ± 0,2; ICM KO1: 3,7 ± 0,3
Herzfrequenz (SPM)	WT 457,6 ± 72,8 SPM; ICM KO1 508,8 ± 46,6 SPM
EDV (µl)	WT 74,6 ± 11,5 µl; ICM KO1 78,0 ± 18,4 µl
ESV (µl)	WT 30,2 ± 6,1 µl; ICM KO1 32,1 ± 5,6 µl
SV (µl)	WT 44,4 ± 7,4 µl; ICM KO1 45,9 ± 14,0 µl
EF (%)	WT 59,5 ± 3,5 %; ICM KO1 57,1 ± 4,5 %
HZV (ml/min)	WT 20,0 ± 3,2 ml/min; ICM KO1 20,9 ± 2,1 ml/min
	Tag 7
LV Masse (mg)	WT: 169,0 ± 18,6 mg; ICM KO1: 154,8 ± 11,9 mg
Körpergewicht (g)	WT 33,2 ± 2,1 g; ICM KO1 32,7 ± 3,0 g
Herzindex	WT: 5,1 ± 0,6; ICM KO1: 4,7 ± 0,3
Herzfrequenz (SPM)	WT 584,7 ± 36,0 SPM; ICM KO1 599,5 ± 20,6 SPM
EDV (µl)	WT 93,1 ± 10,0 µl; ICM KO1 88,3 ± 10,5 µl
ESV (µl)	WT 31,9 ± 6,0 µl; ICM KO1 39,6 ± 4,0 µl
SV (µl)	WT 61,2 ± 7,0 µl; ICM KO1 48,7 ± 7,8 µl
EF (%)	WT 63,2 ± 6,5 %; ICM KO1 54,9 ± 3,1 %
HZV (ml/min)	WT 34,7 ± 4,6 ml/min; ICM KO1 29,2 ± 4,4 ml/min
	Tag 14
LV Masse (mg)	WT: 165,0 ± 13,7 mg; ICM KO1: 150,1 ± 11,7 mg
Körpergewicht (g)	WT 33,5 ± 2,3 g; ICM KO1 33,3 ± 2,3 g
Herzindex	WT: 4,8 ± 0,4; ICM KO1: 4,6 ± 0,6
Herzfrequenz (SPM)	WT 589,5 ± 12,3 SPM; ICM KO1 607,0 ± 29,4 SPM
EDV (µl)	WT 91,8 ± 13,1 µl; ICM KO1 88,7 ± 9,5 µl
ESV (µl)	WT 29,3 ± 7,9 µl; ICM KO1 39,8 ± 5,5 µl
SV (µl)	WT 62,5 ± 9,3 µl; ICM KO1 48,9 ± 5,2 µl
EF (%)	WT 65,9 ± 7,6 %; ICM KO1 57,7 ± 5,2 %
HZV (ml/min)	WT 35,8 ± 5,7 ml/min; ICM KO1 31,0 ± 3,0 ml/min

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke danke ich ganz herzlich für die Betreuung der Promotion. Du hattest stets ein offenes Ohr für Fragen, und hast dir immer die Zeit genommen, mich durch zahlreiche Anregungen, interessante Diskussionen und aufbauende Worte während meiner Arbeit zu begleiten. Vielen Dank!

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter möchte ich mich für die Begutachtung meiner Doktorarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Michael Reinartz, der mir bei meinen vielen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat!

Weiterhin danke ich dem Team der Herz- und Kreislaufphysiologie für die unermüdliche Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima. Vor allem erwähnt seien hier die besten MTA's Barbara Emde, Susanne Küsters, Julia Albrecht, Barbara Patzer und Mika Holthaus. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Annika Raupach, Dr. Sabine Hamer und Dr. Katharina Bottermann bedanken; jetzt habe ich es auch geschafft! Weiterer Dank gilt Dr. Sarah Möllendorf, Dr. Torben Söker, Dr. André Heinen, Dr. Stefanie Gödecke und Sascha Bestmann. Viele von euch sind mir über die lange Zeit zu Freunden geworden, die ich nicht mehr missen möchte!

Den größten Dank schulde ich meiner Familie: meinen Eltern, sowie Timo, Lara, Max und Karo - ihr seid die Besten! Ohne eure liebevolle, geduldige und unermüdliche Unterstützung wäre ich nicht, wo ich heute bin.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

Unterschrift: